

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462702

研究課題名(和文)細胞系譜解析を用いた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)Elucidation of molecular mechanism of corneal epithelial stem cells using lineage tracing analysis

研究代表者

中村 隆宏 (NAKAMURA, TAKAHIRO)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30411078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞系譜解析を用いた角膜上皮幹細胞の恒常性維持機構の解明を目的に、LRIG1遺伝子ノックインマウスの創出に成功した。本マウスを用いて解析した結果、生体内で標識されたLRIG1(+)角膜上皮幹細胞は、角膜輪部に局在するのみならず、角膜周辺部、中央部にも散在的に存在することがわかった。また、本マウスを用いた長期追跡観察で、角膜輪部には全く細胞移動しない極めて静止状態に近い幹細胞が存在することがわかった。これらの結果は、角膜上皮が角膜輪部に存在する幹細胞でのみ維持されていると考えられている現在のコンセプトに再考の必要性を示す極めて重要な研究結果となった。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the mechanism of the homeostatic maintenance of corneal epithelial stem cells, we successfully generated leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1 (LRIG1) knock-in mice. Using those mice, we found that LRIG1(+) corneal epithelial stem cells are not only located in the limbal region, but also in the peripheral and central regions. Using long-term lineage tracing, we verified that quiescent corneal epithelial stem cells do exist in the limbal region. While our novel findings require further detailed examination, they may lead to a groundbreaking reconsideration of the corneal-epithelial stem-cell concept.

研究分野：眼科学

キーワード：角膜上皮 上皮幹細胞 細胞系譜解析 Lrig1 創傷治癒

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。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、組織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恒常性維持機構を明らかにする目的で、スイス連邦工科大学より single cell clonal analysis 法を導入した。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し、さまざまな幹細胞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* が角膜上皮幹細胞マーカーの候補となることを突き止めた¹。また、*Lrig1* 遺伝子ノックアウトマウスを用いた解析から、当遺伝子が、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を報告した。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、これまでの知見をさらに発展させ、角膜をモデルに用いて、*Lrig1* による包括的な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、まず *in vivo* における *Lrig1*(+)角膜上皮幹細胞の細胞動態を解析するため、最新の細胞系譜解析の技術 (lineage tracing) を駆使して *Lrig1* 遺伝子ノックインマウスを作成し、生理的定常状態、創傷治癒過程における *Lrig1*(+)細胞による幹細胞維持機構、創傷治癒機構の解析を行う。

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 遺伝子である *Lrig1* を生体内で蛍光標識可能なノックインマウスを用いて細胞系譜解析を行い、形態学的・細胞生物学的・分子生物学的考察を加える。また多光子励起レーザー顕微鏡を用いて *Lrig1*(+)角膜上皮幹細胞を生きたままその細胞動態を解析し、関連するシグナル分子、環境因子(ニッチ)との関係などの細胞生物学的検討を行う。また、同マウスを用いて角膜創傷モデル、遺伝子導入モデルによる *in vivo*, *in vitro* の機能解析を行い、角膜上皮幹細胞の恒常性維持機構を分子レベルで解明する。これら一連の包括的な機能解析により、*in vivo/in vitro* 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す。

4. 研究成果

これまでの我々の研究奨励採択後の研究結果により、Tomato 蛍光色素で生体標識可能なモノカラーLRIG1 遺伝子ノックインマウスの創出に成功した。本マウスを用いて、生理的定常状態、創傷治癒過程における LRIG1(+)角膜上皮幹細胞による角膜の恒常性維持にかかわる細胞動態、分子機構を解析した。その結果、モノカラーにより生体内で標識された LRIG1(+)角膜上皮幹細胞は、通説である角膜輪部に局在するのみならず、角膜周辺部、中央部にも散在的に存在することが明らかとなった。また、通説では角膜上皮細胞は角膜輪部領域に存在する幹細胞により供給され、恒常性が維持されと考えられていた。しかしながら、本マウスを用いた1年にもおよぶ追跡観察で、角膜輪部には全く細胞移動しない極めて静止状態に近い幹細胞が存在することがわか

った。これらの結果は、角膜上皮が角膜輪部に存在する幹細胞でのみ維持されていると考えられている現在のコンセプトに再考の必要性を示す極めて重要な知見である。さらに、モノカラーLRIG1(+)角膜上皮幹細胞に関わるネットワーク関連分子、環境因子(ニッチ)に焦点をあて、各分子の角膜の恒常性維持における生物学的な役割に関して包括的に検討を加えた。その結果、生体内の様々な部位に存在し、発生・分化・癌化などの生命現象や幹細胞分化制御に深く関与していることが報告されている機能性miRNAがLRIG1に関連する角膜上皮の恒常性維持に極めて重要な役割を担っていることを見出した。

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)

すべて査読あり

Nakamura T ,Inatomi T ,Sotozono C , Koizumi N , Kinoshita S . Ocular surface reconstruction using stem cell and tissue engineering. Prog Retin Eye Res , 51:187-207 , 2016.
Kitazawa K ,Hikichi T ,Nakamura T , Sato T , Mitsunaga K , Tanaka A , Nakamura Y , Yamakawa T , Furukawa S , Goshima N , Watanabe A , Okita K , Ueno M , Kawasaki S , Masui S , Kinoshita S . OVOL2 maintains the transcriptional program of human corneal epithelium by suppressing epithelial-to-mesenchymal transition. Cell Reports , 15(6) : 1359-1368 , 2016.
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. 6, 37173; doi: 10.1038/srep37173 , 2016.

Amemiya T , Nakamura T , Yamamoto T , Kinoshita S , Kanamura N . Autologous Transplantation of Oral Mucosal Epithelial Cell Sheets Cultured on an Amniotic Membrane Substrate for Intraoral Mucosal Defects. PLoS One. 10(4): e0125391, 2015.

Sotozono C , Inatomi T , Nakamura T , Koizumi N , Yokoi N , Ueta M , Matsuyama K , Kaneda H , Fukushima M , Kinoshita S : Cultivated oral mucosal epithelial transplantation for persistent epithelial defect in severe ocular surface diseases with acute inflammatory activity. Acta Ophthalmol, 2014 Sep; 92(6):e447-53.
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. 2014 Apr 7;9 (4):e93164. doi: 10.1371/journal.pone.0093164. eCollection 2014.

[学会発表](計10件)

国際学会

Nakamura T . Development of Functional Human Oral Mucosal

Epithelial Stem Cell Sheets Using a Defined, Feeder-free and Serum-free Culture System for Ocular Surface Reconstruction. Termis-AP 2016, Taipei, Taiwan, 2016.9.5.

Nakamura T. Holoclone-type stem cells controls corneal homeostasis. 1st International Stevens-Johnson Syndrome Symposium. Kyoto, Japan, 2016.1.23.

Kitazawa K, Hikichi T, Nakamura T, Sotozono C, Kinoshita S, Masui S. Loss of human corneal epithelial cell identity exhibited by deletion of PAX6 using the CRISPR/Cas9 system. 2016 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Seattle, Washington, USA, 2016.5.3.

Sotozono C, Inatomi T, Nakamura T. Cultivated Oral Mucosal Epithelial Transplantation (COMET) for Severe Ocular Surface Disorders. 40th World Congress of the International College of Surgeons. Kyoto, Japan, 2016.10.23.

Nakamura T. Holoclone-type Stem Cells Controls Corneal Homeostasis. Chulalongkorn Eye Center (CEC) and Kyoto Prefectural University of Medicine (KPUM) Joint Meeting, Bangkok, Thailand, 2015.8.19.

Nakamura T: LRIG1 controls corneal homeostasis. 3rd Midnight Sun Symposium LRIG Proteins and the Regulation of Growth Factor Signaling, Abisko, Sweden, 2014.6.27.

Nakamura T: Corneal Regeneration using Tissue-specific Epithelial and

Endothelial Cells. From Cells to Tissues: Stem Cells, Tissue Repair & Tissue Engineering for Diabetes, Eye Disease & Neurodegenerative Diseases, Dublin, Ireland, 2014.9.18.
Nakamura T: Lrig1 Controls Corneal Maintenance Through the Stat3-Dependent Inflammatory Pathway. ISER XXI Biennial meeting, San Francisco, California, USA, 2014.7.21.

国内学会

中村隆宏. 人の角膜の再生医療. 第37回動物臨床医学会年次大会 人と動物の比較疾患研究会, 大阪, 2016.11.20.
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. ヒト角結膜上皮細胞に対するラミニン 511 の細胞生物学的効果に関する検討. 角膜カンファランス 2016 (第40回日本角膜学会総会・第32回日本角膜移植学会), 軽井沢, 2016.2.18.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 隆宏 (NAKAMURA Takahiro)
京都府立医科大学・医学(系)研究科
(研究院)・准教授
研究者番号: 30411078