

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791272

研究課題名（和文）

フィーダー細胞表面に存在する上皮分化抑制因子の同定

研究課題名（英文）

Identification of feeder cell surface factor that inhibit epithelial cell differentiation

研究代表者

宮下 英之（MIYASHITA HIDEYUKI）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60424173

研究成果の概要（和文）：

臨床用上皮培養からの異種由来成分排除を目的として、マウス 3T3 細胞表面上の上皮分化抑制因子の同定を試みた。3T3 と、上皮未分化維持能に劣るマウス角膜線維芽細胞の遺伝子発現をマイクロアレイで比較し、候補遺伝子として Dlk1 を得た。しかし、Dlk1 過剰発現および Dlk1 抑制フィーダーは、共に上皮のコロニー形成に顕著な影響は与えなかった。Dlk1 は 3T3 に高発現するものの、上皮の未分化維持とは関連が無いと思われる。

研究成果の概要（英文）：

Fibroblasts, especially mouse cell line 3T3, support clonal growth of epithelial cells via direct cell-cell contact. We compared gene expression profile between 3T3 and less-colony supportive corneal fibroblasts, and found abundant expression of Dlk1 in 3T3. However, overexpression or inhibition of Dlk1 in feeder cells did not affect on the epithelial colony supporting ability. Although Dlk1 is highly expressed in 3T3, Dlk1 may not be related to the feeder layer activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
平成 21 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼発生・再生医学

1 . 研究開始当初の背景

表皮角化細胞や角膜上皮細胞など重層上皮細胞の培養には、マウス繊維芽細胞株 3T3 がフィーダー細胞として用いられてきた (Rheinwald and Green. Cell. 1975 Nov;6(3):331-43)。フィーダー細胞を用いた培養法は、無血清低カルシウム培地を用いフィーダー細胞を用いない培養法に比べ細胞集団倍加数に優れていることから(Fu. et al., Cancer Res. 2003 Nov 15;63(22):7815-24.)、フィーダー細胞は重層上皮細胞を未分化により維持することができると考えられる。しかし近年、3T3 は異種由来のため、臨床目的には同種フィーダー(ヒト細胞)を用いることがより望ましいと考えられるようになった。我々もヒト繊維芽細胞のフィーダーとしての検討を行ったが、ヒトフィーダーは培養上皮シートの重層には十分なものの (Omoto . et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009 May;50(5):2109-15)、角膜輪部上皮のコロニー形成率は 3T3 がより優れていることも明らかになった。我々は複数のヒト細胞あるいはマウス細胞について検討をおこなったが、3T3 のフィーダー細胞としての能力はどの細胞に比べても優れていた。よって、将来ヒト細胞を 3T3 の代替にするのであれば、3T3 がより優れる要因を同定し、これを補う必要があると考えられた。

フィーダー細胞が重層上皮細胞を未分化に維持する機構としては、液性因子を介した機構と、細胞表面との接触を介した機構が双方共に重要であると考えられていた。これは、低密度で播種した上皮細胞のコロニー形成が、フィーダー細胞の培養上清のみ

(Rheinwald, 1975)、あるいはフィーダー細胞の細胞膜のみ(Tseng. et al., Curr Eye Res. 1996 Sep;15(9):973-84.) では維持できないことから示される。このうち液性因子については、表皮が産生する IL1 に応答して繊維芽細胞が KGF を産生し、これが表皮の増殖を刺激する機構 (Smola. et al., J Cell Biol. 1993 Jul;122(2):417-29.)、繊維芽細胞から産生される PTN が表皮の増殖を刺激する機構 (Florin. et al., J Cell Sci. 2005 May 1;118(Pt 9):1981-9.) などが知られているが、細胞表面の上皮未分化維持因子についてはよく知られていなかった。

2 . 研究の目的

我々は予備実験において、3T3 とそれより少し上皮コロニー形成率に劣る角膜実質由来繊維芽細胞との間で cDNA マイクロアレイ解析を行い、3T3 でより多く発現している細胞表面因子として Dlk1 を同定した。Dlk1 は Notch, Delta と類似した構造を持つが、Notch リガンドである Delta の哺乳類ホモログ Dll とは異なり Notch シグナルを抑制する (Baladron. et al., Exp Cell Res. 2005 Feb 15;303(2):343-59.)。一方、重層上皮細胞である表皮角化細胞は Notch シグナルが活性化されると分化する (Rangarajan. et al., EMBO J. 2001 Jul 2;20(13):3427-36.)。これらのことから我々は、3T3 細胞表面に存在する Dlk1 が、Notch シグナルの抑制を介して重層上皮細胞を未分化に維持するとの仮説を立て、これを検証した。

3 . 研究の方法

もし Dlk1 が上皮細胞未分化維持因子である

なら、角膜上皮細胞のコロニー形成率はDlk1を過剰発現させた細胞をフィーダーにすることで増加し、Dlk1をknock outした細胞をフィーダーにすることで減少すると考えられる。

Dlk1過剰発現実験については、Dlk1発現ベクターを作成し、まず角膜実質由来線維芽細胞への導入を試みた。その後、COS7への導入を行った。COS7は上皮であり重層上皮のコロニー形成支持能をまったく示さないため、セルカルチャーインサート内に播種したCOS7をPFA固定して角膜輪部上皮と接触するフィーダー層とし、別に3T3をインサート外に用意して液性因子を供給する系を開発した。

Dlk1-KO実験については、まずNIH/3T3にDlk1に対するshRNAを導入することでのKnock outを試みた。その後、siRNAを用いたKnock outを試みた。siRNAによる阻害実験においては、Dlk1の次にNIH/3T3で発現の高かったNrn1、およびPtnについても検討を行った。24well plateにNIH/3T3を播種し、siRNAを最終濃度25nMでLipofectionにより導入した。翌日マイトマイシンC処理によりNIH/3T3をフィーダー化し、上皮を播種してコロニーが識別できるようにまで培養、上皮コロニー形成率を求めた。

4. 研究成果

(1) はじめに予備実験の段階で、上皮コロニー形成率(以下CFE)に差のあるマウスNIH/3T3(以下3T3)とマウス角膜実質線維芽細胞(以下COPF, 図1A)との発現遺伝子の比較をcDNAマイクロアレイ

を用いて行った。通常用いられるフィーダー細胞と同じく、マイトマイシンC処理した細胞を解凍、播種。上皮用培地に交換し、翌日RNAを調整した。解析にはAffymetrix Mouse Genome 430 2.0 arrayを用い、独立した実験を3回行った。COPFより3T3で有意に発現が上昇している遺伝子のうち、Gene ontologyのCellular componentでPlasma membraneを含む遺伝子だけを抽出した。その結果、図1Bに掲げる遺伝子を候補として抽出できた。次にRT-PCRによる確認を行い(図1C)、3T3に強く発現する遺伝子としてDlk1を同定した。

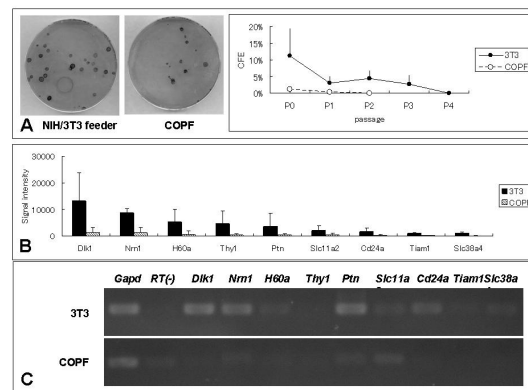


図1:(A) 3T3 および COPF 上でのヒト角膜輪部上皮細胞のCFE。3T3は上皮CFEおよび上皮継代可能回数に優れていた。(B)3T3およびCOPFのcDNAマイクロアレイ解析。細胞表面に関連する遺伝子のうち、上位を示す。(C)上記遺伝子に対するRT-PCR。Dlk1,Nrn1,Ptnなどが3T3でより多く発現していることが確認された。

(2) Dlk1過剰発現実験は以下のとおり行った。RT-PCRでマウスDlk1のほぼ全長を増幅し、pENTR/D-TOPO(Life technologies社)に組み込んだ後に、N末端側がDLK1,C末端側がEGFPである融

合タンパクを CMV プロモータで発現する pcDNA-DEST47 に組み替えた。なお、DLK1 は N 末端側が細胞外に位置する 1 回膜貫通型の膜タンパクである。はじめに COPF への導入を試みたが、導入効率が低かったため、COS7 への導入に切り替えた。COS7 への Dlk1 の導入をウェスタンブロットにて確認後(図 2A)、これをフィーダーとして角膜輪部上皮を播種した。しかし、COS7 上ではコントロール、Dlk1 導入細胞共にまったくコロニー形成が見られなかったため、評価系を二層フィーダー法に切り替えた。具体的には、セルカルチャーインサートを用いて、上層フィーダーを PFA 固定したフィーダー細胞、下層フィーダーを 3T3 フィーダーとし、上層フィーダーに上皮細胞を播種、液性因子は同一条件下で細胞表面の因子の影響のみを比較できるような系を構築した(図 2B)。実際にこの系を用いて、上層フィーダーを用いない場合に比べ、上層に固定した 3T3 フィーダーを用いた場合のほうに上皮 CFE が増加することが確認できた(図 2C、上段)。次にこの系を用いてコントロールベクター導入群と Dlk1 導入群との間で上皮 CFE を比較したが、両群の間に差を見出すことはできなかった。Dlk1 が上皮 CFE に関与しているとは言いがたいが、今後の更なる検討が必要である。

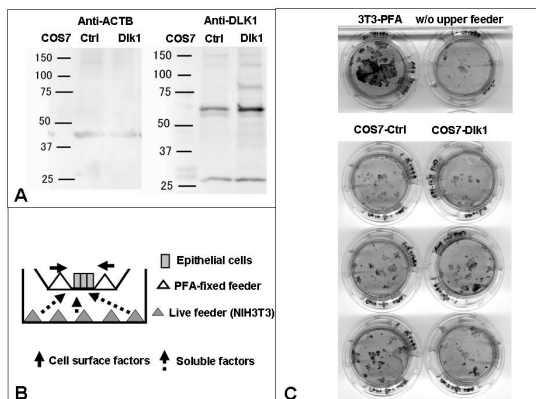


図 2 : (A) Dlk1 発現ベクターを導入後の COS7 をウェスタンブロットにより解析した。GFP 融合 Dlk1 (70-90 kDa) の発現が確認できた。(B) 二層フィーダーを用いた細胞表面因子の評価法。液性因子は下層フィーダーより、細胞表面の因子は上層フィーダーより供給される。COS7 は上皮用培地で分化し角膜上皮のコロニー形成を阻害するが、あらかじめ固定しておくことで角膜上皮に悪影響を与えることなく細胞表面因子のみを供給することができる。(C) 二層フィーダーを用いた Dlk1 が上皮 CFE に与える影響の評価。PFA 固定した 3T3 フィーダーは、フィーダーが無い場合に比べて上皮のコロニー形成を促進した(上段)。一方、Dlk1 の導入は PFA 固定 COS7 上での上皮コロニー形成に影響を与えなかった(下段)

(3) 平行して、Dlk1 の Knock down 実験を行った。はじめ、dlk1 mRNA に対する shRNA(以下 shRNA-dlk1)を 3T3 に導入し、恒久的に Dlk1 shRNA を発現する株を選別、これをフィーダー細胞に用いることを試みた。shRNA-dlk1 を BLOCK-iT Pol II miR RNAi expression vector (Life Technologies)に組み込み、CMV プロモータで EmGFP と shRNA-dlk1 を、SV40 プロモータで Blastocidin 耐性遺伝子を発現するベクターを作成、これを 3T3 にリポフェクションした(図 3A)。Blasticidin で耐性クローンを選別後、ウェスタンブロット(図 3B)) および上皮 CFE の比較(図 3C)を行ったが、Dlk1 タンパクの減少は見られず、また上皮 CFE の有意な変化も一部のク

ローンで減少しているように見えるものの、優位な差は見られなかった。

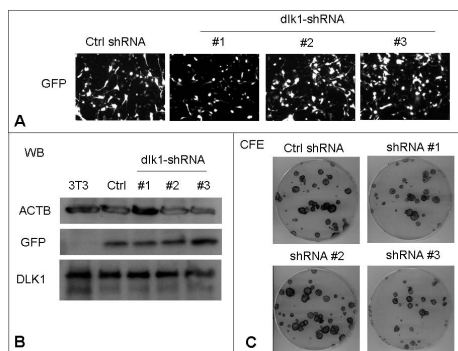


図 3 : (A) リポフェクション 2 日後の 3T3. コントロールの shRNA、または dlk1 の異なる配列に対する shRNA を EGFP とともに発現するベクターを導入し、蛍光顕微鏡で観察した。(B) Blasticidin により選別した細胞に対してウェスタンブロットを行った。GFP の導入は確認できるものの、Dlk1 の発現量には差が見られない。(C) shRNA 導入後選別した 3T3 フィーダー上における、ヒト角膜輪部上皮細胞のコロニー形成。コロニーはホルマリン固定後ローダミン B で染色した。

- (4) 前述の結果を受け、系を siRNA による Knock down 実験に切り替えた。mouse Dlk1 に対するデザイン済み siRNA (Qiagen 社)、およびその他の候補遺伝子として Nrn1、Ptn に対する siRNA を 3T3 にリポフェクションし、標的遺伝子量の変化を定量的 RT-PCR (SYBR Green および ABI 7700, Applied Bioscience) によって確認したところ、それぞれ効果のある siRNA を選別することができた(図 4A)。次に Dlk1、Nrn1、Ptn の Knock down が上皮 CFE に与える影響を、マウス角膜上皮細胞株(図 4B)およびヒト角膜輪部上

皮細胞(図 4C)を用いて検討した。しかしながら、どちらの細胞も siRNA 処理フィーダーによる上皮 CFE の著明な変化を見ることができなかった。これらの結果からは Dlk1 が上皮のコロニー形成率に影響を与えているとはいいがたいが、培養中のフィーダーにおける Dlk1 発現量の回復なども考えられるため、今後の更なる検討が必要である。

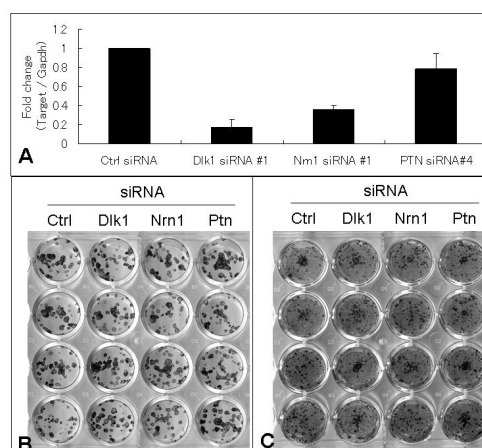


図 4 : (A) siRNA がそれぞれの標的遺伝子に与える効果。定量的 RT-PCR。(B,C) それぞれの遺伝子に対する siRNA で処理した 3T3 を翌日マイトマイシン C 処理し、マウス角膜上皮細胞株 (B) あるいはヒト輪部上皮細胞 (C) を各々 100 または 500 個播種してコロニーが顕著になるまで培養した。上皮細胞はフィーダー除去後にホルマリン固定してエオシン染色 (B) するか、上皮の接着が弱い場合はフィーダーごとホルマリン固定してローダミン B 染色 (C) した。

5 . 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 0 件)

(学会発表)(計 2 件)

宮下英之、榛村重人、坪田一男、フィーダーが無血清培地中のヒト角膜輪部上皮の細胞寿命に与える影響、第34回 角膜カンファランス、2010年2月12日、仙台国際センター

宮下英之、榛村重人、坪田一男、血清代替物を用いたヒト角膜輪部上皮細胞培養、第9回 日本再生医療学会総会、2010年3月18日、広島国際会議場

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮下 英之 (MIYASHITA HIDEYUKI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：60424173

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし