

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390404

研究課題名(和文)角膜上皮細胞の細胞特性を規定するコア転写因子群の同定

研究課題名(英文)Identification of master transcription factors in corneal epithelial cells

研究代表者

木下 茂(Kinoshita, Shigeru)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30116024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒト角膜上皮細胞の特異的機能を維持している転写因子ネットワークについて検討を行った。マイクロアレイを用いてヒト角膜上皮細胞で高発現している転写因子を146因子選定した。さらにiPS干渉スクリーニングを用いて、ヒト角膜上皮細胞維持に関与が高い転写因子を20因子にまで絞り込んだ。その中から誘導因子を組み合わせて新生児皮膚繊維芽細胞に遺伝子導入を行ったところ、角膜上皮特異的マーカーであるケラチン3、ケラチン12を含む角膜上皮関連遺伝子の遺伝子発現の増加を認めた。このことは誘導可能であった転写因子セットがヒト角膜上皮細胞の機能を維持する転写因子ネットワークを形成している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We attempted to identify master transcription factors (TFs) in corneal epithelial cells (CECs) which are able to maintain the cell-type specific transcriptional profile. First, we used microarray analysis to select candidate master TFs in CECs from all the genes, which were highly expressed in CECs compared to various other cells. In order to narrow down the master TFs in CECs, iPS interference screening was performed and produced 20 candidate TFs. A particular combination of candidate TFs was able to induce CEC-like cells expressing keratin 12, which is a corneal specific marker when overexpressed in a heterologous cell type. Furthermore, the expression level of other corneal-related genes, such as keratin 3, keratin 15, aldehyde dehydrogenase 3, transketolase, and E-cadherin were upregulated in the induced cells. These results suggested that defined TFs, which enabled the induction of CECs, contributed to the maintenance of the corneal-specific transcriptional profile.

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：角膜上皮 転写因子 ダイレクトリプログラミング コア転写因子 マスターレギュレーター

1. 研究開始当初の背景

細胞は各々の細胞特異的な機能を発現し、かつ維持している。このいわば“細胞アイデンティティ”にはゲノムメチル化やヒストンテール修飾といったエピジェネティック制御が大きく関与していると言われていいる。一方で Oct4, Sox2, Klf4 といった転写因子の遺伝子導入によって任意の細胞から胚性幹細胞 (ES 細胞) と同質の人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) が作成可能である (Takahashi & Yamanaka, Cell, 2006) ことから、ある種の転写因子も“細胞アイデンティティ”の確立において極めて重要であると考えられる。また、このような細胞特異的な機能を維持する転写因子は強い誘導活性をもつことが多い。古くは、MyoD の強制発現による繊維芽細胞から筋細胞への分化転換の報告があり (Davis et al.; Cell, 1987)、最近では神経細胞 (Vierbuchen et al.; Nature, 2010)、肝細胞 (Huang et al.; Nature, 2011)、心筋細胞 (Ieda et al.; Cell, 2010) においても強い誘導活性をもつ転写因子セットが報告されている。こうした知見から、角膜上皮細胞においてもこのような“細胞アイデンティティ”の確立に関わる“コア転写因子”が存在することが予想される。角膜上皮細胞特異的なコア転写因子を同定することは角膜上皮細胞の理解という意味では最も重要なテーマであると考えられ、また今後 ES 細胞や iPS 細胞を使った再生医療を角膜上皮細胞において応用する局面でも重要な知見となる。

2. 研究の目的

ヒト角膜上皮細胞の特異的な機能を維持している転写因子ネットワークを同定することを目的として本研究を行った。

3. 研究の方法

(1) ヒト角膜上皮コア転写因子の候補選定

ヒト角膜上皮コア転写因子の候補因子として、マイクロアレイによる解析をおこない、角膜輪部上皮細胞で比較的高発現している転写因子に注目した。比較をおこなった細胞は結膜上皮細胞、心筋細胞、皮膚繊維芽細胞、ES 細胞である。

次にマイクロアレイの結果から得られた候補因子を iPS 干渉法 (Hikichi T et al. PNAS, 2013) を用いてスクリーニングを行い、候補因子をさらに絞り込んだ。候補因子の cDNA をすべてレトロウイルスベクターにクローニングした。

(2) コア転写候補因子を体細胞に強制発現させて誘導できた細胞とヒト角膜上皮細胞との遺伝子発現プロファイルの同一性についての検討

iPS 干渉スクリーニングで得られた上位干

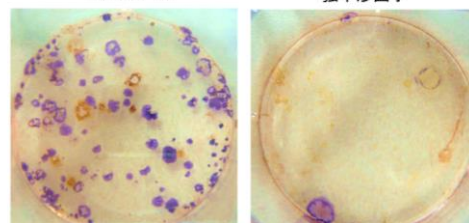
渉因子を新生児ヒト皮膚繊維芽細胞に強制導入させ、角膜上皮細胞の遺伝子発現プロファイルとの同一性を解析する。解析は免疫染色でタンパクレベルを、また qRT-PCR を行い、mRNA レベルについて検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト角膜上皮コア転写因子の候補選定

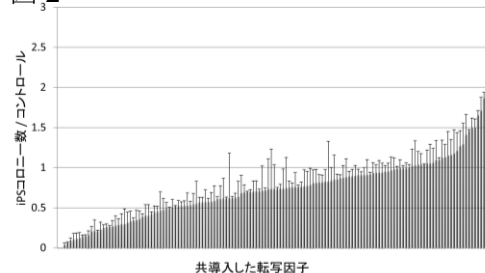
ドナー角膜をディスペーゼ処理後、角膜輪部上皮細胞のみをディスペーゼで単離した。また結膜上皮も同様にディスペーゼ処理を行い、結膜上皮細胞を単離して、それらの RNA を用いて、マイクロアレイ解析を行った。その結果、ES 細胞、心筋細胞、皮膚繊維芽細胞のいずれよりも 4 倍以上高発現である、または ES 細胞、心筋細胞、皮膚繊維芽細胞の中の 2 種類の細胞より 8 倍以上高発現である、または結膜上皮細胞より 8 倍以上高発現である、という条件で絞りこんだ 146 個の転写因子を候補因子として選定した。次に 146 因子について iPS 干渉スクリーニングを行った。角膜上皮細胞に山中 4 因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, cMYC) をレトロウイルスで遺伝子導入し、3 週間の培養後、アルカリフォスファターゼ染色を行い、iPS コロニー数をカウントした。cDNA がクローニングされていない空ベクターを導入したものをコントロールとして、共導入した各因子における iPS 化効率の変化を検討した。コントロールでは 60 個程度の iPS コロニーを認めるのに対し、いくつかの転写因子の共導入では iPS 細胞のコロニー数が大幅に減少した (図 1)。

図 1 コントロール 強干渉因子



146 因子のスクリーニング結果を示す (図 2)。Hikichi らの報告と同様に、角膜上皮細胞においてもいくつかの転写因子の共導入は強い iPS 化阻害効果を認めた。また上位 30 位の強干渉因子では GO term 解析を行うと epidermis development, ectoderm development, hair follicle development に関係する因子がエンリッチされていた。

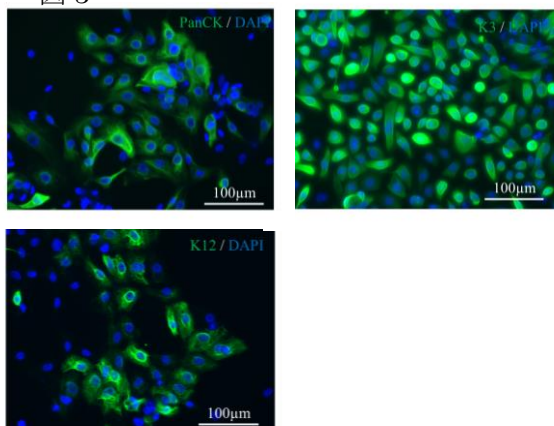
図 2



(2) コア転写候補因子を体細胞に強制発現させて誘導できた細胞と角膜上皮細胞との遺伝子発現プロファイルの同一性についての検討

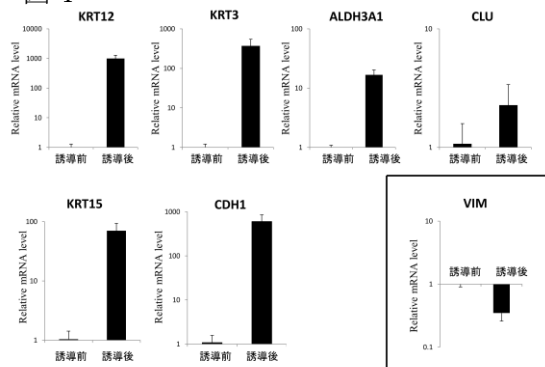
iPS 干渉スクリーニングで絞りこまれた強干渉因子の中で、最適なコア転写因子セットを同定するために新生児ヒト皮膚繊維芽細胞に強制発現させ、誘導できた細胞と角膜上皮細胞との遺伝子発現プロファイルの同一性について検討した。角膜上皮細胞誘導の可否判定は、角膜上皮細胞特異的マーカーであるケラチン 12 を指標にした。新生児皮膚繊維芽細胞に干渉因子の遺伝子導入を行い角膜上皮細胞培地で培養をおこなった。感染 3 日目頃より細胞形態の変化を認め、10 日目にはパンサイトケラチン陽性細胞を認めた。また誘導細胞は角膜上皮特異的タンパクであるケラチン 3 とケラチン 12 も発現していた (図 3)。

図 3



次に誘導細胞の RNA を回収し、遺伝子発現プロファイルを検討するために、qRT-PCR を行った。免疫染色の結果と同様に、誘導前と比べるとケラチン 3 とケラチン 12 の発現レベルが著明に増加していた。さらに ALDH3A1、クラスタリン、ケラチン 15、E-カドヘリンといった角膜上皮細胞関連遺伝子の発現上昇、一方で繊維芽細胞マーカーである Vimentin の発現低下を認めた (図 4)。

図 4



以上の結果より、転写因子セットの強制導入により新生児皮膚線維芽細胞から角膜上皮細胞の分化転換に成功した。この転写因子セットは強い誘導活性をもつ、ヒト角膜上皮細胞のコア転写因子であることが示唆された。

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 13 件)

- Okumura N, Nakano S, Kay EP, Numata R, Ota A, Sowa Y, Sakai T, Ueno M, Kinoshita S, Koizumi N.: Involvement of cyclin D and p27 in cell proliferation mediated by ROCK inhibitors Y-27632 and Y-39983 during corneal endothelium wound healing. Invest Ophthalmol Vis Sci. 査読有、2014 Jan 15;55(1):318-29.
- Nakamura T, Hamuro J, Takaishi M, Simmons S, Maruyama K, Zaffalon A, Bentley AJ, Kawasaki S, Nagata-Takaoka M, Fullwood NJ, Itami S, Sano S, Ishii M, Barrandon Y, Kinoshita S: LRIG1 inhibits STAT3-dependent inflammation to maintain corneal homeostasis. J Clin Invest. 査読有、124(1): 385-397, 2014.
- Kitazawa K, Kawasaki S, Aoi K, Shinomiya K, Matsuda A, Funaki T, Nakatsukasa M, Murakami A, Kinoshita S: Investigation of gene therapy using immortalized cells derived from a Gelatious Drop-Like Dystrophy patient. Invest Ophthalmol Vis Sci. 査読有、2013、Aug 23;54(8):5701-11.
- Hirata-Tominaga K, Nakamura T, Okumura N, Kawasaki S, Kay EP, Barrandon Y, Koizumi N, Kinoshita S: Corneal endothelial cell fate is maintained by LGR5 via the regulation of hedgehog and wnt pathway. Stem Cells. 査読有、31(7): 1396-1407, 2013..
- Nakahara M, Okumura N, Kay EP, Hagiya

- M, Imagawa K, Hosoda Y, Kinoshita S, Koizumi N.: Corneal endothelial expansion promoted by human bone marrow mesenchymal stem cell-derived conditioned medium. PLoS One. 査読有、2013 Jul 23;8(7):e69009
6. 上野盛夫, 中村隆宏, 木下茂: 角膜の再生医療. 日本医師会雑誌, 査読なし、142(4): 777-780, 2013.
 7. Sotozono C, Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Yokoi N, Ueta M, Matsuyama K, Miyakoda K, Kaneda H, Fukushima M, Kinoshita S: Visual improvement following cultivated oral mucosal epithelial transplantation. Ophthalmology. 査読有、120(1): 193-200, 2013.
 8. Kawasaki S, Yamasaki K, Nakagawa H, Shinomiya K, Nakatsukasa M, Nakai Y, Kinoshita S.: A novel mutation (p.Glu1389AspfsX16) of the phosphoinositide kinase, FYVE finger containing gene found in a Japanese patient with fleck corneal dystrophy. Mol Vis. 査読有、2012;18:2954-60.
 9. Okumura N, Koizumi N, Ueno M, Sakamoto Y, Takahashi H, Tsuchiya H, Hamuro J, Kinoshita S. ROCK inhibitor converts corneal endothelial cells into a phenotype capable of regenerating in vivo endothelial tissue. Am J Pathol 査読有、181(7) : 268-277, 2012.
 10. Yamamoto M, Quantock AJ, Young RD, Okumura N, Ueno M, Sakamoto Y, Kinoshita S, Koizumi N. A selective inhibitor of the Rho kinase pathway, Y-27632, and its influence on wound healing in the corneal stroma. Mol Vis 査読有、18: 1727-1739, 2012.
 11. Nakamura Y, Nakamura T, Tarui T, Inoue J, Kinoshita S: Functional role of PPAR δ in corneal epithelial wound healing. Am J Pathol. 査読有、180(2):583-598, 2012.
 12. Okumura N, Koizumi N, Ueno M, Sakamoto Y, Takahashi H, Hirata K, Torii R, Hamuro J, Kinoshita S. Enhancement of corneal endothelium wound healing by a ROCK inhibitor eye drop. Br J Ophthalmol 査読有、95(7):1006-1009, 2011.
 13. Nakamura T, Takeda K, Inatomi T, Sotozono C, Kinoshita S: Long-term results of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation in the scar phase of severe ocular surface disorders. Br J Ophthalmol. 査読有、95(7): 942-946, 2011.
- [学会発表] (計 20 件)
1. Kitazawa K, Kawasaki S, Aoi K, Shinomiya K, Matsuda A, Funaki T, Nakatsukasa M, Murakami A, Kinoshita S: Investigation of Gene Therapy and Pathophysiology Using Immortalized Cells Derived from a Gelatinous Drop-Like Dystrophy Patient. Gordon Research Seminar, Ventura, USA, 2014.2.16
 2. 前田謙一, 横山修一, 細田勇喜, 渡部俊介, 今川究, 中村隆宏, 木下茂: ヒト角膜上皮細胞シートの安定的な製造を可能にするシート作製技術の開発. 角膜カンファレンス 2014, 沖縄, 2014.1.30.
 3. 中村隆宏, 羽室淳爾, 高石樹朗, 丸山和一, 永田真帆, 川崎論, 板見智, 佐野栄紀, 石井優, 木下茂: LRIG1 による角膜の恒常性維持機構の解析. 角膜カンファレンス 2014, 沖縄, 2014.1.31.
 4. 大倉翔貴, 中村隆宏, 畑友衣子, 小林正和, 永田真帆, 小泉範子, 木下茂: 角膜上皮細胞における R-spondin1 の機能解析. 角膜カンファレンス 2014, 沖縄, 2014.1.31.

5. 永田真帆, 中村隆宏, 外園千恵, 稲富勉, 横井則彦, 木下茂: 眼表面扁平上皮腫瘍における LRIG1 発現解析. 角膜カンファレンス 2014, 沖縄, 2014.1.31.
6. Kitazawa K, Kawasaki S, Aoi K, Shinomiya K, Matsuda A, Funaki T, Nakatsukasa M, Murakami A, Kinoshita S: Investigation of gene therapy using immortalized cells derived from a Gelatinous Drop-Like Dystrophy patient. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Seattle (ARVO) 2013, Seattle, USA, 2013.5.8
7. Asada K, Toda M, Hagiya M, Nakata K, Ueno M, Okumura N, Koizumi N, Hamuro J, Kinoshita S: Integral Analysis of Gene Signatures and MicroRNA Expression of Cultured Human Corneal Endothelial Cells in Relation to Their Functions, Cell Senescence, Epithelial-Mesenchymal Transition, and Fibrosis. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2013.Seattle, USA, 2013.5.7
8. Matsunaga T, Kitazawa K, Yamasaki K, Sato T, Watanabe Y, Funaki T, Matsuda A, Ebihara N, Kawasaki S, Murakami A: Transfer of TACSTD2 gene into corneal epithelial cells of Gelatinous drop like corneal dystrophy and its functional expression. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Seattle (ARVO) 2013, Seattle, USA, 2013.5.7
9. Koizumi N, Okumura N, Shiina T, Suzuki S, Nakamura S, Sakamoto Y, Yamasaki K, Ueno M, Hamuro J, Kinoshita S: Efficacy and Safety Evaluation of Cell-Injection Therapy using Cultivated Human Corneal Endothelial Cells. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2013.Seattle, USA, 2013.5.6
10. Tsujimoto Y, Okumura N, Kay EP, Numata R, Kinoshita S, Koizumi N: Rho kinase inhibitor promotes cell adhesion of corneal endothelial cells through inhibiting phosphorylation of MLC. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2013.Seattle, USA, 2013.5.6
11. Shinomiya K, Kawasahi S, Aoi K, Kitazawa K, Kinoshita S: A new method for the efficient and less-stress dissociation of corneal epithelial cells. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Seattle (ARVO) 2013, Seattle, USA, 2013.5.5
12. 内藤泰行, 河内明宏, 邵仁哲, 中村隆宏, 稲富勉, 木下茂, 美紀恒治: 羊膜を基質とし作成した口腔粘膜再生シートを用いた尿路再建. 第 11 回日本再生医療学会. 横浜, 2012.6.12.
13. Kitazawa K, Kawasaki S, Shinomiya K, Matsuda A, Funaki F, Yamasaki K, Nakatsukasa M, Fukuoka H, Ebihara N, Murakami A, Kinoshita S: Establishment of immortalized corneal and conjunctival epithelial cells lacking the functional TACSTD2 gene. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale (ARVO) 2012, Ft. Lauderdale, USA, 2012.5.7
14. 永田真帆, 中村隆宏, 外園千恵, 稲富勉, 横井則彦, 板見智, 木下茂: 結膜腫瘍での Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1(LRIG1)の発現. 第 116 回日本眼科学会総会. 東京, 2012.4.5.
15. 張佑子, 外園千恵, 中川紘子, 中村隆宏, 稲富勉, 上田真由美, 横井則彦, 木下茂: 角膜上皮化生をきたした培養口腔粘膜上皮移植の 1 例. 角膜カンファレンス 2012. 東京, 2012. 2.23.

16. 平田香菜, 中村隆宏, 外園千恵, 稲富勉, 奥村直毅, 小泉範子, 横井則彦, 木下茂: 角膜扁平上皮癌における GPR49 の発現の検討. 角膜カンファレンス 2012. 東京, 2012. 2.23.
17. 堀内稔子, 中川紘子, 稲富勉, 上田真由美, 中村隆宏, 小泉範子, 外園千恵, 横井則彦, 木下茂: 全層角膜移植の 11 年間の動向と治療成績. 角膜カンファレンス 2012. 東京, 2012. 2.23.
18. Sotozono C, Inatomi T, Nakamura T, Ueta M, Yokoi N, Miyakoda K, Kinoshita S: Cultivated Oral Mucosal Epithelial Transplantation for Ocular Surface Reconstruction in Stevens-Johnson Syndrome. 第 115 回米国眼科学会議 (AAO), Orlando, USA, 2011.10.24.
19. 外園千恵, 稲富勉, 中村隆宏, 小泉範子, 横井則彦, 都田桂子, 松山琴音, 木下茂: 難治性角結膜疾患に対する自家培養口腔粘膜上皮シート移植のレトロスペクティブ調査. 第 65 回日本臨床眼科学会, 東京, 2011.10.8.
20. 稲富勉, 外園千恵, 中村隆宏, 小泉範子, 都田桂子, 松山琴音, 木下茂: 自家培養口腔粘膜上皮シート移植による結膜囊再建効果の検討. 第 65 回日本臨床眼科学会, 東京, 2011.10.8.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 茂 (KINOSHITA SHIGERU)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：30116024

(2) 研究分担者

上野 盛夫 (UENO MORIO)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：40426531

川崎 諭 (KAWASAKI SATOSHI)
大阪大学・医学研究科・講師
研究者番号：60347458

(3) 連携研究者

()

研究者番号：