

令和 2 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10209

研究課題名(和文)皮膚における毛包および汗腺組織への分化を運命づけるメカニズムの探索

研究課題名(英文) Analysis of the developmental mechanism directing hair follicle- and sweat gland-differentiation in the skin

研究代表者

高萩 俊輔 (Takahagi, Shunsuke)

広島大学・医系科学研究科(医)・助教

研究者番号：40448246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：上皮間葉細胞塊を形成して分化誘導する再生モデルを利用することで、毛包・汗腺への分化を決定づけるメカニズムや因子を探索することを目的とした。上皮間葉細胞塊の形成により、背部皮膚由来の上皮間葉細胞塊は毛包への分化を示したが、足底皮膚由来の上皮間葉細胞塊、spheroidからは汗腺への分化は観察できなかった。構成する細胞として表皮芽が伸長し始める時期の細胞が適していたが、分化に関わる間葉系細胞の数による分化の差は乏しかった。汗腺の再生には表皮芽を形成する十分な細胞数の上皮系細胞が必要である可能性、上皮-間葉細胞の相互作用以外にもキーファクターとなる成長因子の関与がある可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究からは、汗腺の再生には表皮芽を形成する十分な細胞数の上皮細胞が必要である可能性、上皮-間葉細胞の相互作用以外にもキーファクターとなる成長因子などの関与がある可能性が考えられた。毛包分化に比較して汗腺への分化の誘導効率は高くないと考えられ、これらの上皮細胞の採取方法や、上皮間葉細胞の相互作用以外の成長因子が明らかになることで、汗腺組織の再生に応用出来る可能性、あるいはその方法を確立できる可能性がある。また、臨床的な意義として、その機序に関する分子や経路の促進物質あるいは阻害分子を研究することにより、無汗症や多汗症の治療薬の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, the mechanism and factors involved in the development of hair follicles or sweat glands were explored by using an in-vitro model. This model induced the differentiation in hair follicles or sweat glands by forming condensed "epithelial-mesenchymal cell mass" or "spheroid". The epidermal-mesenchymal cell mass derived from mouse dorsal skin showed differentiation into hair follicles, while the differentiation into sweat glands was not observed in the epidermal-mesenchymal cell mass/spheroid derived from mouse footpad skin. Constituent cells were preferably collected at the time of neonatal when epidermal buds started to grow, and the differentiation seemed independent of the number of mesenchymal cells involved. Regeneration of sweat glands may require a sufficient number of epithelial cells purified from epidermal buds, and may involve key growth factors in addition to epithelial-mesenchymal cell interactions.

研究分野：皮膚科学

キーワード：汗腺 毛包 上皮間葉細胞塊 スフェロイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

汗腺や毛包の発達程度は動物種や皮膚の部位により異なるが、各々の皮膚付属器への分化やその分布を運命づけるメカニズムの詳細は不明である。胎児期の組織発生過程において、毛包や汗腺などの外胚葉系器官の形成は、その発生予定領域の上皮が肥厚した Bud (芽) が間葉細胞側に陥入することで開始する。続いて、その上皮系細胞の凝集塊が周囲の間葉系組織との間で相互の分化を誘導し、外胚葉系器官が完成する。毛包および汗腺の形成は、ともに一見同じに見える表皮芽 (Bud) から生じるが、その後形成される器官が分岐するメカニズムの詳細は不明である。上皮細胞の分化方向は、上皮細胞にあらかじめプログラムされている可能性、あるいは各分化段階における間葉系細胞からのシグナルが分化の方向性を規定している可能性が考えられるが、その詳細は明らかにされていない。

外胚葉系器官の発生モデルとして、上皮間葉細胞塊を作成して分化を誘導するモデルがある。この分化誘導法は生体内における組織発生過程を模倣して組織再生を誘導する方法である(1)。成体の標的組織から分離した上皮性幹細胞と間葉系幹細胞を緊密な接触が維持されるよう、小さなコラーゲンゲル滴内に区画化して配置する。数時間以内に細胞は上皮-間葉相互作用を開始し、幼若組織として器官原基が再生する。これまで、この手法を用いて歯・毛包・唾液腺などの外胚葉系器官の組織再生が達成されている(2, 3)。そこで、本研究では、上皮間葉細胞塊を形成することによる毛包、汗腺の再生モデルを利用して、毛包・汗腺への分化を決定づけるメカニズムや因子を探索することを目的として開始した。

1) Nakao K, Morita R, Saji Y et al. The development of a bioengineered organ germ method. *Nature methods* 2007;4:227-30.

2) Toyoshima KE, Asakawa K, Ishibashi N et al. Fully functional hair follicle regeneration through the rearrangement of stem cells and their niches. *Nature communications* 2012;3:784.

3) Ogawa M, Oshima M, Imamura A et al. Functional salivary gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ. *Nature communications* 2013;4:2498.

2. 研究の目的

本研究では、上皮間葉細胞塊を形成することにより分化誘導する in-vitro の毛包・汗腺の再生モデルを利用して、毛包、汗腺への分化を決定づけるメカニズムや因子を探索することを目的とした。まず In-vitro で皮膚から採取した上皮系および間葉系細胞を、上皮間葉細胞塊として毛包・汗腺に誘導し、各組織分化に関連する分子を同定することを目指した。次に、幼弱マウスにおける毛包・汗腺の各発生段階で検討し、毛包・汗腺組織への分化を運命づける分子やメカニズムを探索することを目標とした。

3. 研究の方法 (図1)

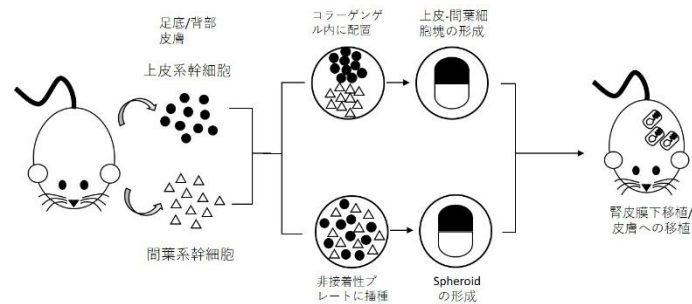
C57BL/6 マウス足底皮膚あるいは背部皮膚を酵素処理することにより、上皮系細胞、間葉系細胞を分離した。採取した細胞をコラーゲンゲル内にお互いに接触する状態で配置し上皮間葉細胞塊を作成した。あるいは、採取した上皮系細胞と間葉系細胞の懸濁液を非接着性プレートに播種して spheroid を作成した。作成した上皮間葉細胞塊、あるいは spheroid を in-vitro で1週間程度の期間培養した。

3次元培養の実験には、1週間程度培養した spheroid を使用し、培養プレート上のコラーゲンゲルに spheroid を包埋して3次元で増殖できる状態で培養した。3次元培養にはフィーダーとしてマイトマイシン C 処理した線維芽細胞を共培養した。

分化誘導した細胞の移植実験では、培養した上皮間葉細胞塊あるいは spheroid を回収し、C57BL/6 マウス腎皮膜下に移植した。あるいは、免疫不全マウス BALB/c-nu の皮内に移植した。数週間後に移植した組織を採取した。

分化誘導した細胞あるいは組織を回収し汗腺組織への分化を評価した。汗腺組織への分化は、形態的観察、汗腺分化マーカーの定量 PCR、免疫染色、ウェスタンブロット法で評価した。汗腺マーカーとして CK18、毛包マーカーとして CK17、併せてその他の汗腺分化シグナルを指標として用いた。

(図 1)



4 . 研究成果

(1) 上皮-間葉細胞塊からの汗腺分化誘導

マウス胎児(胎生 18 日, E18)の背部皮膚および足底皮膚から、上皮細胞(Epi)、間葉系細胞(Mes) を採取し、コラーゲンゲルに配置することで上皮-間葉細胞塊を作成して培養した。汗腺分化に関連した分子の mRNA 発現は培養時間と共に低下、あるいは経過を通じて十分な発現を認めなかった。そこで、マウス背部皮膚、あるいは腎被膜下に上皮-間葉細胞塊を移植して in-vitro での分化能を検証した。皮膚/腎被膜下に、背部由来の上皮-間葉細胞塊を移植すると、毛包組織の構築が検出され、毛包マーカーCK17 で染色される組織が観察された(図 2)。足底由来上皮-間葉細胞塊を移植した場合には汗腺組織を認めず、汗腺マーカーCK18 で染色される組織は観察されなかった。

(2) spheroid からの汗腺分化誘導

上皮-間葉細胞混濁液から作成した spheroid からの汗腺分化誘導も検討した。作成した spheroid の汗腺・毛包マーカーの mRNA 発現は、上皮-間葉細胞塊と同様に汗腺分化マーカーは時系列で発現が低下し、汗腺分化シグナルは経過を通じて十分な発現はなかった。マウス背部皮膚、および腎被膜下に spheroid を移植したが、皮膚へ移植したものでは両 spheroid ともに汗腺あるいは毛包を形成しなかった。腎被膜下への移植では、上皮-間葉細胞塊の場合と同様に背部由来 spheroid の移植で毛包の形成を認めたが、足底由来 spheroid を移植したものでは汗腺の形成はなかった。

(3) 細胞採取時期および上皮-間葉細胞率による分化誘導の差異

コラーゲンゲル内に上皮-間葉細胞塊を作成する方法と、上皮-間葉細胞混濁液から spheroid を作成して分化誘導する方法では汗腺分化の誘導に関して優劣を認めなかった。一方、spheroid を用いた手法の方が大量の細胞塊を得ることが出来た。そのため、spheroid からの汗腺分化誘導法を中心に分化誘導法を確立するために、細胞採取時期および混合する上皮細胞-間葉細胞の割合を検討した。

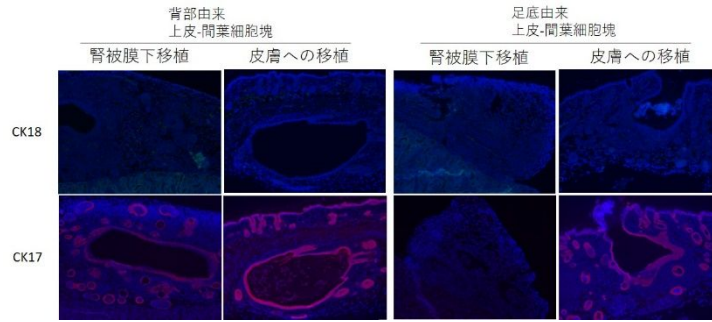
まず、マウス足底皮膚を採取する時期が、汗腺組織への分化のしやすさに影響する可能性を検証するために、胎生(E)および出生後(PN)の日数が複数(E14, E18, PN3, PN6)のマウスから採取した足底皮膚を用いて spheroid を作成した。CK18 の mRNA および蛋白発現を解析したところ、表皮芽が伸長しはじめる PN3 マウスで作成した spheroid で mRNA の発現が上昇し、免疫染色では CK18 の発現が検出できた。

次に、spheroid に混合する上皮系細胞、間葉系細胞の割合が、汗腺への分化に影響する可能性を検討した。種々の割合(Epi:Mes 1:1 ~ 30:1)で、上皮細胞と間葉細胞を混合して作成した spheroid を培養して、CK18 遺伝子発現を絶対定量 qPCR で測定した。E18 由来 spheroid は間葉系細胞が少ないもので CK18 発現量が多く、上皮細胞単独で最も CK18 発現量が多かった。出生 3 日(PN3)由来 spheroid では間葉細胞数による差なく、上皮細胞単独と同程度の CK18 発現を認めた(図 3)。ウェスタンブロットでは上皮-間葉細胞を等量混合した PN3 由来 spheroid で CK18 蛋白発現が多かった。

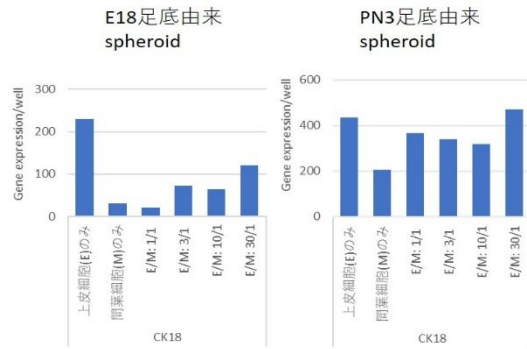
(4) 3 次元培養による汗腺分化

3 次元培養による分化を検討するために上皮系および間葉系細胞を 1 : 1 で作成した spheroid をコラーゲンゲル中で 3 次元培養した。PN3 由来 spheroid では、3 日後に spheroid 周囲に上皮様胞巣が伸長し、6 日後には囊腫状の構造を形成した(図 4)が、E18 由来 spheroid の形態変化はなかった。PN3 由来 spheroid では、フィーダー細胞数を調整することで CK18 遺伝子が発現した。

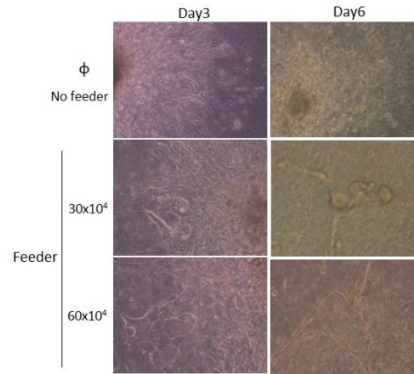
(図 2)



(図 3)



(図 4)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takahagi S, Tanaka A, Hide M.	4. 巻 67
2. 論文標題 Sweat allergy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Allergol Int.	6. 最初と最後の頁 435-441
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2018.07.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Okamoto M, Takahagi S, Kamegashira A, Yanase Y, Hide M.	4. 巻 46
2. 論文標題 Successful treatment of refractory dermal pain with etizolam and clonazepam in a patient with acquired idiopathic generalized anhidrosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 e351-e353
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.14921.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahagi S, Okamoto M, Ishii K, Tanaka A, Yanase Y, Hide M.	4. 巻 69
2. 論文標題 High histamine concentrations in human sweat in association with type I allergy to the semi-purified sweat antigen.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergol Int.	6. 最初と最後の頁 307-309
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2019.08.011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Mayumi OKAMOTO, Shunsuke TAKAHAGI, Kaori ISHII and Michihiro HIDE.
2. 発表標題 High histamine concentrations in human sweat in association with type I allergy to semi-purified antigen.
3. 学会等名 24th World Congress of Dermatology（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shunsuke TAKAHAGI, Mayumi OKAMOTO, Kaori ISHII, Michihiro HIDE.
2. 発表標題 Possible involvement of high histamine concentration in sweat in association with type-I-hypersensitivity against sweat in patients with cholinergic urticaria.
3. 学会等名 GA2LEN UCARE Urticaria Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shunsuke Takahagi, Mayumi Okamoto, Akiko Kamegashira, Michihiro Hide.
2. 発表標題 Cholinergic dermalgia: Is this a subtype of cholinergic urticaria?
3. 学会等名 4thGALEN GLOBAL URTICARIA FORUM (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考