

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16028

研究課題名(和文) ヒト汗腺幹細胞から再生した3次元組織構造体を用いた熱中症などの体温調節障害の解析

研究課題名(英文) Analysis of thermoregulatory disorders using sweat gland organoids generated from human sweat gland stem cells

研究代表者

倉田 隆一郎 (Kurata, Ryuichiro)

大阪大学・薬学研究科・招へい教員

研究者番号：50773115

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)：汗腺幹細胞の再生能を発揮させる微小環境を汗腺の3次元構造解析から探索した。汗腺の基底膜のプロファイリングでは、汗腺の導管部ではラミニン332を発現し、分泌部ではラミニン511が発現していた。分泌部ではラミニン511の受容体であるインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ が発現しており、ラミニン511が汗腺分泌部に存在する汗腺幹細胞の維持に関わる可能性が示唆された。また、汗腺幹細胞を回転浮遊培養させることによって培養場の硬さを変化させたところ、同じ培地組成でも汗腺幹細胞の増殖活性が増加することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は発汗障害解明の新しい糸口となり、将来の発汗改善薬の開発や熱中症患者の減少に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：We screened the microenvironment that exerts the regenerative capacity of sweat gland stem cells using three-dimensional structural analysis of sweat glands. Profiling of the sweat gland basement membrane revealed that Laminin-332 and Laminin-511 were predominantly expressed in the duct and secretory portion of the sweat gland, respectively. In the secretory portion, integrin $\alpha 6 \beta 1$ which is a receptor of Laminin-511 was expressed, suggesting that Laminin-511 is implicated with the maintenance of sweat gland stem cells in the secretory portion of sweat glands. Furthermore, when the sweat gland stem cells were cultured under the shear stress by horizontal rotation, they acquired the proliferation activity.

研究分野：皮膚科学

キーワード：汗腺 幹細胞 オルガノイド 発汗 熱中症

1. 研究開始当初の背景

ヒト汗腺の発汗による体温調節は、他の動物にない唯一無二の機能である。この汗腺の体温調節機能の低下は熱中症などの重い障害となるため、その原因となる遺伝子がマウスの研究から同定されてきた。しかし、同定された遺伝子が必ずしもヒトの発汗障害に関わるとは限らなかったため、ヒト特有の発汗障害の解明には、ヒト組織レベルの機能解析が必要であった。一方、制約の多いヒト研究において、近年、組織幹細胞から生体に似た構造体を再生し、遺伝子導入によって組織レベルで解析する方法が開発されている。そこで我々は、ヒト汗腺幹細胞から汗腺構造体を作製し、組織レベルで発汗機能を解析することにした。これまでに我々は、ヒト汗腺に存在する幹細胞を同定するために、ヒト皮膚組織から汗腺細胞を単離する方法を検討し、 $\alpha 6$ integrin 及び $\beta 1$ integrin の高い発現を示す筋上皮細胞集団 ($\alpha 6^{hi} \beta 1^{hi}$ 細胞集団) と、AQP5 陽性の管腔細胞集団 (AQP5⁺細胞集団) を単離する方法を確立した。そして、これらの細胞集団を用いて幹細胞能を評価し、筋上皮細胞が幹細胞の定義である自己複製能と多分化能を持つ細胞であることを示した。興味深いことに、幹細胞能の証明に利用した sphere assay 法において、筋上皮細胞から汗腺様の 3 次元構造体が形成された。汗腺は分泌部と導管部で構成された 1 本の管状の外分泌腺で、分泌部においては頂端側が管腔細胞、基底側が筋上皮細胞で構成されている。今回、筋上皮細胞から形成された構造体は、管腔細胞および筋上皮細胞のマーカーをそれぞれ頂端側と基底側の細胞層で発現する外分泌腺様の中空構造を形成していた (図 1)。そのため、発汗機能への影響を評価するために、この汗腺様構造体が組織レベルでの発汗機能解析に十分な特徴を保有しているかを検証することにした。

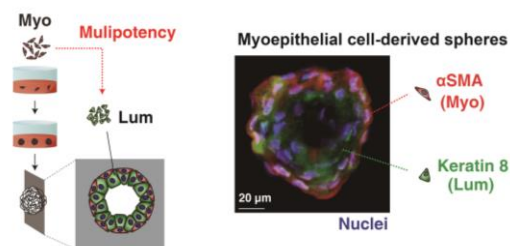


図 1 ヒト汗腺様構造体の形成

2. 研究の目的

本研究では組織レベルで発汗機能解析ができる汗腺構造体を汗腺幹細胞から作製し、発汗障害分子を汗腺構造体に導入し、発汗機能への影響を明らかにすることにした。

3. 研究の方法

新鮮なヒト皮膚組織 (倫理審査承認済み) から色素 (Neutral red) で可視化した汗腺のコイル部分を実体顕微鏡下で採取し、グリセロールによる透明化処理を施した後、免疫染色を行い、汗腺の 3 次元観察を行った (図 2)。また、採取した汗腺コイル部分は、コラゲナーゼ、ディスパーゼ、トリプシンなどの種々の消化酵素を用いて単一細胞まで消化した。消化した細胞から $\alpha 6$ integrin 及び $\beta 1$ integrin の高い発現を示す筋上皮細胞集団を単離し、sphere assay 法により汗腺様構造体を形成させた。

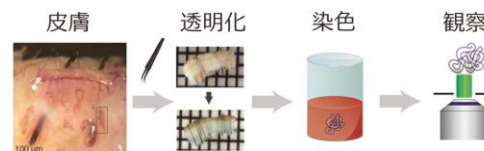


図 2 汗腺の 3 次元構造解析

4. 研究成果

(1) 汗腺幹細胞を維持する微小環境の探索

機能解析が可能な汗腺構造体を汗腺幹細胞から作製するため、汗腺幹細胞の再生能を発揮させる微小環境を汗腺の 3 次元構造解析から特定することにした。汗腺 3 次元構造解析により、微小環境として i) 細胞外基質、ii) 分泌因子、iii) 細胞間接着を中心に調査したところ、細胞外基質としてラミニン-511 が分泌腺の基底側に位置する筋上皮細胞に

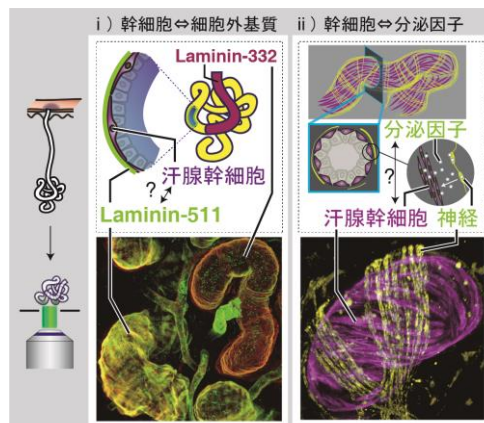


図 3 汗腺幹細胞を維持する微小環境の探索

において強く発現していた(図 3)。また、神経伝達物質を分泌する神経線維が分泌腺を中心に配向していた。さらに、幹細胞の維持に関わると報告されている Notch が筋上皮細胞層で特に強く発現していた。このように汗腺幹細胞である筋上皮細胞において、組織幹細胞ニッチとして報告されている因子が多く発現していることが明らかとなった。

(2) 汗腺幹細胞から汗腺構造体の作製

汗腺幹細胞を維持する微小環境の探索で特定した微小環境因子を、汗腺幹細胞に作用させ汗腺構造体を作製することにした。汗腺の3次元構造解析により特定した微小環境候補である Notch を汗腺幹細胞で活性化させると、腺性の空洞が構造体で形成されたことが明らかとなった(図 4)。

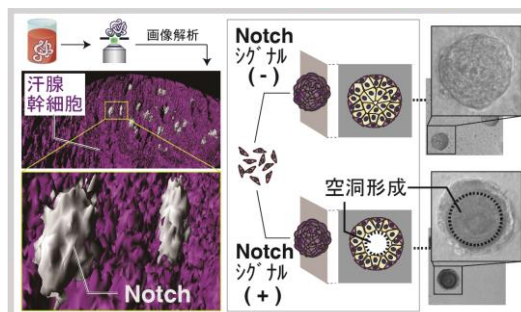


図 4 汗腺幹細胞から汗腺構造体の作製

(3) 物理環境変化における汗腺幹細胞の分化能および増殖能の解析

汗腺は皮膚組織中で特殊な物理環境下(弾力性のある脂肪中)で存在している。より生体に近い汗腺構造体を形成させるために、培養場の硬さを変化させることによって、汗腺構造体の分化能や増殖能が変化するかを調査した。浮遊培養と同じ培地組成において、汗腺幹細胞をプラスチック上で接着培養させると、細胞は増殖せずに分化・消失した(図 5)。一方、汗腺幹細胞を回転浮遊培養させると、汗腺構造体が顕著に肥大化したため、物理環境の変化によって、汗腺幹細胞の増殖能や分化能が変化することが明らかとなった。

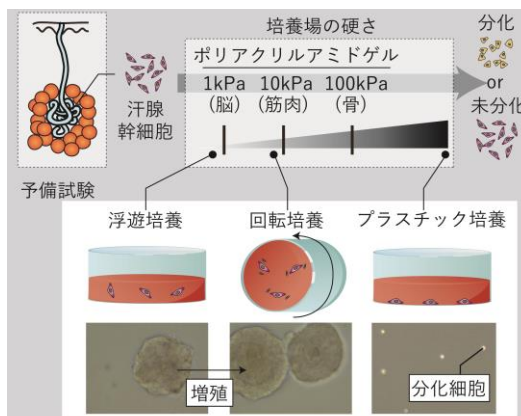


図 5 物理環境変化における汗腺幹細胞の分化能および増殖能の解析

(4) ゲノム編集による汗腺構造体の発汗障害誘導および汗腺構造体における発汗障害の機能解析

汗腺幹細胞から作製した汗腺構造体に対し、ゲノム編集により発汗障害に関わる分子(ACHM3, EDA)を変異させるため、ウイルスベクターに ACHM3, EDA 遺伝子が組み込まれた組換えウイルスベクターとウイルスのパッケージングに必要な遺伝子を保持するベクターとをコトランスフェクション用細胞にコトランスフェクションし、組換えウイルス粒子を回収した。今後は、ゲノム編集された汗腺構造体から編集された細胞のみを単離し、汗腺機能に関わる分子(α SMA, K8 など)の発現変化を定量し、単離した細胞から汗腺構造体を再度形成させ、3次元構造解析により形態学的な解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 関口清俊(連携研究者)
2. 発表標題 細胞外マトリックスと幹細胞ニッチ
3. 学会等名 湯島スキンケア研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 早川智久、倉田隆一郎、藤田郁尚、岡田文裕、関口清俊
2. 発表標題 汗腺機能評価モデル構築に向けた不死化汗腺筋上皮細胞の樹立
3. 学会等名 第26回日本発汗総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishizuka S, Mori T, Kurata R, Okada F
2. 発表標題 The establishment of a procedure for three-dimensional visualization of sebum production in human sebaceous glands.
3. 学会等名 2ndIPCE Conference（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakashima K, Kurata R, Fujita F, Okada F, Tanemura A, Murota H, Katayama I, Sekiguchi K
2. 発表標題 Are you satisfied with your antiperspirant? High-resolution 3D live imaging of human sweat glands for development of a motion-suppressing antiperspirant that directly inhibits gland contraction and suppresses sweat secretion
3. 学会等名 IFSCC Congress 2018 Munich（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 倉田隆一郎
2. 発表標題 ヒトの汗腺の三次元構造
3. 学会等名 第117回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kurata R, Fujita F, Okada F, Futaki S, Nakano I, Tanemura A, Murota H, Katayama I, Sekiguchi K
2. 発表標題 Sweat gland stem cells in human sweat glands
3. 学会等名 International skin conference 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 倉田隆一郎
2. 発表標題 ヒト汗腺の構造と再生 (教育講演: 汗と皮膚病変)
3. 学会等名 第118回日本皮膚科学会総会(名古屋) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kurata R
2. 発表標題 Isolation and characterization of sweat gland stem cells from human skin
3. 学会等名 2019 Gordon Research Conference(アメリカ) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakashima K, Kurata R, et al.
2. 発表標題 Contraction of myoepithelial cells transports sweat in human eccrine sweat glands revealed by 3D live-imaging system
3. 学会等名 77th SID Annual Meeting (アメリカ) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayakawa T, Kurata R, et al.
2. 発表標題 Generation of immortalized sweat gland myoepithelial cells and eccrine sweat gland function evaluation model
3. 学会等名 49th European Society for Dermatological Research (フランス) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 游優、倉田隆一郎ら
2. 発表標題 ヒトアポクリン汗腺の3次元構造解析とアポクリン分泌の動態観察
3. 学会等名 第27回日本発汗学会 (浜松)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秦野 衛、倉田 隆一郎
2. 発表標題 尋常性ざ瘡の発症解明に向けたヒト皮脂腺を用いたトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第140回 日本薬学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計8件

産業財産権の名称 皮脂腺の観察方法およびその利用	発明者 石塚 周太, 倉田 隆 一郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018/2/28	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 不死化汗腺筋上皮細胞およびその製造方法	発明者 早川 智久, 倉田 隆 一郎, 藤田 郁尚, 岡 田 文裕, 他1名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018/8/7	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 制汗剤	発明者 中島輝恵、倉田隆一 郎、藤田郁尚、岡田 文裕	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019/3/27	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 皮脂腺の観察方法およびその利用	発明者 石塚 周太, 倉田 隆 一郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018/10/17	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 汗腺の識別方法、および汗腺の識別キット	発明者 游優, 中島輝恵, 倉 田隆一郎, 藤田郁 尚, 岡田文裕	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-100595	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 アポクリン汗腺の動態の観察方法、および被験物質の評価方法	発明者 游優, 中島輝恵, 倉 田隆一郎, 藤田郁 尚, 岡田文裕	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-100596	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 制汗剤処方	発明者 久加亜由美, 倉田隆 一郎, 中島輝恵, 藤 田郁尚, 原武史	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-170774	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 制汗剤処方	発明者 久加亜由美, 倉田隆 一郎, 中島輝恵, 藤 田郁尚, 原武史	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-170775	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 汗腺の動態の観察方法	発明者 中島輝恵、倉田隆一 郎、藤田郁尚、関口 清俊、他3名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018/1/19	取得年 2018年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

体温調整を担うヒト汗腺において発汗収縮の可視化と数値化により、評価法の確立に成功
<https://www.mandom.co.jp/release/pdf/2018091801.pdf>

日本の研究グループで初！
 Cosmetic Victories 2019 で最優秀賞を受賞
<https://www.mandom.co.jp/release/pdf/2019061801.pdf>

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
連携研究者	関口 清俊 (Sekiguchi Kiyotoshi) (50187845)	大阪大学・蛋白質研究所・寄附研究部門・教授 (14401)	
連携研究者	室田 浩之 (Murota Hiroyuki) (90363499)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	