

令和元年8月31日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06809

研究課題名(和文) 妊娠期表皮幹細胞のheterogeneityによる増殖亢進メカニズムの解明

研究課題名(英文) The mechanism for the proliferation of epidermal stem cells during pregnancy

研究代表者

一條 遼 (Ichijo, Ryo)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・特定助教

研究者番号：50804382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、妊娠期表皮幹細胞のheterogeneityを解明するため、研究を行った。Tbx3-creERT2/R26-H2B-EGFPマウスを用いたSingle cell RNA sequenceにより、妊娠期特異的細胞集団を同定した。さらにEGFP陽性細胞をデータ上で抽出することにより、EGFP陽性細胞の遺伝子発現は分化方向へと進むことが明らかとなった。ホールマウントによる染色でも、EGFP陽性細胞は出産後排出されることを確認している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、表皮幹細胞は均一な細胞群であると考えられている。よって、本研究により、表皮幹細胞のheterogeneityが証明されれば、現状では解明が困難であった皮膚病や癌研究に貢献できる可能性がある。表皮幹細胞のheterogeneityが基底細胞の増殖を亢進するメカニズムを解明することは、新たな表皮の増殖制御機構を明らかにする可能性があり、妊娠や老化などの「ライフステージ」による皮膚変化の解明に応用でき、社会に与えるインパクトは大きいことが予想される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we conducted the research to reveal the heterogeneity of interfollicular epidermal stem cells in pregnancy. Pregnancy-specific cell populations were identified by single cell RNA sequence using Tbx3-creERT2 / R26-H2B-EGFP mice. By extracting EGFP positive cells on the data, it revealed that the gene expression of EGFP positive cells differentiated. We also confirmed that EGFP positive cells were delaminated after delivery by whole mount staining.

研究分野：分子生物学

キーワード：妊娠 表皮 幹細胞

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

1. 研究開始当初の背景

皮膚は表皮、真皮、皮下組織から形成される。さらに表皮は基底層、有棘層、顆粒層、角質層から形成される。基底膜に接する基底細胞が増殖能を持つ細胞である。これまで基底細胞の研究は胎仔での研究が多く、成体での研究はあまりなされていなかった。しかし近年では成体マウスをモデルとした表皮幹細胞の研究が多くなってきた。基底層は増殖能と分化能をもった前駆細胞の単一集団から形成され、細胞運命は確率論的に決定されるとする確率論的モデル (Stochastic model) が近年、提唱されてきている。現在、表皮では表皮基底細胞全てが均一な表皮幹細胞であるとする確率論的モデルが支持されている。申請者は近年、急激な皮膚の増殖が起きると考えられる妊娠期腹側表皮では、性質の異なる表皮幹細胞の出現を明らかにしてきた。この性質の異なる細胞群は増殖能が高く、転写因子である T-box3(Tbx3) を発現していることも明らかにしている。さらに、妊娠期だけでなく、創傷治癒の際にも Tbx3 陽性細胞は表皮で出現する。しかし、増殖能の高い Tbx3 陽性細胞がその後も幹細胞としての能力を維持しているか、あるいはターンオーバーによって排除されるかなどの性質に関しては不明であった。

2. 研究の目的

表皮の中で増殖能をもつ細胞は、基底層に存在する基底細胞と呼ばれる未分化の細胞群である。近年、この表皮基底細胞全てが表皮幹細胞であるとする確率論的モデルが支持され、主流となっている。しかし、申請者の研究によって、妊娠期腹側表皮では性質の異なる表皮幹細胞の出現が示唆された。さらに、これらの性質の異なる表皮幹細胞は数回分裂した後、表皮からいなくなるということがわかった。つまり、この表皮幹細胞は short lived proliferative progeny である可能性が示唆された。この表皮幹細胞の heterogeneity は近年、急速に発展した 1 細胞解析を行うことで解明できると考えられる。そこで本研究では、妊娠期表皮幹細胞の heterogeneity が表皮の増殖亢進を可能とするメカニズムの解明を研究目的とする。

3. 研究の方法

(1) Tbx3-CreERT2 マウスの作製

Tbx3-CreERT2 マウスを作製し、Rosa26-H2B-EGFP マウスと交配した。Tbx3 の発現が報告されている臓器で Tbx3 の発現を確認した。

(2) Tbx3-CreERT2/Rosa26-H2B-EGFP マウスを用いた Single cell RNA sequence による解析

非妊娠、妊娠 16 日目、出産後 6 日、40 日目の Tbx3-CreERT2/Rosa26-H2B-EGFP マウス表皮細胞を Single cell RNA sequence により解析する。非妊娠マウスについてはタモキシフェンを 3 日間投与し 4 日後に回収、妊娠 16 日目については妊娠 13、14、15 日目にタモキシフェンを投与、出産後 6、40 日目については妊娠 14、15、16 日目にタモキシフェンを投与した。それぞれのサンプルから表皮を単離し、10X Genomics 社の Chromium により、Single cell RNA sequence を行った。

(3) Tbx3-CreERT2/Rosa26-H2B-GFP マウスを用いたラベルトレース実験による解析

Tbx3-CreERT2 マウスを作製し、R26-H2B-GFP マウスと交配した。Tbx3-CreERT2/Rosa26-H2B-GFP マウス妊娠中にタモキシフェンを腹腔注射する。それにより、Tbx3 陽性細胞をマークする。解析したマウスは非妊娠、妊娠 18 日目、出産後 6 日、14 日、30 日、180 日である。非妊娠マウスはタモキシフェン投与後 4 日後に、妊娠、出産マウスは妊娠 14、15、16 日目にタモキシフェンを腹腔注射した。コントロールとして Keratin14-creERT2/Rosa26-H2B-EGFP マウスを用いた。それぞれのサンプルはホールマウントにより染色した。

4. 研究成果

(1) Tbx3-CreERT2 マウスの作製

Tbx3-CreERT2 マウスについては遺伝子型が次世代へと受け継がれること、サザンブロッティングにより目的遺伝子が挿入されていることを確認した。Tbx3-CreERT2/Rosa26-H2B-EGFP マウスの胎生期(E11.5, E12.5)にタモキシフェンを投与し、E13.5 で解析した。その結果、すでに先行研究により Tbx3 の発現が確認されている臓器である、肝臓、心臓で EGFP を確認することができた。さらにその EGFP を発現する細胞は Tbx3 による免疫染色により、EGFP と Tbx3 を発現していることも確認した。Tbx3 は成体での肝臓でも発現していることが知られている。成体マウスにタモキシフェンを投与し、4 日後に肝臓を観察したところ、成体での肝臓でも EGFP の発現を確認できた。

(2) Tbx3-CreERT2/Rosa26-H2B-EGFP マウスを用いた Single cell RNA sequence による解析

トランスクリプトーム解析の結果、表皮基底層において 7 つのクラスターに分かれた。つまり、単一の細胞群ではなく heterogeneity な細胞集団であることがわかった。また、妊娠期のみ出現するクラスターが存在した。その中には増殖因子が多く含まれていた。さらに、EGFP 陽性細胞の遺伝子発現変化を解析したところ、妊娠 16 日目と比較し、出産後 6、40 日目では分化マーカーを発現する EGFP 陽性細胞の割合が増加していた。

妊娠期には毛包周期が止まることが知られている。本実験による Single cell RNA sequence の結果、毛包の細胞が妊娠期に減少し、出産後から急激に毛包の増殖期に入ることがトランスクリプトーム解析の結果わかった。この結果から、本実験の Single cell RNA sequence のトランスクリプトーム解析が正しいことを示唆している。

(3) Tbx3-CreERT2/Rosa26-H2B-EGFP マウスを用いたラベルトレース実験による解析

Tbx3-creERT2/R26H2B-EGFP マウスを用いてホールマウント染色によって確認した。その結果、出産後 30 日では EGFP 陽性細胞が表皮中に存在しているが、出産後 180 日では存在を確認できなかった。一方、Keratin14-creERT2/Rosa26-H2B-EGFP マウスでは出産後 180 日でも EGFP 陽性細胞を検出できた。以上より、妊娠期に高増殖能を獲得する Tbx3 陽性の表皮幹細胞は増殖能を獲得した後、排出されることが分かった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Murata T, Honda T, Egawa G, Yamamoto Y, Ichijo R, Toyoshima F, Dainichi T, Kabashima K. Transient elevation of cytoplasmic calcium ion concentration at a

single cell level precedes morphological changes of epidermal keratinocytes during cornification. *Sci Rep.* 2018 Apr 26;8(1):6610.

<https://www.nature.com/articles/s41598-018-24899-7> / Doi: 10.1038/s41598-018-24899-7.

Ichijo R, Kobayashi H, Yoneda S, Iizuka Y, Kubo H, Matsumura S, Kitano S, Miyachi H, Honda T, Toyoshima F. Tbx3-dependent amplifying stem cell progeny drives interfollicular epidermal expansion during pregnancy and regeneration. *Nat Commun.* 2017 Sep 11;8(1):508.

<https://www.nature.com/articles/s41467-017-00433-7> / Doi: 10.1038/s41467-017-00433-7.

〔学会発表〕(計5件)

一條遼、山本拓也、豊島文子、「高増殖能を有する表皮幹細胞のダイナミクス」、第41回日本分子生物学会年会、2018年

一條遼、「肥満と加齢による表皮幹細胞・前駆細胞枯渇メカニズムの解明」、新学術領域研究「学術研究支援基盤形成」『先進ゲノム解析研究推進プラットフォーム(先進ゲノム支援)』拡大班会議、2018年

Ichijo R, Kobayashi H, Yoneda S, Iizuka Y, Kubo H, Matsumura S, Honda T, Toyoshima F. Tbx3-dependent amplifying stem cell progeny drives interfollicular epidermal expansion during pregnancy and regeneration. The 16th Stem Cell Research Symposium, 2018年

久保嘉一、一條遼、山本拓也、豊島文子、「妊娠期皮膚拡張における転写因子 Tbx3 の機能解析」、生命科学系学会合同年次大会、2017年

一條遼、小林大毅、米田早織、飯塚ゆい、久保嘉一、松村繁、北野さつき、宮地均、本田哲也、豊島文子、「妊娠期の腹側皮膚伸展を可能とする表皮幹細胞ダイナミクスの解明」、生命科学系学会合同年次大会、2017年

〔図書〕(計1件)

一條遼 他、医歯薬出版、医学のあゆみ、2018、Vol.266 No.8

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ等

朝日新聞デジタル(2017年9月11日)、産経新聞大阪 2017年9月12日26面、日経バイオテクオンライン(2017年9月14日)、マイナビニュース(2017年9月15日)掲載。

6. 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

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。