

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16361

研究課題名(和文)毛包幹細胞の起源と誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文)The origin and induction processes of hair follicle stem cells

研究代表者

森田 梨津子(Ritsuko, Morita)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：20700040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：毛包の再生能を支える毛包表皮幹細胞が、胎仔期に正しい場所と時間に誘導される機構は、いまだ十分に理解されていない。本研究では、1細胞解像度のライブイメージングとRNA-seq解析を駆使して、毛包表皮幹細胞が生まれる過程を連続的かつ網羅的に追跡した。その結果、将来の幹細胞になる細胞は毛包プラコード辺縁の基底細胞層から誘導されること、プラコードには遺伝子発現パターンの異なる表皮細胞系譜が同心円上に配置し、この二次元同心円パターンが間葉側へ突出・陥入して長軸方向に伸長することで、三次元的な筒状の毛包構造を作ること、成体毛包幹細胞の性質は、毛包の形態形成過程を通じて段階的に獲得されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、一見均質な細胞から幹細胞と分化細胞が生まれる組織の秩序や恒常性が形成されていく仕組みを理解することは、毛包だけでなく多くの器官発生に普遍的に存在する「可塑性と頑強性」の理解に繋がると期待される。さらに、幹細胞の誘導、適切な維持・制御の機構が解明されれば、生体外における毛包培養や胎仔性幹細胞の誘導・増殖・分化の制御技術の開発に大きく寄与することが期待され、将来的には薬剤評価系の確立など、皮膚や毛包に伴うがんや疾病に向けた創薬開発に貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Although many fundamental regulatory mechanisms of adult tissue stem cells have been explored, it remains obscure how stem cells (SCs) are induced in the right place at the right time during development. In this study, we identified the developmental origin and induction process of mouse hair follicle epidermal SCs with two marker-independent single cell methods; single-cell live imaging and single-cell transcriptomics. We revealed that different epidermal lineages are aligned in a two-dimensional (2D) concentric manner in the placode basal layer. Each 2D concentric zone is enlarged and telescopes out to form longitudinally aligned 3D cylindrical compartments in the hair follicle. We also found that prospective SC precursors are derived from the epidermal basal layer located at the periphery of the placode. Molecular properties of adult SCs are not the default state, but rather gradually induced during hair follicle morphogenesis.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：1細胞ライブイメージング 1細胞RNA-seq 毛包幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生涯にわたって再生を繰り返す皮膚と毛包は、幹細胞と周囲微小環境(幹細胞ニッチ)との相互作用を研究する良いモデルである。これまでに Krt15 や CD34 などの特異的な幹細胞マーカーが特定されたことで、成体毛包幹細胞の詳細な遺伝子発現プロファイルや、幹細胞ニッチとの相互作用による増殖や分化制御のメカニズムの理解が進んだ。一方、毛包の基本的な構造と恒常性を維持するための仕組みが形成される「発生過程」において、一見均一な胎仔性の表皮前駆細胞の集団から、どのようにして毛包表皮幹細胞が正しい場所に正しい時に誘導されるのか、ニッチと幹細胞の相互依存的な関係が胎仔期にどのように生み出されるのかについてはほとんど理解されておらず、本研究分野の重要な未解決問題として残されてきた。

毛包幹細胞の発生過程の解析が進まない一因に、初期幹細胞を標識するマーカー遺伝子がまだ同定されていないことが挙げられた。これを克服するため、本研究では、申請者がこれまでに開発した、外胚葉性器官原基の「胎児期器官形成過程の細胞動態解析法」を応用し (Morita *et al.*, *Plos one* 2016)、マウス発生期毛包の全細胞の動態と系譜を追跡することで、①毛包幹細胞の起源と②細胞系譜を、時空間情報を元に同定できると着想した。さらに、イメージングから明らかとなった毛包幹細胞の系譜とその時空間情報に、1細胞 RNA-seq から明らかにされる③毛包構成細胞の状態変化の情報を付加することで、これまで同定不可能であった毛包表皮幹細胞が生み出される過程に迫れると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、マウス毛包発生における毛包表皮幹細胞の誘導をモデルとし、マーカーに依存しない2つの新手法の組合せ、つまり、1) 1細胞解像度での毛包器官発生の4次元イメージングと、2) 1細胞トランスクリプトームを統合させたマルチオミクスデータの統合的解析から、毛包表皮幹細胞の起源と誘導メカニズムをこれまでにない解像度で理解することを目指した。

3. 研究の方法

(1) マウス毛包器官発生の4次元ライブイメージングによる幹細胞の起源と系譜の同定

我々の確立したマウス胎仔頬髭毛包の *ex vivo* ライブイメージングにより、毛包の発生開始から、幹細胞領域が形成され、最終分化細胞が毛を産生するまでの過程を1細胞レベルの解像度で連続的に可視化する。さらに、比較的初期から発現する幹細胞マーカーのレポーターマウスを用いて、将来的に幹細胞となる細胞を可視化した上で、その細胞系譜をマーカー遺伝子の発現する前の時間に遡って追跡し、幹細胞の①発生予定領域を明らかにするとともに、②発生過程の細胞系譜や動態を網羅的に解析する。

(2) 1細胞 RNA-seq による幹細胞誘導過程の細胞状態変化の解析

ライブイメージングから明らかにされた幹細胞の細胞系譜に加えて、③細胞の分化状態の時間的な発展を詳細にプロファイリングしていくために、各発生ステージの毛包組織から分取した細胞の1細胞 RNA-seq を実施する。この際、発生初期の幹細胞の前駆的な細胞を標識する分子マーカーが同定されていないことから、光変換型蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックマウスを用いて、各発生ステージの毛包組織を任意に標識し、細胞を単離する。

(3) ライブイメージングとトランスクリプトームのデータ統合による幹細胞の誘導機序の理解

その後は、1細胞 RNA-seq から得られたトランスクリプトームデータの解析の中で、新規に同定される幹細胞前駆細胞のマーカーを用いて、トランスクリプトームデータをライブイメージングの動態データに統合させ、細胞状態の変化の情報とリンクした幹細胞の発生系譜を完成させる。さらに上記解析の中で、幹細胞の誘導過程を特徴づけるシグナルネットワークが見いだされることが期待される。

本解析により、幹細胞の起源と誘導メカニズムをこれまでにない解像度で理解することを目指す。

4. 研究成果

我々は、既存の分子マーカーに依存しない、1細胞解像度の器官発生長期ライブイメージングを用いて、毛包発生初期のプラコード形成期から、幹細胞領域が形成され毛産生細胞が分化して毛を産生する発生後期までを連続的に捉えることに成功した。このライブイメージングデータの中で、毛包を構成する細胞を、網羅的に時間を遡って追跡することで、i) 筒状の発生後期毛包において長軸方向に整理する表皮細胞は、時間を遡った毛包プラコードにおいて同心円状に配置すること、ii) 将来幹細胞になる細胞は毛包プラコードの辺縁の基底細胞層から誘導されること、iii) 初期の毛包幹細胞は成体毛包幹細胞とは異なり、積極的に毛包の形態形成に寄与しないことなどを明らかにした (Fig. 1)。

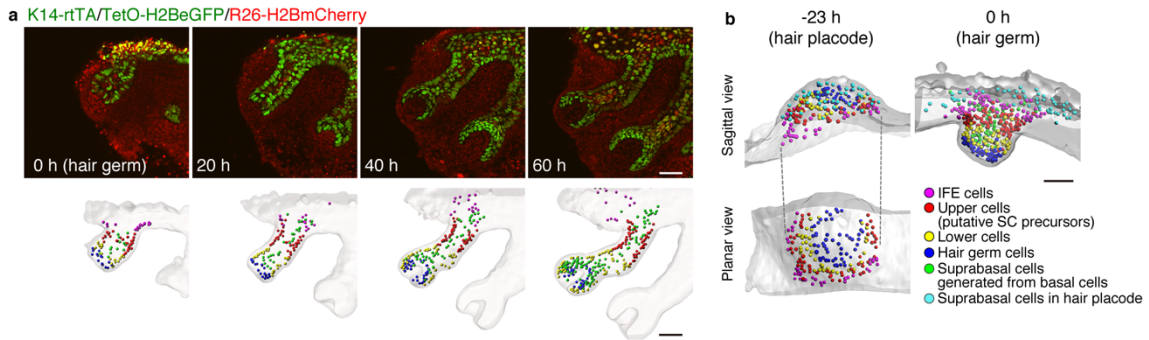


Fig. 1 毛包表皮細胞の遡及解析による幹細胞の発生系譜と発生予定領域の同定

- a. bulbous stage から hair germ stage への遡及的解析
- b. hair germ stage から hair placode stage への遡及的解析

さらに、幹細胞誘導過程の細胞状態の変化を明らかにするため、毛包プラコードが形成される前の胎齢 11 日、毛包プラコード形成が認められる胎齢 12.0 日、肥厚した表皮組織が陥入する胎齢 13.0 日、幹細胞領域が形成され発達する胎齢 13.5 日、14.0 日、15.0 日、胎仔性幹細胞集団の区画化が完成する胎齢 17.0 日の 7 ステージについて、幹細胞前駆細胞と分化細胞を含む毛包構成細胞を分取し、1

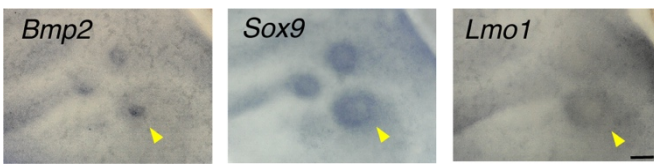


Fig. 2 プラコード (arrow head) 上の同心円遺伝子発現パターン

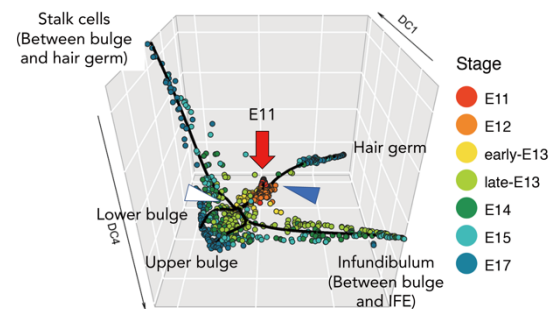


Fig. 3 毛包表皮細胞の偏時系列解析

通じて段階的に獲得されていくこと (Fig. 3)などを明らかにした。

また上記解析を通して、毛包プラコードには異なる遺伝子発現パターンを有する上皮細胞系譜が同心円上に配置し、このプラコード上の二次元同心円パターンが間葉側へ突出するように陥入、かつ各領域が長軸方向に伸長することで、三次元的な筒状の毛包構造を作るといふ、新たな毛包発生のモデル - テレスコープモデル - を見出した (Fig. 4)。これは、ショウジョウバエ胚発生における肢原基 (imaginal disk) 形成機構にもよく似た普遍的なシステムであると期待される (Fig. 4)。本研究成果は論文にまとめ、学術誌に投稿中である (Morita *et al.* under review)。

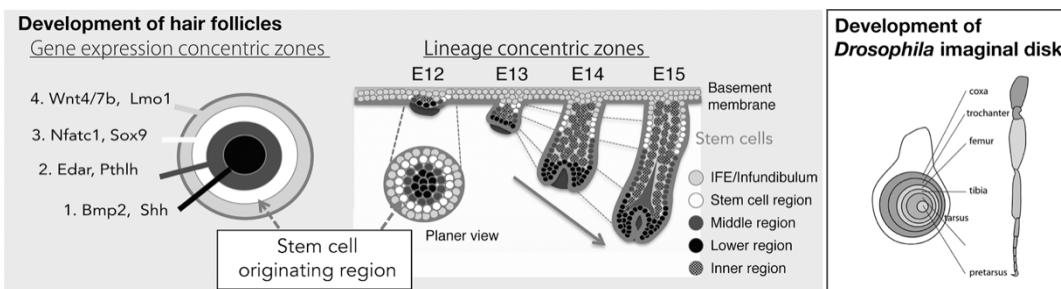


Fig. 4 毛包幹細胞の起源と毛包発生の新モデル (テレスコープモデル)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hironobu Fujiwara, Ko Tsutsui, Ritsuko Morita	4. 巻 60
2. 論文標題 Multi-tasking epidermal stem cells: Beyond epidermal maintenance.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dev Growth Differ.	6. 最初と最後の頁 531-541
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1111/dgd.12577	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 Tsutsui K, Machida H, Morita R, Nakagawa A, Sekiguchi K, Miner JH, Fujiwara H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Mapping the molecular and structural specialization of the skin basement membrane for inter-tissue interactions.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1101/2020.04.27.061952	査読の有無 無
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 該当する

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 2件/うち国際学会 8件）

1. 発表者名 森田 梨津子, 三千 典子, 林哲太郎, 梅田茉奈, 芳村美佳, 二階堂愛, 阿部 高也, 清成 寛, 古田 泰秀, 藤原 裕展
2. 発表標題 毛包幹細胞の起源と誘導メカニズムの解明を目指して
3. 学会等名 NGS現場の会第五回研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ritsuko Morita, Noriko Sanzen, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Itoshi Nikaido, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Yasuhide Furuta and Hironobu Fujiwara
2. 発表標題 Origin and Induction Processes of Hair Follicle Stem Cells
3. 学会等名 Single Cell Science Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ritsuko Morita, Noriko Sanzen, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Itoshi Nikaido, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Yasuhide Furuta and Hironobu Fujiwara
2. 発表標題 Deciphering the molecular and cellular basis of the induction of hair follicle stem cells
3. 学会等名 RIKEN Kansai joint retreat
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ritsuko Morita, Noriko Sanzen, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Itoshi Nikaido, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Yasuhide Furuta and Hironobu Fujiwara
2. 発表標題 Deciphering the origin and induction processes of hair follicle stem cells
3. 学会等名 Consortium of Biological Sciences 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ritsuko Morita, Noriko Sanzen, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Itoshi Nikaido, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Yasuhide Furuta and Hironobu Fujiwara
2. 発表標題 Origin and induction processes of hair follicle stem cells
3. 学会等名 Single Cell Biology 2018 Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森田 梨津子, 三千 典子, 林哲太郎, 梅田茉奈, 芳村美佳, 二階堂愛, 阿部 高也, 清成 寛, 古田 泰秀, 藤原 裕展
2. 発表標題 毛包幹細胞の起源と誘導メカニズムの解明を目指して
3. 学会等名 第六回皮膚の会
4. 発表年 2018年

1 . 発表者名 Ritsuko Morita, Noriko Sanzen, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Itoshi Nikaido, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Yasuhide Furuta and Hironobu Fujiwara
2 . 発表標題 Origin and induction processes of hair follicle stem cells
3 . 学会等名 CDB Symposium 2018 (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Ritsuko Morita, Noriko Sanzen, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Itoshi Nikaido, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Yasuhide Furuta and Hironobu Fujiwara
2 . 発表標題 Deciphering the origin and induction processes of hair follicle stem cells
3 . 学会等名 Joint Annual Meeting of 51st JSDB and 70th JSCB
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Ritsuko Morita, Noriko Sanzen, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Itoshi Nikaido, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Yasuhide Furuta and Hironobu Fujiwara
2 . 発表標題 The origin and induction processes of hair follicle stem cells
3 . 学会等名 Japan-Singapore International Skin Conference 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Ritsuko Morita, Noriko Sanzen, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Itoshi Nikaido, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Yasuhide Furuta and Hironobu Fujiwara
2 . 発表標題 The origin and induction processes of hair follicle stem cells.
3 . 学会等名 EMBO Workshop on Single Cell Biology (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 Ritsuko Morita, Noriko Sanzen, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Itoshi Nikaido, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Yasuhide Furuta and Hironobu Fujiwara
2. 発表標題 The origin and induction processes of hair follicle stem cells.
3. 学会等名 The 2019 Epithelial Differentiation & Keratinization Gordon Research Seminar (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ritsuko Morita, Noriko Sanzen, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Itoshi Nikaido, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Yasuhide Furuta and Hironobu Fujiwara
2. 発表標題 The origin and induction processes of hair follicle stem cells.
3. 学会等名 The 2019 Epithelial Differentiation & Keratinization Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ritsuko Morita, Noriko Sanzen, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Itoshi Nikaido, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Yasuhide Furuta and Hironobu Fujiwara
2. 発表標題 The origin and induction processes of hair follicle stem cells.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting -2019 Single Cell Analyses (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ritsuko Morita
2. 発表標題 マルチオミクス解析による毛包幹細胞の起源と毛包発生モデルの解明
3. 学会等名 最先端循環代謝学の若手研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----