The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Discovery of Molecular Markers to Discriminate Corneal Endothelial Cells in the Human Body
Author(s)	吉原, 正仁
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61635
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	吉原 正仁
論文題名 Title	Discovery of Molecular Markers to Discriminate Corneal Endothelial Cells in the Human Body （FANTOM5データベースを活用した新規角膜内皮細胞特異的マーカーの同定）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

近年、ドナー不足により、多能性幹細胞を用いた、角膜疾患に対する角膜内皮細胞の再生医療が注目されている。多能性幹細胞は様々な細胞に分化しうるため、角膜内皮細胞を正確に同定する特異的マーカーが必須となる。しかし、既知の角膜内皮マーカーは他の多くの細胞でも発現しているため、これらの発現を基に角膜内皮細胞のみを単離することは困難であった。そこで、本研究では、細胞内における遺伝子の発現状況を網羅的に把握するトランスクリプトームデータを用い、ヒト生体内において角膜内皮細胞特異的に発現するマーカーの同定を試みた。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

ヒト角膜内皮細胞におけるトランスクリプトームデータとして、既報の角膜内皮細胞のRNA-seqデータを解析した。このデータには、3個体の成人(31歳, 56歳, 64歳)および2個体の胎児（胎生16週～18週）由来の角膜内皮細胞における遺伝子発現プロファイルが含まれていた。しかし、56歳の成人由来の検体における遺伝子発現を確認したところ、角膜上皮細胞マーカーの発現を認めたため、この検体には角膜上皮細胞が混在しているものと判断し、以降の解析は残りの4検体の発現プロファイルを用いて行った。一方、比較対象となるヒト生体内の各種細胞におけるトランスクリプトームデータとして、975のヒト由来サンプルの遺伝子発現をCAGE(Cap Analysis of Gene Expression)法により網羅的に解析したFANTOM（functional annotation of the mammalian genome）5データベースを使用した。

まず、角膜内皮細胞に発現する遺伝子として、RNA-seqデータで10FPKM（fragments per kilobase of exon per million mapped fragments）以上発現している10,627の遺伝子を抽出した。更に、将来、目的産物である角膜内皮細胞を生きたままの状態で単離することを考慮し、遺伝子オントロジー（GO）termの定義に基づき、細胞膜に局在するタンパク質をコードする遺伝子を選択したところ、1,494の遺伝子に絞り込むことが出来た。これらの遺伝子について、FANTOM5データベースを参照して初代培養細胞または生体組織における発現量を確認し、5以上の細胞種で10TPM(tags per million)以上発現している遺伝子を除くことにより、マーカー候補を13遺伝子まで絞り込んだ。

これら13遺伝子について、まず、ヒト角膜内皮細胞および22種の全身組織由来のRNAを用いて、定量的PCRによる発現定量を行った。13遺伝子のうち、8遺伝子は角膜内皮細胞以外の組織でも高発現していたため、これらを除外し、最終的にマーカー候補は5遺伝子まで絞り込まれた。次に、ヒト眼球組織におけるこれら5遺伝子の発現定量を行ったところ、いずれも角膜内皮細胞に特異性の高い発現パターンを示した。最後に、これら5つのマーカーについて、ヒト角膜組織切片を用いて免疫組織化学染色を行ったところ、いずれも角膜内皮特異的に染色された。以上の結果から、これら5つのマーカーはRNAおよびタンパク質レベルで角膜内皮細胞特異的に発現していることが示された。

〔総　括(Conclusion)〕

既存のデータを使用したイン・シリコ・スクリーニングにより候補遺伝子の絞り込みを行った後、検証実験により5つの新規角膜内皮細胞特異的マーカーを同定した。これらのマーカーは既知のマーカーよりも極めて特異性が高く、角膜内皮細胞の再生医療において有用であることが期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　吉原 正仁

論文審査担当者		（職）	氏　名
	主　査	大阪大学教授	西田幸二
	副　査	大阪大学教授	不二門尚
	副　査	大阪大学教授	高島成二

論文審査の結果の要旨

申請者はヒト角膜内皮細胞特異的に発現するマーカー分子の同定を目的とし、既報のヒト角膜内皮細胞の遺伝子発現データと、ヒトの多様な細胞における遺伝子発現を網羅的に解析したFANTOM5データベースを比較することで、イン・シリコ・スクリーニングによる候補遺伝子の絞り込みを行った。解析において入念にそのデータの内容を吟味し、適切なデータのみを選択することで、適切な候補を絞り込んだ上で、培養細胞、および生体細胞を用いた検証実験を自ら実施することで、5つの新規角膜内皮マーカーの存在を、RNAおよび蛋白レベルで証明した。これらの遺伝子は既報のマーカーと比較し、ヒト生体内で極めて特異的な発現パターンを示しており、十分な信頼性を持つだけでなく、細胞表面マーカーであるため、生細胞の同定にも使用することが可能であり、従来困難であった角膜内皮再生医療分野において、多能性幹細胞由来の目的産物の純化・品質評価に非常に有用であることが期待される。

よって、本論文を博士（医学）の学位授与に値するものと認める。