

機関番号：34310

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791721

研究課題名（和文） Notch シグナルによる上皮幹細胞の恒常性維持機構の解明

研究課題名（英文） Notch signaling regulates the homeostatic function of corneal epithelial stem cells.

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

研究成果の概要（和文）：Notch シグナルの主要関連分子の Hes1 は、角膜や眼球の形態発生において必要不可欠な役割を担っていることが解明された。また、Hes1 は角膜上皮幹細胞、前駆細胞等に局所特異的に発現しており、分化した角膜上皮細胞には発現していなかった。遺伝子導入実験からその機能としては、細胞増殖を抑制して角膜上皮幹細胞を未分化状態に維持し、角膜上皮の恒常性維持機構に極めて重要な働きをしていることがはじめて確認された。

研究成果の概要（英文）：Hes1, a major target gene in Notch signaling, is essential for corneal and eye morphogenesis. Hes1 is mainly expressed in the corneal epithelial stem/progenitor cells and is not detected in the differentiated corneal epithelial cells. Forced Hes1 expression inhibits the differentiation of corneal epithelial stem/progenitor cells and maintains these cells' undifferentiated state. Our data provides the first evidence that Hes1 is essential for corneal morphogenesis and regulates the homeostatic function of corneal epithelial stem/progenitor cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：眼発生・再生医学

1. 研究開始当初の背景

Notch シグナルは発生過程の多様な局面で細胞運命の決定や細胞分化を調節し、さまざまな臓器で重要な役割を担っている事が明らかになりつつあるが、角膜における機能解析に関しては全くなされていない。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 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の作成を試みた。集積したデータから Notch シグナル伝達系が活性化している知見が得られた。

2. 研究の目的

本研究では、角膜をモデルに用いて、Notch シグナル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、Notch シグナルの主要関連因子である Hes1 遺伝子

の欠損マウス、ならびに上皮細胞特異的に Hes1 遺伝子欠損マウスを作成し、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、Notch シグナル関連因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

Notch1/Hes1 遺伝子欠損マウスモデルを用いて角膜における機能解析を、①組織学的・形態学的検討、②細胞生物学的検討、③分子生物学的検討、④角膜創傷モデルによる Notch シグナル因子の in vivo 機能解析、⑤遺伝子導入による Notch シグナル因子の in vitro 機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) まず Notch シグナルの主要関連因子である Notch1 遺伝子欠損マウスを用いて、Notch シグナルと角膜上皮との関連性を検討した。その結果、既報のとおり角膜創傷モデルにて、上皮が血管新生を伴って過増殖し、角化上皮へと分化転換した。よって Notch シグナルが角膜上皮の恒常性維持機構において機能的な役割を果たしていることを確認した。

(2) 次に Notch シグナルの下流にある主要関連因子である Hes1 遺伝子の欠損マウスを作成し、角膜、特に角膜上皮における機能解析を行った。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、K0 マウスの角膜は著しく発生が障害されていることがわかった。また細胞生物学的、分子生物学的検討から、Hes1 は角膜上皮の発生や恒常性維持機構に重要な働きをしていることが確認された。

(3) Hes1 遺伝子の欠損マウスならびに Hes1-GFP マウスを作成し、角膜、特に角膜上皮における機能解析を行った。Hes1-GFP マウスを解析した結果、Hes1 遺伝子は角膜上皮幹細胞が存在すると考えられている角膜輪部上皮基底細胞に強く発現していることがわかった。

(4) マウス角膜創傷モデルによる Notch シグナル関連因子の in vivo における機能解析を行った。その結果、Hes1 は角膜上皮の創傷治癒過程において、強くその発現が認められ、Ki67 などの細胞増殖マーカーとも相関することがわかった。

(5) レトロウイルスベクター (CLIG) を用い

て Hes1 を培養角膜上皮細胞に遺伝子導入した。その結果、Hes1 は細胞増殖サイクルを抑制する作用が認められた。また Hes1 遺伝子は、角膜上皮幹細胞を未分化な状態に維持する作用があることがわかった。

以上のことより、Hes1 は細胞増殖を抑制して角膜上皮幹細胞を未分化状態に維持する機能があり、角膜上皮の発生や恒常性維持機構に極めて重要な働きをしていることが確認された。

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 7 件)

1. Nakamura T, Kelly JG, Trevisan J, Cooper LJ, Carmichael PL, Scott AC, Cotte M, Susini J, Martin-Hirsch PL, Kinoshita S, Fullwood NJ, Martin F: Micro spectroscopy of spectral biomarkers associated with human corneal stem cells. *Mol Vis*. 16:359-368, 2010. 査読有
2. Connon CJ, Douth J, Chen B, Hopkinson A, Mehta JS, Nakamura T, Kinoshita S, Meek KM: The variation in transparency of amniotic membrane used in ocular surface regeneration. *Br J Ophthalmol*. 94(8):963-964, 2010. 査読有
3. Kelly JG, Nakamura T, Kinoshita S, Fullwood NJ, Martin FL: Evidence for a stem-cell lineage in corneal squamous cell carcinoma using synchrotronbased Fourier-transform infrared microspectroscopy and multivariate analysis. *Analyst*. 135(12): 3120-3125, 2010. 査読有
4. Nakamura T, Sotozono C, Bentley AJ, Mano S, Inatomi T, Koizumi N, Fullwood NJ, Kinoshita S: Long-Term Phenotypic Study After Allogeneic Cultivated Corneal Limbal Epithelial Transplantation for Severe Ocular Surface Diseases. *Ophthalmology*. 117(12):2247-2254, 2010. 査読有

5. Grude O, Nakamura T, Hammiche A, Bentley AJ, Martin FL, Pollock HM, Kinoshita S, Fullwood NJ. Discrimination of human stem cells by photothermal microspectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*. 49(1): 22–27, 2009. 査読有
6. Takayama T, Kondo T, Kobayashi M, Ohta K, Ishibashi Y, Kanemaru T, Shimazu H, Ishikawa F, Nakamura T, Kinoshita S, Nakamura K: Characteristic morphology and distribution of bone marrow derived cells in the cornea. *The Anatomical Record*. 292(5): 756-763, 2009. 査読有
7. Takaoka M, Nakamura T, Sugai H, Bentley AJ, Nakajima N, Yokoi N, Fullwood NJ, Hyon SH, Kinoshita S: Novel Sutureless Keratoplasty with a Chemically Defined Bioadhesive. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 50(6):2679-2685, 2009. 査読有

〔学会発表〕（計 10 件）

1. Nakamura T: Long-Term Clinical Results of Autologous Cultivated Corneal Limbal Epithelial Transplantation in Severe Ocular Surface Disease. The 2nd Asia Cornea Society Biennial Scientific Meeting, Kyoto, Japan, 2010.12.3.
2. Nakamura T: Long-Term Results of Autologous Cultivated Oral Mucosal Epithelial Transplantation in The Scar Phase of Severe Ocular Surface Disease. 2010 Korea-Kyoto Joint Cornea Conference, Kyoto, Japan, 2010.12.3.
3. Nakamura T, Kinoshita S: Hes1 Regulates Corneal Development and The Function of Corneal Epithelial Stem Progenitor Cells. XIX Biennial Meeting of the International Society for Eye Research (ISER), Montreal, Canada, 2010.7.22.

4. Maruyama K, Bock F, Schlotzer-Schrehardt U, Nakamura T, Kerjaschki D, Kruse F.E, Kinoshita S, Cursiefen C: Podoplanin Regulates Corneal Epithelial Morphology. 2010 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, USA, 2010.5.6.
5. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Kinoshita S: Long-Term Results of Autologous Cultivated Corneal Limbal Epithelial Transplantation in Severe Ocular Surface Disorders. 2010 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, USA, 2010.5.2.
6. Nakamura T, Takeda K, Inatomi T, Sotozono C, Kinoshita S: Autologous Cultivated Oral Mucosal Epithelial Transplantation in Severe Ocular Surface Disorders: Long-Term Results. World Cornea Congress VI, Boston, USA, 2010.4.9.
7. Nakamura T: New development of corneal epithelial regeneration. 3rd KPUM-FAU Erlangen-Nurnberg Joint Meeting. Erlangen, Germany, 2009.11.10.
8. Nakamura T, K Takeda, T Inatomi, C Sotozono, S Kinoshita: Long-Term Results of Autologous Cultivated Oral Mucosal Epithelial Transplantation in Severe Ocular Surface Disorders. 2009 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, USA, 2009.5.7.
9. Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Sotozono C, Kinoshita S: Phenotypic Analysis of Cultivated Oral Mucosal

Epithelium Transplanted on a Human Cornea. 2009 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, USA, 2009.5.7.

10. Sotozono C, Nakamura T, Inatomi T, Hamuro J, Satake Y, Shimazaki J, Tsubota K, Hara Y, Ohashi Y, Kinoshita S: Multicenter Prospective Analysis of Cultured Corneal Epithelial Sheet Transplantation. 2009 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, USA, 2009.5.4.

[図書] (計 3 件)

1. 中村隆宏: 角膜疾患 難治性眼表面疾患の克服に向けて. 臨床眼科 64(13): 1994-2002, 2010.
2. 中村隆宏, 木下茂: 角膜. 遺伝子医学 MOOK 13 号. 295-298, 2009.
3. 中村隆宏, 木下茂: 角膜の再生医療. 総合臨床, 58(1): 104-111, 2009.

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・准教授
研究者番号：30411078

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし