

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462756

研究課題名(和文) バイオイメーシングを用いた角膜実質幹細胞の同定

研究課題名(英文) Bio-imaging for Cornea stromal Stem Cell Biology

研究代表者

林 康人 (Hayashi, Yasuhito)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70314953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Keratocan-IRES2-nls-Cre とKeratocan-IRES2-CreERT2マウスの作製をして、ROSA26mT/mGまたはROSA26LacZと交配し、ノックイン遺伝子の機能を解析した。Keratocan-IRES2-nls-Cre /ROSA26LacZのCreは胎生期の眼周囲中胚葉細胞と海馬CA1の錐体細胞に発現していた。Keratocan-IRES2-CreERT2/ROSA26mT/mGマウスでは、タモキシフェンによりほとんどのケラトサイトでfloxed遺伝子を摘み取ることができた。これらのマウスはケラトサイト幹細胞研究の有用なモデル動物になりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Keratocan-IRES2-nls-Cre and Keratocan-IRES2-CreERT2 knock-in mouse lines were newly developed by gene targeting technique using C57BL/6-derived ES cells for keratocyte specific Cre-lox P recombination. These mice were mated with ROSA26mT/mG or ROSA26LacZ to investigate temporal and spatial Cre recombinase expression pattern. In Keratocan-IRES2-nls-Cre/ROSA26LacZ embryo, Cre recombinase expression was observed in periorbicular mesenchymal cells. After birth, Cre recombinase expression were observed in keratocytes and hippocampal CA1 pyramidal cells. In keratocytes of Keratocan-IRES2-CreERT2/ROSA26mT/mG mice, Cre-lox P recombination were observed after tamoxifen induction. These mouse lines will become useful model for keratocyte stem cell biology.

研究分野：角膜実質

キーワード：ケラトサイト 角膜実質 幹細胞 バイオイメーシング

1. 研究開始当初の背景

角膜は眼表面にあって、透明かつ平滑なレンズの役割をになう重要な組織である。中でも角膜実質は角膜の90%を占め、形状と透明性は視力に直結する。感染や変性、外傷などにより一度、透明性と平滑性を失った角膜を透明治癒させるために確立された方法は現在のところ角膜移植しかないが、角膜移植は術後の免疫抑制やそれにとまなう感染、角膜不整乱視など、避けては通れない問題があり、視力の改善は不十分である。そのため角膜再生医療を発展させる必要があるが、実質細胞(ケラトサイト)の特性(形態、遺伝子の発現パターン、幹細胞とniche細胞の同定、細胞分裂後の細胞の形態や動態)を理解する必要があるが、ケラトサイトの幹細胞を発見するための研究ですらほとんどなされていない。角膜実質はケラトサイト以外に免疫細胞、リンパ管、神経など異なる種類の細胞から構築されているが、透明な角膜実質に必須であると考えられているケラトサイトは培養すると、その性質が変化するため、本来の状態を研究するのは困難であった。生体内に存在する本来の状態を解明するには、動物が生きた状態で経時的に細胞の動きや、蛋白の発現、細胞分裂の状態を外から捉える必要がある。

2. 研究の目的

角膜実質ケラトサイトの発生様式、組織障害時の治癒形態、幹細胞の同定を蛍光蛋白発現遺伝子組換えマウスを用いたバイオイメージングで解析し、その遺伝子発現パターンや、nicheの同定することで角膜実質の再生の基礎データを構築し、角膜透明治癒を最終目標とする。今回の研究ではより明確な回答を得るため、ケラトサイト特異的発現遺伝子であるケラトカン遺伝子にCreERT2を導入し、ケラトサイトに特化した解析を行う。

3. 研究の方法

Keratocan-IRES2-nls-Cre と Keratocan-IRES2-CreERT2 ノックインマウスの作製をして、2種類のCre reporter mouse、ROSA26mT/mG またはROSA26LacZ、と交配し、それぞれのノックイン遺伝子の機能を解析。CAG-FUCCI2をROSA26に組み込んだ、ROSA26(loxP-NeoR-loxP-CAG-FUCCI2)を作製して、Keratocan-IRES2-nls-Creと交配し、ケラトサイトの再生を観察。

4. 研究成果

Keratocan-IRES2-nls-Cre /ROSA26LacZにより、Keratocan-IRES2-nls-CreのCre発現は胎生期の眼周囲中胚葉細胞と一部の強膜細胞、極一部の角膜内皮細胞、さら

は海馬CA1の錐体細胞に発現していることが解った。Keratocan-IRES2-nls-Cre/ROSA26mT/mGのイメージングにより、ケラトサイトの形状は従来より信じられていたヒト型ではなく、広い細胞質に細長い突起を多数持っている形状であることが解った。角膜上皮欠損により、ケラトサイトにアポトーシスを誘導すると、ケラトサイト消失の状態と再生の状態が観察された。Keratocan-IRES2-CreERT2/ROSA26mT/mGにおいては、タモキシフェンによりほとんどのケラトサイトでflox遺伝子を摘み取ることが可能であることが解った。

ケラトサイトが消失すると、速やかに局所で細胞増殖をおこし、経過により、過剰に増殖してしまうことで、混濁の原因を作っていることが解った。角膜上皮の欠損により、周辺部角膜では、血管の増生をおこすが、ケラトサイトは消失せず、角膜中央のケラトサイト増殖時には、極一部の血管周囲の細胞が増殖周期にはいることが観察された。

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0件)

[学会発表](計3件)

1. ケラトサイト細胞増殖周期のFucci2バイオイメージング. 林康人、大嶋佑介、阪上-沢野 朝子、清成寛、今村健志、大橋裕一

第120回日本眼科学会総会 2016年4月7日(木)~10日(日) 仙台国際センター・東北大学百周年記念会館(宮城県、仙台市)

【緒言】角膜実質の形態保持のためには、ケラトサイトの細胞増殖が不可欠である。

【目的】Cre発現細胞に **Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator 2 (Fucci2)** を発現する

ROSA26(CAG-loxP-pgkNeo-loxP-mVenus-hGeminin(1-110)-IRES2-mcherry-hCdt1(30-120))

(ROSA26-Fucci2) を作製して、Keratocan遺伝子発現時にCre recombinase発現するKeratocan-IRES2-nls-Cre knock-in マウ

ス (KINC)と交配して、ケラトサイトの細胞増殖周期を観察すること。

【方法】ROSA26 の 7kb と 3kb の相同組換えアームの間に CAG-loxP-pgkNeo-loxP- mVenus-hGeminin(1-110)- IRES2- mcherry - hCdt1(30-120)を挿入した gene targeting construct を C57BL/6N 由来の ES 細胞 (HK3i)に導入し、8 細胞期の ICR マウス胎児に移植して、ROSA26- Fucci2 マウスを得た。ROSA26- Fucci2 マウスと KINC マウスを交配して得られた KINC/ROSA26-Fucci2 マウス眼球を角膜上皮擦過前後に共焦点もしくは 2 光子顕微鏡で観察した。

【結果】KINC/ROSA26- Fucci2 角膜上皮擦過前は角膜実質中央、周辺部ともにほぼ全ての細胞核で G1 期を示す mcherry の蛍光を観察した。角膜上皮擦過 48 時間後、角膜実質中央では、S/G2/M 期を示す mVenus の蛍光を多数認めた。周辺部においては脈管の周囲に mVenus の蛍光を認めた。

【結論】角膜上皮擦過により消失したケラトサイトの修復は角膜実質周辺部のみでなく、角膜中央の分裂増殖も寄与している。

2. 緑膿菌感染角膜のバイオイメージング

林康人、岡奈央子、中尾早織、宮本仁志、鈴木崇 大橋裕一 . 第 52 回日本眼感染症学会 2015 年 7 月 10 日(金)・11 日(土) グランフロント大阪 (大阪府、大阪市)

【緒言】角膜の細菌感染症は塗末の検鏡培養や炎症細胞の浸潤から起炎菌の状態を類推することで治療方針を決定しているが、起炎菌がどのようにケラトサイトや免疫細胞などの角膜組織と関わっているかは不明である。

【目的】蛍光標識した緑膿菌を蛍光標識し

たマウスに感染させ、緑膿菌、ケラトサイト及び炎症細胞の動態を経時的に観察すること。

【方法】プラスミドに緑膿菌で発現するプロモーター (pbfr)と蛍光蛋白(TagBFP)を組み込み、エレクトロポレーションで遺伝子を導入する。2 種類の蛍光蛋白でケラトサイトとそれ以外の細胞が識別可能な Keratocan-IRES2-nls-Cre /ROSA26mT/mG (KINC/RTG)マウスに蛍光蛋白導入緑膿菌を接種して、経時的に共焦点顕微鏡により形態を観察する。

【結果】蛍光蛋白の導入が成功した緑膿菌株 (exoU 陽性:細胞毒性型)を KINC/RTG に接種 18 時間後、緑膿菌は上皮や実質浅層に散在し、多数の浸潤細胞の集簇と崩壊を始めたケラトサイトが観察された。接種 72 時間後においては、角膜穿孔の周囲に好中球と考えられる細胞内に、緑膿菌を示す蛍光蛋白が観察され、実質膿瘍内にはケラトサイトを認めなくなっていた。

【結論】角膜の緑膿菌感染は菌数に比べ激しい炎症が起き、実質組織の崩壊を誘導している可能性がある。

3. Keratocan-IRES2-nls-Cre knock-in mouse のバイオイメージング

林康人、阿部高也、清成寛、藤野貴広、大嶋佑介、高平尚子、中尾早織、Chia-Yang Liu、Winston W. -Y. Kao、今村健志、大橋裕一 . 第 119 回 日本眼科学会総会 2015 年 4 月 16 日(木)~ 4 月 19 日(日). ロイトン札幌、さっぽろ芸術文化の館、札幌市教育文化会館.(北海道、札幌市)

【緒言】バイオイメージングにより角膜実質の形態及び機能を解析するためには、ケラトサイト特異的 Cre 発現マウスが有効な手段となりうる。

【目的】Keratocan 遺伝子発現時に Cre recombinase 発現する

Keratocan-IRES2-nls-Cre knock-in (KINC) mouse (CDB1213K) を作製し、Cre reporter mouse (ROSA26mT/mG) と交配して、Cre recombinase 発現部位を同定し、角膜実質の細胞形態を解析すること。

【方法】6.7kb と 3kb の相同組換えアームの間に IRES2-nlsCre-FRT-NeoR-FRT を挿入した gene targeting construct を C57BL/6N 由来の ES 細胞(HK3i)に導入する。PCR と Southern blot で相同組換えが確認できた ES 細胞のクローンを 8 細胞期の ICR mouse 胎児に移植して、KINC chimera (F0) mouse を得る。KINC (F1) mouse を ROSA26mT/mG (Cre recombinase 発現細胞の細胞膜を緑色蛍光、それ以外の細胞の細胞膜を赤色蛍光に識別) と交配して得られた KINC/ROSA26mT/mG 眼球を共焦点もしくは 2 光子顕微鏡で観察する。

【結果】KINC/ROSA26mT/mG 眼球において角膜実質ケラトサイトと強膜線維芽細胞で Cre recombinase の発現を示す緑色蛍光を観察した。角膜実質内の神経、炎症細胞およびリンパ管と角膜上皮及び角膜内皮には赤色蛍光を認めた。

【結論】KINC/ROSA26mT/mG は角膜実質のケラトサイトと神経、炎症細胞を識別することが可能であり、他の間葉系細胞からケラトサイトへの分化誘導の研究の手段となりうる可能性がある。

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 康人 (Hayashi, Yasuhito)
愛媛大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70314953

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

今村 健志 (Takeshi, Imamura)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70264421