

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861462

研究課題名(和文) 角膜におけるRSP01の恒常性維持機構

研究課題名(英文) Role of R-spondin1 in corneal homeostasis

研究代表者

永田 真帆 (Nagata, Maho)

京都府立医科大学・医学部附属病院・後期特定専攻医

研究者番号：40614102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：生体において、発生・細胞増殖・細胞分化に大きな役割を果たしているWntシグナル伝達経路のリガンドであるR-spondin1 (RSP01) が角膜において、どのような役割を果たしているかについて研究した。その結果、RSP01ノックアウトマウスにおいて、角膜上皮混濁、角膜上皮創傷治癒遅延、角膜上皮分化異常をおこすことが確認され、RSP01が角膜恒常性維持において大きな役割を果たしている可能性が高いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：R-spondin1 (RSP01) is a ligand of the Wnt signaling pathway that regulates crucial aspects of cell fate determination such as embryonic development, cell proliferation, and cell differentiation. Role of RSP01 in corneal homeostasis was investigated. As a result, RSP01 gene knockout mouse represented subepithelial corneal opacity, delay of corneal epithelial wound healing, and abnormality of corneal differentiation, that indicates the important role of RSP01 in corneal homeostasis.

研究分野：眼科学

キーワード：角膜上皮 細胞分化 創傷治癒 角膜混濁 Wntシグナル R-spondin1 分化異常

1. 研究開始当初の背景

我々の研究グループは、これまでに角膜上皮幹細胞の維持機構を明らかにする目的で、single cell clonal analysis 法を導入し、単一細胞レベルからの網羅的な角膜上皮幹細胞遺伝子発現プロファイルの作成を試みた。その結果、角膜上皮幹細胞において Wnt シグナル伝達系の主要ターゲット遺伝子の一つである Leucine rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 (LGR5) 遺伝子が活性化されていることがわかった。2011年にそのリガンドとして R-spondin1 (RSP01) が発見され注目されることとなったが、この RSP01 は、ヒトの遺伝子異常により生殖器異常を生じ、同時に角膜混濁を生じるとの報告がある。我々は、RSP01 が角膜透明性維持に関与するのではないかと考え本研究を着想した。

2. 研究の目的

Wnt シグナル伝達関連因子であり、幹細胞増殖促進効果を示すとされる RSP01 が、角膜の恒常性維持機構においてどのような役割を果たしているかを解析する。

我々は角膜上皮幹細胞の単一細胞からの網羅的な遺伝子発現プロファイルより Wnt シグナル伝達系関連遺伝子の活性化を確認している。その Wnt シグナル伝達系の関連因子である RSP01 に注目し、遺伝子改変マウスおよびを用いて in vivo/in vitro 機能解析を行い、Wild type との違いについて比較検討する。RSP01 の角膜幹細胞への増殖促進効果、および角膜の恒常性維持への役割を検討することにより、より純化した角膜上皮幹細胞を用いた角膜再生医療の開発を目標とする。

3. 研究の方法

1. 形態学的・組織学的検討

RSP01 遺伝子欠損マウスを作成し、経時的に眼球を肉眼的・組織学的に観察し、Wild type マウスと比較した。同時に、角膜周辺組織(結膜、眼瞼、マイボーム腺等)の形態学的考察を加え、角膜との関連性も検討する。RSP01 遺伝子欠損マウスを生育・維持していく経過の中で特徴的な表現型が観察される場合は、必要に応じて走査型・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。Wild type マウスを用い、発生段階から成長期にかけて RSP01 の発現分布の特徴を免疫組織化学染色法、RT-PCR 法により経時的に観察した。

2. 細胞生物学的検討

上記により採取したマウス角膜(Wild type, Knock-out)におけるキャラクター解析を行う。具体的には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, デスモブラキン等)、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)、炎症マーカー(TNF, INF, IL6/8 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、細胞分化に関する情報を集積する。また、その表現型が特徴的な場合は Real Time-PCR 法等を用いて定量的に考察する。

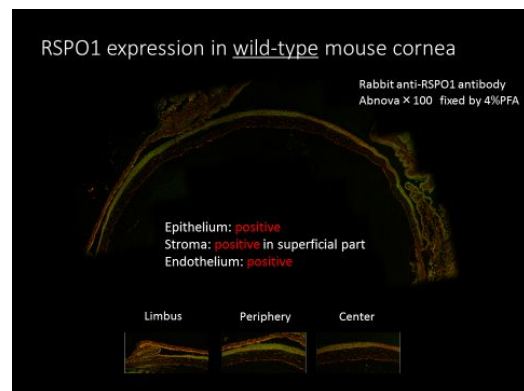
さらに RSP01 遺伝子欠損マウスより採取した角膜上皮細胞を培養し、角膜上皮細胞の増殖、分化に関して in vitro における機能解析を行う。

3. 角膜創傷モデルによる RSP01 の in vivo 機能解析

RSP01 遺伝子欠損マウスの角膜創傷モデルを作成し、組織再生をしていく過程での RSP01 の in vivo における機能解析を行う。角膜創傷後、経時的に角膜創傷範囲を観察し、創傷治癒過程にどのような差があるか Wild type マウスと比較する。また、経時的にサンプリングした組織を用いて、免疫組織化学的手法で細胞増殖マーカー、細胞分化マーカー、幹細胞マーカー等の発現について確認する。さらに、RT-PCR 法などにより、関連する遺伝子の発現パターンを詳細に解析する。

4. 研究成果

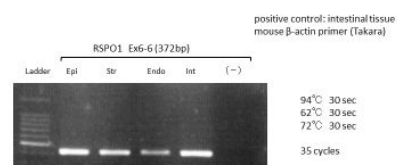
(1) Wild-type マウスにおける RSP01 の発現
Wild-type マウスの角膜組織において、RSP01 の発現分布を免疫染色により確認したところ、角膜上皮、角膜実質浅層、角膜内皮に発現が確認された。



角膜上皮、実質、内皮をわけて採取し、それぞれ RT-PCR 法により RNA レベルでの発現を確認したが、角膜上皮、実質、内皮ともに発現が確認された。

RSP01 expression in wild-type mouse cornea

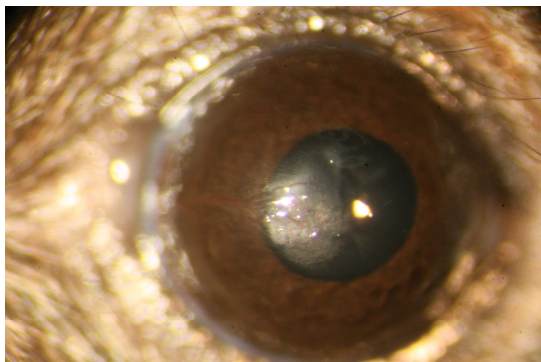
RT-PCR



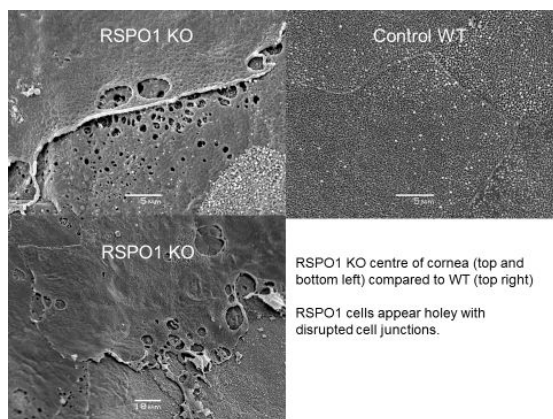
RSP01 expressed in corneal epithelium, stroma, and endothelium.

(2)RSP01-KO マウスの形態学的・組織学的変化

RSP01-KO マウスの前眼部を継続的に観察した結果、2 か月以降強い点状表層角膜症が目立ち、3-6 か月以降角膜中央部の角膜上皮下～角膜実質浅層の楕円形の角膜混濁を生じた。中には、混濁にむかう新生血管を生じるほど炎症所見が強いものがあった。



HE 染色でも角膜上皮下もしくは角膜実質浅層の沈着物を認め、沈着物のまわりに炎症性細胞、新生血管と思われる所見を確認した。HE 染色では、角膜上皮細胞間隙に多くの空胞形成が確認された。また、角膜上皮最表層の不整な様子もみられた。電子顕微鏡を用いて、これらの所見について確認したところ、角膜上皮再表層の細胞間のタイトジャンクション構造が破綻し、細胞表面部分に無数の穴がみられた。



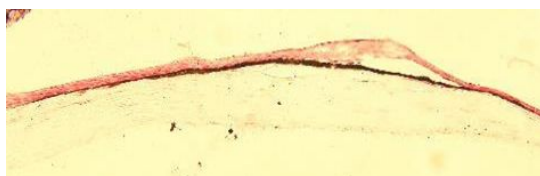
(3)RSP01-KO マウスの点状表層角膜症の原因検索

同じく点状表層角膜症を生じる疾患としては涙液減少によるドライアイ、Meibom 腺機能不全、眼瞼縁炎による眼瞼縁角化等がある。RSP01-KO マウスおよび Wild-type マウスの涙液量をフェノールレッド綿糸法により測定したところ、両群に有意差は認めなかった。また、眼瞼の HE 染色を確認したが、Meibom 腺異常や眼瞼縁の角化の所見は認めなかった。

(4)RSP01-KO マウスの角膜混濁の原因検索

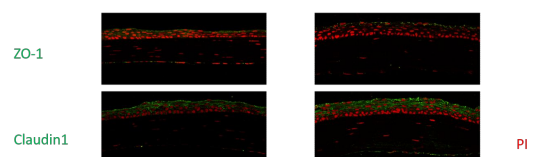
角膜混濁の原因となっていると思われる沈着物の内容を調べるため、カルシウム染色

(von Kossa 法) を行ったところ、沈着物に強い染色がみられ、カルシウムを含む沈着物であることが確認された。



同じくカルシウム沈着をおこす帯状角膜変性では、全身の血液中のカルシウム濃度が高くなる腎臓疾患や糖尿病、または眼局所の炎症が強い場合に起こりやすい。RSP01-KO マウスの血液中のカルシウム濃度を測定したが、特に異常は認めず、その他血液中の生化学的検査においても腎臓疾患、糖尿病を疑う異常は認めなかった。眼局所の炎症については、前眼部所見、HE 染色で、細胞浸潤、新生血管などの炎症所見が認められ、通常よりも炎症が強いことでカルシウム沈着を起こしやすい状態にあることが示唆される。

涙液中には正常状態でもカルシウムが含まれるとされ、角膜上皮タイトジャンクション破綻などによりカルシウムが上皮下および角膜実質浅層に沈着する可能性がある。RSP01-KO マウスのタイトジャンクション構造については、電子顕微鏡所見で破綻していることが確認されているため、免疫染色においても、細胞接着について、ZO-1、claudin1 について染色を行ったところ、やはり RSP01-KO マウスでは染色がみられず、細胞接着構造が破綻していることが確認された。



これより、細胞間接着の破綻により、涙液中のカルシウムが角膜上皮内、上皮下、角膜実質にまで浸透し、カルシウム沈着を引き起こしている可能性が考えられた。

つまり、炎症惹起と細胞接着破綻の両方が角膜混濁の原因ではないかと現在は考えている。

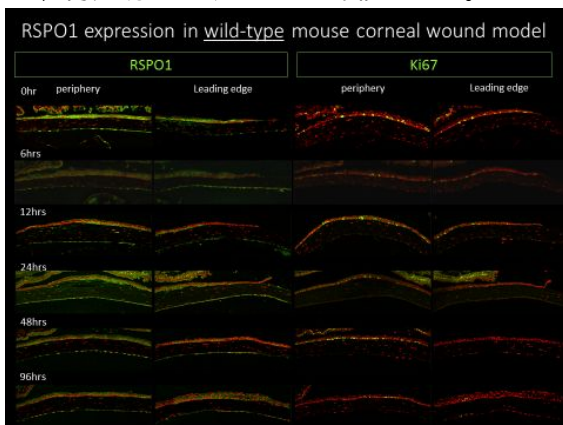
(5)RSP01 の眼球発生への関与

RSP01-KO マウスは、一見 Wild-type マウスと同様に眼球発達していると思われたが、継続的に角膜径を計測すると、全週齢で RSP01-KO マウスでは明らかに角膜径が小さく、RSP01 が眼球発達段階において何らかの作用がある可能性が考えられた。その機序については現在のところ不明である。

Meibom 腺発生異常などによる角膜上皮恒常性維持への関与について調べるため、生後 9-12 日にかけて、眼瞼の開瞼時期を比較検討したが、RSP01-KO マウスで特に開瞼時期がはやいまたは遅いということはなく、眼瞼発生の異常による角膜恒常性維持への関与については、否定的である。

(6)RSP01 の創傷治癒過程での恒常性維持への関与

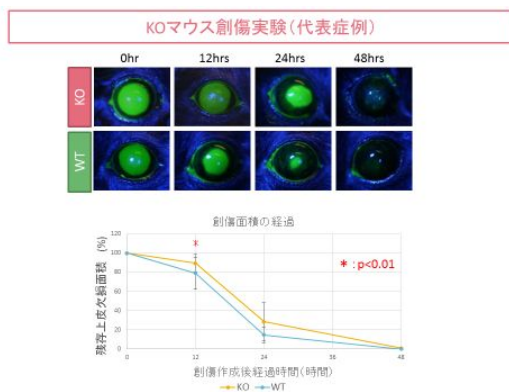
Wild-type マウスの角膜上皮に円形の上皮欠損を作成し、継時的に（直後、6、12、24、48、96 時間後）角膜組織を採取し、RSP01 の免疫染色を行ったところ、創傷直後には RSP01 の発現が低下し、48-96 時間後にかけて、再発現してくることが確認された。



創傷治癒過程では、RSP01 が特に重層化する段階、つまり角膜再構築期において働いている可能性が示唆された。

(7)RSP01 の角膜上皮創傷治癒への関与

RSP01-KO マウスと Wild-type マウスの角膜中央部に円形の上皮欠損を作成し、継時的に角膜上皮欠損の大きさを計測し、両者の差を検討したところ、全測定時点で RSP01-KO マウスでは Wild-type マウスよりも角膜欠損が大きく、創傷治癒遅延が起きていることが確認された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Jongkhajornpong P, Nakamura T, Sotozono C, Nagata M, Inatomi T, Kinoshita S. Elevated expression of ABCB5 in ocular surface squamous neoplasia. Sci Rep. (査読あり) 6: 20541, 2016.

Nagata M, Nakamura T, Hata Y, Yamaguchi S, Kaku T, Kinoshita S. JBP485 promotes corneal epithelial wound healing. Sci

Rep. (査読あり) 5: 14776, 2015.

Nakamura T, Hata Y, Nagata M, Yokoi N, Yamaguchi S, Kaku T, Kinoshita S. JBP485 promotes tear and mucin secretion in ocular surface epithelia. Sci Rep. (査読あり) 5: 10248, 2015.

Kobayashi M, Nakamura T, Yasuda M, Hata Y, Okura S, Iwamoto M, Nagata M, Fullwood NJ, Koizumi N, Hisa Y, Kinoshita S: Ocular surface reconstruction with a tissue-engineered nasal mucosal epithelial cell sheet for the treatment of severe ocular surface diseases. Stem Cells Transl Med. (査読あり) 4(1): 99-109, 2015.

Nagata M, Nakamura T, Sotozono C, Inatomi T, Yokoi N, Kinoshita S. LRIG1 as a potential novel marker for neoplastic transformation in ocular surface squamous neoplasia. PLoS One. (査読あり) 9(4): e93164, 2014.

〔学会発表〕(計 7 件)

永田真帆、中村隆宏、畑由衣子、村越友衣乃、山口俊平、郭太乙、外園千恵、木下茂。合成ペプチド JBP485 の角膜上皮創傷治癒促進効果。角膜カンファレンス 2016, 2016 年 2 月 20 日, 軽井沢プリンスホテルウエスト(長野県北佐久郡軽井沢町)。

村越友衣乃、中村隆宏、永田真帆、山口俊平、郭太乙、外園千恵、木下茂。ラエンネックによるムチン分泌・産生能に関する検討。角膜カンファレンス 2016, 2016 年 2 月 20 日, 軽井沢プリンスホテルウエスト(長野県北佐久郡軽井沢町)。

岩本美優、中村隆宏、永田真帆、村越友衣乃、奥村直毅、外園千恵、小泉範子、木下茂。角膜カンファレンス 2016, 2016 年 2 月 18-20 日, 軽井沢プリンスホテルウエスト(長野県北佐久郡軽井沢町)。

永田真帆、中村隆宏、畑由衣子、村越友衣乃、山口俊平、郭太乙、外園千恵、木下茂。合成ペプチド JBP485 の角膜上皮創傷治癒促進効果。4 大学連携研究フォーラム, 2015 年 11 月 25 日, 京都府立大学(京都府京都市)。

永田真帆、中村隆宏、畑由衣子、大倉翔貴、岩本美優、木下茂。角膜上皮創傷治癒における R-spondin1 の発現解析。角膜カンファレンス 2015, 2015 年 2 月 11-13 日, 高知市文化プラザかるぼーと(高知県高知市)。

大倉翔貴、中村隆宏、畑由衣子、岩本美優、
永田真帆、小泉範子、木下茂．ヒト角膜上皮
細胞に対する R-spondin1 の機能解析．角膜
カンファランス 2015，2015 年 2 月 12 日，高
知市文化プラザかるぼーと（高知県高知市）．

永田真帆、中村隆宏、畑由衣子、大倉翔貴、
岩本美優、木下茂．角膜上皮創傷治癒におけ
る R-spondin1 発現 .4 大学連携研究フォーラ
ム，2014 年 12 月 2 日，京都工芸繊維大学（京
都府京都市）．

〔図書〕（計 2 件）

永田真帆，外園千恵．第 3 章 各論
角結膜腫瘍，D．異形成症，上皮内癌，扁平
上皮癌．眼科臨床エキスパート 知っておき
たい眼腫瘍診療（大島浩一・後藤浩編）
252-258，医学書院，東京，2015．

永田真帆，外園千恵．第 10 章 腫瘍性疾
患．小児眼科学（東範行編）186-193，三輪
書店，東京，2015．

〔その他〕

ホームページ等

（京都府立医科大学眼科）

http://www.opth.kpu-m.ac.jp/actual_results/2011/

（京都府立医科大学感覚器未来医療学）

<http://shigerukinoshita.com/publications/index.html>

（ランカスター大学）

[http://www.research.lancs.ac.uk/portal/en/people/nigel-fullwood\(07632a44-c3b1-408f-8753-a7e252e0f9c6\)/publications.html](http://www.research.lancs.ac.uk/portal/en/people/nigel-fullwood(07632a44-c3b1-408f-8753-a7e252e0f9c6)/publications.html)

6．研究組織

(1)研究代表者

永田 真帆 (NAGATA, Maho)

京都府立医科大学・医学部附属病院・後期
特定専攻医

研究者番号：4 0 6 1 4 1 0 2

(2)研究分担者

なし

(3)研究協力者

Nigel Fullwood

ランカスター大学・Biomedical and Life
Science・Senior Lecturer