

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592672

研究課題名(和文) マウス表皮細胞から形質転換した角膜上皮様細胞を用いた角膜上皮再建の試み

研究課題名(英文) An examination of corneal epithelium reconstruction by transdifferentiation from mouse epidermal cells to corneal epithelial-like cells

研究代表者

小林 剛 (Kobayashi, Takeshi)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座助教

研究者番号：70380285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：自己の表皮細胞から形質転換させた角膜上皮細胞を用いることが可能となれば、角膜上皮再生医療の臨床効果は飛躍的に改善されると推測される。本研究では、マウス表皮細胞、表皮sp細胞を用い、マウス強角膜片を用いた器官培養ならびに輪部線維芽細胞との共培養による細胞シート作製を検討し、これらの培養系にて角膜上皮様細胞への形質転換が誘導される可能性を示した。さらに、実質細胞の働きに着目しトランスクリプトーム解析を行い、形質転換に関与する可能性のある複数の因子を見出した。これら実質由来因子の検討をさらに進めその働きを解明することで、器官培養およびフィーダー細胞を必要としない培養法の開発が可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is considered that the clinical efficacy of regenerative medicine of corneal epithelium is improved by use of corneal epithelial cell sheet constructed by transdifferentiation of autologous epidermal cells. In this study, culture method of transdifferentiated cells from mouse epidermal cells (MECs) or side population (sp) cells was examined. And, to examine the factors that have possibility to influence the transdifferentiation, transcriptome analysis was performed for mouse limbal stromal fibroblasts (MLSFs). When MECs or sp cells were cultured on limbal stroma or MLSF feeder cells, K12 expression was observed in the epithelial cells. The transcriptome analysis revealed the high-level expression of some Wnt inhibitors. Further study is necessary to reveal the role of these factors on the transdifferentiation.

研究分野：眼科学

キーワード：培養上皮シート 表皮細胞 角膜上皮 形質転換

### 1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞を始め、再生医療の進歩には目覚ましいものがある。中でも角膜上皮の再生医療は他分野に先駆け臨床応用が行われ、良好な成績が報告されている。しかしながら、現状では allo の角膜上皮または自家口腔粘膜上皮を用いた培養上皮細胞移植にとどまり、臨床的效果は限定的である。自己の細胞(表皮細胞)から形質転換させた角膜上皮細胞を用いることが可能となれば、臨床的效果は飛躍的に改善されると推測される。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞源として表皮細胞、表皮 sp 細胞を用い、マウス強角膜片を用いた器官培養ならびに輪部由来線維芽細胞(MLSF)との共培養により細胞シートを作製、サイトケラチン 12(K12)を発現する角膜上皮様細胞への形質転換による角膜上皮再建のための培養方法について検討を行った。さらに、どのような環境あるいは因子が形質転換に必要なことについて検討するため、角膜実質細胞の働きに着目し、トランスクリプトーム解析を行い、形質転換に関与する因子の解析を試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) *K12Cre/ZEG* マウスおよび *K12Cre/RTG* マウス

検討には、角膜上皮特異的分化マーカーである K12 の発現により GFP を発現する *K12Cre/ZEG* マウス由来の細胞を用いた。本マウスは、K12 遺伝子の下流に Cre リコンビナーゼを導入した *K12Cre* 遺伝子およびレポーター遺伝子である ZEG 遺伝子を持ち、K12 を発現した細胞では Cre リコンビナーゼの働きで、ZEG 遺伝子の緑色蛍光タンパク質(GFP) 遺伝子上流の切り出しが行われ、GFP が発現する。また、ドナー由来の K12 未発現細胞を可視化するため、ROSA26 membrane-tagged tdTomato-membrane-tagged EGFP レポーター(RTG)を用いた *K12Cre/RTG* マウスを作製した。本マウスの細胞は K12 未発現細胞において tdTomato の発現が見られ、K12 を発現した細胞において GFP を発現する。

(2) マウス表皮細胞、マウス表皮 side population(sp)細胞の採取と培養  
生直後の *K12Cre/ZEG* マウスより採取した皮膚全層から dispase 処理(250U/mL Dispase II, 4, 16h)にて表皮を剥離、trypsin 処理(0.25% Trypsin, 37, 10 min)にて単一細胞とした(マウス表皮細胞)。表皮 sp 細胞は、trypsin 処理により得た単一細胞(マウス表皮細胞)を Hoechst 33342 (5 µg/ml, 90 min)にて染色後、fluorescence activated cell sorting (FACS, Beckman Coulter)により分離を行った。FACS による sp 細胞の分離に当たっては、低蛍光の 2%の分画を分取した。

#### (3) マウス強角膜片を用いた器官培養

*K12Cre/ZEG* マウスまたは *K12Cre/RTG* マウスより単離培養した表皮細胞(1st passage)を、ディスペーゼ処理にて上皮を除去した野生型マウスの強角膜片上に播種(1x10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup>)、supplemented hormone epithelial medium (SHEM, 5%FBS)で7日間培養した。また、実質細胞の働きについて検討するため、凍結融解により実質細胞を死滅させた強角膜片を作製し、同様に上皮細胞を播種し培養を行った。

#### (4) 輪部由来線維芽細胞(MLSF)との共培養

マウス(12W, C57BL/6, female)の眼球を Dispase にて処理(15 mg/ml, 4, o/n)上皮を剥がし強角膜片を作製、内皮を除去した後、角膜実質を(約4mm径)を切り取った。角膜中心部をトレパン(2mm)で切除、輪部実質をコラーゲナーゼ溶液(1 mg/mL collagenase A)中にてインキュベート(37, 90 min)した後、細胞を回収、サブコンフルエントまで培養した(10%FBS/DMEM, 5 days)。マイトマイシン処理(4 µg/ml, 2h)を行った後、培養表皮細胞(CnT-07, 1st passage)またはマウス表皮 sp 細胞を播種(1x10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup>)、SHEM (5%FBS)で7日間培養した。

#### (5) 免疫染色

細胞シートを 4% パラホルムアルデヒド(PFA)で固定し、免疫組織学的検討を行った。PFA 固定試料よりパラフィン切片(5 µm)スライドを作製し、脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオシン(HE)染色または免疫染色を行った。免疫染色に用いる試料は、クエン酸緩衝液を用いてマイクロウェーブ(20分間)にて抗原賦活化を行った。一次抗体は抗サイトケラチン抗体(AE1/AE3, mouse-monoclonal IgG, Vector)、抗 K12 抗体(mK12[420-436])、抗マウス K12 ウサギ抗血清)または抗 GFP 抗体(DyLightTM549 標識抗 GFP 抗体, goat-polyclonal IgG, ROCKLAND)を用いた。一次抗体反応後(4, o/n)、サイトケラチンおよび K12 の染色には FITC 標識二次抗体を反応させた。DAPI による核染色を行った後、蛍光顕微鏡にて蛍光および微分干渉像を取得し重ね合わせ画像を作成した。

#### (6) マウス輪部実質由来線維芽細胞(MLSF)のトランスクリプトーム解析

角膜輪部および角膜中心部実質をコラーゲナーゼ処理後、細胞を回収しサブコンフルエントまで培養(10%FBS/DMEM, 5 days) RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて total RNA を抽出した。Agilent Expression Array (SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray Kit)にてトランスクリプトーム解析を行い、39,430 遺伝子および 16,251 lincRNAs について MLSF と角膜中心部実質由来線維芽細胞

(MCSF)の比較を行った。2回のトランスクリプトーム解析の結果において輪部で2倍以上の発現を認めた遺伝子の中から分泌タンパク質または細胞外マトリクスの構成タンパクをコードする遺伝子、またその可能性の高い遺伝子を選択し、Real-time PCRによる確認を行った。

(7) 表皮由来細胞の分化に及ぼす Wnt 関連因子の影響

MLSF のトランスクリプトーム解析により高発現を認めた Wnt 関連因子が上皮細胞の分化に及ぼす影響について検討するため、マウス表皮細胞を無血清培地 (CnT-PR, CELLnTEC) にて培養、sFRP2 (10 nM) または DKK3 (10 nM) を添加後 24 時間培養した。RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出し、SuperScript® VIL0™ cDNA Synthesis Kit (Life Technologies) にて cDNA を合成、real-time PCR により、K12 遺伝子、pax6 遺伝子発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

器官培養ならびに MLSF との共培養による細胞シートの作製

K12Cre/ZEG マウスまたは K12Cre/RTG マウス由来の表皮細胞を播種したマウス強角膜片上において、GFP 陽性細胞が認められた。ここで見られた GFP の発現は K12 の発現を示していると考えられる。一方で、凍結融解により実質細胞を死滅させた強角膜片上では、GFP 陽性細胞は認められなかったことから、上皮細胞の K12 発現誘導に実質細胞由来の因子が関与した可能性が示唆された。これらの細胞シートに対し、免疫組織学的検討を行ったところ、角膜周辺部から角膜中心部にかけて上皮様細胞層が認められ、これらの細胞はサイトケラチン (AE1/AE3) 陽性であった。しかしながら、角膜上皮細胞の分化マーカーである K12 陽性細胞および GFP 陽性細胞は、角膜輪部でのみ見られ、角膜中心部では認められなかった。また、角膜中心部においては単層の細胞層が見られたのに対し、角膜輪部では重層化した細胞層が見られることが分かった。また、実質細胞を死滅させた強角膜片上の細胞は、細胞のサイズが大きく myofibroblast-like な形態であり、実質細胞の存在が上皮細胞の分化に重要な働きを持つと考えられた。

表皮 sp 細胞はヘキスト染色による低蛍光の細胞群として得られ、幹細胞を比較的高い割合で含むことが報告されている。Hoechst 33342 で染色後のマウス表皮細胞から 2% の分画を FACS により回収することで、1 匹当たり約  $1 \times 10^4$  cells の sp 細胞を得ることが出来、プラスチック上での培養で小型の細胞からなるコロニーを形成することを確認した。そこで、K12Cre/RTG マウス表皮から sp 細胞を FACS により分取し、マイトマイシン処理した

MLSF と共培養を行ったところ、GFP 陽性細胞が見られた。しかしながら、GFP 陽性細胞は一部に限局して認められたことから、形質転換に必要な環境または因子についてのさらなる検討が必要であると考えられた。

MLSF のトランスクリプトーム解析

角膜中心部実質由来線維芽細胞 (MCSF) と MLSF のトランスクリプトーム解析を行ったところ、MLSF で 2 倍以上の発現量が見られたものは 762 遺伝子、4 倍以上の発現量が 169 遺伝子であった。さらに、2 回のトランスクリプトーム解析の結果、2 回共に MLSF で 2 倍以上の高発現が認められた遺伝子の内、分泌タンパク質または細胞外マトリクスの構成タンパクをコードする遺伝子、またその可能性の高い遺伝子の中から、候補遺伝子を選択し、real-time PCR による確認を行ったところ、MLSF で有意に高発現を認めた因子の中に、分泌タンパク質のコード遺伝子が 21 種、細胞外マトリクスの構成タンパク質をコードする遺伝子が 15 種含まれていることが明らかとなった。また、分泌タンパク質のコード遺伝子の内、5 種類は Wnt シグナルに関連する因子であった。(図 1)

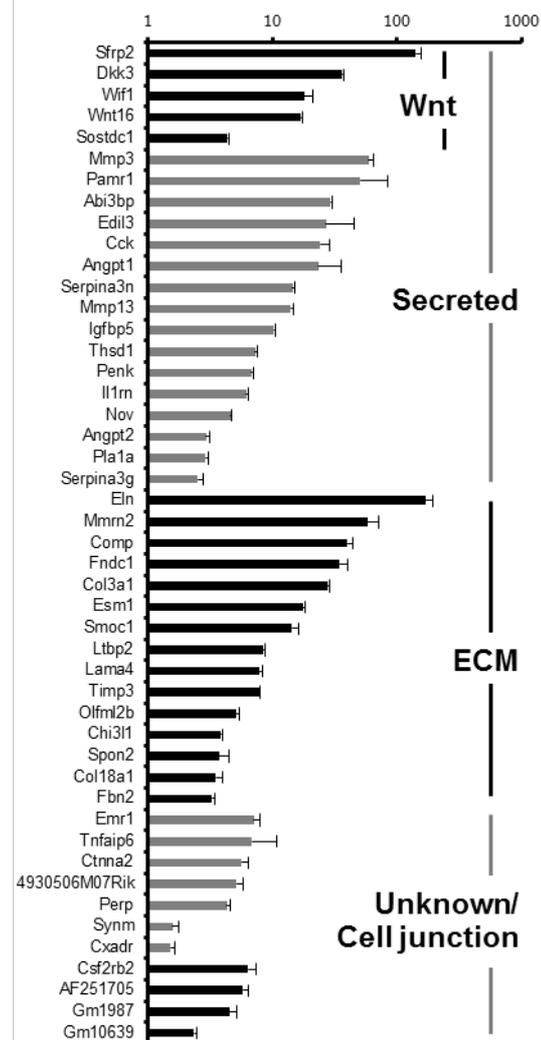


図 1 . 角膜輪部実質特異的因子の解析

マウス表皮由来細胞の分化に及ぼす Wnt 関連因子の影響

MLSF のトランスクリプトーム解析により高発現を認めた Wnt 阻害因子である sFRP2 または DKK3 添加後のマウス表皮細胞における K12 遺伝子および pax6 遺伝子の発現を調べたところ、統計的有意差は認めなかったものの、sFRP2 添加群ではコントロールに比べ、K12 遺伝子発現量が 1.5 倍、pax6 遺伝子発現量が 1.6 倍であり、両遺伝子ともに発現量増加の傾向を示した。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

培養角膜上皮移植が開発、臨床応用されるようになり、かつて難治とされた癩痕性角結膜疾患においても、良好な治療成績が報告されている。一方、組織幹細胞の多分化能または可塑性 (plasticity) に関する研究が盛んに報告されるようになった。皮膚はヒトの持つ最大の器官であり、細胞の採取も比較的容易であることから、表皮由来細胞から形質転換した角膜上皮様細胞を用いることが可能となれば、限られた細胞源しかない角膜上皮の再生治療に非常に有用となると考えられる。角膜分野においても、表皮に含まれる幹細胞 (毛包幹細胞) から角膜上皮様細胞への形質転換が可能であることが示されているものの、そのメカニズムについては不明な点が多い [Nan, et al., 2007, Yang, et al., 2009, Blazejewska, et al., 2009]

本研究では、マウス強角膜片を用いた器官培養において、*K12Cre/ZEG* マウス表皮細胞の GFP 発現を認め、角膜上皮様細胞 (K12 陽性細胞) へ形質転換し得ることが示された。さらに、K12 陽性細胞および GFP 陽性細胞は角膜輪部に限局して認められ、角膜輪部の環境が形質転換に重要であることが示唆された。さらに、輪部の基質だけでは GFP 陽性細胞を認めなかったこと、マイトマイシン処理した輪部実質由来線維芽細胞との共培養により GFP 陽性細胞を認めたことなどから、角膜輪部の実質細胞由来の因子が形質転換に関与すると考えられた。そこで MCSF と MLSF のトランスクリプトーム解析を行い、候補遺伝子を選択し、real-time PCR による確認を行ったところ、MLSF で有意に高発現する複数の因子が明らかとなった。これら因子には、5 種類の Wnt シグナルに関連する因子を含む分泌タンパク質のコード遺伝子が 21 種、細胞外マトリクスの構成タンパク質をコードする遺伝子が 15 種含まれていた。

Wnt シグナルは、種々の遺伝子発現を調節することが知られるシグナル伝達経路であり、Wnt/  $\beta$ -catenin signaling の活性化は角膜上皮細胞の増殖を促進し [Nakatsu, et al., 2011]。一方で、Wnt 阻害因子のノックアウトマウスでは角膜上皮において表皮特異的分化マーカーの発現、皮脂腺および毛包の形成

が起こることが知られている [Mukhopadhyay, et al., 2006]。また、輪部上皮における Wnt 関連因子の発現は報告されているものの、実質における発現はほとんど調べられていないのが現状である。種々の実質由来の液性因子 (サイトカイン) が paracrine に働き、角膜上皮細胞の恒常性維持に関与することはよく知られ、実質由来の Wnt 因子もまた同様に角膜上皮細胞の分化制御に関与していると考えられる。本研究においては、MLSF で高発現を認めた Wnt 関連因子はその多くが、sFRP2 や DKK3 などの Wnt 阻害因子であった。Wnt 阻害因子のノックアウトが角膜上皮の表皮様分化を促進することからも、これらによる Wnt シグナルの調節が角膜上皮の分化に関与する可能性が考えられる。MLSF のトランスクリプトーム解析により高発現を認めた Wnt 阻害因子である sFRP2 または DKK3 が上皮細胞の分化に及ぼす影響について予備的検討を行ったところ、sFRP2 添加後のマウス表皮細胞において、K12 遺伝子および pax6 遺伝子発現量の増加傾向を認めた。Wnt シグナルの調節には同時に複数の因子が関与することも考えられることから、今後これらの因子の組み合わせも含めさらなる検討が必要であると考えられる。

(3) 今後の展望

本研究では、マウス表皮細胞またはマウス表皮 sp 細胞を、マウス強角膜片上で培養、または MLSF と共培養することで細胞シートを作製し、これらの培養系において角膜上皮様細胞への形質転換 (K12 遺伝子発現) が誘導される可能性を示し、さらに形質転換に関与する可能性のある複数の因子を見出すことが出来た。我々の最終目標は、重症角膜輪部機能不全症候群への臨床応用であり、今後、本研究で見出された Wnt シグナル関連因子を含む輪部実質細胞由来因子の検討をさらに進め、上皮細胞の分化における働きを解明することで、器官培養およびフィーダー細胞を必要としない培養方法の開発が可能になると考えられる。また、これら輪部因子に関する知見は、細胞移植のみならず、失われた輪部機能を再生するための遺伝子治療または薬物治療の新たなターゲットとしても大いに期待できると考えられる。さらに、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 等を用いた次世代の再生医療においても、目的とする細胞への安定的な分化誘導は基本的な技術的課題の一つであり、ここで得られる形質転換に関する知見が利用可能であると考えられ、当分野において多大な貢献ができると期待するものである。

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 12 件)

Kobayashi T, Shiraishi A, Hara Y, Kadota Y, Yang L, Inoue T, Shirakata Y, Ohashi Y.

Stromal-epithelial interaction study: The effect of corneal epithelial cells on growth factor expression in stromal cells using organotypic culture model. *Experimental Eye Research*. 2015年 in press (査読有)

DOI: 10.1016/j.exer.2015.02.009.

Kobayashi T, Higuchi-Watanabe N, Shiraishi A, Uno T, Ohashi Y. Miraflo, Soft Contact Lens Cleaner, activity against *Acanthamoeba* spp.. *Eye & Contact Lens*. 2015年 in press (査読有)

DOI: 10.1097/ICL.0000000000000112.

Inoue T, Kobayashi T, Nakao S, Hara Y, Suzuki T, Hayashi Y, Zheng X, Shiraishi A, Ohashi Y.

Horizontal intracorneal swirling water migration indicative of corneal endothelial function.

*Invest Ophthalmol Vis Sci*.

55(12):8006-14. 2014年11月(査読有)

DOI: 10.1167/iovs.14-14762.

Toriyama K, Inoue T, Suzuki T, Kobayashi T, Ohashi Y.

Necrotizing Keratitis Caused by Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Virus.

*Case Rep Ophthalmol*. 2014. 5:325-328.

2014年10月(査読有)

DOI: 10.1159/000368297.

Yamaguchi S, Suzuki T, Kobayashi T, Oka N, Ishikawa E, Shinomiya H, Ohashi Y.

Genotypic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from ocular infection.

*J Infect Chemother*. 20(7):407-11. 2014年7月(査読有)

DOI: 10.1016/j.jiac.2014.02.007.

Nonaka L, Maruyama F, Onishi Y, Kobayashi T, Ogura Y, Hayashi T, Suzuki S, Masuda M.

Various pAQU plasmids possibly contribute to disseminate tetracycline resistance gene *tet(M)* among marine bacterial community.

*Front Microbiol*. 5:152. 2014年5月(査読有)

DOI: 10.3389/fmicb.2014.00152.

Li Y, Inoue T, Takamatsu F, Kobayashi

T, Shiraishi A, Maeda N, Ohashi Y, Nishida K.

Differences between niche cells and limbal stromal cells in maintenance of corneal limbal stem cells.

*Invest Ophthalmol Vis Sci*.

55(3):1453-62. 2014年3月(査読有)

DOI: 10.1167/iovs.13-13698.

小林剛, 樋口(渡部)成美, 白石敦, 大橋裕一

各種フルオロキノロン系抗菌点眼液がヒト培養角膜上皮細胞に与える影響についての検討

*医学と薬学*. 70(1):61-66. 2013年7月

[http://www.shizenkagaku.com/igakutoyokugaku/backnumber\\_\\_70120137.html](http://www.shizenkagaku.com/igakutoyokugaku/backnumber__70120137.html)

Joko T, Shiraishi A, Akune Y, Tokumaru S, Kobayashi T, Miyata K, Ohashi Y.

Involvement of P38MAPK in human corneal endothelial cell migration induced by TGF- (2).

*Exp. Eye Res*. 2013. 108:23-32. 2013年3月(査読有)

DOI: 10.1016/j.exer.2012.11.018.

Mito T, Suzuki T, Kobayashi T, Zheng X, Hayashi Y, Shiraishi A, Ohashi Y.

Effect of photodynamic therapy with methylene blue on *Acanthamoeba* in vitro.

*Invest Ophthalmol Vis Sci*.

53(10):6305-13. 2012年9月(査読有)

DOI: 10.1167/iovs.12-9828

Miyamoto K, Kobayashi T, Hayashi Y, Zhang Y, Hara Y, Higashine M, Shiraishi A, Ohashi Y.

Involvement of stem cell factor and c-kit in corneal wound healing in mice. *Molecular Vision*. 18:1505-15. 2012年6月(査読有)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3381705/>

Zhang Y, Kobayashi T, Hayashi Y, Yoshioka R, Shiraishi A, Shirasawa S, Higashiyama S, Ohashi Y.

Important role of epiregulin in inflammatory responses during corneal epithelial wound healing.

*Invest Ophthalmol Vis Sci*. 53:2414-23.

2012年4月(査読有)

DOI: 10.1167/iovs.11-8869.

[学会発表](計4件)

小林剛

ジフェニルメタン系下剤(ピサコジル)の新しいドライアイ点眼薬としての可能性

第 119 回日本眼科学会総会(ロイトン札幌、北海道・札幌市)シンポジウム 2015 年 4 月 16 日 - 2015 年 4 月 19 日

小林剛、林康人、鎌尾知行、高平尚子、中尾早織、井上智之、白石敦、大橋裕  
結膜の水輸送に及ぼすジフェニルメタン系下剤(ピサコジル)の影響  
第 39 回日本角膜学会総会(高知市文化プラザかるぼーと、高知県・高知市)一般口演 2015 年 2 月 11 日 - 2015 年 2 月 13 日

小林剛、林康人、鎌尾知行、高平尚子、中尾早織、井上智之、白石敦、大橋裕  
ドライアイモデルマウスの結膜嚢内涙液貯留量に及ぼすピサコジル点眼の影響  
第 38 回日本角膜学会総会(沖縄コンベンションセンター、沖縄県・宜野湾市)一般口演 2014 年 1 月 30 日 - 2014 年 2 月 1 日

小林剛  
皮膚上皮細胞から角膜上皮様細胞への形質転換における実質の関与  
第 37 回日本角膜学会総会(白浜町立体育館、和歌山県・白浜町)シンポジウム 2013 年 2 月 14 日 - 2013 年 2 月 16 日

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 剛 (Kobayashi, Takeshi)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・寄附講座  
助教

研究者番号：70380285

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし