

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791851

研究課題名(和文) 幹細胞ニッチにおけるNrf2を介した生体防御機構の役割

研究課題名(英文) The role of the Nrf2-mediated defense system in stem cell niche

研究代表者

林 竜平 (Hayashi, Ryuhei)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70535278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：Nrf2ノックアウト(KO)マウスでは外来異物や酸化ストレスに対する感受性亢進などが引き起こされる。本研究の目的は、角膜上皮再生時におけるNrf2を介した酸化ストレス防御機構の関与を明らかにすることである。角膜上皮創傷治癒実験の結果、Nrf2 KOマウスでは創傷24～48時間で有意に創傷治癒が遅延した。次にその作用機序を明らかにするために、Nrf2もしくはKeap1のノックダウン(KD)の角膜上皮細胞の増殖と遊走への影響を検討したところ、Nrf2発現KDより細胞遊走能は有意に低下し、逆にKeap1のKD(Nrf2活性化)により、細胞遊走能は有意に上昇した。一方、増殖能への影響は限定的であった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the involvement of Nrf2-mediated defense system in corneal epithelial regeneration. Results of corneal epithelial wound-healing experiments demonstrated that corneal epithelial wound healing in Nrf2 KO mice were significantly delayed in 24-48 hours after injury, compared to that in WT. To clarify the role of Nrf2 during wound healing, we performed in vitro experiments with siRNA for Nrf2 and its suppressor Keap1. Nrf2 knockdown significantly delayed corneal epithelial cell migration, but did not affect cell proliferation. Conversely, Keap1 knockdown significantly accelerated cell migration. These results suggest that Nrf2 contributed to the corneal epithelial wound-healing process by accelerating cell migration.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：Nrf2 角膜上皮 角膜上皮幹細胞 創傷治癒 細胞遊走 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

組織幹細胞は多分化能とともに、自己複製能を有し、各組織修復や恒常性の維持に重要な役割を有している。また近年では、これら幹細胞の性質を利用して、再生医療の細胞源としての研究が詳細に行われている。一方で、組織において幹細胞が未分化性を保持する機構、つまり幹細胞ニッチの詳細な機構は不明である。学術的貢献および医療の発展の観点から幹細胞が *in vivo* や *in vitro* 環境でいかに維持されるかを理解するのは極めて重要である。これまでに組織幹細胞ニッチには細胞間接着、血管由来因子、ECM さらに、酸化ストレスや低酸素環境もその一つである。我々は既に細胞間接着に着目した研究を実施し、N-cadherin が幹細胞維持に機構に重要な役割を果たしていることを示唆した (Hayashi R., et al. *Stem Cells* 2007; 図1)。しかし同時に、細胞接着

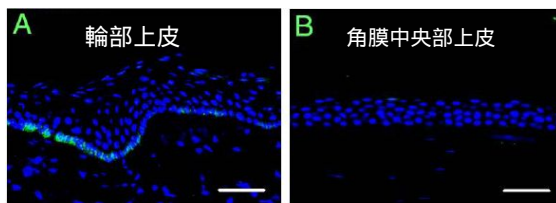


図1 角膜上皮幹細胞ニッチの N-cadherin 発現
角膜上皮幹細胞が存在する輪部上皮においてのみ N-cadherin は発現している。

だけでは幹細胞ニッチの全容解明に不十分であることも示唆された。

そこで、我々は酸化ストレスなどの障害から細胞・組織の防御に寄与する生体防御機構に着目している。近年、幹細胞ニッチや組織再生における酸化ストレスの関与について報告されている。造血幹細胞ニッチにおいては、造血幹細胞は低酸素環境に存在していることが示されており、(Parmar K., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*,2007) 角膜上皮・神経においても同様の報告が存在する

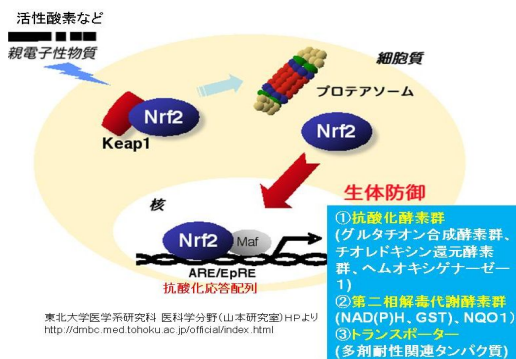


図2 . Nrf2 による生体防御機構

Nrf2 は活性酸素等を感じること、核内に移行し、生体防御遺伝子の発現を促進する。

(Smith J., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*,2000)。一方、これまでに、酸化ストレス自体の報告は多数あるものの、酸化ストレスを含めた様々な内外ストレスに対する「生体防御機構」が幹細胞 (ニッチ) や組織再生における関与は明らかではない。我々が着目する Nrf2 は、酸化ストレスに対する防御遺伝子のみならず、異物代謝酵素群やトランスporterなどの遺伝子発現を統一的に制御しており、生体防御において中心的な役割を有する重要な転写因子であることが明らかになりつつある (図2)。

しかしこれまでに幹細胞と Nrf2 の関係について直接検討された報告はない。そのため我々は、仮説として Nrf2 を介した生体防御機構は、単に酸化ストレスに対する防御を担っているのみならず、幹細胞の維持、増殖、分化、組織再生等を横断的に担う総合的な生体防御システムであると考えており、本仮説を実証すべく本研究を実施した。

2. 研究の目的

成体組織中には組織幹細胞が存在しており、それらにより組織再生・創傷治癒が行われることで組織の恒常性は維持されている。しかし、組織幹細胞が、組織中で維持されるための仕組み”幹細胞ニッチ”は明確になっていない。我々は仮説として、生体防御に中心的な役割を果たす分子 Nrf2 に着目し、Nrf2 が幹細胞維持、細胞分化、増殖、遊走を含めた組織再生プロセスを横断的に関与する因子であると考えている。そこで本研究では、広く研究されている角膜上皮の幹細胞ニッチを研究モデルとして、幹細胞維持および組織再生における Nrf2 の役割の解明を目的とする。

3. 研究の方法

平成 24 年度は、主に Nrf2 KO マウスを用いた解析を中心に行い、平常時および創傷時の組織再生における幹細胞機能および細胞増殖・遊走能に対する影響を検証した。さらに平成 25 年度においては、主に培養ヒト角膜上皮細胞を用いて、siRNA を用いた Nrf2 の抑制および活性化の細胞遊走能や増殖能に対する効果について検討を行った。

4. 研究成果

角膜上皮創傷モデルを作製し、上皮剥離後0-72時間に前眼部写真を撮影し、角膜上皮の創傷治癒面積を定量した。その結果、WTマウスでの創傷治癒は約48時間で完全に治癒していたのに対してNrf2 KOマウスでは創傷24-48時間でWTと比較して有意に創傷治癒が遅延していた (図3)。また、WTの角膜上皮のNrf2の免疫染色により、Nrf2

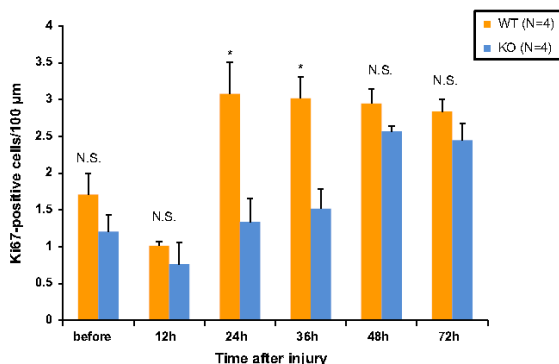


図3 .WT および Nrf2 KO マウスにおける角膜上皮創傷治癒

Nrf2 KO マウスにおいて創傷後 24-48 時間において有意な創傷治癒遅延が認められた。

は核内移行し、活性化が起きていることが示された。Nrf2を介した酸化ストレス防御機構は角膜上皮の再生過程に関与していることが示されたため、その作用機序に関する解析を進めた。まず、siRNAによるNrf2もしくはKeap1発現のノックダウンを培養角膜上皮細胞株にて検討したところ、いずれも70-80%程度のmRNA発現の抑制および、Nrf2下流遺伝子のNQO-1発現の有意な抑制と上昇を確認した。Nrf2もしくはKeap1のノックダウンの角膜上皮細胞の増殖と遊走への影響を検討したところ、**Nrf2発現のノックダウンにより細胞遊走能は有意に低下し、逆にKeap1のノックダウン(Nrf2活性化)により、細胞遊走能は有意に上昇した(図4)**。一方で、Nrf2およびKeap1のノックダウンはいずれも細胞増殖への影響は限定的であっ

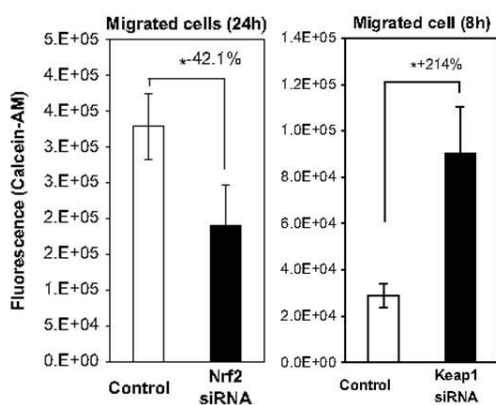


図4 .角膜上皮細胞における Nrf2, Keap1 ノックダウンの細胞遊走能への影響

Nrf2 ノックダウンにより細胞遊走能の有意な低下が認められたが、Keap1 ノックダウンでは細胞遊走能は有意に上昇した。

た。これらのことから、Nrf2は角膜上皮の細胞遊走能に影響し、角膜創傷治癒に關与していることが示された。さらに、Nrf2ノックダウンによりdelta-N p63やp75NTRの発現低下が示唆された。以上の結果より、Nrf2活性化は細胞遊走能と幹細胞性能への影響を介して、角膜上皮再生に寄与したと考えられる。現在までの研究成果について、学術雑誌「Free Radic Biol Med」2013年4月に論文発表し、2013年4月の日本眼科学会、2013年5月の米国眼科学会等で発表を行った。

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6件)

1. Hara S, Hayashi R, Kageyama T, Tsujikawa M, Nishida K. Identification and Potential Application of Human Corneal Endothelial Progenitor Cells, *Stem Cells and Development 2014 in press*
2. Hagiwara K, Obayashi T, Nobuyuki S, Yamanishi E, Konno N, Hayashi R, Nakazawa T, Nishida K, Osumi N, Molecular and cellular features of murine craniofacial and trunk neural crest cells as stem cell-like cells, *PLoS One 2014 9(1) e84072*.
3. Oie Y, Nozaki T, Takayangi H, Hara S, Hayashi R, Takeda S, Mori K, Moriya N, Soma T, Tsujikawa M, Saito K, and Nishida K, Cell transportation technique by airplane for clinical trial using tissue-engineered human oral mucosal epithelial cell sheets. *Tissue Engineering part A 2013, in press*
4. Hayashi R, Himori N, Taguchi K, Ishikawa Y, Uesugi K, Ito M, Yamamoto M, Thomas D, Tsujikawa M, Nakazawa T, Yamamoto M, Nishida K, The Role of Nrf2-Mediated Defense System in Corneal Epithelial Wound Healing. *Free Radic Biol Med 2013 Apr12;61C:333-342*.
5. Hato S, Higa K, Inagaki E, Yoshida S, Kimura E, Hayashi R, Tsujikawa M, Tsubota K, Nishida K, Shimmura S. Validation of Na,K-ATPase pump function in corneal endothelial cells for corneal regenerative medicine. *Tissue Engineering part A 2013 in press*
6. Hayashi R, Ishikawa Y, Kageyama T, Ito M, Takashiba K, Fujioka T, Tsujikawa M, Miyoshi Y, Yamato M, Nakamura Y and Nishida K. Generation of Corneal Epithelial Cells from Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Human Dermal Fibroblast and Limbal Epithelium. *PLoS One. 2012;7(9) e45435*

【学会発表】(計14件)

- 1) 大阪大学蛋白質研究所セミナー2014年3月、シンポジスト「角膜上皮の再生治療」**林 竜平**
- 2) 第13回日本再生医療学会2014年3月、シンポジスト「細胞シートを用いた角膜上皮再生治療～体性幹細胞とiPS細胞～」**林 竜平**
- 3) 第19回眼創傷治癒研究会(広島市)2013年9月、一般口演「角膜上皮創傷治癒におけるNrf2の役割」**林 竜平**、檜森紀子ら
- 4) ARVO 2013, 5, May, 2013 Seattle WA. Susumu Hara, **Ryuhei Hayashi**, Thomas Duncan, Motokazu Tsujikawa, Toru Nakazawa, Masayuki Yamamoto, Kohji Nishida
- 5) ARVO 2013, 5, May, 2013 Seattle WA. The Role of Nrf2-Mediated Defense System in Corneal Epithelial Wound Healing, **Ryuhei Hayashi**, Noriko Himori, Keiko Taguchi, Yuki Ishikawa, Kohji Uesugi, Miyuki Ito, Thomas Duncan, Motokazu Tsujikawa, Toru Nakazawa, Masayuki Yamamoto, Kohji Nishida
- 6) 第117回日本眼科学会2013年4月、一般口演「p75NTRを指標としたヒト角膜内皮由来角膜内皮前駆細胞の性状解析」原進、**林 竜平**、辻川元一、西田幸二
- 7) 第117回日本眼科学会2013年4月、一般口演「角膜上皮創傷治癒におけるNrf2の役割」**林 竜平**、檜森紀子ら
- 8) 第12回日本再生医療学会2013年3月、シンポジスト「iPS細胞による角膜上皮再生医療」**林 竜平**、西田幸二
- 9) 第12回日本再生医療学会2013年3月、一般口演「神経堤マーカーを指標としたヒト角膜内皮細胞の新規培養法の検討」原進、**林 竜平**、辻川元一、西田幸二
- 10) 第12回日本再生医療学会2013年3月、一般講演「iPS細胞からの機能的な培養重層上皮細胞シートの作製」**林 竜平**、石川幸、早川絵理香、相馬剛至、佐々本弦、景山智文、金野なつみ、辻川元一、西田幸二
- 11) 第12回日本再生医療学会2013年3月、ポスター「ヒトiPS細胞からの角膜上皮細胞の分化誘導」石川 幸、**林 竜平**、伊藤美由紀、景山智文、高柴邦子、藤岡剛ら
- 12) 第12回日本再生医療学会2013年3月、ポスター「口腔粘膜上皮細胞シートを用いた新規保存液作製のためのスクリーニング法の確立」香取良祐、**林 竜平**、小林英司、西田幸二)
- 13) 第116回日本眼科学会 シンポジスト2012年4月、「角膜上皮幹細胞・前駆細胞」**林 竜平**

14) 第116回日本眼科学会 一般口演2012年4月、「iPS細胞からの培養上皮細胞シートの作製」**林 竜平**、石川幸、景山智文、早川絵理香、辻川元一、西田幸二

【図書】(計6件)

1. 「iPS細胞を用いた角膜再生医療の現状」2013年、大阪大学医学部学友会会誌公益社団法人 医学振興銀杏会 **林 竜平**、西田幸二
2. 先進医療ナビゲーター「角膜上皮の再生医療」(株)日本医学出版 p108-112 2013年2月、**林 竜平**、西田幸二
3. 「眼手術学・角膜・結膜・屈折矯正」角膜輪部」株式会社文光堂 2013年 **林 竜平**
4. 『再生医療叢書4. 上皮・感覚器』、朝倉書店、「角膜上皮の幹細胞」p32-38, 2013年、**林 竜平**
5. 「角膜上皮幹細胞のニッチ」**林 竜平** 医学書院 「臨床眼科」オキュラーサーフェス診療アップデート 66巻増刊号 2012年10月 327-330
6. 医学のあゆみ「角膜上皮の再生医療」241巻10号 医歯薬出版株式会社2012年6月、p.749-752 **林 竜平**、西田幸二

【産業財産権】

- 出願状況(計 0件)
- 取得状況(計 0件)

【その他】

無し

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
林 竜平 (HAYASHI, Ryuhei)
大阪大学大学院医学系研究科 助教
研究者番号: 70535278
- (2) 研究分担者
()
研究者番号:
- (3) 連携研究者
()
研究者番号: