

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19228

研究課題名(和文) 気相接触を必須とする培養表皮の形成機構と羊水由来の形成促進因子探索

研究課題名(英文) Mechanism of liquid-air phase-dependent differentiation in cultured keratinocyte

研究代表者

人見 清隆 (Hitomi, Kiyotaka)

名古屋大学・創薬科学研究科・教授

研究者番号：00202276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：表皮細胞は立体培養により多層化させて分化を再現できる。しかしこの際、細胞の上層側を空気暴露した状態が必須である。その分化促進機構を明らかにするため、空気暴露の有無による遺伝子パターン解析を行った。その結果、有意に差のある数種の遺伝子群を見出した。また空気暴露がなくとも表皮形成の生じる胎児環境に着目し、羊水と胎児表皮形成を解析した後、羊수에表皮細胞促進因子の存在を確認したため精製を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

立体培養系における、ヒト表皮細胞の分化促進の刺激メカニズムとしての空気暴露は極めてユニークで前例のないものであり、その後のシグナル伝達解明は全く新奇な系を見出す可能性がある。これは表皮分化の新たな機構を確立するほか、新たな分化促進因子を見出す手掛かりにもなりうる。

一方で、マウスの羊水中に表皮細胞分化を促進する物質を検出できたので、今後は精製を進めて同定する。これはヒトの表皮再生に有用な因子となりうる他、母体の生育環境評価を羊水で行う際にも有用な評価基準として用いられるため、研究、医療、畜産の広い分野に波及効果をもたらす可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In my research human keratinocyte differentiation have been studied using three-dimensional culture system, where air exposure is essential for keratinization with multilayer. In order to clarify the mechanism by which air-exposure causes differentiation, search for mRNAs and proteins which might cause cellular signaling on the initiation of differentiation. By comparison with mRNAs from day 2-culture (air and liquid), several candidates of specific key molecules were identified and their characterization is ongoing.

In paralleled with this approach, the amniotic fluid from mouse uterus were investigated for their component by mass spectrometric analysis and its ability to promote differentiation. Skin formation during several fetal days were analyzed for barrier function as well as transglutaminase activity. Partial purification is underway based on the promoting activity for keratinocyte differentiation using several marker proteins.

研究分野：応用生物化学

キーワード：表皮形成 羊水 空気暴露 タンパク質架橋化酵素

### 1. 研究開始当初の背景

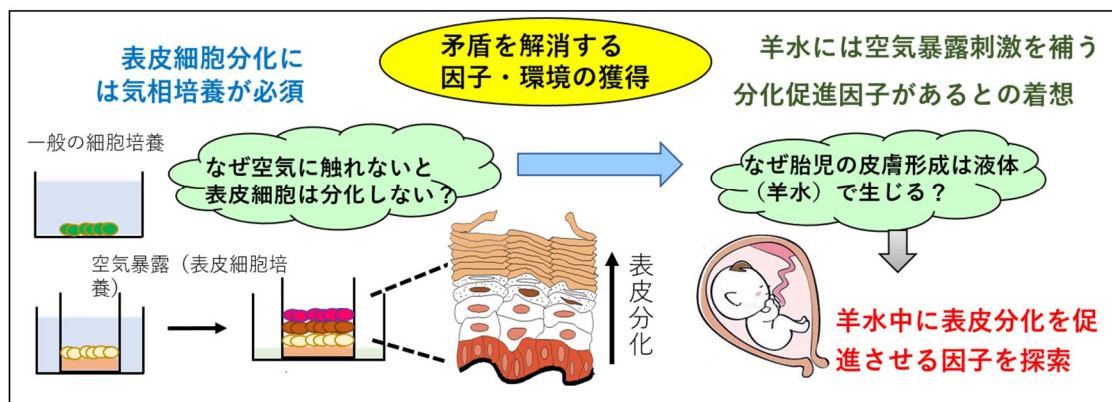
皮膚表皮は、真皮の上層にある未分化な基底細胞(基底層)が分化と増殖を繰り返し、棘皮細胞(棘皮層)、顆粒細胞(顆粒層)と呼ばれる段階の前駆細胞を経て、終末分化細胞である角化細胞(角化層)が形成され、これら4つの層が表皮を構成している。幹細胞が最終分化する過程は、様々な液性因子と環境因子が関与して初めて達成される。

本課題に取り組む機会となったのは、これまで表皮細胞培養系を用いて、最外の角化層に存在する、表皮のバリア機能に必須な高分子複合体(cornified envelop)の形成を司るタンパク質架橋化酵素(トランスグルタミナーゼ)の研究に従事してきたことによる。表皮細胞を*in vitro*で研究対象とする場合には、当然ながらこの4層の細胞層が再現して形成された状態の培養系が解析のためには必要である。しかし、単に幹細胞の基底細胞を汎用される液体培地のもとで培養しただけでは、こうした角化層まで形成される表皮構造が再現されることはない。

表皮などの上皮細胞を実際の組織のように分化した多層構造として再現するために、これまで確立された特殊な培養方法がある。それは、高密度まで増殖させた表皮細胞を分化促進用の培地、すなわち高カルシウムイオンを有する培地に置換し、そのうえで培地を取り除く「空気暴露」刺激を与えることである。これによって、細胞は上記の4層からなる表皮組織様の構造体が形成されることになる。

空気暴露が細胞にはストレスがかかる独特な刺激条件であるにも関わらず、この現象はそのメカニズムが何ら解明されないまま「表皮構造が容易に再現できること」の利点から、表皮分化のモデル系として医療応用や化粧品開発などに適用されてきた。冒頭のように表皮におけるタンパク質架橋化酵素のこの立体培養細胞系を用いての発現解析を進める中で、この現象に興味を抱き、空気暴露が分化に必須であることの原因を解明したと考えた。

また同時に、空気暴露がなくても皮膚表皮形成が進行する「胎児の表皮形成」はこの現象と矛盾するために、羊水の中に何らかのこれを補う成分が含まれているのではないかと考えた。胎児の発達と皮膚表皮形成、羊水成分の関連については詳細な解析が行われておらず、併せて解析したいと考えた。



### 2. 研究の目的

表皮細胞の立体培養を行う際に、どのようなメカニズムで空気暴露をすることが細胞の分化を開始させて層状構造をもたらすのか、この分子レベルでの解明が第一の目的である。現在のところ分化のスイッチを促すものについては、培地におけるカルシウムイオンの濃度を上昇させることは明確になっているものの、空気暴露の刺激によって、細胞内でどのようなシグナル伝達が起こり、どのような遺伝子・タンパク質の発現が引き金となるのかについての知見がなく、このすべてについてできる限りの情報を集めることを目的としてスタートした。

一方、哺乳類において表皮が空気に触れることなく形成される環境としては、胎児が発達する子宮内の羊水がある。したがって、「空気に触れないと表皮形成ができない」という、上記の現象との矛盾を解消するための何らかの因子・環境が羊水の中には存在するはずであり、それをつきとめることをもう一つの研究目的として並行した。

しかしながら、羊水中で、どの胎生段階で表皮が分化して作られていくのか、その詳細な過程の知見はなかったことから、本課題の中ではまず、マウスを対象に各胎生段階における表皮形成度合いを調べるとともに、その際の羊水の成分(タンパク質)にどのような違いがあるのかについても、質量分析による網羅的なりストアップを試みた。また、マウス羊水中でのそのような促進物質活性を探索することも考えて、同様に表皮細胞培養系を用いて検討することも目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 表皮細胞培養系

表皮細胞としてはヒトの初代培養をまず対象とした。また立体培養の方法は基本的にこれまで確立された方法に倣って行った。細胞ごとのロットや分化能に差がある場合も考慮して、常に

角化が生じる培養系を用いていることを、顕微鏡観察や分化マーカーの検出(2)などによって確認した。また細胞は現在広く立体培養に用いられているヒト表皮細胞を購入していたが、期間中には代替できる細胞株(Ker-CT)も同時に試み、分化が同様に行えることを明らかにした。これは外来の遺伝子を導入させる際に用いることとした。

立体培養の場合、通常、二重培養容器を用いて細胞を上部のフィルター上にまいてコンフルエントな状態にし、空気暴露を行う。その後は下層の培地を交換しながら培養し、14日から21日で角化が完成させる。なお、今回はその前後の期間をタイムコースで調製するとともに、長期期間(35日から49日間)の培養も併せて行った。

#### (2) 表皮形成の観察および分化能の検討

立体培養系における表皮形成は、培養後に細胞層を固定・染色して顕微鏡観察を行った。また、分化度合いを視覚的なものだけに頼ることなく、分化する表皮細胞内において、cornified envelopの構成因子で分化マーカーとされるいくつかの特異的なタンパク質(involucrin, small proline rich protein, transglutaminase)などの発現量を指標として、抗体を用いた解析(イムノブロットング)を行って評価した。

#### (3) トランスクリプトーム解析

立体培養において、空気暴露を施した後に2日間で表皮の分化が開始されていることが判明した。そこで空気暴露有り無しで48時間培養した系から、RNAを調製し、RNA-seqを行い、発現する遺伝子群の違いを調べた。これはトランスクリプトーム解析としては一般に行われる手法で、cDNAライブラリーを作製して次世代シーケンサーで解析し、存在するmRNAの量・質情報を網羅的に明らかにするものである。

#### (4) 空気暴露の有無で差異のあった遺伝子群の解析

(3)の解析で、空気暴露の有無により発現に差異のある遺伝子をいくつか同定した。しかしながら、これは定点(48時間)での解析であるため、より詳細で正確な情報を得るために時間的な変化にもとづいて、どのようにこれらの遺伝子が変動するのかを調べた。空気暴露開始後に、2, 5, 8, 11, 14日めのそれぞれの細胞集団からRNAを抽出し、幾つかの遺伝子について、reverse-transcription PCRによって定量した。

加えて、特異的抗体が入手できる分子については、イムノブロットングによって発現量の変動を調べた。

#### (5) マウス胎生日数に伴う表皮形成と羊水成分の解析

妊娠後の日数の判明しているマウス(ICR)を用いて、11日から18日のマウスから胎児を抽出し、その表皮切片を調製すると同時に羊水を分取した。表皮切片については、組織染色によって皮膚の形態を観察して成熟度を評価すると同時に、皮膚形成に必要なタンパク質架橋酵素(トランスグルタミナーゼ)の活性を可視化した。

羊水については、遠心分離した上清を濃縮し、質量分析によって含有されるタンパク質分子を網羅的に明らかにした。各胎生日数によって存在した分子群を統計学的に処理して、その変動を解析した。

#### (6) 羊水からの分化促進因子の部分精製

後述するように、(5)の羊水の成分解析を行うと同時に、得た画分を立体表皮培養系に添加してその効果を観察した。すなわち、表皮形成ができないはずの液体培養状態に添加することで、それでも分化が亢進されるかどうかを、分化と共に表皮内で合成される上述(2)の分化マーカーとなるタンパク質群の発現量で検討した。また、二次元培養の状態でも同様の効果がみられるかどうかについて、検討した。

精製方法としては、羊水画分をイオン交換クロマトグラフィーにかけて分画し、それらについても分化促進能について同様の評価を行った。また疎水性クロマトグラフィーも試みた。

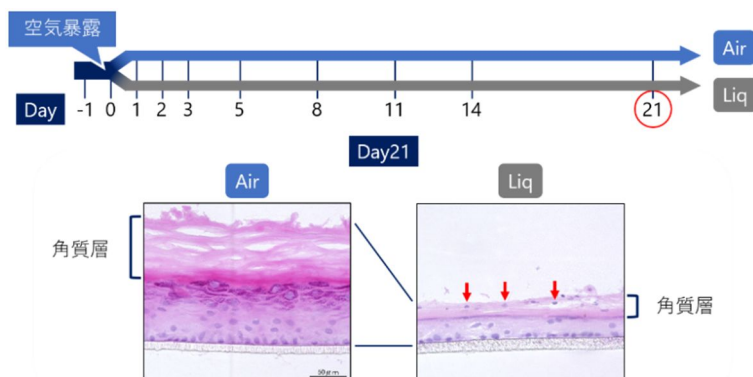
## 4. 研究成果

研究期間に行った研究項目は以下の4つであり、それぞれを分けて述べる：

### (1) 空気暴露による立体培養系での表皮形成

空気暴露の有無による表皮形成の違いを、日にちを追って培養細胞を固定化して、Hematoxylin/Eosin (HE)染色を行った。図中でAirは空気暴露した場合、Liqは液体培地に沈めた(通常の)培養様式を示す。通常は空気暴露を実施することによって、細胞層の重層化を可視化することができる。2日目を過ぎ、5日目からは差が生じ始める。11日目になると、通常の空気暴露では角化層の形成が観察されるが、液相のままの培養系では角化層の形成や細胞の脱核がみえない(図は21日目の染色結果)。

なお、この液相のままの培



養も、長期間培養することによって、一定の厚さの層ができることが判明した。しかしながら、電子顕微鏡観察を行ったところ、明確な差異が見られた。つまり、一見角化が生じているような HE 染色結果であったが、角化層は通常生じるオルガネラの消失が見られず、培養期間に限らず液相では分化が生じないことが明らかになった。

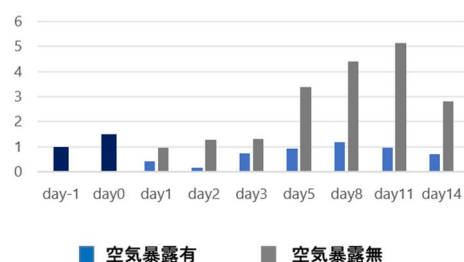
## (2) トランスクリプトーム解析による空気暴露により作用を受ける遺伝子の探索とその発現様式

RNA-seq とよばれる解析によって、0 日目（開始時）気相または液相培養の 48 時間後、の RNA パターンをデータとしてその分子内容を比較した。その結果、差異のある遺伝子が、液相で増えたものが 48 個、気相で増えたものが 30 個、得ることができた。なおこれは一連 (n = 1) での解析であるため、確実性を得るために遺伝子群の変動については、さらなる検討が必要である（実施して後述）。得た差異のある遺伝子の内容は、転写調節因子や糖代謝をはじめとするものであり、一定のカテゴリーに当てはまるものであった。

得られた制御遺伝子群からのメカニズムの解析を進めるため、明らかにした一連の転写因子および、関連する遺伝子群について定量的 PCR によって空気暴露からの日数ごとの RNA 発現量を解析した。図には今後の研究対象とするものの中の一つである低酸素応答制御因子 EGLN3 の日数進行時の RNA 発現のパターンである。

図のように、解析がきちんとした差異のあるものを捉えていることが判明し、現在のところ、選抜したほとんどの遺伝子群が探索結果と矛盾のない変動を示していた。なおこの時のポジティブコントロールとして、トランスグルタミナーゼ（タンパク質架橋化酵素）を並行しているが、これについても同様に気相培養において高い発現レベルを得ており、解析検討は問題なく進められていることがわかる。

Liqで48時間めに増加した遺伝子として探索された分子(EGLN3)の日数による変動



## (3) マウス胎生日数に伴う表皮形成と羊水成分の解析

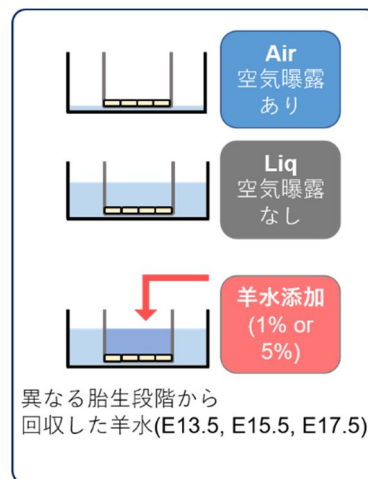
HE 染色による形態観察の結果からは、マウスの表皮は 11 日から 13 日において急速に分化増殖をすることが HE 染色の他以下の事実から明らかになった。また、低分子の蛍光化合物である Lucifer Yellow を使った色素の細胞膜透過実験では、胎生日数が 15 日後半以降でない、十分なバリア形成が行われていないことを示した。さらに、このバリア機能に必須な酵素、トランスグルタミナーゼ (TG1) の活性可視化の結果としては、早い段階から活性が認められるものの、13 日から高くなり、分化としてはこの日数あたりに表皮形成の進行が急になることが示唆された。

一方、胎生日数による羊水成分の違いを、質量分析によって解析した。その網羅的な分布を明らかにしており、2 回行ってほぼ再現性のある結果を得ていたため、論文公表の予定である。胎生日数ごとの表皮細胞の分化促進効果に差があるものの、羊水分に存在を認めた。なお、その際の評価対象としては、立体培養の際に液相培養して本来角化しない系に加える場合と、二次元培養で通常分化促進培地で培養する場合の 2 とおりの対象系を行った。

マーカータンパク質として、TG1, TG3 の他、SPR および Involucrin について、誘導がかかることが明らかになった。

## (4) 羊水からの分化促進因子の部分精製

胎生日数 12 - 14 日目の羊水について、活性のある画分が得られたため、これらから部分精製を試みた。具体的には陰イオン交換クロマトグラフィーを行って分画し、これを立体培養系および二次元培養系に添加したところ、特定の画分で細胞内のマーカータンパク質が上昇することを確認し、表皮分化促進能をする画分を見出せた。またトランスグルタミナーゼ (TG3) の発現を促進する画分と同時に、抑制する別の画分も見出せた。これらについては再現性を得ており、現在さらに精製を進めており、疎水性相互作用を含めた他クロマトグラフィー法を試みている。まだ単離には至らないが、活性画分を迅速に評価する系の工夫も含めて検討しており、今後はこの中に含まれる分化促進物質の同定をめざしていく。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tatsukawa H, Otsu R, Tani Y, Wakita R, Hitomi K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Isozyme-specific comprehensive characterization of transglutaminase-crosslinked substrates in kidney fibrosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7306
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-25674-4.	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 Mizikova I, Pfeiffer T, Nardiello C, Surate Solaligue DE, Steenbock H, Tatsukawa H, Silva DM, Hitomi K, Morty RE. 他6名	4. 巻 285
2. 論文標題 Targeting transglutaminase 2 partially restores extracellular matrix structure but not alveolar architecture in experimental bronchopulmonary dysplasia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 3056 ~ 3076
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1111/febs.14596	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 該当する
1. 著者名 Ito Y., Tatsukawa H., Yamaguchi H., Takahashi K., Hitomi K., and Yuszawa Y.	4. 巻 660
2. 論文標題 Detection and identification of potential transglutaminase 2 substrates in the mouse renal glomeruli.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Archives Biochemical Biophysics	6. 最初と最後の頁 11 ~ 19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.abb.2018.10.001.	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 Kojima T., Hata J, Hayashi K., Hitomi K, Nakano H.	4. 巻 82
2. 論文標題 Spatial arrangement of proteins using scCro-tag: application for an in situ enzymatic microbead assay.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience Biotechnology Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1911 ~ 1921
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1080/09168451.2018.1501265	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 Tanabe Y., Yamane M., Kato M., Teshima H., Kuribayashi M., Tatsukawa H., Takama H., Akiyama M., Hitomi K.	4. 巻 286
2. 論文標題 Studies on differentiation-dependent expression and activity of distinct transglutaminases by specific substrate peptides using three dimensional reconstituted epidermis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 2536-2548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.14832	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 Teshima H., Kato M., Tatsukawa H., Hitomi K.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Analysis on expression of transglutaminases in the reconstructed human epidermis using three-dimensional culture	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ab.2020.113606.	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 Watanabe Y., Okuya K., Takada Y., Kinoshita M., Yokoi S., Chisada S., Kamei Y., Tatsukawa H., Yamamoto N., Abe H., Hashimoto H., Hitomi K.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Gene disruption of medaka ( <i>Oryzias latipes</i> ) orthologue for mammalian tissue-type transglutaminase (TG2) causes movement retardation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa038	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 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 辰川英樹、人見清隆
2. 発表標題 Isozyme-Specific Global Identification and Analysis of Transglutaminase Substrates in Fibrotic Diseases
3. 学会等名 ゴードン国際会議2018Transglutaminases in Human Disease Processes (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 人見清隆
2. 発表標題 Activation and Substrates of Transglutaminases
3. 学会等名 ゴードン国際会議2018Transglutaminases in Human Disease Processes (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤辰将、辰川英樹、山口央輝、高橋和男、人見清隆、湯澤 由紀夫
2. 発表標題 Detection and Identification of Possible Transglutaminase Substrates in the Mouse Renal Glomeruli.
3. 学会等名 ゴードン国際会議2018Transglutaminases in Human Disease Processes (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 辰川英樹、人見清隆
2. 発表標題 Isozyme-specific identification and characterization of substrates crosslinked by transglutaminases in liver fibrosis
3. 学会等名 The 13th International Symposium on ALPD and Cirrhosis
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 人見清隆
2. 発表標題 タンパク質架橋酵素による表皮構造タンパク質の修飾がバリア機能を強化する
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中川晴加、辰川英樹、人見清隆
2. 発表標題 肝線維症において架橋される新規基質タンパク質の解析
3. 学会等名 2018年度日本農芸化学会中部支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊優子、鈴木里沙、Meng Qi、辰川英樹、人見清隆
2. 発表標題 モデル生物としてのメダカを用いた組織型タンパク質架橋化酵素の機能解析
3. 学会等名 2019年度日本農芸化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 手島裕文、栗林美樹、辰川英樹、人見清隆
2. 発表標題 最終分化に空気暴露を必須とするヒト表皮立体培養細胞の性状解析
3. 学会等名 2019年度日本農芸化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田辺勇輝、加藤まなみ、山根美樹、高間寛之、辰川英樹、秋山真志、人見清隆
2. 発表標題 表皮形成におけるタンパク質架橋化酵素の機能解析
3. 学会等名 生命科学系合同年次大会（生化学会・分子生物学会）
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 手島裕文、栗林美樹、加藤まなみ、辰川英樹、人見清隆
2. 発表標題 ヒト表皮細胞の分化に気相培養を必須とするメカニズムの研究
3. 学会等名 日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗林美樹、手島裕文、加藤まなみ、田辺勇気、辰川英樹、人見清隆
2. 発表標題 マウス胎生段階における表皮形成と羊水成分の変動解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Teshima H, Ito H, Kuribayashi M, Kato M, Tatsukawa H, Hitomi K
2. 発表標題 Studies on epidermal differentiation by air-liquid interface stimulation in three-dimensional culture
3. 学会等名 研究皮膚科学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Teshima H, Kuribayashi M, Kato M, Tatsukawa H, Hitomi K
2. 発表標題 Studies on cellular changes upon air-liquid phase stimulation in the three-dimensional keratinocyte culture system,
3. 学会等名 ゴードン国際会議 (Barrier Function of Mammalian Skin) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kato M, Teshima H, Kuribayashi M, Tatsukawa H, Hitomi K
2. 発表標題 Detection system of transglutaminase in vitro and in vivo activities using specific substrate peptides in the epidermis and three-dimensional keratinocyte cultured system
3. 学会等名 ゴードン国際会議 (Barrier Function of Mammalian Skin) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 手島裕文、伊藤帆南、栗林美樹、加藤まなみ、辰川英樹、人見清隆
2. 発表標題 表皮細胞の分化に気相培養を必須とするメカニズムの解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 手島裕文、伊藤帆南、栗林美樹、加藤まなみ、辰川英樹、人見清隆
2. 発表標題 表皮細胞の分化に気相培養を必須とするメカニズムの解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 手島裕文、伊藤帆南、栗林美樹、加藤まなみ、辰川英樹、人見清隆
2. 発表標題 空気暴露に刺激される表皮分化のメカニズム解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 手島裕文、加藤まなみ、辰川英樹、人見清隆 第5章分担執筆 井上國世編	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 297
3. 書名 食品・バイオにおける最新の酵素応用	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----