

令和元年5月16日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11326

研究課題名(和文) RSP01を用いた角膜再生医療の基盤技術開発

研究課題名(英文) Basic technology development of corneal regenerative medicine using RSP01

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・客員講師

研究者番号：40614102

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)：角膜は、透明性を維持することで眼の機能を保つが、その機序は詳細には解明されていない。RSP01遺伝子欠損マウスでは、徐々に角膜が混濁する。また、炎症反応が強く創傷治癒が遅延するほか、バリア機能が失われ角膜上皮下沈着物にカルシウム(Ca)を含む。この角膜上皮では、Caに結合するS100A8/A9遺伝子発現が大幅に上昇していた。RSP01は本来バリア機能を保持し同時にS100A8/9発現をおさえることでCa沈着などを抑制すると考えられた。角膜の透明性維持機構のひとつとして、RSP01が関与していることが解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、角膜の透明性維持機構の一部を解明するものである。角膜の透明性が失われる疾患で、とくに炎症が遅延したり創傷治癒遅延がおこる素因があると、角膜移植を行っても最終的に透明性維持が難しく視力が回復しない場合がある。角膜の透明性維持機構を解明することで、今まで治癒することが難しかった角膜疾患の治療に役立てられる可能性がある。本研究では、RSP01が炎症を制御し創傷治癒を促進することがわかり、同時にカルシウム沈着を主とする角膜混濁を抑制する働きがあることが証明され、角膜の透明維持機構の一部に迫るとともに角膜混濁を生じる疾患の治療への基盤となる知見となった。

研究成果の概要(英文)：Corneal transparency is necessary to maintain visual function, but the mechanism to keep its transparency remains unclear. We found that RSP01 gene-deficient mouse gradually occurs corneal opacity and deposit. In this mouse, increased inflammation and delayed wound healing were found. Moreover, we found that the barrier function of the corneal epithelium was poor in this mouse and the deposits within cornea contained calcium. Gene expression analysis of the corneal epithelium revealed that the calcium-binding proteins S100A8/A9 were remarkably up-regulated in RSP01 gene-deficient mouse. We suppose that RSP01 originally keeps the barrier function of corneal epithelium, suppresses S100A8/A9 expression, and prevents accumulating calcium deposits. We conclude that RSP01 is one of the key to elucidate the mechanism of maintaining the corneal transparency.

研究分野：角膜再生医療

キーワード：RSP01 角膜混濁 Wnt 炎症 創傷治癒 角膜上皮 S100A8/A9 カルシウム沈着

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

生体の各組織には組織特異的な幹細胞が存在し、組織の発生・修復・再生に重要な役割を担う。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が、その細胞動態や維持機構に関しては不明な点が多い。

我々の研究グループは、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 (図 1) の主要ターゲット遺伝子である LGR5 遺伝子が活性化していることを確認した (共同研究者中村ら)<sup>1,2</sup>。

Wnt シグナル伝達系は個体発生、組織再生、発癌等において重要な役割を担う。LGR5 は Wnt と複合体を形成する G タンパク共結合型受容体で (図 1) 腸管上皮 (2007 年) 皮膚 (2008 年) の上皮幹細胞に特異的に発現し、幹細胞研究で注目されている。この LGR5 のリガンドは近年まで不明であったが、2011 年に RSPO1 が LGR5 のリガンドのひとつであることが証明された (図 1)。

RSPO1 は Wnt agonist として働き、腸管の幹細胞増殖を促進する。これよりヒントを得て、我々は予備実験で、ウサギ創傷モデルにおいて RSPO1 点眼が角膜上皮創傷治癒を促進することを発見した (図 2、未公表データ)。さらに in vivo/in vitro で増殖活性が低い角膜内皮細胞においても RSPO1 には強い細胞増殖促進効果があることも示した (共同研究者平田ら)<sup>3,4</sup>。一方、ヒト RSPO1 遺伝子異常家系では、半陰陽、掌蹠角化症等とともに両眼の角膜混濁が生じるとの症例報告 (2008 年) があり角膜恒常性維持への関与が示唆されるが、角膜混濁を生じる病態の詳細は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、RSPO1 による角膜上皮増殖促進機構および角膜恒常性維持機構を解明することが目的である。具体的には RSPO1 遺伝子欠損 (KO) マウスと Wild-type マウスとの違いについて、細胞生物学的、分子生物学的に解析した。我々は、準備段階で生体創出に成功した RSPO1-KO マウスで角膜混濁発生を確認したが、この角膜混濁の病態やメカニズムについては、不明であった。よって、RSPO1 の角膜上皮創傷治癒における役割について、および 遺伝子欠損により角膜混濁が生じるメカニズム について、細胞生物学的、分子生物学的的手法等を用いて詳細に検討し考察することを目的としている。これらの実験により得られたデータを集積し、RSPO1 の角膜の恒常性維持における役割について検討した。RSPO1 の角膜創傷治癒促進効果、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、より効率の良い角膜再生医療につながる基盤技術の開発を目標とするものである。

(参考文献)

1. Tomizuka K et al. Hum Mol Genet 17(9);1278-1291:2008
2. Nakamura T et al. I Stem cells. 25; 628-638:2007.
3. Ueno M et al. Proc Natl Acad Sci USA. 103; 9554-9559: 2006.
4. Nakamura T et al. Ophthalmology 113; 1765-72: 2006.

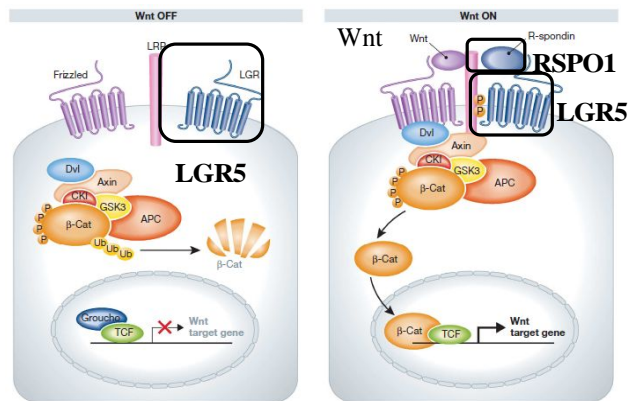
## 3. 研究の方法

### RSPO1 遺伝子欠損マウスモデルを用いた角膜における機能解析

#### 1. 形態学的・組織学的検討

RSPO1 遺伝子欠損マウスを作成し、経時的に眼球を採取して角膜の形態発生を肉眼的・組織学的に観

(図 1) LGR5 とそのリガンドである RSPO1



察し、Wild type マウスと比較した。以前の我々の実験で、RSP01 遺伝子欠損マウス数匹において、壮年期以降に角膜混濁を生じることがわかっている。これらを生じるメカニズムに関連する所見や組織変化について、若年期からさらに詳細に観察し、継時的に組織を採取し形態学的変化を分析した。同時に、角膜周辺組織（結膜、眼瞼、マイボーム腺等）についても形態学的考察を加え、角膜での変化との関連性も検討した。前眼部だけでなく、眼球発生における RSP01 の関与も考慮し、発生段階での形態学的・組織学的解析を行った。

## 2．細胞生物学的検討

上記により継時的に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ことで、RSP01 遺伝子欠損マウスで生じる角膜混濁の原因について、細胞生物学的に検討し、RSP01 の角膜恒常性維持における役割について考察した。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)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た。特に RSP01 遺伝子欠損マウスにおいて角膜混濁が確認されているため、混濁が生じるメカニズム解明のため、細胞間接着や細胞分化についてより詳細に検討を行った。また、RSP01 遺伝子欠損マウスで生じる角膜混濁の構成物について、様々な染色方法を用いて検索した。RSP01 の遺伝子レベルでの恒常性維持機構を解明するため、in vitro における RSP01 遺伝子欠損マウス角膜上皮細胞に対して、網羅的な遺伝子発現解析を行い、in vivo/in vitro における遺伝子発現動態を調べた。遺伝子欠損マウスの遺伝子発現プロファイルにおいて、特徴的な増減を示した遺伝子群（S100A8/S100A9）に対しては、その発現を Real time-PCR 法で確認し、その機能に関して考察した。

## 3．角膜創傷モデルによる RSP01 の in vivo 機能解析

我々は、予備実験でウサギへの RSP01 点眼による RSP01 の創傷治癒促進効果を確認している。組織再生の過程での RSP01 の in vivo における機能解析を行うため、RSP01 遺伝子欠損マウスの角膜創傷モデルを作成し、Wild-type マウスとの差について比較検討した。創傷作成後、継時的に採取した組織を用いて、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、炎症関連マーカー、幹細胞マーカー等の発現について確認した。特にこれまでの角膜内皮細胞における in vitro の実験において RSP01 による細胞増殖促進効果が確認されているため、細胞増殖関連因子についてより詳細に検討する。

RSP01 遺伝子欠損マウスで発現がとくに上昇していた S100A9 の transgenic マウスについての角膜およびその他の組織の形態学的解析および機能解析

### 1．形態学的解析

本研究で明らかになった、RSP01-遺伝子欠損マウスにおいて発現が上昇していた、calcium-binding protein のひとつである S100A9 についてその生体への影響について考察を加えた。S100A9-transgenic マウスを入手し、その形態学的、特徴について詳細に観察し、解析した。S100A9-transgenic マウスを経時的に観察し、角膜におこる変化について細隙灯顕微鏡にて詳細に観察した。

### 2．組織学的解析

角膜組織を経時的にサンプリングし、正常との違いについて考察を加えた。形態学的解析の結果で RSP01 遺伝子欠損マウスと類似の角膜沈着物があったため、角膜沈着物の構成内容について、様々な染色を行った。

## 4．研究成果

Wnt シグナルのリガンドである RSP01 の遺伝子異常家系では両眼性の角膜混濁と手掌足底の過角化、難聴をおこすが、RSP01-KO マウスで角膜混濁、角膜炎症、角膜上皮障害が徐々に出現することを確認した。また RSP01-KO マウスでは角膜上皮創傷治癒が遅延し、創傷治癒過程では創傷 1 週間で明らかにマクロフ

アージが多く浸潤していることを確認した。RSP01 は本来創傷治癒時に炎症反応を制御し創傷治癒を助ける役目があると思われた。

角膜混濁の原因検索のための実験では、von Kossa 法、電子顕微鏡により角膜上皮下へのカルシウム沈着、免疫組織染色と電子顕微鏡によりタイトジャンクション (TJ) の乱れを証明し、何らかの機序で TJ が破綻した結果、バリア機能が低下し涙液中の物質が上皮下に浸透し蓄積しているのではないかと考えられた。遺伝子異常による発現変化を調べるため、RSP01-K0 マウスより角膜上皮のみを分離し、抽出した RNA を用いて網羅的遺伝子解析を行った。その結果、カルシウムを含む沈着物や炎症を引き起こす物質として、S100A8/A9 の発現上昇を発見した。この S100A8/A9 は、炎症部位に発現するタンパクでもあり、一部の研究では、発現上昇により TJ を障害しうる、さらには、S100A8/A9 がヘテロダイマーを形成してカルシウムとともにアミロイドを形成するとの結果が報告されており、RSP01-K0 マウスの角膜混濁の機序の仮説にあてはまる。さらには、RSP01-K0 マウスより角膜上皮のみを分離して RNA を抽出し、この S100A8/A9 の相対的発現量を Realtime-PCR 法を用いて解析したところ、著明な発現上昇を認め (S100A8 は 96.90 倍、S100A9 は 141.96 倍) S100A8/A9 が RSP01 の発現に大きく関与していることを示唆するものとなった。また間接免疫染色法を用いて、RSP01-K0 マウス角膜での S100A8/A9 の染色を行ったところ、上皮下および角膜実質に生じている沈着部位で陽性であった。さらには、S100A9 transgenic マウスを入手して長期経過を観察すると、角膜混濁を起こすことを観察した。この角膜の von Kossa 染色では角膜沈着物にカルシウムが含まれることを証明した。

RSP01 遺伝子欠損マウスにおいては、S100A8/A9 の発現上昇に伴い、TJ 破綻により涙液より上皮下にまわりこんだカルシウムとともに結合し複合体を形成したものが沈着しているとの仮説に矛盾しないものとなった。

RSP01 は、S100A8/A9 の発現制御を行い、角膜上皮 TJ 構造の恒常性を維持し、また炎症を制御することで角膜透明性を保っていることが示唆された

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nakamura T, Yokoo S, Bentley AJ, Nagata M, Fullwood NJ, Inatomi T, Sotozono C, Yamagami S, Kinoshita S. Development of functional human oral mucosal epithelial stem/progenitor cell sheets using a feeder-free and serum-free culture system for ocular surface reconstruction. Sci Rep. 2016 Nov 14;6:37173. doi: 10.1038/srep37173.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

京都府立医科大学眼科学教室 研究実績 [http://www.opth.kpu-m.ac.jp/actual\\_results-2/](http://www.opth.kpu-m.ac.jp/actual_results-2/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名: Nigel Fullwood

ローマ字氏名: Nigel Fullwood

Lancaster University, Research directory

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

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。