

令和 2 年 6 月 27 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11487

研究課題名(和文)機能性miRNAによる角膜上皮幹細胞の生体恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanism of corneal epithelial stem cells using functional miRNA analysis

研究代表者

中村 隆宏 (NAKAMURA, TAKAHIRO)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号：30411078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：単一細胞レベルでの網羅的な機能性miRNAプロファイルを作成し、miRNA 205がヒト角膜上皮幹細胞で有意に発現が亢進していることを、複数のヒト角膜上皮細胞群においてその再現性を確認した。次にmiRNA-205の遺伝子改変マウスの作成した。miRNA-205ノックアウトマウスは胎生期に皮膚の形成不全により致死性であった。胎生期および生後5日までの角膜上皮の形態学的、細胞生物学解析を行った。WTと比較して、重層化の程度など軽微な変化は認められたが、あきらかな形態学的・細胞生物学的差異はなかった。以上より、miRNA205は角膜上皮幹細胞において胎生期と成体における機能が異なることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の精力的な基礎研究から、タンパク質をコードしていないnon-coding RNAの一種であるmiRNAは生体内の様々な部位に存在し、発生・分化・癌化などの生命現象や幹細胞分化制御に深く関与していることが報告されている。生体内で角膜は視覚を司る重要な組織であり、その角膜上皮幹細胞の単一細胞レベルでの網羅的な機能性miRNAプロファイルの作成の試みは、世界的に見ても初めての試みであり、極めて独創的・先駆的である。また、miRNAレベルでの遺伝子改変マウスの作成の試みは、いまだ報告が少なく、遺伝改変技術を用いた生体内での恒常性維持機構の解明、分子レベルでの機能解析に大きく貢献したと考える。

研究成果の概要(英文)：We created a comprehensive functional miRNA profile at the single-cell level and confirmed that reproducibility of miRNA 205 was significantly upregulated in human corneal epithelial stem cells in multiple human corneal epithelial cell groups. Next, a genetically modified mouse of miRNA-205 was prepared. The miRNA-205 knockout mouse was fatal during the embryonic period due to skin hypoplasia. Morphological and cytobiological analyzes of corneal epithelium during the embryonic period and up to 5 days after birth were performed. Compared with WT, slight changes such as the degree of stratification were observed, but there were no obvious morphological or cell biological differences. These results suggest that miRNA205 has different functions in embryonic and adult corneal epithelial stem cells.

研究分野：眼科学

キーワード：角膜上皮 幹細胞 miRNA 再生医療

1. 研究開始当初の背景

一般に、生体の各臓器・組織には組織特異的な幹細胞が存在し、その修復・再生に重要な役割を担うと考えられている。これまでの細胞生物学的な基礎研究から、角膜上皮幹細胞は角膜周辺部に位置する角膜輪部の基底層に存在すると考えられている。しかし、角膜上皮幹細胞の細胞動態や分子機構に関しては未だ不明な点が多い。

一方、近年の精力的な基礎研究から、タンパク質をコードしていない non-coding RNA の一種である miRNA は生体内の様々な部位に存在し、発生・分化・癌化などの生命現象や幹細胞分化制御に深く関与していることが報告されている。しかし角膜上皮幹細胞における機能性 miRNA の役割に関しては全く不明である。今後、組織幹細胞を用いた角膜再生医療の発展を考える上では、機能性 miRNA を含めた分子レベルでの細胞動態の理解が必須である。

我々の研究グループはこれまでに上皮幹細胞の恒常性維持機構を明らかにする目的で、スイス連邦工科大学より single cell clonal analysis 法を導入し、単一細胞レベルからの網羅的な上皮幹細胞遺伝子発現プロファイルを作成した。その結果 Lrig1 が角膜上皮幹細胞マーカーの候補となることを突き止めた

2. 研究の目的

本研究では、これまでの知見をさらに発展させ、角膜をモデルに用いて、近年領域横断的に注目されている機能性 miRNA と Lrig1 による包括的な上皮幹細胞の恒常性維持機構の解明を主目的とする。具体的には、我々が本年作成した角膜上皮幹細胞の単一細胞レベルでの網羅的な機能性 miRNA プロファイルから、角膜上皮幹細胞に高発現していた miRNA 205 に焦点を当て、その遺伝子改変マウス等を用いて in vivo および in vitro の機能解析を行う。また、一連の研究から得られた miRNA 205-Lrig1 に関連する角膜上皮幹細胞の恒常性維持機構に必須のネットワーク関連分子、環境因子(ニッチ)の知見を集積する。

3. 研究の方法

角膜上皮幹細胞の恒常性維持機構の解明を目的に、その分子機構の鍵となる機能性 miRNA と推察される miRNA 205 ノックアウトマウスを作成し、形態学的・細胞生物学的・分子生物学的考察を加える。また、同マウスから得られた miRNA 205 のターゲット遺伝子等の知見を集積し、我々がすでに解析した Lrig1 ノックアウトマウスと関連性を比較検討する。

4. 研究成果

単一細胞レベルでの網羅的な機能性 miRNA プロファイルを複数作成した。その結果、miRNA 205 がヒト角膜上皮幹細胞で有意に発現が亢進していることを、複数のヒト角膜上皮細胞群において確認した。また、予備実験段階で、miRNA 205 遺伝子改変マウスの創出技術をさらに確立して、安定した miRNA 205 ノックアウトマウスの創出に成功した。また、創出した miRNA-205 ノッ

クアウトマウスは、胎生期において皮膚の形成不全により致死的事であることを確認した。そこで胎生期および生後5日までの角膜上皮の形態学的、細胞生物学解析を行った。WTと比較して、重層化の程度など軽微な変化は認められたが、あきらかな形態学的・細胞生物学的差異はなかった。以上より、miRNA205は角膜上皮幹細胞において胎生期と成体における機能が異なることが示唆された。生体内で角膜は視覚を司る重要な組織であり、その角膜上皮幹細胞の単一細胞レベルでの網羅的な機能性miRNAプロファイルの作成の試みは、世界的に見ても初めての試みであり、極めて独創的・先駆的である。また、miRNAレベルでの遺伝子改変マウスの作成の試みは、いまだ報告が少なく、遺伝改変技術を用いた生体内での恒常性維持機構の解明、分子レベルでの機能解析に大きく貢献したと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kinoshita S, Koizumi N, Ueno M, Okumura N, Imai K, Tanaka H, Yamamoto Y, Nakamura T, Inatomi T, Bush J, Toda M, Hagiya M, Yokota I, Teramukai S, Sotozono C, Hamuro J.	4. 巻 378
2. 論文標題 Injection of Cultured Cells with a ROCK Inhibitor for Bullous Keratopathy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 N Engl J Med	6. 最初と最後の頁 995-1003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1056/NEJM192802231980115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitazawa Koji, Hikichi Takafusa, Nakamura Takahiro, Sotozono Chie, Kinoshita Shigeru, Masui Shinji	4. 巻 154
2. 論文標題 PAX6 regulates human corneal epithelium cell identity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 30 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2016.11.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Koizumi Noriko, Miyazaki Dai, Inoue Tomoyuki, Ohtani Fumie, Kandori-Inoue Michiko, Inatomi Tsutomu, Sotozono Chie, Nakagawa Hiroko, Horikiri Tomoko, Ueta Mayumi, Nakamura Takahiro, Inoue Yoshitsugu, Ohashi Yuichi, Kinoshita Shigeru	4. 巻 101
2. 論文標題 The effect of topical application of 0.15% ganciclovir gel on cytomegalovirus corneal endotheliitis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 British Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 114 ~ 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bjophthalmol-2015-308238	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Motozawa Naohiro, Nakamura Takahiro, Takagi Seiji, Fujihara Masashi, Hiramasa Yasuhiko, Ishida Kazuhiro, Sotozono Chie, Kurimoto Yasuo	4. 巻 96
2. 論文標題 Unique circumferential peripheral keratitis in relapsing polychondritis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e7951 ~ e7951
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.0000000000007951	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Imai Yasutomo, Hosotani Yuka, Ishikawa Hiroto, Yasuda Koubun, Nagai Makoto, Jitsukawa Oriie, Gomi Fumi, Nakanishi Kenji, Yoshimoto Tomohiro, Nakamura Takahiro, Yamanishi Kiyofumi	4. 巻 7
2. 論文標題 Expression of IL-33 in ocular surface epithelium induces atopic keratoconjunctivitis with activation of group 2 innate lymphoid cells in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-10227-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kinoshita Shigeru, Koizumi Noriko, Ueno Morio, Okumura Naoki, Imai Kojiro, Tanaka Hiroshi, Yamamoto Yuji, Nakamura Takahiro, Inatomi Tsutomu, Bush John, Toda Munetoyo, Hagiya Michio, Yokota Isao, Teramukai Satoshi, Sotozono Chie, Hamuro Junji	4. 巻 378
2. 論文標題 Injection of Cultured Cells with a ROCK Inhibitor for Bullous Keratopathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 New England Journal of Medicine	6. 最初と最後の頁 995 ~ 1003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1056/NEJMoa1712770	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 永田真帆, 中村隆宏, 池田華子, 垣塚彰, 中小路真美, 石田学, 外園千恵, 木下茂.
2. 発表標題 VCP ATPase阻害剤による角膜組織保護効果.
3. 学会等名 角膜カンファランス2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北澤耕司, 増田皓介, 村上怜, 中村隆宏, 木下茂, 外園千恵.
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 を用いてKLF4 をノックアウトしたヒト角膜上皮細胞の検討.
3. 学会等名 第122回日本眼科学会総会
4. 発表年 2018年

1 . 発表者名 Nakamura T
2 . 発表標題 Ocular surface reconstructoin using defined culture system for severe ocular surface diseases.
3 . 学会等名 2nd international Stevens-Johnson syndrome symposium (招待講演) (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Kitazawa K , Hikichi T , Nakamura T , Sotozono C , Kinoshita S , Masui S
2 . 発表標題 OVOL2 maintains atranscriptional program in human corneal epithelial cells.
3 . 学会等名 2017 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Murakami R , Kitazawa K , Hikichi T , Nakamura T , Sotozono C , Kinoshita S , Masui S
2 . 発表標題 PAX6, OVOL2, KLF4 coordinately contribute the reprogramming of the corneal epithelial cells Transcription factors PAX6, OVOL2, and KLF4 coordinately contribute to the reprogramming of corneal epithelial cells.
3 . 学会等名 2017 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Nakamura T
2 . 発表標題 Ocular surface reconstruction using defined culture system for severe ocular surface diseases-Next generation of COMET for global expansion.
3 . 学会等名 3rd Chulalongkorn Eye Center (CEC) and Kyoto Prefectural University of Medicine (KPUM) Joint Meeting (招待講演) (国際学会)
4 . 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----