

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462690

研究課題名(和文) 骨髄線維芽細胞の注入による角膜実質再生

研究課題名(英文) Bone Marrow Mesenchymal Cell Transplantation for thin Corneal Stroma

研究代表者

大橋 裕一 (Yuichi, Ohashi)

愛媛大学・本部・学長

研究者番号：00116005

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)：本研究では、骨髄線維芽細胞を菲薄化した角膜実質に注入し、治癒させる画期的な医療の基礎的データの収集を目的とし、C57BL/6由来のES細胞を利用した遺伝子標的組換えにより、新たにCAG-FUCCI 2をROSA26に組み込んだ、ROSA26 (loxP-NeoR-loxP-CAG-FUCCI 2)を作製して、Keratocan-IRES2-nls-Creと交配し、骨髄線維芽培養細胞を角膜実質に注入することで、実質内の移植細胞の増殖を観察した。移植された骨髄線維芽培養細胞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。

研究成果の概要(英文)：Bone Marrow Mesenchymal Cell Transplantation for thin Corneal Stroma
ROSA26 (CAG-loxP-NeoR-loxP- mVenus -hGem (1/110) IRES2 mCherry -hCdt1 (30/120)) knock-in mouse lines were newly developed by gene targeting technique using C57BL/6-derived ES cells for tissue specific cell cycle bio-imaging. These mice were mated with Keratocan-IRES2-nls-Cre to get bone marrow mesenchymal cell culture (BMC) . The BMCs were injected into artificial thin cornea stroma. The transplanted BMC proliferation were observed a confocal microscope or a multi-photon microscope in-vivo or ex-vivo. Corneal stromal opacities were appeared two weeks after BMC injection. Over-proliferation of BMCs increase the thickness of corneal stroma, but ruin its clarity.

研究分野：眼科学

キーワード：ケラトサイト バイオイメージング 骨髄線維芽細胞 再生医療 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

)角膜実質に注入された骨髄線維芽細胞がケラトサイトとして働くかは不明である。角膜実質は角膜厚の約90%を占め、透明で強靱なドーム形状を保持するための重要な組織である。角膜実質の菲薄化は感染、外傷、免疫異常、円錐角膜とその類縁疾患など原因は様々であるが、進行すると容易に穿孔し、失明の危機に陥る。角膜穿孔を防ぐ方法は現在のところ角膜移植しかない。角膜移植は確立された方法ではあるが、術後乱視による実用視力不良は避けることができず、拒絶反応など、宿主の免疫の攻撃を受けることで、再移植を余儀なくされる症例も多数存在する。以前より我々の研究グループは角膜実質の再生の研究に取り組んでおり、臍帯血の線維芽細胞や骨髄線維芽細胞のマウス角膜実質内注入により、ケラトカンを発現する細胞が出現するという現象を観察している(Liu et al., J. Cell. Mol. Med. 2012)。しかし、これまでの研究では注入された骨髄線維芽細胞がケラトサイトと同様に角膜実質組織において、扁平な樹枝状の形状を持ち、周囲の細胞とGap junctionを形成して、1型コラーゲンを産生しているかは不明である。細胞の増殖は組織の再生には不可欠である。以前は細胞増殖がおきているかを確認するため、実験動物を安楽死させる必要があり、1つの個体を経時的に観察することは不可能であった。FUCCI (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) は理化学研究所の Sawano 等が開発した、生細胞の細胞周期を蛍光標識でリアルタイムで観察が可能な、画期的な研

究手法である (Sawano et al, Cell. 2008)。現在、FUCCI を用いた個体の発生や細胞の分化、腫瘍発生のメカニズムの解明など、多くの分野で研究が展開されている。FUCCI の遺伝子改変マウスへの応用も、進化を続けており、single allele で mCherry-hCdt1(30/120) と mVenus-hGem(1/110)を発現できる系統や、組織特異的 Cre マウスとの組み合わせにより、mCherry-hCdt1(30/120)または mVenus-hGem(1/110)を発現する系統 (Fucci2 (G1): CDB0229K および Fucci2 (S/G2/M): CDB0230K) が存在する (Abe et al., Development, 2013)。しかし、組織特異的に single allele で mCherry-hCdt1(30/120)と mVenus-hGem(1/110)を同時に発現できるマウスの系統は作成されておらず、実質特異的な観察が困難な場合が存在する。配偶子形成時に floxed 遺伝子が切り落とされる現象は多くの Cre 発現 mouse で観察されるが、single allele に Fucci2 (G1) と Fucci2 (S/G2/M) の両者を組み込むことで、この問題を回避できると予測した。

2. 研究の目的

)骨髄線維芽細胞注入による角膜実質再生は画期的な方法である。この方法の臨床応用は自己の骨髄由来細胞を使用できることから、免疫系を回避できる可能性が高く、有効な治療法となりうる。円錐角膜など、比較的多い病態の根治的治療の基礎的データを収集する。

)Keratocan -IRES2-nlsCre と RTG マウスを交配して得られた骨髄線維芽細胞が

角膜実質内でケラトサイト様細胞に分化し、ケラトサイトと同様の構造と機能を有することをバイオイメージングで証明する。

) single allele 組織特異的 Fucci2 (G1) (S/G2/M) マウスを作成し Keratocan-IRES2-nlsCre マウスと交配して得られた骨髄線維芽細胞がケラトサイト様細胞に分化し細胞増殖する状態を明らかにする。

本研究課題により、作成される single allele 組織特異的 Fucci2 (G1) (S/G2/M) マウスは立体的に複雑な構造を持つ組織であっても、組織特異的 Cre マウスと組み合わせることで、細胞分裂の状態を容易に俯瞰することが出来ることが予測される。発生、組織再生や腫瘍研究など、他のバイオサイエンス研究で使用出来るように基礎的データを集積する。

3. 研究の方法

) 菲薄化した角膜実質への骨髄線維芽細胞注入 する。5-6 週令の Keratocan-IRES2-nlsCre/RTG マウス大腿骨および脛骨より骨髄を採取して、10%FBS-DMEM で 6 経代培養し、骨髄線維芽細胞を回収する。得られた細胞 10^4 個を $2\mu\text{L}$ の PBS で懸濁して、33G 針を用いて角膜実質注入し、2 光子顕微鏡で経過を観察する。この時、Keratocyte のマーカーである Keratocan が発現した細胞は m-EGFP (細胞膜局在型緑色蛍光蛋白)、Keratocyte 様細胞に分化していない細胞は m-tdTomato (細胞膜局在型赤色蛍光蛋白) を発現するため、形態とともに細胞の分化を容易に判別しうる。骨髄線維芽細胞移植のヒト応用のために、菲薄化した角膜実質をクライオで作製し、異種の

血清を除去した、無血清培地による培養の可能性についても検討をする。

) Gene Targeting Vector の作成する。ランダムインテグレーションによる遺伝子組換えマウスは発現ベクターの作成が容易で、マウスの作成も相同組換えが必要ではないので ES 細胞を経ること無く、容易ではあるが、遺伝子挿入部位により、遺伝子発現パターンが異なるため、各系統ごとに発現パターンを検討する必要があり、多大な時間と労力を費やしても、目的のマウスが得られないことがある。ノックインマウスの場合、挿入する部位の遺伝子の発現パターンは既知であり、作成されてたマウスの信頼性が保証されている。今回、Single allele FUCCI のために 2 種類の Gene Targeting Vector を作成する。

ROSA 26 の intron1 に遺伝子を挿入するが、loxP element を配置すると、Cre recombinase が作用していない状態では、Neo 耐性遺伝子と膜発現型青色蛍光蛋白 (mCFP) の stop codon により、mVenus-hGem (1/110) と mCherry-hCdt1 (30/120) は発現しない。Cre recombinase が働いた場合、向かい合わせに配置した mVenus-hGem (1/110) と mCherry-hCdt1 (30/120) の遺伝子の向きが裏返るもの 1/2 の確立で出来る。下流から上流に向かう方向には ROSA 26 遺伝子自体の promoter が働かないため、CAG など動物細胞での発現量が多いとされている promoter を配置する。

IRES2 は 2 つの遺伝子を同時に発現させることを可能にするが、IRES2 の上流の遺伝子に比べ下流の遺伝子は発現量が低下する

ことが解っているため、細胞分裂時の状態をより明確にするため、mVenus-hGem(1/110)を IRES2 より上流に mCherry-hCdt1(30/120)を IRES2 より下流に下流に配置する。

) 相同組換え ES 細胞 (B6 由来) の作成とキメラマウスの作成する。理化学研究所 CDB の指導、協力のもと HK3i cell (C57BL/6 由来 ES 細胞) に上記作製した Gene Targeting Vector を導入し、相同組換え ES 細胞をスクリーニングする。スクリーニングで陽性のクローンのゲノム DNA を用いて Neomycin 耐性遺伝子と 5' arm と 3' arm の外側の配列を probe とした、Southern blot を行い、相同組換えが ROSA 26 の intron1 で正確に行われているか確認する。キメラマウスの作成の作製を理化学研究所 CDB に依頼し、キメラマウスを C57BL/6 と交配して、ROSA26 mVenus -hGem (1/110) IRES2 mCherry -hCdt1 (30/120) マウスを得る。

) ケラトサイト特異的 FUCCI マウスを作製して、ケラトサイトの増殖を観察する。ROSA26 mVenus -hGem(1/110) IRES2 mCherry- hCdt1 (30/120) マウスを Keratocan -IRES2 -nls Cre と交配して得られた Keratocan-IRES2-nls-Cre/ROSA26 mVenus -hGem (1/110) /mCherry -hCdt1 (30/120) の角膜実質の障害モデルを作製して、ケラトサイトの増殖を観察する。

) ケラトサイト培養細胞をタイムラプス観察して FUCCI 蛍光と細胞増殖の関係を確認する。

) 組織特異的 FUCCI 骨髄線維芽細胞移植

する。Keratocan-IRES2-nls-Cre/ROSA26 mVenus -hGem (1/110) /mCherry -hCdt1 (30/120) 骨髄線維芽細胞を C57BL/6 角膜実質注入後の細胞増殖を経時的に観察する。さらに上皮欠損後の骨髄線維芽細胞の動向も観察する。

4 . 研究成果

Keratocan-IRES2-nls-Cre ノックインマウス F1 雄と ROSA26mT/mG による交配により得られた、Keratocan-IRES2-nls-Cre /ROSA26mT/mG はケラトサイトにおいて Cre の発現が確認され、ケラトサイト特異的なバイオイメージングが可能であることが示された。Keratocan-IRES2-nls-Cre /ROSA26mT/mG においては、ケラトサイトの細胞質の形態が従来、信じられていたものとはかなり異なることや、上皮欠損作製後にはケラトサイトが崩壊すること。さらに、上皮欠損作製後の角膜実質深層においては、ケラトサイトの前駆細胞と考えられる丸い突起を周囲に多数出した、類円形の間葉系細胞が分裂して移動し、ケラトサイト様に形状を変化させていく様子が経時的に観察できている。この細胞の分裂を詳細に検討するために、細胞周期のバイオイメージングを可能にする single allele 組織特異的 Fucci2 (G1)(S/G2/M) マウス作製のための、C57BL/6N 由来 ES 細胞の相同組換えスクリーニングにより、ROSA26 に CAG-loxP-pgkNeo-loxP mVenus -hGeminin (1-110) -IRES2 -mcherry -hCdt1 (30-120) の挿入に成功した。相同組換えスクリーニング陽性 37 クローンのうち、10 クローンでサザンプロットでも相同組換えを確認し、そのうちの3つのク

ローン (#15、#28、#38) で 8 細胞期への ES 細胞注入を行った。得られたキメラマウスで 3 クローンとも germline transmission を確認した。

Keratocan-IRES2-nls-Cre ノックインマウス F1 雄と ROSA26 *mVenus* -*hGem*(1/110) /*mCherry*-*hCdt1* (30/120) マウスによる交配により得られた Keratocan -IRES2-nls-Cre / ROSA26 *mVenus* -*hGem* (1/110) /*mCherry*-*hCdt1* (30/120) マウスは角膜上皮欠損によるケラトサイト消失モデルにおいて細胞増殖のバイオイメージングが確認された。ケラトサイト培養細胞では、細胞の突起が収縮して、細胞質に *mVenus* の蛍光蛋白が漏れ出した直後に細胞分裂がおり、分裂直後は *mCherry* の蛍光が弱く、すぐに分裂周期に入る細胞では *mCherry* の蛍光が強くなることなく、*mVenus* の蛍光が強くなっていき、次の分裂に入ることが解った。上皮被覆後の再増殖では局所で増殖周期の細胞の比率が高く、増殖環境が重要であることが示唆された。骨髄線維芽細胞の移植と増殖周期のイメージングを両立させるべく、青蛍光の Cre レポーターマウス (ROSA26mR/mB) の作製した。このシステムでは骨髄線維芽細胞がケラトサイトに分化すると、深赤蛍光から青蛍光に変化しホストのケラトサイトとの関係を解析できると同時に ROSA26 (CAG -loxP -pgkNeo -loxP -*mVenus* -*hGeminin* (1-110) -IRES2 -*mCherry* -*hCdt1* (30-120) と組み合わせることで、細胞増殖も観察できる画期的なものであるが、現時点で、実験は継続中であり、骨髄線維芽細胞増殖周期とケラトサイト分化の関係、ホストのケラトサイトと移

植骨髄線維芽細胞との関係については、解っていない。

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)

) 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)

) 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)

) 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)

[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

大橋 裕一 (Ohashi , Yuichi)

愛媛大学・大学院医学系研究科・学長

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

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()