

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591966

研究課題名（和文） ケラチン 12-蛍光タンパク質レポーターを用いた角膜上皮細胞への運命決定機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of the fate determination mechanism to corneal epithelial cells using fluorescent reporter

研究代表者

吉田 悟 (YOSHIDA SATORU)

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号：50398781

研究成果の概要（和文）：K12-DsRed レポーターコンストラクトを作成し、マウス角膜上皮細胞株およびマウス iPS 細胞に導入、染色体に同コンストラクトが組み込まれた安定株を得た。既報にある、バルジ幹細胞を K12 陽性細胞に分化転換する様な活性は、ヒト角膜輪部繊維芽細胞の培養上清中には確認できず、また、K12-DsRed レポーターの発現を促進するような活性も確認できなかった。一方で、マウス iPS 細胞から K12 陽性細胞を誘導することに成功した。しかし、マウス角膜上皮細胞から分離培養した上皮細胞株と同様に K12 陽性の特性を維持したまま培養することは難しく、角膜上皮細胞の特性を誘導・維持するためには、何らかの因子が必要であることが改めて確認できた。

研究成果の概要（英文）：We constructed a K12-DsRed BAC reporter, which express DsRed under the control of Krt12 promoter. The K12-DsRed reporter was introduced into a mouse corneal epithelial cell line, TKE2, and a mouse iPS cell line. An activity that converts bulge stem cells to K12-positive cells in human limbal fibroblast has been reported. However, We could confirm neither such activity nor the activity that promote the expression of K12-DsRed reporter. On the other hand, we successfully induce K12-positive epithelial cells colony from mouse iPS cells. However, as well as in the case of mouse corneal epithelial cell line, the expression of K12 in induced epithelial cells was not maintained. These results suggested that some factors required to be elucidated to induce and maintain the property of corneal epithelial cells such as the expression of K12 and PAX6.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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・角膜上皮細胞・ケラチン 12

1. 研究開始当初の背景

角膜上皮細胞は、表皮細胞と同じく外胚葉由来で体表面に在る上皮細胞であり、重層扁平上皮細胞としてケラチン 14(K14)および p63 の発現など共通する性質も持ち合わせ

ているが、角化しない・K1, K10 を発現しない・PAX6, K12 を発現している、と云う点で、表皮細胞とは大きく異なっている。また、角膜上皮細胞は、結膜上皮細胞と同じく頭部外

胚葉由来で、PAX6 の発現は結膜上皮細胞においても認められるが、K12 の発現は角膜上皮細胞に特異的であり、同じ由来と考えられる結膜上皮細胞でも K12 を発現する透明な角膜上皮細胞にはならない。角膜上皮の幹細胞は角膜輪部に存在し、この幹細胞から生じる娘細胞が角膜中央部へ向かって移動し代謝回転することで透明な角膜上皮の恒常性が保たれていると考えられている。外傷などの外的要因や遺伝的性質などの内的要因によりこの角膜上皮幹細胞が損なわれると、角膜上皮幹細胞疲弊症となり、角膜表面が結膜上皮細胞や角化上皮細胞に覆われるとともに、しばしば血管侵入を伴い、角膜の透明性が損なわれることとなる。そうした場合、従来は全層を置換する全層角膜移植術が施されてきたが、最近では、侵襲を少なくするために障害を受けた層のみを移植する角膜パーツ移植術が開発されている。角膜上皮に関しては、羊膜やフィブリン等の基質上、あるいは温度感受性培養皿上に上皮幹細胞をシート状に培養したものを移植する培養上皮移植術が既に確立されている。片眼性の角膜上皮幹細胞疲弊症の場合は、健常眼から採取される幹細胞を元に培養上皮シートを作製し得るが、両眼性の場合自己の角膜上皮幹細胞は使用できない。したがって、両眼性の場合ドナー由来の培養角膜上皮細胞が用いられてきたが、近年では角膜上皮細胞の代わりに自己の口腔粘膜上皮細胞を用いた培養上皮シートの移植術が開発されており、視力の回復も報告されている。しかし、やはり移植した口腔粘膜上皮細胞が K12 を発現するようにはならず、透明性も角膜上皮細胞に劣り、しばしば血管侵入が生じ得るといった問題を含んでいる。

一方で我々は、従来困難であったマウスの角膜上皮細胞を長期継代培養する方法を確立してきたが、マウスの角膜上皮細胞では、継代培養を重ねていくと PAX6 および K12 の発現が低下・減少することが観察された。一般に、細胞にとって分化と増殖は相反する選択肢であると考えられており、マウス角膜上皮細胞の場合も、増殖を促す系での培養であるため細胞が分化よりも増殖の方へすすむ結果、脱分化し、これらの分化マーカーが失われると考えられる。しかし、一旦 PAX6, K12 の発現が低下した細胞株では、血清刺激やカルシウム刺激、“air-lifting” 培養によって分化刺激を与えてもそれらの発現は回復せず、角膜上皮細胞への分化に抵抗性を示した (Ma *et al.*, IOVS, 2009)。一方で、ヒト角膜輪部実質の線維芽細胞の培養上清を

用いて、マウスの毛包幹細胞を PAX6, K12 陽性の角膜上皮様細胞に分化させたことが報告された (Blazejewska *et al.*, Stem Cells, 2009)。角膜の正常発生には水晶体の正常な形成が必要であることも知られており、これらのことは、ヒト角膜輪部実質の線維芽細胞や少なくともマウス胚発生期の水晶体・角膜実質細胞からは、角膜上皮への分化を促す液性因子が放出されており、たとえマウス角膜由来の細胞株であっても PAX6, K12 陽性の本来の角膜上皮細胞へ分化させるには、現状の培養条件に加え、そうした液性因子に依る刺激が必要であることを示唆している。今後、眼表面の再生医療においても iPS 細胞の応用が進むことが期待されている。ES 細胞から上皮細胞を誘導する方法に関しては幾つかの報告があるが、角膜上皮細胞を誘導する方法は確立されておらず、iPS 細胞からの誘導も困難が予想される。角膜上皮へと分化を運命づける因子とそのメカニズムを解明できれば、それをを用いて上述の口腔粘膜上皮細胞や iPS 細胞等の多能性幹細胞を角膜上皮細胞へと特異的に分化誘導することで、角膜上皮治療にも応用可能と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、(1) マウス角膜上皮細胞由来の細胞株に、K12 遺伝子発現制御下で発現する蛍光レポーター遺伝子を組み込んだ細胞株を作製し、これを用いて (2) 角膜輪部線維芽細胞に K12・PAX6 陽性角膜上皮細胞へと分化誘導する活性があることを確認し (3) 胚発生期の K12 の発現が始まる前後のマウス水晶体あるいは角膜実質に、K12・PAX6 陽性角膜上皮細胞へと分化誘導する活性があることを明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

角膜上皮細胞特異的なマーカーであるケラチン 12 (K12) の発現制御下に蛍光タンパク質である DsRed を発現するように設計したレポーターコンストラクトを作製し、これを組み込んだ上皮細胞株を用いて、ヒト角膜輪部線維芽細胞の培養上清および胚発生期のマウス水晶体・角膜実質に K12 陽性角膜上皮細胞へと分化誘導する活性があることを検証する。さらにこの活性の本体となる因子をマイクロアレイ解析と上記レポーターを導入した細胞株を用いて同定し、さらに同定された因子と多能性幹細胞を用いて分化誘導能を検証する。

4. 研究成果

(1) 胎生期における PAX6 および K12 の発現

K12 の発現自体、PAX6 による制御下にあることが知られているが、胎生期における角膜上皮細胞での PAX6 および K12 の発現時期を検証した結果、胚発生期のマウス角膜上皮では、PAX6 の発現は E11.5 から認められることが報告されているにもかかわらず K12 の発現は E14.5 でも認められなかった (図 1 および図 2 を参照)。この結果は、K12 陽性の角膜上皮細胞となるには、PAX6 の発現に加え何らかの別のシグナルが必要であることを示している。

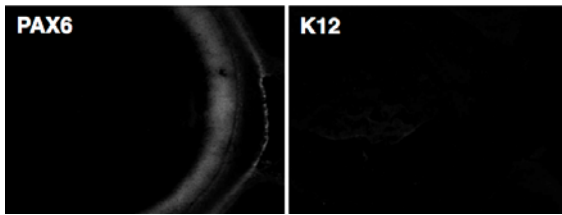


図 1 E14.5 (14.5 日胚) マウス眼組織での PAX6, K12 の発現。PAX6 は発現しているが、K12 はまだ発現していない。

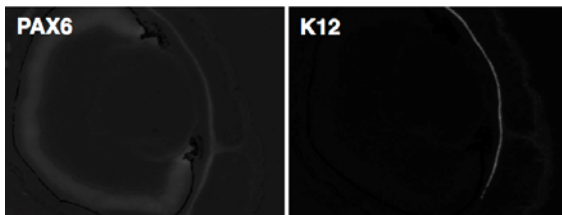


図 2 新生児マウスでは、PAX6、K12 両方の発現を認められる。また PAX6 の発現は網膜、結膜にも認められるが K12 の発現は角膜上皮のみに認められる。

(2) K12 レポーターコンストラクトを導入した上皮細胞株の作製

マウス K12 遺伝子を含む BAC (Bacterial Artificial Chromosome) クローンを元に、K12 遺伝子プロモーター下に DsRed を挿入したレポーターコンストラクトを作製した。このコンストラクトをマウス角膜上皮から樹立した TKE2 細胞株 (Kawakita *et al.*, *J. Cell. Mol. Med.*, 2008) に導入し、抗生物質によりコンストラクトが実際に導入された細胞の選択を行った。TKE2 株では、K12 の発現は失われてしまっているため、薬剤処理により強制的に K12 プロモーターを動かし、DsRed の赤色蛍光が認められることを確認した (図 3 を参照)。これにより、目的のコンストラクトが作製出来ていることが確認されたので、レポーターコンストラクトが染色体に組み込まれた安定株の選択を行った。

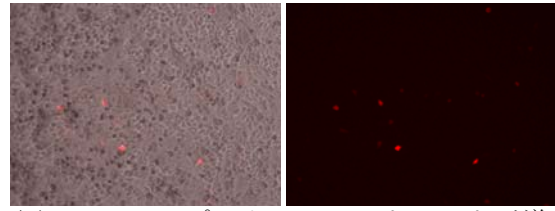


図 3 K12-レポーターコンストラクトが導入された細胞で、DsRed (赤色蛍光タンパク質) の発現を確認出来る。

(3) ヒト角膜輪部線維芽細胞を用いた分化誘導の確認

ヒト角膜上皮幹細胞が存在していると考えられている角膜輪部より採取・培養した線維芽細胞の上清に、マウスの毛包バルジ幹細胞を K12 陽性の角膜上皮様の細胞に分化転換させる活性が在ることが報告された (Blazewaska *et al.*, *Stem Cells*, 2009)。この活性の再現性を確認するため、米国アイバンクより研究用角膜を入手し、角膜輪部の線維芽細胞と角膜中央部の線維芽細胞を培養し、培養上清を得た。参考論文に従い、使用する線維芽細胞の継代数は 2 代までとした。FACS (Fluorescence-activated cell sorting) を用いてマウス毛包からインテグリン $\alpha 6$ 陽性の幹細胞を分取・増殖させ、予め回収した線維芽細胞の培養上清を用いて培養した。培養法の詳細は上述の参考論文に準じた。RT-PCR 法、および免疫染色法により PAX6, K12 の発現を解析し、検証を行ったが、バルジ幹細胞を K12 陽性細胞に分化転換する活性の再現性を得るには至らなかった。また、上述の K12 レポーターコンストラクトを導入した上皮細胞株をヒト角膜輪部線維芽細胞の培養上清を用いて培養し、K12 の発現が誘導されるか否かを検証したが、同様に、K12 の発現誘導は確認できなかった。

(4) iPS 細胞から角膜上皮細胞の誘導

角膜上皮細胞への分化決定因子の検索と併行して、マウス iPS 細胞から角膜上皮細胞を誘導する検討を行った。その結果、PA6 細胞をフィーダー細胞として用いる SDIA 法に BMP を添加する誘導法で、K12 陽性の重層上皮細胞が誘導されることを見出した (Yoshida *et al.*, *PLoS One* 2012)。また、さらにレチノイン酸を添加することによって K12 陽性細胞率が上昇することを見出した。K12 陽性細胞の誘導は、免疫染色法および RT-PCR 法で確認するとともに、前述の K12-DsRed レポーターコンストラクトを導入したマウス iPS 細胞を用いて誘導培養を行い、DsRed の発現でも確認した。

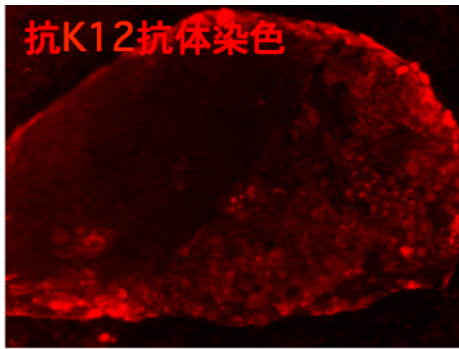


図4 マウス iPS 細胞から誘導した K12 陽性細胞コロニー

しかし、この K12 陽性細胞も培養期間とともに消失してしまい、K12 陽性細胞を維持することは難しかった。K12 を発現するようになった細胞は、分化の程度が進んでおり、増殖能が低い可能性がある。K12 の発現が低い幹細胞、あるいは前駆細胞の状態に維持し、分化に応じて K12 陽性の角膜上皮細胞になるような培養系を構築する必要があるのかも知れない。そのうえでも、角膜上皮細胞への運命決定因子が重要であり、引き続き検索を行う。

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 1 件)

①Yoshida S, Yasuda M, Miyashita H, Ogawa Y, Yoshida T, Matsuzaki Y, Tsubota K, Okano H, Shimmura S.
Generation of stratified squamous epithelial progenitor cells from mouse induced pluripotent stem cells.
PLoS One. 2011;6(12):e28856.
doi:10.1371/journal.pone.0028856.
Epub 2011 Dec 9. 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

①Yoshida S, Miyashita H, Ohta S, Yasuda M, Inagaki E, Tsubota K, Okano H, Shimmura S.
Differentiation Of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Crest Cells Into Corneal Keratocytes In Vivo
International Society for Stem Cell (ISSCR) 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, 13-16 June 2012

②Yoshida S, Yasuda M, Miyashita H, Yoshida T, Okano H, Tsubota K, Shimmura S.
Generation of stratified squamous epithelial cells from induced pluripotent

stem cells.

The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting, Fort Lauderdale, FL, USA, 1-5 May 2011

③Yoshida S, Yasuda M, Miyashita H, Yoshida T, Tsubota K, Okano H, Shimmura S.
Differentiation of induced pluripotent stem cells into corneal epithelial cells.
The 16th International Conference of the International Society of Differentiation, Nara, Japan, 15-18 Nov 2010

④Yoshida S, Shimmura S, Okano H, Tsubota K.

Differentiation of induced pluripotent stem cells into corneal epithelial cells.
The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting, Fort Lauderdale, FL, USA, 2-6 May 2010

[図書] (計 1 件)

①羽藤晋, 吉田悟, 榛村重人.
iPS 細胞からの角膜上皮誘導.
臨床眼科増刊 オキュラーサーフェス診療アップデート
66 (111), 323-326, 医学書院, 2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 悟 (YOSHIDA SATORU)
慶應義塾大学・医学部・特任講師
研究者番号: 50398781

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

榛村 重人 (SHIMMURA SHIGETO)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号: 00235780