

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592608

研究課題名(和文) ケラチン12遺伝子発現のメカニズム解析

研究課題名(英文) Analysis of Krt12 gene expression mechanism

研究代表者

大橋 裕一(Ohashi, Yuichi)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00116005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：角膜上皮に分化したことを示すK12遺伝子を発現した細胞を緑蛍光で標識するマウスを作製した。この角膜をパイオイメージングで観察し、角膜上皮の基底層に角膜上皮の幹細胞を発見した。さらに、K12遺伝子を発現している細胞の角膜上皮の遺伝子を発現していない細胞とを比較した結果、シトシン Guanin 配列のメチル化がK12遺伝子エクソン1とK12遺伝子プロモーター領域のシトシン Guanin 配列が集積している部分においてK12遺伝子が発現している細胞では少ないことが判った。K12遺伝子の発現にはK12遺伝子プロモーター以外にエクソン1の脱メチル化が重要であることが判った。

研究成果の概要(英文)：A mouse line, which has green fluorescent protein expression in K12 gene expressed cells, was established in this study. In this mouse cornea, we found corneal epithelial stem cells in basal layer of corneal epithelia. Furthermore, we examined CpG methylation pattern analysis between K12 promoter region and exon2. Compare to K12 non-expression cells, K12 expressed cells have less methylated CpG in CpG island and exon1 of the K12 gene.

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：K12 角膜上皮 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

角膜上皮は透明で表面が平滑な角膜を維持するために重要であり、角膜上皮の混濁や表面の不整は視機能を著しく損なう。角膜上皮の再生には様々な方法が用いられてきたが、どれも完全なものではなく、拒絶反応や血管及び結膜の侵入により角膜の透明性と表面の平滑性が長期間維持出来ない場合が多い。これらの問題の根本は血管を伴わず、表面が平滑であるべき角膜上皮の特殊性にある。しかし、この特殊な組織の構築のために必要な分子レベルの未だ不明である。

2. 研究の目的

角膜上皮に特異的に発現する K12 遺伝子 (角膜上皮であるために必須の因子) に着目し、遺伝子組み換えマウスを用いて、K12 遺伝子発現の時期や発現細胞の分布について詳細に検討を行っている。角膜上皮の幹細胞が存在すると考えられている輪部の基底より細胞が角膜の基底に移動すると K12 蛋白の発現が確認できる。この発現は K12 遺伝子のプロモーター領域の CpG メチル化の解除により達成されるものと考えている (仮説 1)。角膜上にある上皮細胞の K12 遺伝子の CpG メチル化を調べると、蛋白レベルでは半分の細胞にしか発現していない生後 2 週の上皮細胞においても、K12 遺伝子の Exon 1 付近では脱メチル化が確認されている。つまり脱メチル化のみでは K12 蛋白は合成されない。一方、皮膚の上皮細胞を角膜上に播種しても一部の細胞 (特に角膜周辺部に播種された細胞) で K12 遺伝子発現があることが解っている。マウスの角膜は生後 2 週までは表皮外胚葉由来の上皮細胞で覆われているが、2 週以降は周辺より輪部由来の上皮が角膜上に進入して生後 12 週頃すべての角膜上皮細胞が輪部由

来に置き換わる (仮説 2)。輪部由来の上皮はその幹細胞が 2 つある K12 遺伝子を発現するか発現しないかを決定していると考えている (仮説 3)。片方の allele が角膜上で発現している細胞の比率は 70% 程度であることが解っている (Y. Hayashi et al. IOVS, 2010)。両方の allele が発現していない細胞は角膜上で clonal selection を受けて角膜中央までは到達しない。以上より下記の 3 つの仮説の検討を目的とした。

) K12 遺伝子 CpG メチル化の解除の時期および必要な因子の解析をする。(仮説 1 の検討)

) K12 遺伝子の発現細胞を経時的に観察し、細胞の動きと起源を明らかにする。(仮説 2 の検討)

) K12 遺伝子 allele selection のメカニズムを明らかにする。(仮説 3 の検討)

3. 研究の方法

K12 遺伝子発現が確認できる胎生 14.5 日から K12^{Cre/Wt}/RTG^{flox/Wt} が開眼する生後 13 日目までは、各ステージごとに、生後 14 日以降は同じマウスを経時的に蛍光実態顕微鏡 (Zeiss, SteREO Lumar.V12) と共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon A1R) で観察した。

) FACS による角膜上皮細胞の選別
生後の眼球は 0.02% EDTA (Invitrogen)-1% Dispase (Roche)-PBS(-) (Invitrogen) 溶液 (1-24 時間、4℃、遮光) で振とうさせてから、手術用顕微鏡下で角膜上皮のみを剥離し、AccumaxTM (Worthington Biochemical) を 10 分反応してから 25G 針を通して single cell suspension を得た。FACS AriaTM セルソーター (BD) を用いて EGFP+ かつ tdTomato- の細胞と EGFP- かつ tdTomato+ の細胞を回収した。細胞を protease K (SDS-EDTA buffer) で溶解し、genomic DNA を精製した。

EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN) で DNA を処理し、K12 promoter 領域から intron1 までカバーできるように作製した primer で PCR を行い、pMD20-T vector (Takara) に TA cloning を行ってから、Applied Biosystems 3500xL ジェネティックアナライザ でシーケンスを調べ、DNADynamo (BlueTractorSoftware) で解析した。

4 . 研究成果

K12IRES-Cre を C57B6/Jcl と 8 回、B6.129(Cg)-Gt(ROSA)26Sortm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J を C57B6/Jcl と 3 回交配後に K12IRES-Cre と B6.129(Cg)-Gt(ROSA)26Sortm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J を交配して、K12IRES-Cre/wt/RTGflox/wt のを作成した。胎生 14.5 日から K12Cre/Wt/RTGflox/Wt が開眼する生後 13 日目までは、K12IRES-Cre allele 発現を示す EGFP 陽性細胞が K12IRES-Cre allele 発現 (-) の tdTomato 陽性細胞の集団が混在した。生後 12 週で EGFP 陽性細胞は車軸状のパターンに変化したが、基底細胞は、モザイクパターンを示し、EGFP 陽性細胞集団のなかに孤立した、tdTomato 陽性細胞が存在。本来 stem cell は角膜上皮への分化を示す、K12 を発現しないと考えられており、この孤立した tdTomato 陽性細胞は角膜上に存在する stem cell であると考えられるのが妥当であると考えた。FACS による角膜上皮細胞の選別のため、single cell suspension を FACSAria™セルソーター(BD)を用いて EGFP + かつ tdTomato- の細胞と EGFP- かつ tdTomato+ の細胞に分けた。CpG Island のメチル化は EGFP + かつ tdTomato- の細胞と EGFP- かつ tdTomato+ の細胞の間に CpG Island の中央では差を認めず、シトシンが脱メチル化を受けていたが、Exon1 の後半

と CpG Island の両端では K12IRES-Cre allele 発現細胞は、ほとんどのシトシンが脱メチル化を受けていたのに対して、K12IRES-Cre allele 発現(-)の細胞では、ほとんどのシトシンがメチル化を受けていた。K12 遺伝子の発現には K12 遺伝子プロモーター以外にエクソン 1 の脱メチル化が重要であることが判った。

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 1 件)

1. The "replacement hypothesis": corneal stem cell origin epithelia are replaced by limbal stem cell origin epithelia in mouse cornea during maturation. Hayashi Y, Watanabe N, Ohashi Y. *Cornea*. 31:568-73, 2012, 査読無し

[学会発表](計 2 件)

- 1 . *Krt12^{Cre}* gene Expression is required demethylation of CpG island and Exon1. Yasuhiro Hayashi, Narumi Higuchi, Naoko Takahira, Yuichi Ohashi, Winston Whei-Yang Kao. ARVO 2014 Annual Meeting. Orlando USA, MAY 04 - 08, 2014

- 2 . 角膜中央の上皮基底細胞層には胎生期由来の上皮幹細胞が残存する可能性がある 林 康人、小林 剛、白石 敦、大橋裕一 角膜カンファランス 2014 (第 38 回日本角膜学会総会、第 30 回日本角膜移植学会) 宜野湾, 2014 年 1 月 30 日 ~ 2 月 1 日

〔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

大橋 裕一 (Ohashi Yuichi)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00116005

(2) 研究分担者

林 康人 (Hayashi Yasuhito)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70314953