

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成26年6月9日現在

機関番号：34310
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2011～2013
課題番号：23592621
研究課題名(和文) Lrigファミリーによる角膜上皮幹細胞の恒常性維持機構の解明
研究課題名(英文) Lrig family controls corneal stem cell homeostasis
研究代表者
中村 隆宏 (NAKAMURA, Takahiro)
同志社大学・生命医科学部・准教授
研究者番号：30411078
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：角膜の恒常性、透明性維持は視覚にとって必須の要素である。本研究で、Lrig1はHolocloneタイプの角膜上皮幹細胞において発現が亢進しており、マウス眼表面上皮基底細胞において局所特異的に発現していた。Lrig1 KOでは角膜の創傷治癒過程が障害され、炎症を伴って角膜の透明性が徐々に失われて角化して失明した。また、Lrig1はSTAT3を抑制的に制御することにより創傷治癒機構をコントロールし、STAT3の阻害剤によりLrig1 KOの表現型をレスキューできた。以上よりLRIG1は、角膜の恒常性や創傷治癒機構を制御している事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Corneal integrity and transparency is indispensable for good vision. The findings of this present study show that Lrig1 was highly expressed in the holoclone-type corneal epithelial stem cell population, and that Lrig1 was sporadically expressed in the basal cells of ocular-surface epithelium to regulate corneal epithelial cell fate during wound repair. Loss of Lrig1 resulted in impaired recruitment of stem cells post wounding, and in the cell-fate switch from transparent epithelium to keratinized skin-like epidermis, leading to corneal blindness. Lrig1 controlled corneal cell fate during repair by negatively regulating the STAT3-dependent inflammatory pathway, and blocking STAT3 rescued the pathological phenotypes observed in Lrig1 KO corneas. Here, we demonstrate that Lrig1 orchestrates corneal-tissue transparency and cell fate during repair.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：上皮幹細胞、角膜、EGFR、Lrig、眼表面

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。角膜はその構造は比較的シンプルであるため、組織再生医学の分野でも精力的に研究され、その一部はすでに細胞治療による臨床応用がはじまっている。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維持機構に関しては不明な点が多く、今後、上皮幹細胞を用いた角膜再生医療の発展を考える上では、その分子レベルにおける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維持機構を明らかにする目的で、その開発元となるスイス連邦工科大学ローザンヌ校よりsinglecell 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の作成を試みた¹。集積したデータからEGFR シグナル伝達系が活性化している知見が得られたため、その準備段階としてEGFR シグナル伝達系の発生段階からの角膜における機能解析を念頭において、さまざまな関連遺伝子を検討した。その結果EGFR シグナルの主要関連遺伝子の一つであるLrig1 遺伝子欠損マウスが角膜の形態発生に極めて重要な役割を担っていることを一部突き止めた。また、当遺伝子が角膜上皮幹細胞において局所特異的に発現し、その恒常性維持機構に重要な役割を担っていることを一部突き止めた。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、角膜をモデルに用いて、Lrig1 による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、EGFR シグナルの主要関連因子であるLrig1 遺伝子欠損マウスを用いて角膜、特に角膜上皮における機能解析を行う。一連の研究により、Lrig 関連分子の角膜組織への分布の特徴やキャラクター解析を行い、最新の遺伝子導入技術やセルソーティング技術を用いて*in vivo*、*in vitro* における角膜上皮幹細胞の恒常性維持機構について検討を加える。

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Key 遺伝子と推察されるLrig1 の遺伝子欠損マウスを作成し、形態学的・細胞生物学的・分子生物学的考察を加えた。モデルマウスを確立後、形態学的・細胞生物学的・分子生物学的考察を加えた。また角膜創傷モデル、遺伝子導入モデルによる*in vivo*、*in vitro* 解析を行い、角膜上皮幹細胞の恒常性維持機構を分子レベルで解明を目標とした。これら一連の包括的な機能解析により、*in vivo/in vitro* ならびに*loss of function study*の両面から、Lrig1 による角膜上皮幹細胞の恒常性維持にかかわる分子ネットワーク

機構の知見を集積し、角膜上皮幹細胞を純化して用いた角膜再生医療の基盤技術の開発を目指した。

4. 研究成果

(1) 幹細胞を用いた角膜再生医療の臨床基盤技術開発を念頭に、角膜上皮幹細胞の恒常性維持機構を分子レベルで解明することを主目的とし、EGFRシグナル伝達系に注目し、その主要関連遺伝子であるLrig1に焦点を当てて研究をすすめた。まず、既報の手法によりLrig1遺伝子欠損マウスの作成を試み、生体創出に成功した。胎生期から経時的に眼球をサンプリングして、角膜の形態発生を肉眼的・組織学的に観察した。その結果、胎生期～生後8週においては、WTおよびK0マウスの角膜ならびに角膜周辺組織（結膜、眼瞼、マイボーム腺等）における組織学的な差異は認められなかった。走査型・透過型電子顕微鏡等を用いて細胞レベルでの詳細な形態学的観察を行った結果も同様の結果であった。その細胞生物学的特徴を考察するため、上皮細胞に特徴的な細胞骨格マーカー（ケラチン等）、細胞間接着分子（ZO1, デスモプラキン等）、基底膜構成分子（インテグリン、ラミニン等）、細胞増殖関連分子（BrdU, Ki67等）、アポトーシス関連分子（Tunel法等）、幹細胞マーカー（p63, ABCG2等）等の発現をRT-PCR法、免疫組織化学染色法を用いて比較検討し、差異は認められなかったが、細胞分化に関する情報を集積した。

(2) 次に、角膜の表現型に関して経時的に詳細な観察を行った結果、生後6カ月以降にK0マウスの角膜において、炎症を伴う角膜混濁を認めた。その細胞生物学的特徴を考察するため、上皮細胞に特徴的な細胞骨格マーカー（ケラチン等）、骨髄由来細胞マーカー（CD45, CD3, F4/80等）、炎症性サイトカイン（TSLP, IL8等）、細胞増殖関連分子（BrdU, Ki67等）

の発現をRT-PCR法、免疫組織化学染色法を用いて比較検討し、細胞分化に関する情報を集積した。K0マウスの角膜では、角膜上皮細胞マーカーであるケラチン12の発現が消失し、表皮細胞マーカーであるロリクリンの発現が認められた。組織像では、20-30層の重層化した上皮層が観察され、病的角化状態を呈していることがわかった。また、WTマウスと比較して、K0マウス角膜ではTSLPをはじめとする炎症性サイトカインの発現レベルも亢進していた。また、K0マウスの角膜実質内には、多数の骨髄由来細胞が集積しており、角膜実質構造のremodelingが認められた。

(3) さらに、Lrig1 K0 マウスを用いて機能解析を進めた。角膜創傷モデルを用いて、Lrig1 (+) 組織幹細胞による上皮修復過程を解析した。同時に、創傷前後での炎症性サイトカインの発現をPCRで比較検討した。その結果、K0ではWTと比較して角膜上皮の創傷治癒過程が障害され、明らかな遅延が認められた。またK0ではWTと比較して創傷刺激により角膜における炎症性サイトカインの発現が有意に亢進し、いわゆる pro-inflammatory state (前炎症状態) を呈していた。本病態の細胞内シグナルとの関連性を検討するため、既報の報告を含めた Pathway を網羅的に解析した。その結果、Lrig1がJAK-STATシグナルの主要関連分子であるSTAT3と密接な関連をしていることを見出した。そこで、角膜創傷モデルを用いて解析した結果、Lrig1 K0マウスの角膜にのみSTAT3の活性化が認められた。また、STAT3阻害剤(STA-21)点眼により、創傷刺激によるLrig1 K0マウスの角膜の表現型創出がレスキューされた。以上、結果より、Lrig1は、JAK-STAT Pathwayを介して炎症を制御し、角膜の恒常性維持に極めて重要な役割を担っていることがわかった。

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 15 件)

1. Nakamura T, Hamuro J, Takaishi M, Simmons S, Maruyama K, Zaffalon A, Bentley AJ, Kawasaki S, Nagata-Takaoka M, Fullwood NJ, Itami S, Sano S, Ishii M, Barrandon Y, Kinoshita S: Lrig1 inhibits STAT3-dependent inflammation to maintain corneal homeostasis. *J Clin Invest.* 124(1): 385-397, 2014.
2. Hirata-Tominaga K*, Nakamura T*, Okumura N, Kawasaki S, Kay EP, Barrandon Y, Koizumi N, Kinoshita S: Corneal endothelial cell fate is maintained by LGR5 via the regulation of hedgehog and wnt pathway. *Stem Cells.* 31(7): 1396-1407, 2013. (*co-first authors)
3. 上野盛夫, 中村隆宏, 木下茂: 角膜の再生医療. *日本医師会雑誌*, 142(4): 777-780, 2013.
4. 中村隆宏: 眼科と幹細胞. *眼科*. 55(3): 269-275, 2013.
5. Fogarty SW, Patel II, Trevisan J, Nakamura T, Hirschmugl C, Fullwood NJ, Martin FL: Sub-cellular spectrochemical imaging of isolated human corneal cells employing synchrotron radiation-based Fourier-transform infrared microspectroscopy. *Analyst.* 138(1): 240-248, 2013.
6. Sotozono C, Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Yokoi N, Ueta M, Matsuyama K, Miyakoda K, Kaneda H, Fukushima M, Kinoshita S: Visual improvement following cultivated oral mucosal epithelial transplantation. *Ophthalmology.* 120(1): 193-200, 2013.

7. 木下茂, 中村隆宏: 角膜と体性幹細胞. *BIO Clinica*. 27(9): 17-21, 2012.
 8. 木下茂, 中村隆宏: 加齢による眼表面疾患の診断と治療. *Advances in Aging and Health Research* 2011 : 145-149, 2012.
 9. 日野智之, 外園千恵, 稲富勉, 福岡秀記, 中村隆宏, 永田真帆, 小泉範子, 森和彦, 横井則彦, 木下茂: 羊膜移植の適応と効果. *日本眼科学会雑誌*. 116(4): 374-378, 2012.
 10. Nakamura Y, Nakamura T, Tarui T, Inoue J, Kinoshita S: Functional role of PPAR δ in corneal epithelial wound healing. *Am J Pathol*. 180(2):583-598, 2012.
 11. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Kinoshita S: Recent advances and future challenges in ocular surface reconstruction: On the road to translational medicine. *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*. January/February 1(1): 28-34, 2012.
 12. 中村隆宏, 木下茂: 角膜上皮の臨床解剖学と病態生理. *日本の眼科* 82(11): 1494-1499, 2011.
 13. Takeda K, Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Watanabe A, Kinoshita S. Ocular surface reconstruction using the combination of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation and eyelid surgery for severe ocular surface disease. *Am J Ophthalmol* . 152(2): 195-201, 2011.
 14. Nakamura T, Kinoshita S. New hopes and strategies for the treatment of severe ocular surface disease. *Curr Opin Ophthalmol*. 22(4): 274-278, 2011.
 15. Nakamura T, Takeda K, Inatomi T, Sotozono C, Kinoshita S: Long-term results of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation in the scar phase of severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol*. 95(7): 942-946, 2011.
- [学会発表] (計 29 件)
- 国際学会 シンポジウム
1. Nakamura T: Recent advances and future challenges in ocular surface reconstruction. APAO/SOE Busan 2012. Busan Korea, 2012. 4. 14.
 2. Nakamura T: Long-Term Results of Cultivated Epithelial Transplantation for Severe Ocular Surface Dysfunction. *The Cornea and Tissue Engineering*, Wales, Cardiff, 2011. 8. 19.
- 国際学会 一般講演
1. Sotozono C, Inatomi T, Nakamura T, Ueta M, Yokoi N, Miyakoda K, Kinoshita S: Cultivated Oral Mucosal Epithelial Transplantation for Ocular Surface Reconstruction in Stevens-Johnson Syndrome. 第115回米国眼科学会議(AAO), Orlando, USA, 2011. 10. 24.
- 国内学会 シンポジウム
1. 中村隆宏: Recent advances and future challenges in ocular surface reconstruction. 第116回日本眼科学会総会. 東京, 2012. 4. 6.
 2. 中村隆宏: 瘢痕性角結膜疾患と外科治療. 第35回日本眼科手術学会総会. 名古屋, 2012. 1. 27.
 3. 中村隆宏: 口腔組織を用いた角膜再生医療の現状と展望. 第11回日本抗加齢医学会総会, 京都, 2011. 5. 27.
- 国内学会 一般講演
1. 小林正和, 永田真帆, 大倉翔貴, 中村隆宏, 小泉範子, 木下茂: 難治性眼表面疾患に対する培養鼻粘膜上皮シート移植術の開発. 第13回日本再生医療学会総会, 京都,

2014. 3. 6.
2. 中村隆宏, 羽室淳爾, 高石樹朗, 丸山和一, 永田真帆, 川崎論, 板見智, 佐野栄紀, 石井優, 木下茂: LRIG1による角膜の恒常性維持機構の解析. 角膜カンファランス 2014 (第38回日本角膜学会総会・第30回日本角膜移植学会), 沖縄, 2014. 1. 31.
 3. 永田真帆, 中村隆宏, 外園千恵, 稲富勉, 横井則彦, 木下茂: 眼表面扁平上皮腫瘍におけるLRIG1発現解析. 角膜カンファランス 2014 (第38回日本角膜学会総会・第30回日本角膜移植学会), 沖縄, 2014. 1. 31.
 4. 大倉翔貴, 中村隆宏, 畑友衣子, 小林正和, 永田真帆, 小泉範子, 木下茂: 角膜上皮細胞におけるR-spondin1の機能解析. 角膜カンファランス 2014 (第38回日本角膜学会総会・第30回日本角膜移植学会), 沖縄, 2014. 1. 31.
 5. 小林正和, 中村隆宏, 安田誠, 畑友衣子, 大倉翔貴, 岩本美優, 小泉範子, 久育男, 木下茂: 難治性眼表面疾患に対する培養ヒト鼻粘膜上皮シート移植術の開発. 角膜カンファランス 2014 (第38回日本角膜学会総会・第30回日本角膜移植学会), 沖縄, 2014. 1. 31.
 6. 中村隆宏: 難治性角結膜疾患に対する培養口腔粘膜上皮シート移植の橋渡し研究. 第12回日本組織移植学会総会・学術集会, さいたま, 2013. 8. 3.
 7. 小林正和, 中村隆宏, 安田誠, 畑友衣子, 大倉翔貴, 奥村直毅, 小泉範子, 久育男, 木下茂: 難治性眼表面疾患に対する培養鼻粘膜上皮シートの開発. 角膜カンファランス 2013 (第37回日本角膜学会総会・第29回角膜移植学会), 和歌山, 2013. 2. 15.
 8. 永田真帆, 中村隆宏, 外園千恵, 稲富勉, 横井則彦, 板見智, 木下茂: 結膜腫瘍での Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1 (LRIG1)の発現. 第116回日本眼科学会総会. 東京, 2012. 4. 5.
 9. 平田香菜, 中村隆宏, 外園千恵, 稲富勉, 奥村直毅, 小泉範子, 横井則彦, 木下茂: 角膜扁平上皮癌におけるGPR49の発現の検討. 角膜カンファランス 2012 (第36回日本角膜学会総会・第28回日本角膜移植学会). 東京, 2012. 2. 23.
 10. 外園千恵, 稲富勉, 中村隆宏, 小泉範子, 横井則彦, 都田桂子, 松山琴音, 木下茂: 難治性角結膜疾患に対する自家培養口腔粘膜上皮シート移植のレトロスペクティブ調査. 第65回日本臨床眼科学会, 東京, 2011. 10. 8.
 11. 稲富勉, 外園千恵, 中村隆宏, 小泉範子, 都田桂子, 松山琴音, 木下茂: 自家培養口腔粘膜上皮シート移植による結膜嚢再建効果の検討. 第65回日本臨床眼科学会, 東京, 2011. 10. 8.
 12. 外園千恵, 中村周, 中山琴美, 吉川晴菜, 中村隆宏, 稲富勉, 木下茂: 屈折矯正後の重篤なMRSA角膜炎2症例. 第48回日本眼感染症学会, 京都, 2011. 7. 9.
- 〔図書〕(計 1 件)
1. Nakamura T: Non-ocular sources for cell-based ocular surface reconstruction. Ocular Surface Disease: Cornea, Conjunctiva and Tear Film, 1st Edition, 373-383, 2013.
6. 研究組織
 (1) 研究代表者
 中村 隆宏 (NAKAMURA, Takahiro)
 同志社大学・生命医科学部・炎症再生医療研究センター・准教授
 研究者番号: 30411078