

2015 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號	090013
參展科別	醫學與健康科學
作品名稱	抑制 Hippo 途徑做為體外擴增受接觸性抑制之人類角膜內皮細胞以用於移植之方法
得獎獎項	大會獎：三等獎

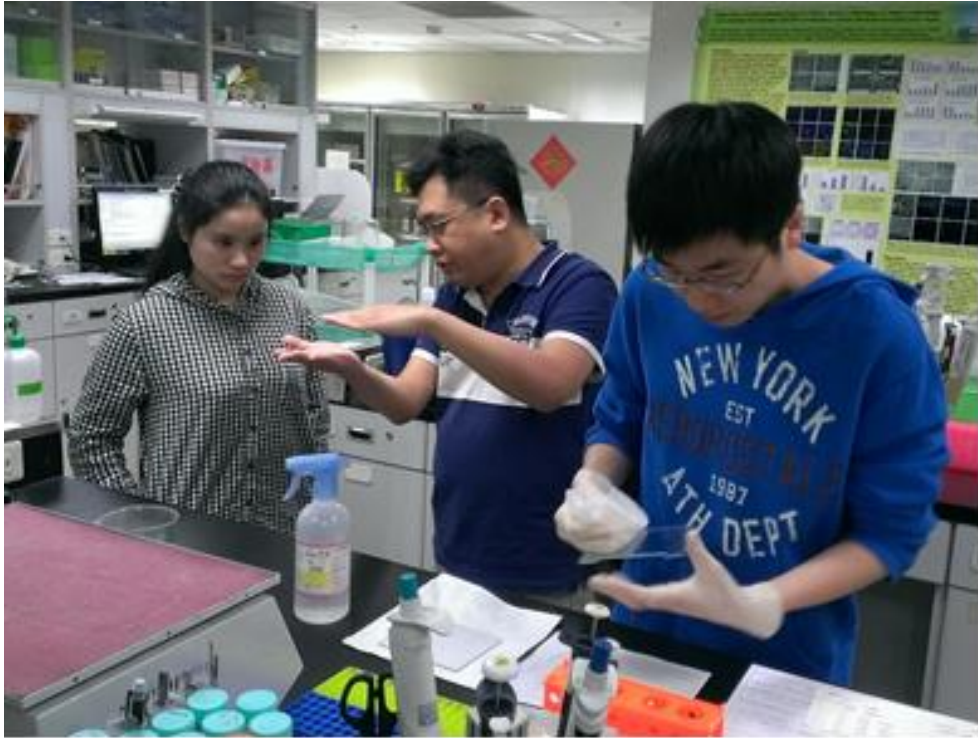
就讀學校 臺北市私立薇閣高級中學

指導教師 鐘勇庭、陳宏吉

作者姓名 馬聖荃

關鍵字 角膜內皮細胞、Hippo 途徑、接觸性抑制

作者簡介



我的名字叫馬聖荃，目前就讀薇閣高中。上國中時開始接觸到生物學，就覺得特別有興趣。為了探索細胞的奧秘，經老師介紹，去年我進入了林口長庚醫院的眼科幹細胞實驗室。感謝陳宏吉教授與薛詒仁博士的熱心指導，使我能參與他們培養人類角膜內皮細胞用於移植的計畫。將近一年從觀摩到參與，之前的假說終於能被證實，真的令人感覺很欣慰。

中文摘要

研究目的

探討經由抑制 Hippo 途徑，誘發受接觸性抑制之人類角膜內皮細胞(HCEC)增生及其機轉之研究。

研究過程

以攜帶 YAP 基因之質體轉染培養之受接觸性抑制之 HCEC，或添加溶血磷脂酸(LPA)後，觀察 HCEC 之 YAP 蛋白核轉移、細胞分化及增生。再利用專一性激酶抑制劑探討可能之訊息途徑。

研究結果

轉染之 YAP 能顯著誘發 HCEC 細胞增生，同時保有其功能。LPA 能誘發 HCEC 的 YAP 蛋白核轉移，進而增進 HCEC 細胞增生。而 PI3K 與 ROCK 抑制劑能顯著抑制 HCEC 的 YAP 蛋白核轉移及細胞增生。

結論

LPA 能誘發 YAP 蛋白核轉移與受接觸性抑制之 HCEC 細胞增生，此現象應與 PI3K 及 ROCK 途徑之活化有關。

應用

此研究提供了一種創新的誘發細胞增生策略以用於移植或細胞療法。

Abstract

Purpose

In the eye, human corneal endothelial cells (HCEC) do not proliferate due to contact inhibition. However, recent studies indicated that these cells have proliferative potential in vitro. Our purpose is to study the effect of inhibiting Hippo pathway on the proliferation of HCEC, and to investigate the underlying molecular mechanism.

Process

Post-confluent B4G12 cells (HCEC cell line) were treated with lysophosphatidic acids (LPA) or transfected with pCMV6-YAP vector. Immunofluorescent staining was performed to study the expression of YAP-1, ZO-1, Na/K-ATPase, SMA and BrdU labeling. Western blot analysis for cyclin D1 and p27^{KIP1}/p21^{CIP1} was performed following YAP over-expression. Selective kinase inhibitors were used to study the possible pathway.

Results

First, we demonstrated the effect of exogenous YAP on inducing cell proliferation in contact-inhibited HCEC cells and post-confluent B4G12 cells. In B4G12 cells, enhanced cyclin D1, suppressed p27^{KIP1}/p21^{CIP1} and G1/S transition were detected upon YAP transfection. Second, we showed that LPA induced nuclear expression of YAP and promotes cell proliferation. Moreover, PI3K and ROCK, but not ERK or p38 were required for LPA-induced YAP nuclear translocation. Cells treated with LPA or YAP maintained normal morphology and function, without undergoing endothelial-mesenchymal transition (EnMT).

Conclusion

LPA suppresses Hippo pathway in contact-inhibited HCEC and B4G12 cells, and promotes their cell proliferation without inducing EnMT, which is related to activation of the RhoA/ROCK and PI3K/AKT pathways.

Application

Our finding provides an innovative strategy to ex vivo cultivate HCEC for further transplantation or cell therapy. Moreover, investigation of YAP signaling in regulation of cell proliferation may unravel the controlling mechanisms of contact inhibition in HCEC

壹、前言

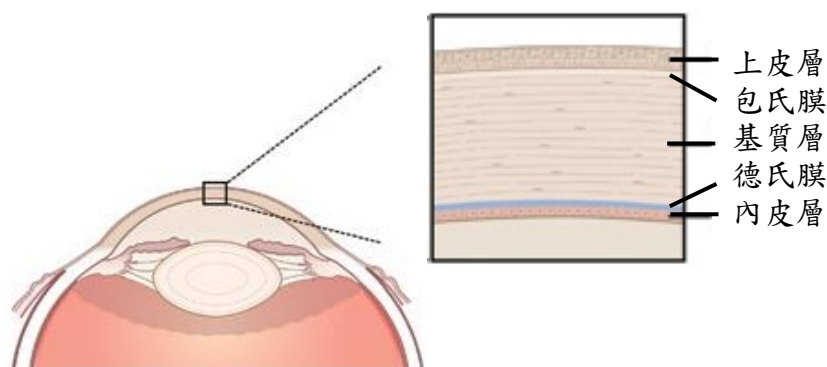
一、研究動機

細胞療法(cell therapy)屬於再生醫學領域(regenerative medicine)中不可或缺之要素。傳統上，當組織缺損或失去功能時，如果組織本身缺乏再生能力便需要以功能正常的捐贈組織來取代。然而，當捐贈來源匱乏時，細胞療法便成為重要的替代方案。

不同於動物，人類的角膜內皮細胞在活體和神經細胞一樣，缺乏再生能力，因此一旦失去功能便需要進行角膜移植。在台灣，由於捐贈角膜來源缺乏，病患通常需要長時間等待捐贈，非常影響生活品質。因此，若能找到體外誘發角膜內皮細胞增生的方法，在缺乏捐贈角膜的國家，或許能利用這些體外培養的細胞作為捐贈角膜之替代來源。

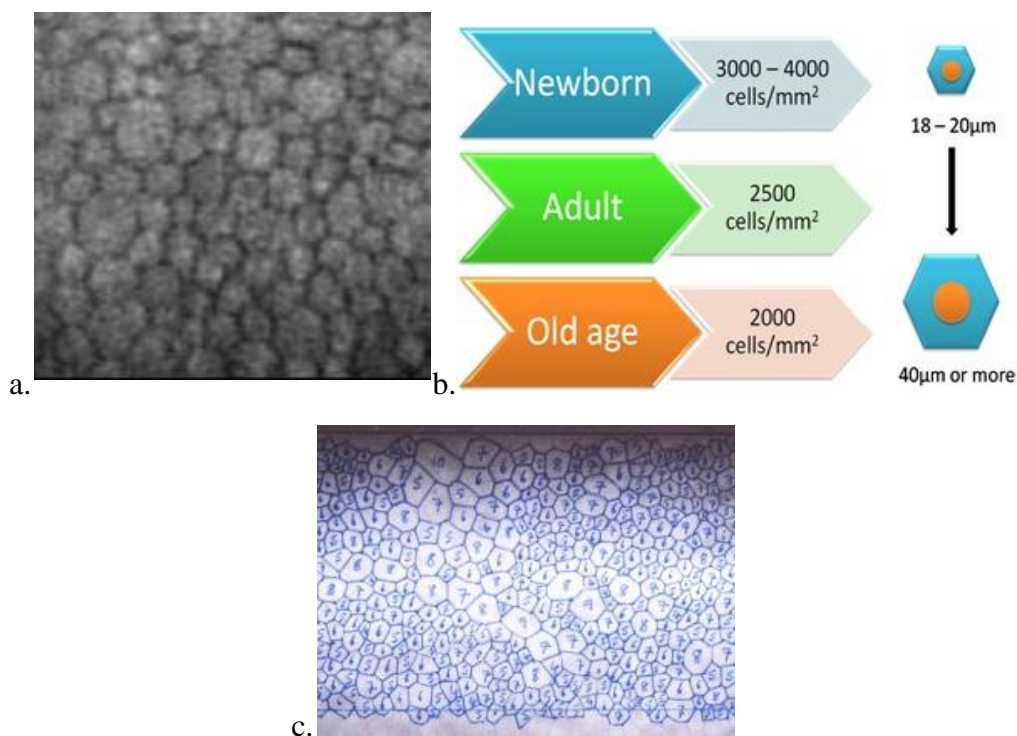
二、研究背景

角膜位於眼球正前方，略向外凸，為鞏膜前端特化而成的透明狀構造。當角膜變得混濁時，光線便無法穿透至視網膜而造成視力變差，甚至會導致失明。角膜由上皮層(corneal epithelium)、包氏膜(Bowman's membrane)、基質層(stroma)、德氏膜(Descemet's membrane; DM)和內皮層(corneal endothelium)所組成(圖一)。角膜內皮層細胞對基質層內含的水分的正常調節是能維持角膜清澈的主因。



圖一、角膜之構造(圖片改編自Cornea Research Foundation of America; www.cornea.org)

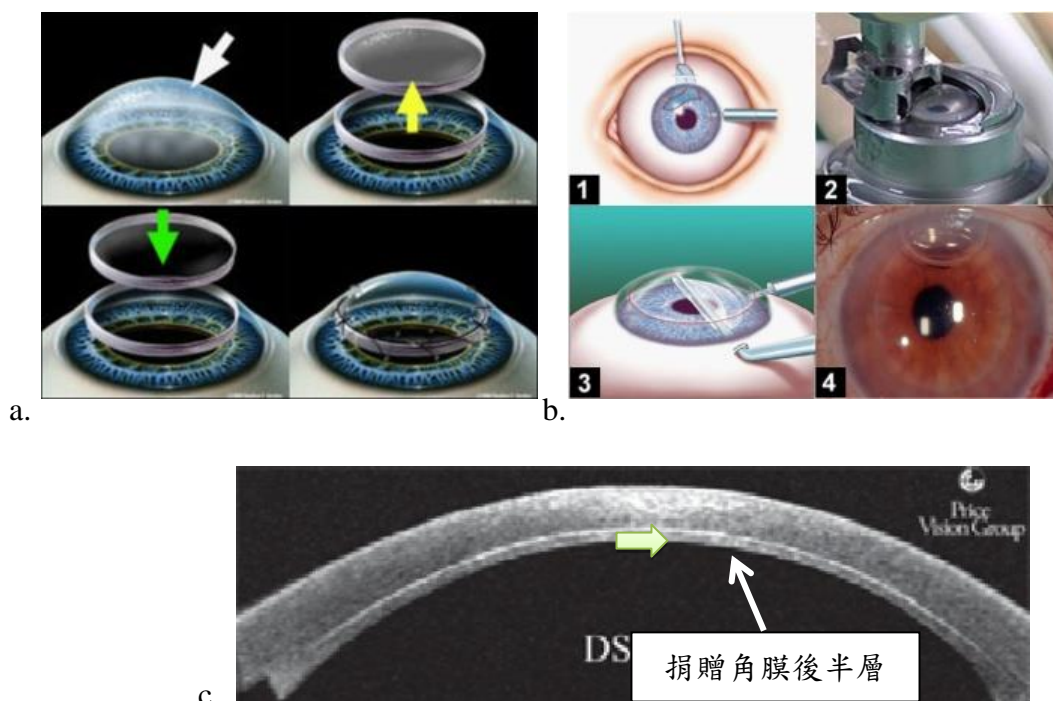
角膜後表面的內皮層由單層的角膜內皮細胞構成，對角膜基質的水含量調節主要是經由 zona occlusion-1 (ZO-1)蛋白所構成的細胞間緊密連結屏障[Iwamoto and Smelser, 1965; Kreutziger, 1976]和 Na-K ATPase 幫浦的離子泵功能[Maurice, 1972; Geroski and Edelhauser, 1984]來維持角膜透明。Na-K ATPase 幫浦可以主動運輸之方式，將水分自角膜基質排到後方的前房(anterior chamber)裡，使眼角膜不會水腫而維持透明。角膜內皮細胞源自神經嵴(neural crest)，從神經外胚層發育而來。人類角膜內皮細胞(human corneal endothelial cell; HCEC)在正常生理情況下不會再增生。剛出生時角膜內皮的細胞密度約為 3,500 ~ 4,000/mm²，隨著年齡增加，細胞密度穩定減少直到 2,000 ~ 3,000 /mm²。當 HCEC 缺損時，鄰近細胞經由細胞肥大、增加覆蓋面積和遷移來填補空缺[Sherrard, 1976; Kaufman and Katz, 1977; Joyce et al., 1990]。當內皮細胞密度低於 1,000 /mm²，角膜內皮層便開始失去水分調節功能(圖二)。



圖二、角膜內皮細胞之型態與生理特性。a. 角膜內皮型態(以非接觸式角膜內皮細胞分析儀拍攝)、b. 年齡與角膜內皮細胞數相關性(圖片引用自[Zavala et al., 2013])、c. 受創角膜內皮之修補模式(圖片引用自www.opticalceu.blogspot.tw)

一旦角膜內皮失去功能(常見於先天性角膜疾病、老化、或白內障手術之傷害)，便導致角膜水腫，傳統上便需要進行全角膜移植(*penetrating keratoplasty*)以回復視力。近十年來，角膜移植有由分層角膜移植取代全層角膜移植之趨勢，亦即只替換角膜受損的部位，而不需全層置換，因此不但可維持角膜之機械強度，更可以降低移植排斥之機會。根據美國眼庫協會的統計 2011 年在美國進行的角膜移植有近半是內皮移植。另外，台灣每年約五百例的角膜移植中也有 60% 是因內皮細胞失去功能，因此對於此類病患逐漸以角膜內皮層移植 (*Endothelial Keratoplasty*) 取代全層角膜移植是很有意義的。

剝除德氏膜之自動化角膜內皮移植 (*Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty; DSAEK*) 手術，是 Gorovoy 醫師在 2006 年發表的角膜內皮移植技術。該方法是將病患的德氏膜和內皮細胞層剝除後，植入預先以角膜板層刀切割好的捐贈角膜的後板層 (包含部分基質層、德氏膜和內皮層)。接受此手術因能減少術後屈光度之變化、傷口癒合更快、維持眼球之完整性、對外力撞擊之抵抗力大增，並降低排斥機率，因此逐漸成為內皮移植的主要手術方式(圖三)。

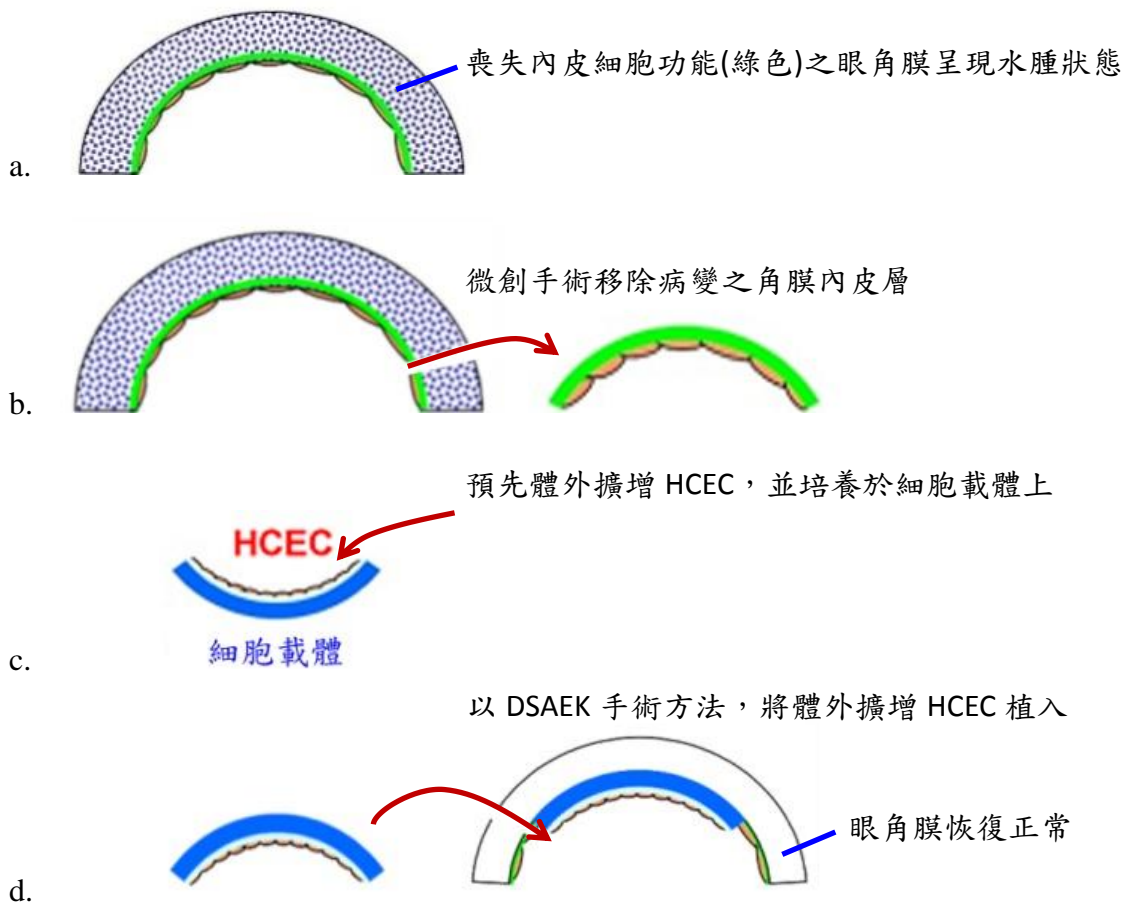


圖三、DSAEK 手術示意圖(說明詳見次頁)。

圖三、 DSAEK 手術示意圖(圖片參見前頁)。

- a. 傳統角膜移植手術流程，先將患者角膜整個切除後再將澄清的捐贈角膜縫入。(圖片引用自 www.govision.mx/servicios/trasplante-de-cornea)
- b. DSAEK 手術流程，(1)以微創手術將患者的失功角膜內皮層刮除，(2)將捐贈角膜以板層刀切割出含有內皮細胞之後板層，(3)將後板層植入前房，(4)將植入之後板層以氣泡固定。(圖片引用自 www.johngoosey.com/aboutDSAEK.asp ; www.healio.com/ophthalmology/cornea-external-disease/news ; www.ocvermont.com/corneal-transplant-DSAEK.php)
- c. DSAEK 手術替換受損角膜內皮後，以光學同調斷層掃描儀(Optical Coherence Tomography)拍攝術後角膜。前板層為受贈者原有之角膜，較薄之後板層則是帶有角膜內皮細胞之捐贈角膜後板層(箭頭)。
(圖片引用自 www.reviewofoptometry.com/)

然而，即便是 DSAEK 手術仍須有捐贈角膜之來源。由於在亞洲捐贈角膜長期處於短缺狀態，而捐贈角膜普遍有年紀老化和內皮細胞密度較少的現象，因此發展體外擴增 HCEC 的培養技術以供作移植有其重要性。鄰國日本是目前全世界進行培養 HCEC 移植最積極的國家。2009 年 Honda 等人已報導將 HCEC 培養在去內皮細胞的角膜板層上，以 DSAEK 手術法將該細胞產物植入兔眼內，使已浮腫之眼角膜再次恢復澄清 [Honda et al., 2009]。將培養之 HCEC 以 DSAEK 手術法植入眼內之方法，稱之為 c-DSAEK (culture-based DSAEK) (圖四)。



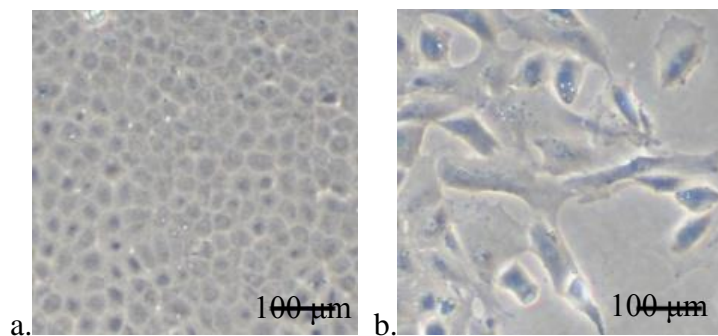
圖四、體外擴增 HCEC 以 DSAEK 手術方法植入之示意圖(圖片改編自 www.uniklinik-freiburg.de)。

雖然 HCEC 在體內的有絲分裂受抑制(mitosis block)，仍可在離體培養環境下誘發其增生。由於 HCEC 在發育上源自外胚層神經嵴，以生長因子如鹼性纖維母細胞生長因子(bFGF)誘發增生的同時，容易發生類似上皮細胞轉型成間質細胞的現象(Endothelial to mesenchymal transition; EnMT)。一旦 HCEC 轉型成間質細胞，就會失去其細胞間障壁和 ATPase 幫浦的功能，而移植已轉型之內皮細胞是沒有功能的。因此成功的培養移植用 HCEC 必須先確保能保持其原有的型態和功能[Mimura et al., 2005]，如果能成功培植保有功能的內皮細胞層就有機會利用類似 DSAEK 的技術重建受損角膜。

Li 等人曾嘗試將剝離下來的德氏膜(含角膜內皮層)以膠原蛋白酶處理，取代過去以 EDTA、trypsin 或 dispase II 的處理模式，此法取得的 HCEC 因保有細胞間連結(junction)和基

底層因此呈現團塊狀。將 HCEC 團塊置於含血清培養液中會在 24 小時內貼附於培養皿上並逐漸展開。免疫細胞染色結果顯示，以膠原蛋白酶處理取得的細胞在離體培養時較能保有原來的細胞間連結[Li et al., 2007]，並避免 EnMT 現象的發生。然而因其使用的培養液僅含 2ng/mL 的 epidermal growth factor (EGF)，因此細胞增生較慢擴增效率不佳。

我們參照 Joyce[Senoo et al., 2000]、Kinoshita[Koizumi et al., 2008]、和 Tseng[Li et al., 2007] 等主要 HCEC 研究學者的配方，設計了 HCEC 的培養流程。目前雖然可培養出保有結構和功能的內皮細胞層，然而仍需克服在團塊展開邊緣細胞密度低的區域容易產生 EnMT 的問題(圖五)。如何在促進 HCEC 增生的同時，避免 EnMT 的發生，是目前學界仍在探討中的課題。

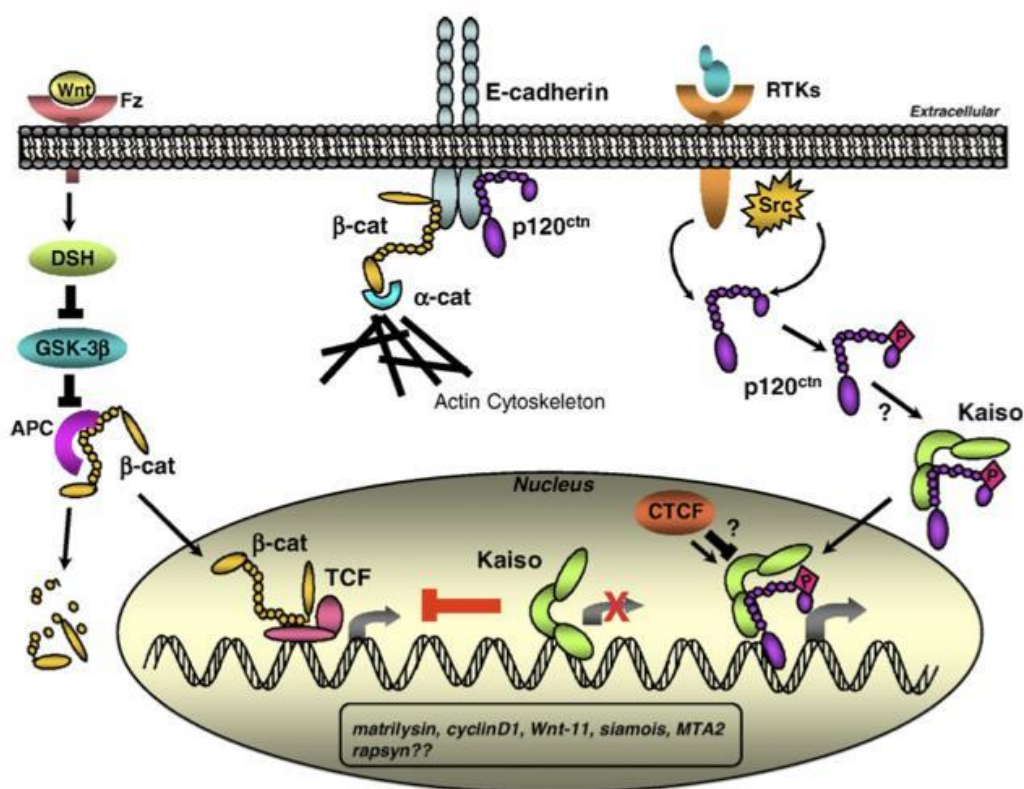


圖五、離體培養之人類角膜內皮細胞型態。a. 靠近團塊中心的 HCEC 型態維持和體內組織相似的多邊形型態、b. 遠離團塊中心的 HCEC 發生 EnMT，呈現間質細胞型態。

HCEC 的增生在體內同時受到細胞外調控因子(例如：細胞間連結和生長因子)和細胞內調控因子(例如：蛋白質磷酸酶和去磷酸酶)的調控[Jampel et al., 1990; van Setten et al., 1996; Chen et al., 1999; Joyce et al., 2002; Joyce, 2003]，因此關於誘導離體培養 HCEC 增生的研究多根據此來發展。

接觸性細胞生長抑制(contact inhibition of cell growth)是正常貼附型細胞維持組織恆定的基本特性，否則細胞將像癌症生長不受控制。Senoo 等人曾觀察在 10%胎牛血清的培養環境中長滿的 HCEC 停止增生，然而當細胞間接觸(cellular contact)被 EDTA (二價離子螯合劑)破壞時細胞很快地恢復增生[Senoo et al., 2000]。

Cadherin 是構成細胞間連結(adherens junctions, AJs)的主要分子，參與接觸性細胞生長抑制的調控[Lampugnani et al., 1997]。Cadherin 細胞質的部分連結 β -catenin，當 AJs 被破壞會釋放 β -catenin 並產生核轉移，進而活化細胞週期。Cadherin 的細胞質部分也會和 p120-catenin 連結，p120-catenin 的核轉移能解除來自 Kaiso (屬於 BTB/POZ-ZF 轉錄因子家族)的增生抑制作用(圖六)。



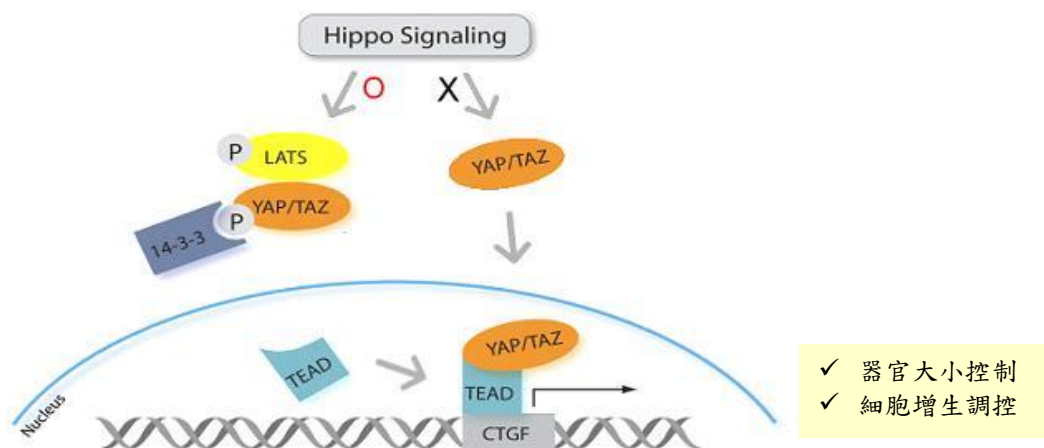
圖六、Cadherin 相關路徑參與細胞增生調控 (圖片引用自[Daniel, 2007])

Zhu 等人曾觀察到在 HCEC 中， β -catenin 的核轉移在誘發細胞增生的同時也會造成細胞的 EnMT 現象，而 p120-catenin 的核轉移能在不產生 EnMT 的狀態下誘發細胞增生[Zhu et al., 2012]。由於 Zhu 等人是以轉染 p120-catenin siRNA 的方式造成 p120-catenin 核轉移，而此法在臨床應用上有其安全性考量。因此我們希望能找到其他方法誘發 HCEC 增生。

Zhu 等人在以轉染 p120-catenin siRNA 誘發 HCEC 增生的同時，除了觀察到 p120-catenin 的核轉移，同時也觀察到 Hippo 路徑被抑制的現象。由於 Hippo 路徑原本就被了解與細胞接觸性增生抑制有關，因此我們希望能證實是否能利用此機制誘發 HCEC 增生。

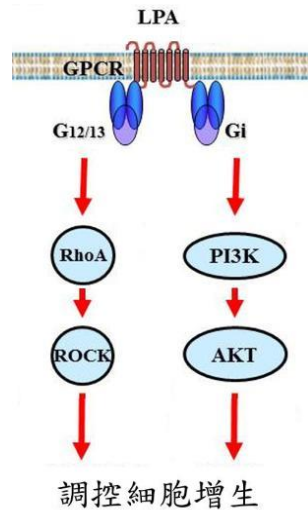
Hippo 路徑最早在果蠅模式中被發現，至最近 20 年開始被廣泛研究。從器官大小調控相關研究開始[Pan, 2007; Saucedo and Edgar, 2007]，至今此路徑在細胞增生、癌症形成等領域中逐漸被廣泛地了解[Zeng and Hong, 2008; Pan, 2010]。在胚胎發育過程中，器官的大小有其特定的尺寸。相關調控很明顯的也可以在組織缺損再生的過程中被觀察到。例如部分肝切除後，肝細胞開始快速分裂以增加再生肝的大小。在到達原本大小後，細胞停止分裂以確保肝的再生不會過度生長[Fausto et al., 2006]。

和果蠅模式類似，在哺乳動物中，細胞間接觸(cellular contact)會活化 Hippo 途徑，使 LATS1/2 蛋白活化，進而磷酸化細胞質中的轉錄因子 YAP1，使得 YAP 與 14-3-3 蛋白結合。此結合會使 YAP 被限制在細胞質，並進而產生蛋白質降解 (protein degradation)。抑制 Hippo 途徑會使 YAP 去磷酸化，進而轉移入細胞核內，與轉錄因子 TEAD 形成複合物後與基因啟動子結合，調控相關下游基因表現，進而調控細胞增生等生理現象[Zhao et al., 2010](圖七)。



圖七、Hippo 途徑參與細胞增生調控 (圖片改編自[Habbig et al., 2011])

近年來 YAP 的上游調控因子已逐漸被探討與了解[Avruch et al., 2012]，其中包含溶血磷脂酸 lysophosphatidic acid (LPA) [Cai and Xu, 2013]。LPA 是一種源自細胞膜的天然磷脂化合物，長久以來被證實與細胞貼附、爬行和增生調控有關[Jalink et al., 1994; Tigyi, 2001]。在角膜表皮細胞，LPA 可經由 PI3K/AKT 途徑調節細胞增生，進而促進傷口癒合[Xu et al., 2007]。此外，LPA 亦已被證實能經由 G-coupled receptors (GPCR)/ROCK 途徑抑制 LATS1/2，造成 YAP 的核轉移並活化其下游基因[Yu and Guan, 2013] (圖八)。雖然在 HCEC 曾被觀察到有 LPA 受器[Wang et al., 2002]，然而其是否會影響 YAP 甚或參與增生調控至今仍未被證實。



圖八、LPA 相關訊息傳遞途徑。(圖片改編自[Nakada et al., 2011]，PI3K 途徑部分參考[Gayral et al., 2006])

三、研究目的

本研究嘗試探討 YAP 核轉移是否會活化受接觸性抑制之 HCEC 增生，並嘗試利用 LPA 誘發 YAP 核轉移現象，並且在擴增 HCEC 的同時避免 EnMT 發生。藉此研究不僅可使我們對 HCEC 生長之調控有進一步了解，亦可應用於實現 C-DSAEC 之再生醫學治療技術，希望此基礎研究成果能有助於開發新穎組織工程方法，而在角膜再生醫學領域作出具體貢獻。

貳、研究方法

一、細胞培養

本研究使用取自角膜移植後的剩餘檢體長出之初代 HCEC，事前已獲得醫學倫理暨人體試驗委員會(IRB)審查通過試驗許可。由於檢體來源取自「去聯結化」的美國眼庫進口眼角膜，衛生署准予不需要取得捐贈同意書。我們將德氏膜連同角膜內皮細胞層剝下後，以膠原蛋白酶去除德氏膜後取得 HCEC 團塊。接著將細胞團塊置於預先塗抹 FNC(fibronectin coating mix) 之培養皿上。細胞以含有 10%胎牛血清之 supplemental hormonal epithelial medium (SHEM)培

養,該培養液含有相同比例 HEPES-buffered DMEM 及 Ham's F12 培養液,另含 0.5% DMSO、20 ng/mL mouse epidermal growth factor、10 ng/mL mouse basic-fibroblast growth factor (bFGF)、5 mg/mL insulin、5 mg/mL transferrin、5 ng/mL selenium、0.5 mg/mL hydrocortisone、50 mg/mL gentamicin、及 1.25 mg/mL amphotericin B。培養液每兩天更換一次。

本研究使用之角膜內皮細胞株(B4G12 cell line)購自 Creative Bioarray, NY,細胞以含有 2% 胎牛血清,另含 10 ng/mL EGF 之 Human endothelium serum free medium (HESFM)培養。培養液每兩天更換一次。

二、 YAP 表現載體和 siRNA 的轉染(transfection)

HCEC 培養 7 天後先將培養液置換為 Opti-MEM 隔夜, B4G12 細胞則是等待其長滿四天後再將培養液置換為 Opti-MEM 隔夜。兩種細胞皆利用 lipofectamin 2000 試劑,將 5 µg/mL 的 YAP 表現載體或是 50 nM 的 YAP siRNA 轉染入細胞內。待細胞轉染 6 小時後更新培養液,之後繼續培養並進行後續分析。

三、 免疫螢光染色(Immunofluorescence)

我們以免疫細胞螢光染色法觀察蛋白質在細胞的表現及表現位置。將細胞培養於 8-well chamber slide 上,以 4% formaldehyde 固定 15 分鐘後以冰磷酸緩衝鹽溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗去固定液。再以 0.2% Triton X-100 處理 15 分鐘,洗去細胞膜脂質後先加 5% 牛血清白蛋白作用 30 分鐘阻斷非特異性結合,再將初次抗體於室溫下作用 1 小時(表一),然後加入二次抗體室溫作用 30 min.,再以 Hoechst 33342 染核並封片。最後以免疫螢光共軛顯微鏡(TCS SP2-MP system; Leica)檢查標本。

抗體名稱	來源	稀釋 倍率 (IHC)	稀釋 倍率 (WB)	廠牌
YAP	rabbit polyclonal	1:100	1:1000	Cell Signaling
histone H3	rabbit polyclonal		1:1000	Cell Signaling
p-AKT (Thr308)	rabbit monoclonal (clone 244F9)		1:1000	Cell Signaling
p27 ^{KIP1}	rabbit polyclonal		1:200	Santa Cruz Biotechnology
p21 ^{CIP1}	rabbit polyclonal		1:200	Santa Cruz Biotechnology
cyclin D1	mouse monoclonal (clone CD1.1)		1:1000	Abcam
BrdU	mouse monoclonal (RPN20Ab)	1:100		Amersham, GE Healthcare
ZO-1	mouse monoclonal (clone ZO1-1A12)	1:100		Chalfont St Giles
Na/K-ATPase	mouse monoclonal (clone C464.6)	1:100		Upstate, Millipore
GAPDH	mouse monoclonal (clone 6C5)		1:10000	Chemicon, Millipore
RhoA	rabbit polyclonal		1:1000	Thermo Scientific

表一、抗體使用種類、來源、稀釋倍率與廠牌表列

IHC: 組織免疫染色法; WB: 西方墨點轉漬法

四、抽取蛋白質(Protein Extraction)

(一) 抽取核蛋白

我們使用 Panomics 公司的 Nuclear Extraction Kit (AY2002)。該 kit 先使用低張溶液(Buffer A)漲破細胞，去除細胞質碎片後，再以高張溶液(Buffer B)處理，使得細胞核內的蛋白質被滲透壓擠出細胞核外。

於實驗前先配置 Buffer A 低張溶液(2.5 mL 1X Buffer A, 25 μ L 100 mM DTT, 25 μ L 100 mM DTT, 25 μ L Protease Inhibitor, and 25 μ L Phosphatase Inhibitor)，將這些成分輕輕地混合均

勻置於冰上。將培養細胞以預冷之 PBS 洗去培養液後倒入適量 Buffer A 溶液，置於冰上等待 15 分鐘。再用刮勺將細胞刮離培養皿後連同溶液移到預冷的離心管中，在 4°C 14000xg 下離心三分鐘。倒去上清液，底部即為細胞核的沉積。再加入 150 μ L of Buffer B (145.5 μ L 1X Buffer B, 1.5 μ L Protease Inhibitor, 1.5 μ L Phosphatase Inhibitor, 1.5 μ L 100 mM DTT)，用渦流發生器 (vortex generator) 最高速 10 秒將其打散。將離心管置於冰上一小時，期間每 20 分鐘搖晃一次。結束後在 4°C 14000xg 下離心 5 分鐘，再將上清液裝到另一個乾淨的管子中，此即為組織細胞之核蛋白溶液。

(二) 抽取總蛋白質

用冰上預冷過的 1X PBS 將細胞清洗後浸置於 Tissue Cells Protein Protein Extraction Reagent (T-PER) 蛋白質萃取液 (2.5 mL T-PER, 25 μ L Protease Inhibitor, 25 μ L Phosphatase Inhibitor) 10 分鐘。以刮勺將細胞刮離培養皿後連同溶液集中於 1.5 mL Eppendoff 離心管後，於冰上用超音波震盪儀將細胞膜打破。4°C 下離心 15 分鐘，上清液即為懸浮的細胞總蛋白質溶液。

(三) 蛋白質定量

將 5X Coomassie brilliant blue，加水稀釋到 1X。將 10 μ L 待測標本稀釋 20 倍後，再加入 200 μ L 的 1X Coomassie brilliant blue 進行 Protein 檢測。將 2 mg/L 的白蛋白標準液 (albumin standard) 稀釋成 0.2mg/L、0.1mg/L、0.05mg/L、0.025mg/L 等梯度濃度以供比較。將待測的蛋白質樣品加到 96 孔盤進行檢測。以 Megellan 檢測其 595 nm 波長吸光值後，用 Excel 軟體計算出原始濃度。

五、西方墨點轉漬法 (Immunoblotting)

將蛋白質樣品經過定量後和 6 倍的 protein loading dye 混合隔水加熱 4 分鐘後置於冰上。以 10% SDS-polyacrylamide gels 電泳分離。各組取 10 μ g 的蛋白質設定電流 20 mA 進行電泳，約一個半小時後取下凝膠後，依 3MM 濾紙、凝膠、nitrocellulose (NC) membrane、3MM 濾紙的順序由上而下疊好，趕出因覆蓋時所產生的氣泡後將此組合放置於半乾式轉漬槽中。設

定電流(1 mA/cm²)，1 小時後可將蛋白質由凝膠轉漬到 PVDF 膜上。PVDF 膜加入 blocking reagent (5% BSA in 1x TTBS)1 小時後，浸泡一抗 IgG 後置於 4°C 冷藏櫃中。隔日以 TTBS 清洗三次，再加入二抗 IgG-HRP 室溫 1 小時後同樣清洗三次，使用 GE Healthcare Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents and Analysis System Kit 進行顯影。取 Reagent 1 和 Reagent 2 各 1mL 混合均勻，將 NC membrane 兩面沾取混合均勻的液體，靜置在黑暗中待其作用 1 分鐘。在暗房中曝光顯影，再以 Kodak 沖片機進行沖片。

六、測量細胞增生 (Measurement of cell proliferation)

(一) BrdU 標記染色法

Bromodeoxyuridine (BrdU) 是胸腺嘧啶(thymidine)之相似物，DNA 複製時可被併入核酸鏈。因此 BrdU 標記可用為確認細胞具有增生能力的指標。我們將不同處理組別的培養細胞以 BrdU 標記 24 小時，接著以冰 PBS 洗去培養液後，以 100% 冰甲醇固定細胞 10 分鐘，先加 5% 牛血清白蛋白作用 30 分鐘以阻斷非特異性結合，再將 anti-BrdU 單株抗體與 DNase-1 混合，室溫下作用 1 小時。然後加入小鼠 Cy3 (Chemicon) 二次抗體 (1 : 100) 室溫作用 30 min.，再以 Hoechst 33342 染核並封片。然後以免疫螢光共軛顯微鏡(TCS SP2-MP system; Leica)檢查標本。

(二) 細胞數計算法

我們直接以細胞記數法評估 B4G12 細胞增生狀態。每個 35-mm 培養皿中置入 8.8×10^5 個細胞，根據試驗需求進行不同處理後置換於無血清培養液中。接著分別於第 1 至 5 天，將細胞以 0.5 mL trypsin 處理後移入 9.5 mL 的 isotone 中，再以細胞記數儀 Coulter counter (Beckman-Coulter, Brea, CA)計算細胞數，每個組別皆進行 3 重複測試。

七、細胞週期分析(Cell cycle analysis)

於 35-mm 培養皿中置入 8.8×10^5 個 B4G12 細胞，根據試驗需求進行不同處理後置換於無血清培養液中。細胞先以 trypsin 處理後移入微離心管後以 600 g 離心 5 分鐘。去除上清液後

加入 300 μ L PBS 和 700 μ L 的無水酒精，於-20 $^{\circ}$ C 中放置隔夜。次日，細胞離心去除上清液後加入 1 mL PBS (內含 10 μ g/mL propidium iodide 和 1 mg/mL RNase A，於 37 $^{\circ}$ C 中放置一小時後以流式細胞儀 FACStar (Becton–Dickinson, Mountain View, CA) 分析 488 nm 波長的螢光後，以 CELLQuest 軟體 (BD Biosciences, San Jose, CA)分析細胞週期。

八、活性態 RhoA 分析(GTP-bounding RhoA assay)

由於 RhoA 激酶的調控不是走磷酸化機制，而是根據其與 GTP 或 GDP 結合的種類調控其活性，因此 RhoA 激酶的活性態是根據其 GTP 結合程度而評估。為進行此分析，每組細胞經個別處理後蒐集 1 mg 蛋白樣品，接著以 RhoA Pull-Down and Detection Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL)分離出 GTP 結合態 RhoA 後，以西方墨點轉漬法檢測各組之 GTP 結合態 RhoA 含量。

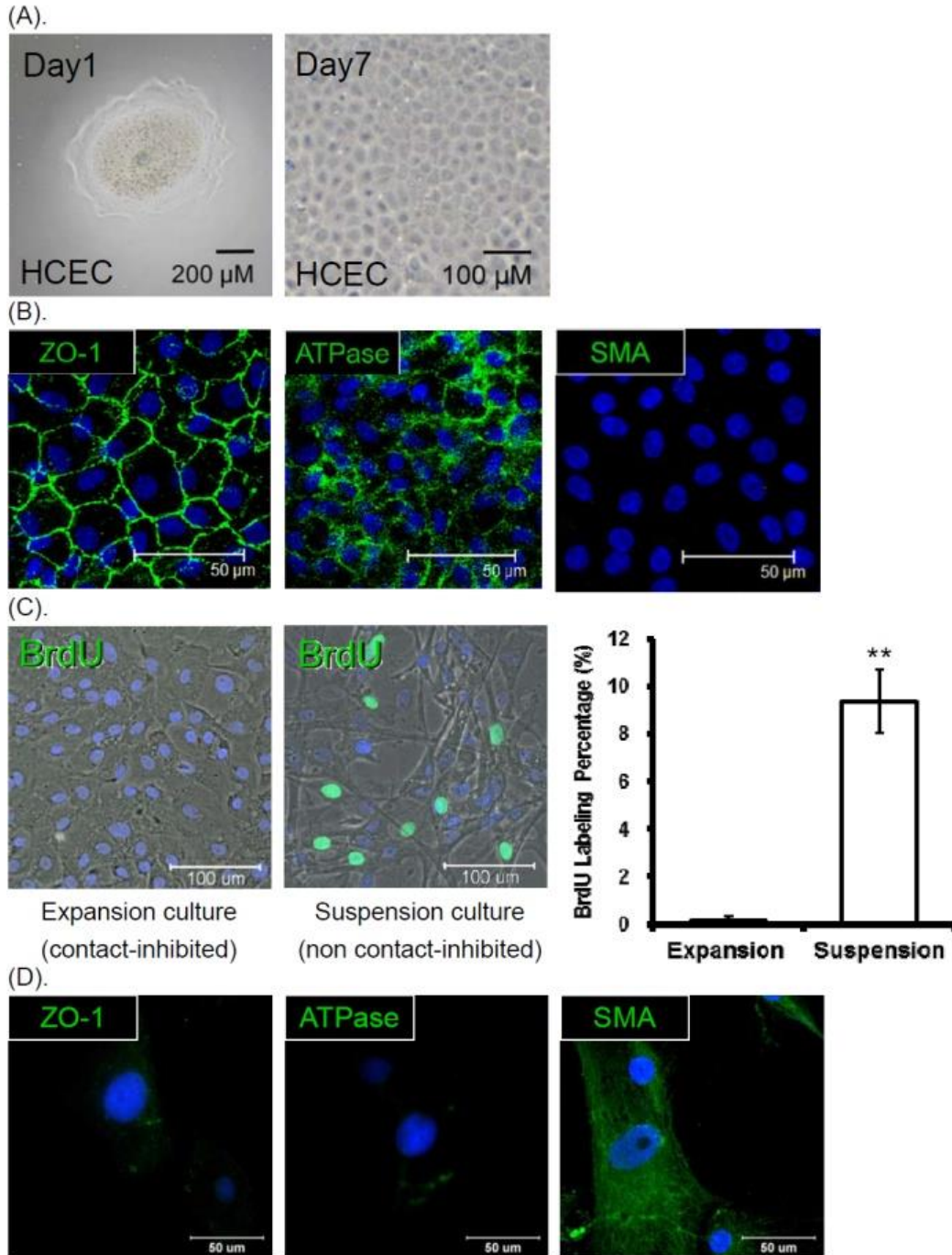
九、統計分析

所有的試驗皆進行至少三重覆，數據以平均值 \pm 標準差表示。所有數據皆以 Microsoft Excel ver. 2010 (Microsoft, Redmont, WA)計算 Student's unpaired t-test 以評估差異， $p < 0.05^*$ 和 $p < 0.01^{**}$ 代表組別間有顯著差異。

參、研究結果與討論

一、結果

(一) 接觸性抑制對角膜內皮細胞增生的影響

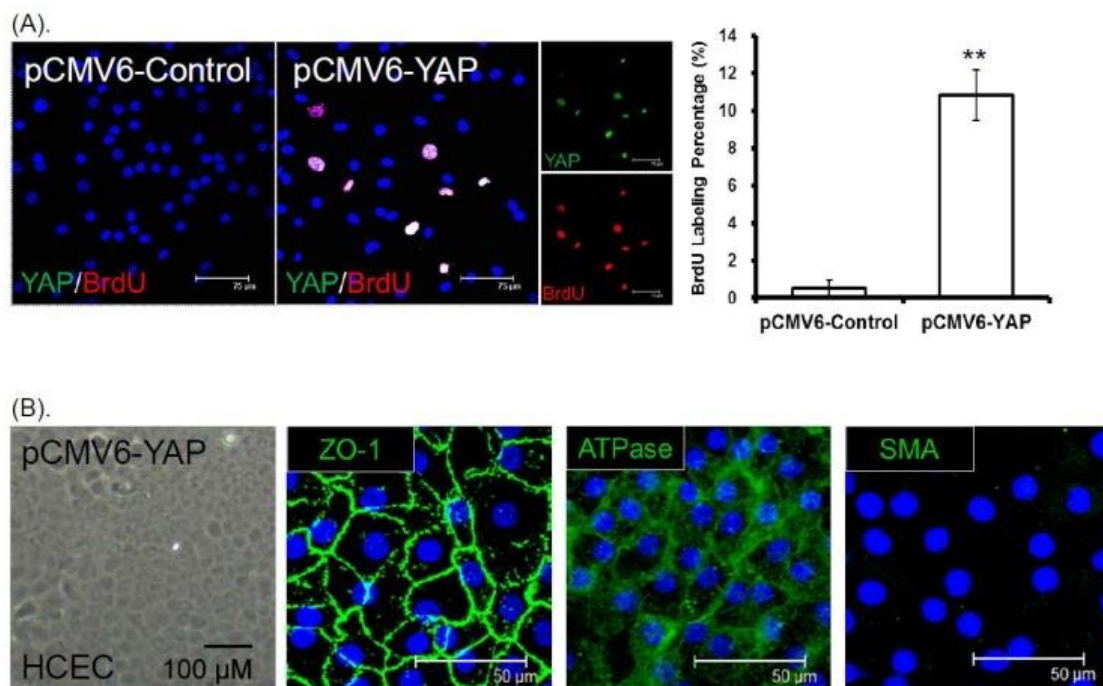


圖九、接觸性抑制對 HCEC 細胞增生的影響 (A). HCEC 細胞團塊於離體培養 7 天後可形成 HCEC 細胞單層 (B). HCEC 細胞單層的功能性 Na-K-ATPase、結構性蛋白 Zona occludens-1 (ZO-1)與 EnMT 標記蛋白 smooth muscle actin (SMA)的細胞螢光染色觀察，細胞核以 Hoechst 33342 標記 (C). HCEC 細胞單層培養與 HCEC 分散培養的型態與 BrdU 標記染色比較 (D). HCEC 分散細胞培養的 Na-K-ATPase、ZO-1 與 SMA 的細胞螢光染色觀察。

角膜內皮層從角膜內側連同德氏膜一起剝下，以膠原蛋白酶分解隔夜後會形成 HCEC 團塊。在有血清的培養液中，細胞團塊會貼附於 FNC coating 的培養皿上，並在離體培養七天後散開為單層細胞 (圖九 A)。HCEC 單層細胞的細胞間互相貼靠，並保有相似於體內組織的多邊形型態，同時免疫螢光觀察 Na-K-ATPase 和 Zonular occludin-1 (ZO-1)的結果顯示 HCEC 單層細胞保留有幫浦功能和細胞間障壁(tight junction) (圖九 A、B)。

接著我們以 BrdU 標記法觀察細胞增生，HCEC 單層細胞的 BrdU labeling 數目很稀少，顯示其增生受到接觸性抑制(contact inhibition)。相較之下，以 Trypsin/EDTA 將細胞打散後(分散式培養；suspension culture)，HCEC 顯著有較多的細胞進行增生(圖九 C)。雖然分散式培養的 HCEC 較多進行增生，然而從相位差顯微鏡觀察形態與免疫染色結果，發現分散式培養的 HCEC 會發生 EnMT，轉型成纖維母細胞狀的細胞(圖九 C)，表現 smooth muscle actin (SMA)，但不再表現 ATPase 與 ZO-1 (圖九 D)。

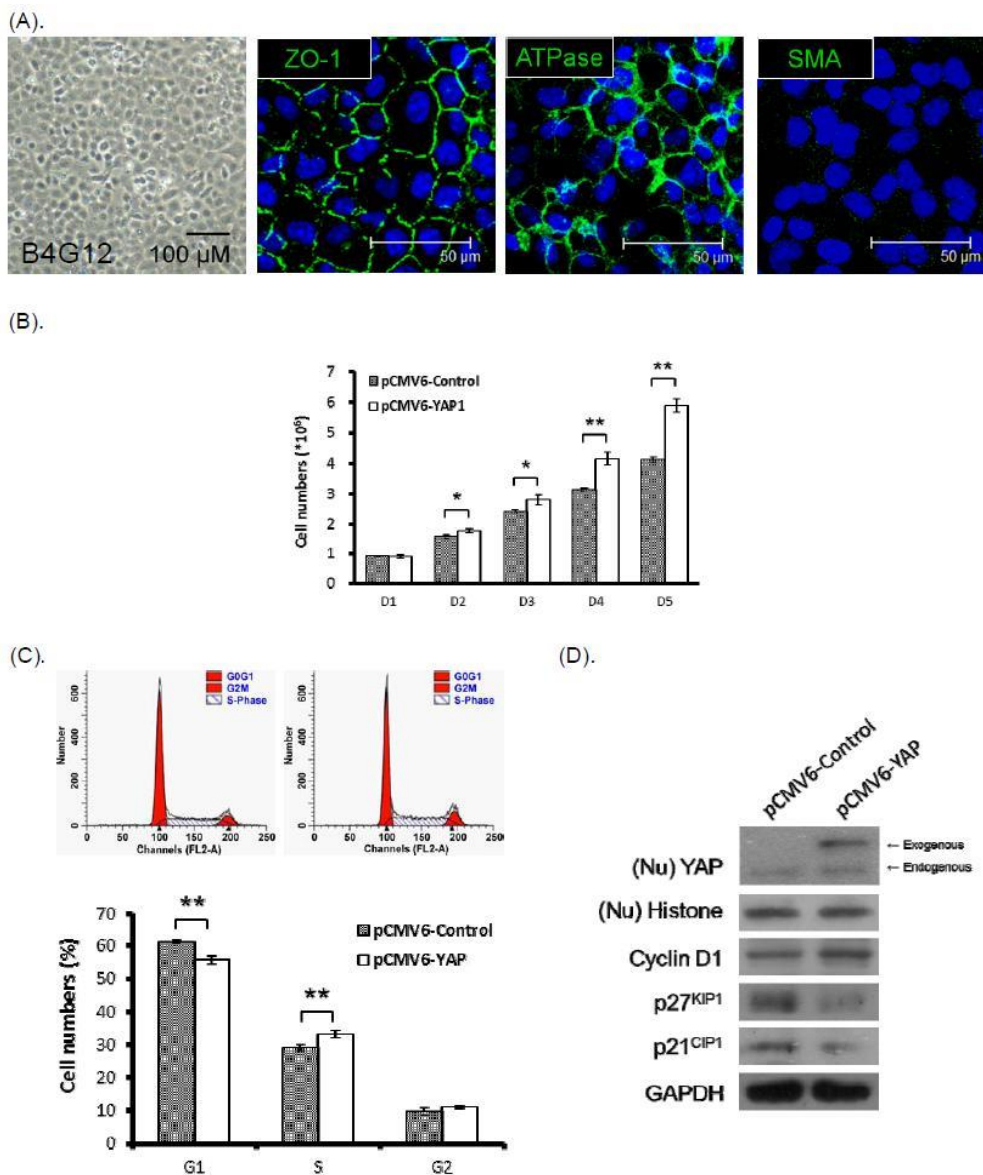
(二) 轉染表現的 YAP 會促進受接觸性抑制的 HCEC 增生



圖十、轉染表現的 YAP 對受接觸性抑制的 HCEC 增生之影響 (A). HCEC 單層細胞分別轉染 YAP 表現載體 (pCMV6-YAP)或對照組載體(pCMV6-Control)後，以 BrdU 標記進行增生的細胞後用免疫螢光細胞染色法觀察 YAP(綠色)和 BrdU 標記細胞(紅色)表現位置 (B). 以細胞螢光染色觀察轉染表現 YAP 對 HCEC 單層細胞的 ATPase、ZO-1 與 SMA 蛋白表現的影響。

YAP 在許多細胞類型都已被證實能促進細胞增生。為了解 YAP 對促進 HCEC 增生的影響，我們將 HCEC 單層細胞轉染 pCMV6-YAP 質體 72 小時，另外同時用 pCMV6-AC-GFP vector (pCMV6-Control)作為對照組。接著以免疫螢光法觀察 YAP 和 BrdU 標記之細胞。如圖十 A 顯示，轉染 pCMV6-YAP 會顯著增加 HCEC 單層細胞的 BrdU 標記數目，且表現轉染 YAP 的細胞與 BrdU 標記的細胞位置相同，暗示轉染的 YAP 可以誘發受接觸性抑制的 HCEC 單層細胞進行增生。另外，免疫染色觀察 Na-K-ATPase、ZO-1 和 SMA 的結果顯示轉染 YAP 不會觸發 HCEC 單層細胞進行 EnMT (圖十 B)。

(三) 轉染表現的 YAP 經由活化細胞週期促進 B4G12 細胞株增生



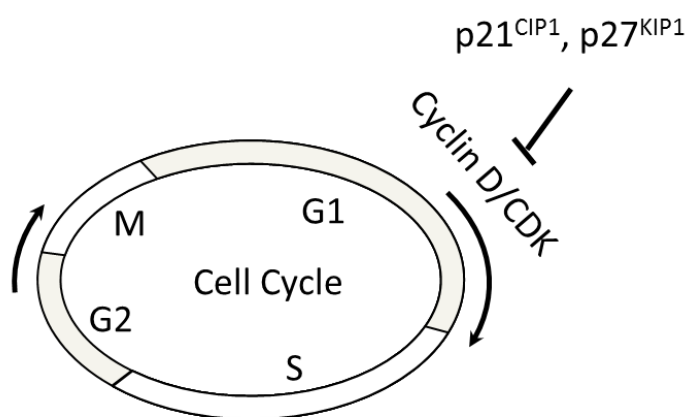
圖十一、轉染表現 YAP 對 B4G12 細胞株增生的影響

圖十一、轉染表現 YAP 對 B4G12 細胞株增生的影響 (A).以免疫細胞染色法觀察 B4G12 人類角膜內皮細胞株的 ATPase、ZO-1 與 SMA 蛋白表現 (B). 以細胞記數法觀察轉染表現 YAP 對細胞增生的影響 (C). 以流式細胞儀分析細胞週期 (D). 以西方墨點法分析細胞週期調控蛋白 cyclin D1、p27^{KIP1} 和 p21^{CIP} 表現之變化。

由於HCEC初代培養細胞來源稀少，我們使用HCEC細胞株(B4G12細胞株)模式分析YAP對細胞增生的調控機轉。如圖十一A所示，B4G12細胞株保有和HCEC初代細胞相同的型態與蛋白質表現。

雖然 B4G12 細胞株的增生速率顯著較 HCEC 快，根據細胞計數的結果，我們仍然可觀察到轉染表現 YAP 的 B4G12 細胞株增生速率顯著比對照組高(圖十一 B)。為了瞭解轉染表現 YAP 對細胞週期的影響，我們以流式細胞分析儀分析細胞週期。由於細胞有絲分裂過程中染色體會由一倍複製為兩倍，因此以 DNA 螢光染劑(Propidium iodide, PI)標記後，流式細胞分析儀可根據螢光強度區分出細胞週期的不同階段。如圖十一 C 結果顯示，轉染表現 YAP 會讓 B4G12 細胞株中位於 G₀-G₁ 時期的細胞百分比從 61.2%減少至 55.7%，位於合成期的細胞百分比從 29.1%增加至 33.1%。此一 G₁/S 轉換(G₁/S phase transition)現象證實轉染表現 YAP 會活化細胞進入 DNA 合成期。

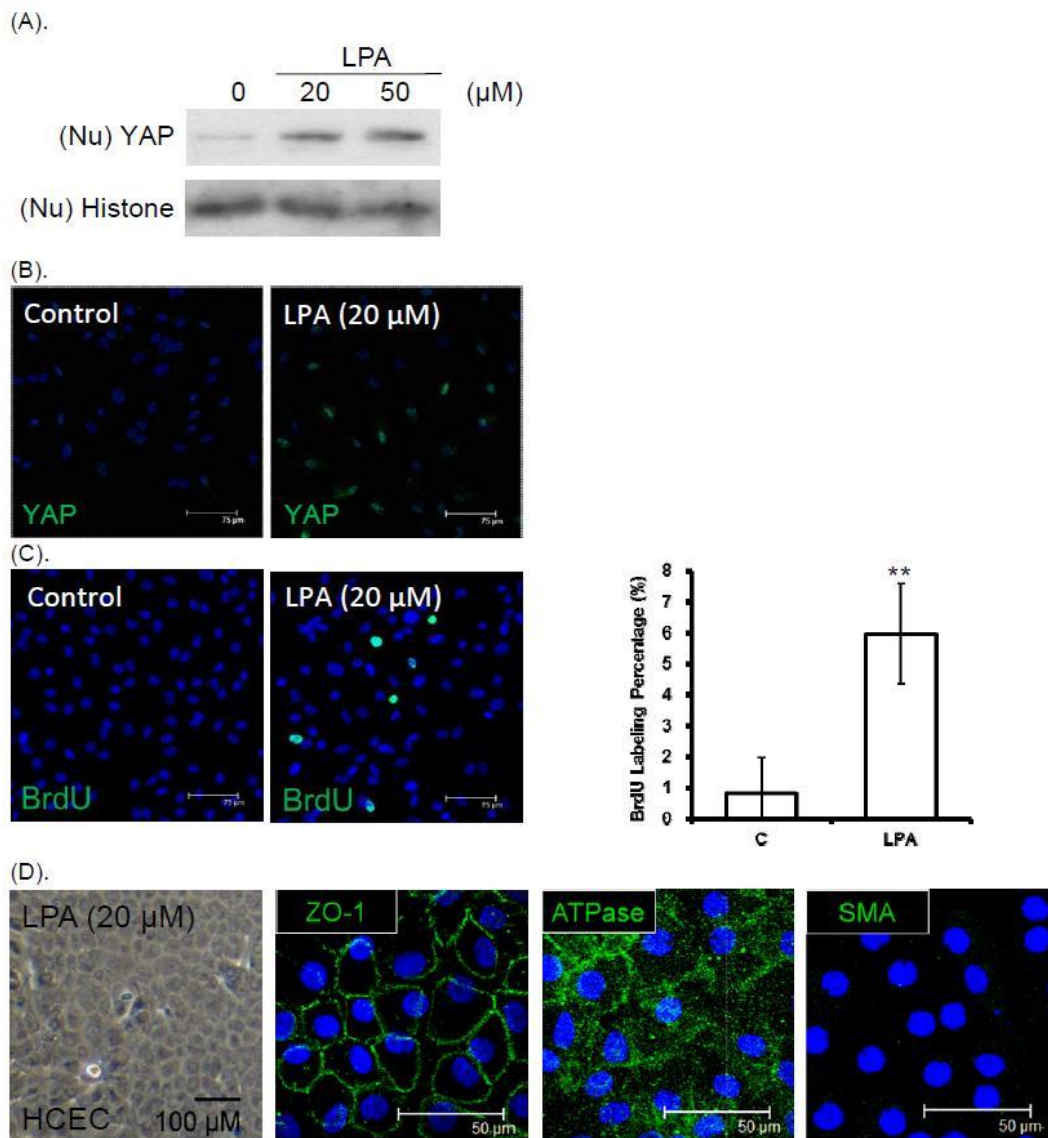
為了釐清 YAP 如何調控細胞增生，我們進一步觀察細胞週期調控蛋白表現的影響。由於我們觀察到 G₁/S phase transition(圖十二)，因此我們選擇以西方墨點法分析 cyclin D1、p27^{KIP1} 和 p21^{CIP} 的蛋白質表現變化。



圖十二、G₁-S 轉換受 cyclin D1/CDK 激酶複合體調控，而此過程會被 p27^{KIP1} 和 p21^{CIP} 抑制

如圖十一 D 結果顯示，轉染表現 YAP 會增加 cyclin D1 與減少 p27^{KIP1}/p21^{CIP}，顯示 YAP 可能經由活化 cyclin 與抑制 CDK inhibitors，使細胞增加 S 期的比例、減少 G0-G1 期的比例，進而促進細胞增生。

(四) 溶血磷脂酸 Lysophosphatidic Acid (LPA)能促進 YAP 的核轉移與 HCEC 細胞增生

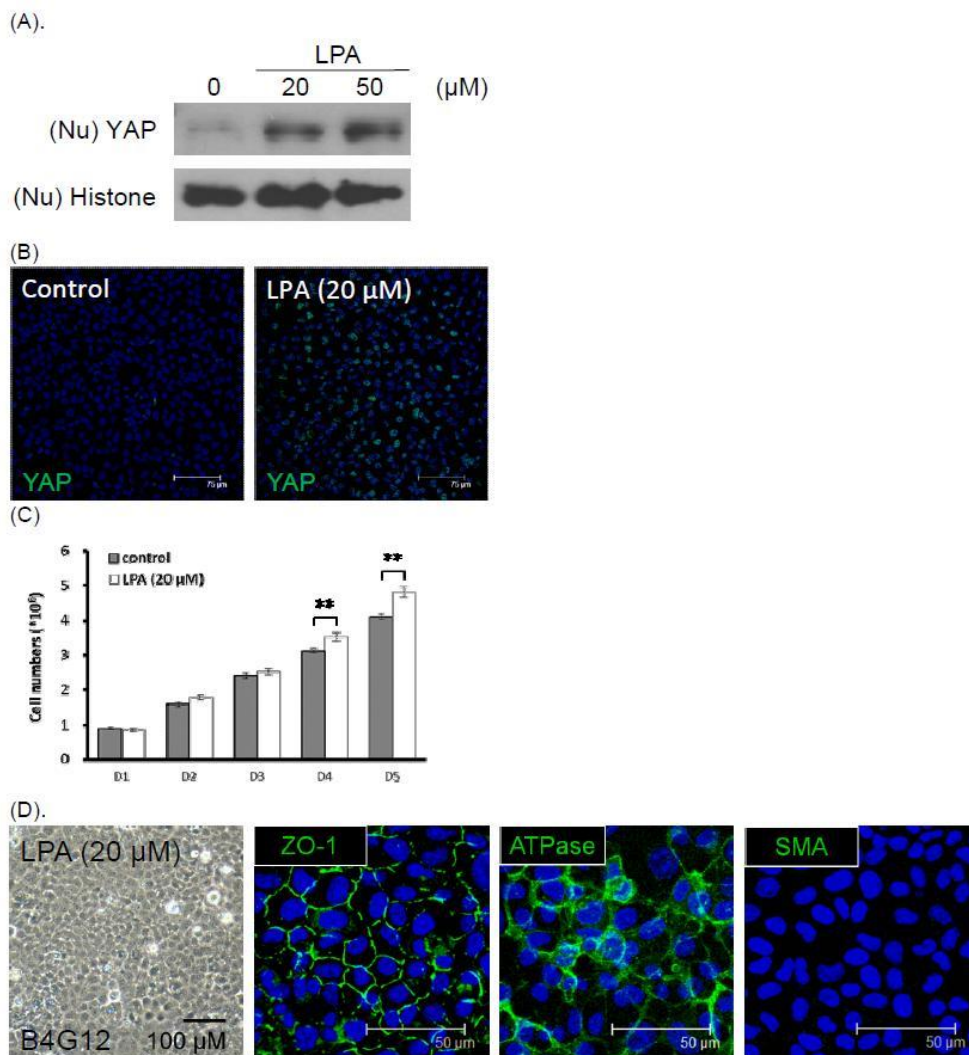


圖十三、(A,B). 以西方墨點法和免疫細胞染色法觀察 LPA 處理後 HCEC 單層細胞之 YAP 核轉移變化 (C). 以 BrdU 標記法觀察 LPA 對細胞增生的影響 (D). 以細胞螢光染色觀察 LPA 對 HCEC 單層細胞的 ATPase、ZO-1 與 SMA 蛋白表現的影響。

LPA 在很多細胞型態中已被證實會觸發 YAP 的核轉移[Avruch et al., 2012; Yu et al., 2012; Cai and Xu, 2013; Yu and Guan, 2013]。為了確認 LPA 也會影響 HCEC 的 YAP 核轉移並有劑

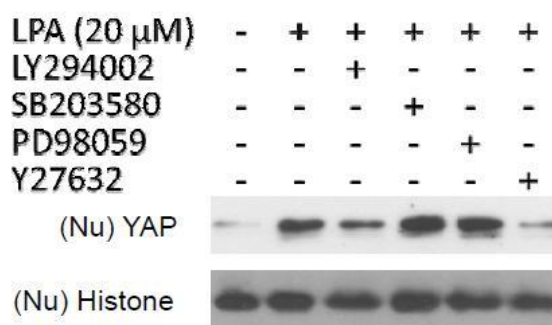
量依存效應(dose-dependent effect)。我們將 HCEC 單層細胞置換成無血清培養液 24 小時後，以不同濃度的 LPA 添加於培養液中 4 小時。接著以西方墨點法觀察細胞核蛋白中 YAP 含量，並用免疫細胞染色法觀察 YAP 核轉移的現象。如圖十三 A、B 所示，添加 20 μM 的 LPA 能顯著地造成 YAP 核轉移的現象。同時根據 BrdU 標記觀察的結果顯示 LPA 可以誘發受接觸抑制之 HCEC 細胞增生(圖十三 C)。和轉染表現 YAP 時情況相同(圖十 A)，免疫染色觀察 ATPase、ZO-1 和 SMA 的結果顯示 LPA 在誘發增生的同時不會觸發 EnMT(圖十三 D)。

(五) LPA 經由 Rho/ROCK 和 PI3K 途徑調控 YAP 的核轉移



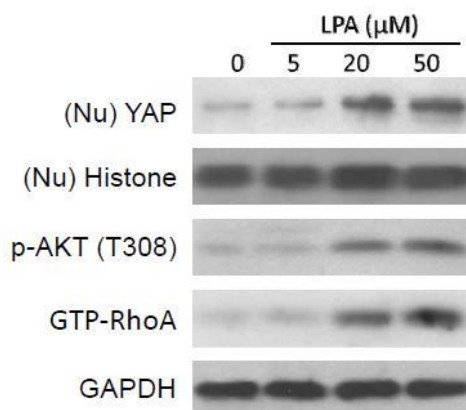
圖十四·(A)·(B). 以西方墨點法和免疫細胞染色法觀察 LPA 處理後 B4G12 細胞株中 YAP 核轉移的變化 (C). 以細胞記數法觀察 LPA 對細胞增生的影響 (D). 以細胞螢光染色觀察 LPA 對 B4G12 細胞 ATPase、ZO-1 與 SMA 蛋白表現的影響。

我們進一步用 B4G12 細胞作為細胞模式來釐清 LPA 促進 YAP 核轉移的訊息傳遞途徑，為此我們先將 B4G12 細胞以無血清培養液培養 24 小時，再以不同濃度的 LPA 添加於培養液中 4 小時，接著以西方墨點法和免疫細胞染色法觀察 YAP 核轉移現象。結果和 HCEC 單層細胞相同，在 B4G12 細胞中 LPA 同樣會影響 YAP 核轉移、促進細胞增生，同時不會發生 EnMT 現象(圖十四 D)。



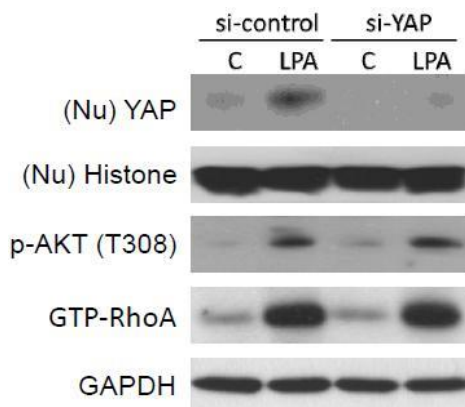
圖十五、利用專一性激酶抑制劑測試 LPA 誘發 YAP 核轉移現象的可能訊息傳遞途徑。LY294002: PI3K 抑制劑(50 μ M); SB203580: p38 抑制劑(20 μ M); PD98059: ERK 抑制劑(20 μ M); Y27632: ROCK 抑制劑(20 μ M)。

如前言所述，已知LPA會經由PI3K途徑影響下游基因[Xu 2007]，我們因此使用PI3K和其可能下游 (ERK1/2、p38以及ROCK)的專一性激酶抑制劑來釐清LPA誘發YAP核轉移現象的可能訊息傳遞途徑。為此，B4G12細胞先以各種專一性激酶抑制劑前處理2小時，接著在以LPA(20 μ M)處理4小時。接著以西方墨點法觀察細胞核內YAP的核轉移。如圖十五所示，Y27632 (ROCK inhibitor)可以顯著抑制LPA誘發的YAP核轉移現象，而LY294002 (PI3K inhibitor)可以部份抑制LPA誘發的YAP核轉移。此外，我們同時觀察到PD98059(ERK inhibitor)和SB203580(p38 inhibitor)不能抑制LPA誘發的YAP核轉移，顯示ERK和P38並無參與相關調控。



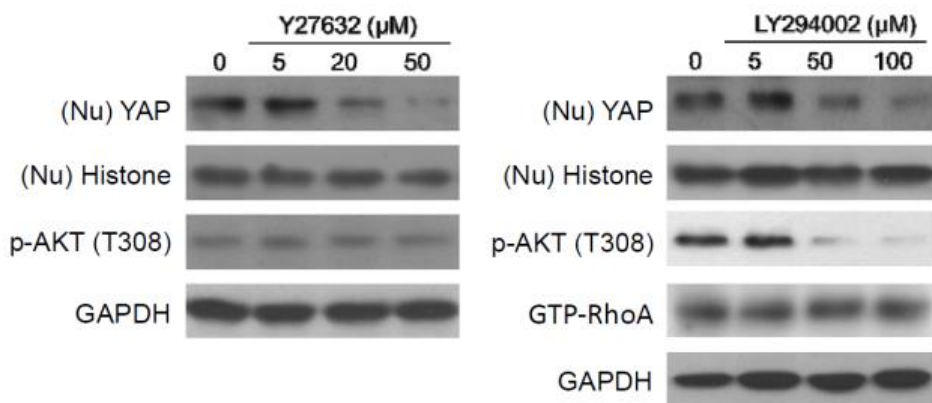
圖十六、以西方墨點法觀察LPA處理對YAP核轉移調控相關激酶活性是否有劑量依存效應。

為了進一步確認與調控YAP核轉移可能有關的激酶活性會被LPA影響，我們以西方墨點法觀察磷酸化AKT和GTP結合態RhoA的表現。由於活性態的PI3K直接催化AKT的T308位置磷酸化，而GTP結合態的RhoA則會直接活化ROCK，因此這兩種蛋白被視為PI3K和ROCK活化程度的指標。由於LPA對這些指標的影響存在劑量依存效應，因此我們推測PI3K和ROCK的活性會被LPA調控(圖十六)。



圖十七、以YAP siRNA驗證相關激酶與YAP的上下游關係

為了要確認在訊息傳遞路徑中，這些激酶和YAP的上下游關係，我們用LPA刺激YAP蛋白被抑制的B4G12細胞。如圖十七所示，YAP蛋白被抑制並不會影響LPA對相關激酶活性的影響，顯示相關激酶的活性直接受LPA影響，而非受YAP核轉移的影響。



圖十八、以專一性激酶抑制劑檢視PI3K和ROCK與YAP在訊息傳遞路徑之上下游關係

為了瞭解PI3K和ROCK在LPA誘發YAP核轉移的訊息傳遞途徑中扮演的角色，我們先以Y27632或LY294002處理B4G12細胞2小時接著以LPA處理4小時後。再觀察相關的專一性激酶

抑制劑對YAP核轉移和相關激酶活性的影響。如圖十八所示，Y27632和LY294002對LPA誘發YAP核轉移現象的抑制皆有劑量依存效應。然而Y27632不會影響AKT的磷酸化，同時LY294002也不會影響GTP結合態的RhoA含量，顯示PI3K/AKT路徑與RhoA/rock路徑對YAP核轉移的調控各自有其獨立途徑。

二、討論

為了建立以培養細胞為基礎的角膜內皮移植術(例如 culture-based Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty, c-DSAEK)，我們嘗試開發體外擴增 HCEC 的新方法。DSAEK 技術由於傷口小 視力恢復快且排斥機率低，被發展來取代角膜移植，是一種用來治療角膜內皮缺損的臨床技術，然而由於此技術仍需要有捐贈角膜，因此在許多缺乏角膜捐贈來源的國家發展 c-DSAEK 有其臨床意義。雖然 HCEC 能以分散式培養法進行體外擴增[Senoo et al., 2000]，然而到最後幾乎都會發生 EnMT。EnMT 型態雖然可用無血清培養液置換法部分回復其形態，但是效果有限，和細胞在組織中的型態相比仍有顯著差異。Zhu 等人於 2012 年發表利用 si-p120 轉染能在保有 HCEC 在活體的型態和結構下誘發受接觸性抑制的 HCEC 進行增生[Zhu et al., 2012]。然而，由於利用 p120 之 siRNA 轉染有抑制到其他基因的風險，因此該方法不適合應用於臨床。

為了臨床應用，我們嘗試以LPA取代si-p120誘發YAP的核轉移，因此本研究驗證了LPA同樣能促進受接觸性抑制HCEC的YAP核轉移，並進而以B4G12細胞模式探討其可能機制。如前言所述，LPA有多重功能的生理角色，包含促進細胞增生、爬行與生存[van Corven et al., 1989; Moolenaar et al., 2004]，也有文章提出LPA和腫瘤發生有關[Mills et al., 2002]，由於我們將LPA應用在體外擴增時的培養基添加物，因此沒有誘發癌症發生的顧慮。另外，雖然少數文章有提到LPA和誘發EMT的可能性[Ochiai et al., 2013]，在本篇研究中，根據我們的結果顯示LPA不會造成HCEC單層細胞的EnMT。

LPA的細胞反應可能經由LPA受器刺激活化下游激酶，包含PI3K/Akt[Xu et al., 2007]、ERK[Meyer zu Heringdorf and Jakobs, 2007]、p38[Jeong et al., 2013]和Rho/ROCK[Fukushima et al., 1998]。然而對於LPA誘發之YAP核轉移現象，在卵巢瘤細胞中，前人相關研究指出PI3K、

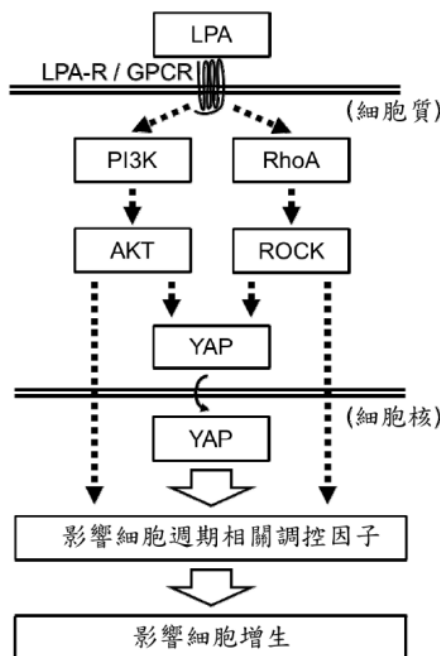
ERK和p38都沒有參與，只有ROCK有關[Cai and Xu, 2013]。除了PI3K，我們的結果與其大致相同。PI3K部分的差異可能是因為細胞的種類和狀態不同所致。

如前言所述，PI3K有多重的生理功能，雖然PI3K的抑制對LPA誘發之YAP核轉移只有部分影響，Xu等人的文章顯示LPA能活化PI3K路徑，幫助角膜上皮傷口癒合 [Xu et al., 2007]。Ambesi等人亦觀察到在微血管內皮細胞中，LPA會經由ERK誘發細胞增生[Ambesi and McKeown-Longo, 2009]。我們曾觀察到PI3K抑制劑會顯著減少細胞增生，且抑制作用比ROCK抑制劑強。因此我們認為LPA活化之PI3K途徑，除了調控YAP核轉移外，亦存在下游與YAP無關之途徑，同樣在增生調控中扮演著重要的角色。此外，由於這些受LPA影響的激酶對細胞增生的影響皆為多重途徑效應(multi-pathway effect)，因此本研究在證實了YAP對增生的影響後，我們將機制的探討聚焦在釐清PI3K和ROCK路徑在LPA影響YAP核轉移的過程中扮演的角色。至於PI3K和ROCK對LPA誘發細胞增生的調控網絡仍有待後續進一步研究釐清。

另一方面，雖然抑制ROCK的活性被認為能抑制細胞凋亡，並且能增加猴子角膜內皮細胞的存活能力[Okumura et al., 2009]，ROCK在HCEC增生中扮演的角色至今仍未定論 [Koizumi et al., 2013]。根據最近發表的文獻指出，以Y27632(ROCK抑制劑)處理長滿的角膜內皮細胞無法影響其增生狀態[Pipparelli et al., 2013]。然而亦有文獻指出在角膜內皮傷口癒合的過程中Y27632可以促進細胞增生[Okumura et al., 2014]。根據我們在試驗過程中得到的經驗，Y27632雖然能維持HCEC單層細胞較長的存活時間與多邊形型態，但不會促進HCEC增生[Zhu et al., 2012]。在B4G12細胞長滿的狀態下，我們觀察到Y27632會抑制YAP核轉移，同時也看到細胞週期相關蛋白和細胞增生狀態被抑制。我們推論，不同學者觀察到ROCK對HCEC增生是促進或是抑制之不同，是由於實驗當時細胞長滿程度不同所造成細胞間接觸的差異所致。

在探討訊息傳遞路徑的過程中，由於PI3K磷酸化的變化不是唯一調控其活性的方式，且AKT的T308位置磷酸化直接受PI3K調控。因此我們常用AKT的T308位置磷酸化評估PI3K抑制劑的效果，我們同樣想嘗試用ROCK的下游因子評估ROCK抑制劑的效果。在臍靜脈內皮細胞中，Y27632可以抑制MLC的磷酸化 [Saito et al., 2002]，在動脈血管內皮細胞中，Y-27632可以抑制MYPT-1的磷酸化[Jung et al., 2012]。我們曾測試了這兩種指標的變化，

然而沒有看到顯著差異。同樣的，在已發表的研究角膜內皮細胞文獻中也找不到相關證據。然而，由於在我們的試驗結果中Y27632能明顯影響YAP核轉移，同時不會影響AKT的磷酸化，因此我們相信試驗中使用Y27632對於ROCK活性的抑制是有發揮作用的，應該不是細胞毒性的結果。



圖十九、LPA 調控 YAP 核轉移與細胞增生之可能訊息傳遞途徑示意圖

肆、結論與應用

於本研究中我們證實了：

1. 轉染表現的 YAP 會經由活化 cyclin D1 與抑制 $p27^{KIP1}/p21^{CIP1}$ 活化細胞增生。
2. LPA 能誘發 YAP 核轉移與促進受接觸抑制的 HCEC 細胞增生，同時不會造成 EnMT 現象。
3. LPA 誘發 YAP 核轉移的現象是經由活化 RhoA/ROCK 和 PI3K/AKT 途徑所造成。

本研究性質為發展細胞療法，屬於生物試劑新功能開發。p120-siRNA的使用屬於基因轉殖，於臨床應用時容易受相關法規限制。由於LPA是細胞膜就存在有的天然化合物，我們相信組織工程領域中能用LPA取代轉染p120-siRNA的方式促進受接觸抑制之HCEC增生。並且在研究機轉過程中所得知識也有機會援用來改良細胞培養製程。

伍、参考文献

- Ambesi, A. and McKeown-Longo, P. J.** (2009). Anastellin, the angiostatic fibronectin peptide, is a selective inhibitor of lysophospholipid signaling. *Molecular cancer research : MCR* **7**, 255-265.
- Avruch, J., Zhou, D., Fitamant, J., Bardeesy, N., Mou, F. and Barrufet, L. R.** (2012). Protein kinases of the Hippo pathway: regulation and substrates. *Seminars in cell & developmental biology* **23**, 770-784.
- Cai, H. and Xu, Y.** (2013). The role of LPA and YAP signaling in long-term migration of human ovarian cancer cells. *Cell communication and signaling : CCS* **11**, 31.
- Chen, K. H., Harris, D. L. and Joyce, N. C.** (1999). TGF-beta2 in aqueous humor suppresses S-phase entry in cultured corneal endothelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science* **40**, 2513-2519.
- Daniel, J. M.** (2007). Dancing in and out of the nucleus: p120(ctn) and the transcription factor Kaiso. *Biochimica et biophysica acta* **1773**, 59-68.
- Fausto, N., Campbell, J. S. and Riehle, K. J.** (2006). Liver regeneration. *Hepatology* **43**, S45-53.
- Fukushima, N., Kimura, Y. and Chun, J.** (1998). A single receptor encoded by vzg-1/lpA1/edg-2 couples to G proteins and mediates multiple cellular responses to lysophosphatidic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 6151-6156.
- Gayral, S., Deleris, P., Laulagnier, K., Laffargue, M., Salles, J. P., Perret, B., Record, M. and Breton-Douillon, M.** (2006). Selective activation of nuclear phospholipase D-1 by G protein-coupled receptor agonists in vascular smooth muscle cells. *Circulation research* **99**, 132-139.
- Geroski, D. H. and Edelhauser, H. F.** (1984). Quantitation of Na/K ATPase pump sites in the rabbit corneal endothelium. *Investigative ophthalmology & visual science* **25**, 1056-1060.
- Habbig, S., Bartram, M. P., Muller, R. U., Schwarz, R., Andriopoulos, N., Chen, S., Sagmuller, J. G., Hoehne, M., Burst, V., Liebau, M. C. et al.** (2011). NPHP4, a cilia-associated protein, negatively regulates the Hippo pathway. *The Journal of cell biology* **193**, 633-642.
- Honda, N., Mimura, T., Usui, T. and Amano, S.** (2009). Descemet stripping automated endothelial keratoplasty using cultured corneal endothelial cells in a rabbit model. *Archives of ophthalmology* **127**, 1321-1326.
- Iwamoto, T. and Smelser, G. K.** (1965). Electron Microscopy of the Human Corneal Endothelium with Reference to Transport Mechanisms. *Investigative ophthalmology* **4**, 270-284.

- Jalink, K., Hordijk, P. L. and Moolenaar, W. H.** (1994). Growth factor-like effects of lysophosphatidic acid, a novel lipid mediator. *Biochimica et biophysica acta* **1198**, 185-196.
- Jampel, H. D., Roche, N., Stark, W. J. and Roberts, A. B.** (1990). Transforming growth factor-beta in human aqueous humor. *Current eye research* **9**, 963-969.
- Jeong, G. O., Shin, S. H., Seo, E. J., Kwon, Y. W., Heo, S. C., Kim, K. H., Yoon, M. S., Suh, D. S. and Kim, J. H.** (2013). TAZ mediates lysophosphatidic acid-induced migration and proliferation of epithelial ovarian cancer cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **32**, 253-263.
- Joyce, N. C.** (2003). Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Progress in retinal and eye research* **22**, 359-389.
- Joyce, N. C., Meklikr, B. and Neufeld, A. H.** (1990). In vitro pharmacologic separation of corneal endothelial migration and spreading responses. *Investigative ophthalmology & visual science* **31**, 1816-1826.
- Joyce, N. C., Harris, D. L. and Mello, D. M.** (2002). Mechanisms of mitotic inhibition in corneal endothelium: contact inhibition and TGF-beta2. *Investigative ophthalmology & visual science* **43**, 2152-2159.
- Jung, C. H., Lee, W. J., Hwang, J. Y., Seol, S. M., Kim, Y. M., Lee, Y. L., Ahn, J. H. and Park, J. Y.** (2012). The role of Rho/Rho-kinase pathway in the expression of ICAM-1 by linoleic acid in human aortic endothelial cells. *Inflammation* **35**, 1041-1048.
- Kaufman, H. E. and Katz, J. I.** (1977). Pathology of the corneal endothelium. *Investigative ophthalmology & visual science* **16**, 265-268.
- Koizumi, N., Okumura, N. and Kinoshita, S.** (2013). Author response: Human corneal endothelium regeneration: effect of ROCK Inhibitor. *Investigative ophthalmology & visual science* **54**, 5594-5595.
- Koizumi, N., Sakamoto, Y., Okumura, N., Tsuchiya, H., Torii, R., Cooper, L. J., Ban, Y., Tanioka, H. and Kinoshita, S.** (2008). Cultivated corneal endothelial transplantation in a primate: possible future clinical application in corneal endothelial regenerative medicine. *Cornea* **27 Suppl 1**, S48-55.
- Kreutziger, G. O.** (1976). Lateral membrane morphology and gap junction structure in rabbit corneal endothelium. *Experimental eye research* **23**, 285-293.
- Lampugnani, M. G., Corada, M., Andriopoulou, P., Esser, S., Risau, W. and Dejana, E.** (1997). Cell confluence regulates tyrosine phosphorylation of adherens junction components in endothelial cells. *Journal of cell science* **110 (Pt 17)**, 2065-2077.

- Li, W., Sabater, A. L., Chen, Y. T., Hayashida, Y., Chen, S. Y., He, H. and Tseng, S. C.** (2007). A novel method of isolation, preservation, and expansion of human corneal endothelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science* **48**, 614-620.
- Maurice, D. M.** (1972). The location of the fluid pump in the cornea. *The Journal of physiology* **221**, 43-54.
- Meyer zu Heringdorf, D. and Jakobs, K. H.** (2007). Lysophospholipid receptors: signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. *Biochimica et biophysica acta* **1768**, 923-940.
- Mills, G. B., Eder, A., Fang, X., Hasegawa, Y., Mao, M., Lu, Y., Tanyi, J., Tabassam, F. H., Wiener, J., Lapushin, R. et al.** (2002). Critical role of lysophospholipids in the pathophysiology, diagnosis, and management of ovarian cancer. *Cancer treatment and research* **107**, 259-283.
- Mimura, T., Yokoo, S., Araie, M., Amano, S. and Yamagami, S.** (2005). Treatment of rabbit bullous keratopathy with precursors derived from cultured human corneal endothelium. *Investigative ophthalmology & visual science* **46**, 3637-3644.
- Moolenaar, W. H., van Meeteren, L. A. and Giepmans, B. N.** (2004). The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **26**, 870-881.
- Nakada, M., Kita, D., Watanabe, T., Hayashi, Y., Teng, L., Pyko, I. V. and Hamada, J.** (2011). Aberrant signaling pathways in glioma. *Cancers* **3**, 3242-3278.
- Ochiai, S., Furuta, D., Sugita, K., Taniura, H. and Fujita, N.** (2013). GPR87 mediates lysophosphatidic acid-induced colony dispersal in A431 cells. *European journal of pharmacology* **715**, 15-20.
- Okumura, N., Ueno, M., Koizumi, N., Sakamoto, Y., Hirata, K., Hamuro, J. and Kinoshita, S.** (2009). Enhancement on primate corneal endothelial cell survival in vitro by a ROCK inhibitor. *Investigative ophthalmology & visual science* **50**, 3680-3687.
- Okumura, N., Nakano, S., Kay, E. P., Numata, R., Ota, A., Sowa, Y., Sakai, T., Ueno, M., Kinoshita, S. and Koizumi, N.** (2014). Involvement of cyclin D and p27 in cell proliferation mediated by ROCK inhibitors Y-27632 and Y-39983 during corneal endothelium wound healing. *Investigative ophthalmology & visual science* **55**, 318-329.
- Pan, D.** (2007). Hippo signaling in organ size control. *Genes & development* **21**, 886-897.
- Pan, D.** (2010). The hippo signaling pathway in development and cancer. *Developmental cell* **19**, 491-505.
- Pipparelli, A., Arsenijevic, Y., Thuret, G., Gain, P., Nicolas, M. and Majo, F.** (2013). ROCK

inhibitor enhances adhesion and wound healing of human corneal endothelial cells. *PLoS one* **8**, e62095.

Saito, H., Minamiya, Y., Saito, S. and Ogawa, J.-i. (2002). Endothelial Rho and Rho kinase regulate neutrophil migration via endothelial myosin light chain phosphorylation. *Journal of leukocyte biology* **72**, 829-836.

Saucedo, L. J. and Edgar, B. A. (2007). Filling out the Hippo pathway. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 613-621.

Senoo, T., Obara, Y. and Joyce, N. C. (2000). EDTA: a promoter of proliferation in human corneal endothelium. *Investigative ophthalmology & visual science* **41**, 2930-2935.

Sherrard, E. S. (1976). The corneal endothelium in vivo: its response to mild trauma. *Experimental eye research* **22**, 347-357.

Tigyi, G. (2001). Physiological responses to lysophosphatidic acid and related glycerophospholipids. *Prostaglandins & other lipid mediators* **64**, 47-62.

van Corven, E. J., Groenink, A., Jalink, K., Eichholtz, T. and Moolenaar, W. H. (1989). Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell* **59**, 45-54.

van Setten, G. B., Fagerholm, P., Philipson, B. and Schultz, G. (1996). Growth factors and their receptors in the anterior chamber. Absence of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha in human aqueous humor. *Ophthalmic research* **28**, 361-364.

Wang, D. A., Du, H., Jaggari, J. H., Brindley, D. N., Tigyi, G. J. and Watsky, M. A. (2002). Injury-elicited differential transcriptional regulation of phospholipid growth factor receptors in the cornea. *American journal of physiology. Cell physiology* **283**, C1646-1654.

Xu, K. P., Yin, J. and Yu, F. S. (2007). Lysophosphatidic acid promoting corneal epithelial wound healing by transactivation of epidermal growth factor receptor. *Investigative ophthalmology & visual science* **48**, 636-643.

Yu, F. X. and Guan, K. L. (2013). The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes & development* **27**, 355-371.

Yu, F. X., Zhao, B., Panupinthu, N., Jewell, J. L., Lian, I., Wang, L. H., Zhao, J., Yuan, H., Tumaneng, K., Li, H. et al. (2012). Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell* **150**, 780-791.

Zavala, J., Lopez Jaime, G. R., Rodriguez Barrientos, C. A. and Valdez-Garcia, J. (2013). Corneal endothelium: developmental strategies for regeneration. *Eye* **27**, 579-588.

Zeng, Q. and Hong, W. (2008). The emerging role of the hippo pathway in cell contact inhibition,

organ size control, and cancer development in mammals. *Cancer cell* **13**, 188-192.

Zhao, B., Li, L., Tumaneng, K., Wang, C. Y. and Guan, K. L. (2010). A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes & development* **24**, 72-85.

Zhu, Y. T., Chen, H. C., Chen, S. Y. and Tseng, S. C. (2012). Nuclear p120 catenin unlocks mitotic block of contact-inhibited human corneal endothelial monolayers without disrupting adherent junctions. *Journal of cell science* **125**, 3636-3648.

【評語】 090013

This is an innovation project with complete data obtained. The project is to study the suppressor Hippo pathway on growing human corneal endothelial cells for transplantation. Some detail underlying mechanism was also studied. This project presents a careful plan with convincing data obtained.