

令和 6 年 5 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03266

研究課題名(和文) 上皮幹細胞コンパートメントを規定する分子機構と生物学的意義の解明

研究課題名(英文) Compartmentalization of epithelial stem cells in skin development and homeostasis

研究代表者

佐田 亜衣子 (Sada, Aiko)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：80779059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚の上皮組織は高度に区画化されており、毛包間表皮、毛包、皮脂腺を生み出す幹細胞が、異なる領域で固有の機能を果たしている。さらに我々は、均一だと考えられてきた表皮基底層の中に、分裂頻度の異なる2種類の独立した幹細胞集団が、規則的なパターンを持って、領域特異的に局在することを明らかにしてきた。しかし、なぜ異なる幹細胞集団が上皮組織の中で領域化しているのか、その意義や形成過程、制御機構は不明であった。本研究では、表皮幹細胞の領域化の*in vitro*再構築および*in vivo*における制御因子の同定に取り組み、表皮幹細胞制御における細胞外環境の重要性を提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに幹細胞不均一性を*in vitro*で再構築することは技術的に困難であったが、今回凹凸を保持した足場を用いた新しい三次元培養系の確立に成功した。さらに、表皮幹細胞の領域化が加齢と共に乱れることを見出し、その制御因子としてfibulin-7を介した幹細胞の微小環境制御の重要性を提唱した。本研究で得られた知見は、将来的に、表皮幹細胞の不均一性や領域化が破綻する皮膚の老化や炎症性皮膚疾患の理解と克服につながる可能性があり、基礎・応用の両面において意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：The epithelial tissue of the skin is highly compartmentalized, and is performing specific functions at different tissue regions. We have shown that two distinct stem cell populations with different cell division frequencies localize in a regular pattern and in a region-specific manner within the epidermal basal layer; however, the significance, formation processes and regulatory mechanisms of epidermal stem cell compartment remain unclear. In this study, we aimed the *in vitro* reconstruction of epidermal stem cell patterning *in vitro* and the identification of regulatory factors *in vivo*, and proposed the importance of the extracellular environment in epidermal stem cell regulation.

研究分野：皮膚再生老化学

キーワード：表皮幹細胞 幹細胞不均一性 細胞外環境 三次元培養 皮膚老化 細胞外マトリクス 領域化 力学的環境

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1-1. 皮膚組織に存在する上皮幹細胞コンパートメント

皮膚の最も表面に位置する表皮は、外界から身体を守るバリアとして働くほか、水分量の調節や損傷治癒など、生命維持に必須の役割を果たす。皮膚の上皮組織は、毛包間表皮と表皮の付属器(毛包、皮脂腺等)に大きく分けられ、それぞれが固有の幹細胞集団によって維持されている。毛包間表皮、毛包、皮脂腺の幹細胞は、恒常状態では独立して働くが、損傷にตอบสนองして、分化運命を転換し、異なる細胞系譜へと寄与する能力を保持する。我々や他のグループの先行研究により、皮膚の異なる幹細胞集団は、上皮組織の中で各々の区画(コンパートメント)を作り、高度に領域化して局在することが示されてきた。細胞系譜解析や数理モデル、トランスクリプトーム解析などにより、皮膚に存在する異なる幹細胞集団の挙動や性質の理解は進んでいるが、①幹細胞の領域化がどのように形成・維持され、②どのような重要性を持つのかは不明であった。

1-2. 分裂頻度の異なる表皮幹細胞の領域化

古典的なモデルにおいて、組織幹細胞は、分裂頻度を低く抑えることで、DNA 損傷・テロメア短縮等の影響を最小限にし、老化やがん化を防ぐと考えられてきた。一方、活発に分裂する細胞は、幹細胞能力を持たない前駆細胞であるとされていた。代表者・佐田は近年、新たに同定した分子マーカー(Dlx1、Slc1a3)と、分裂頻度の違いによって細胞を可視化する H2B-GFP tet-off システムを用い、マウス毛包間表皮では、分裂頻度の低い細胞と高い細胞が2種類の独立した幹細胞として働くことを報告した(*Nat Cell Biol* 2016)。これら2種類の表皮幹細胞は、組織の中で規則的、かつ領域化した局在パターンを示した。さらに分裂頻度の異なる幹細胞の領域化は、マウス皮膚だけでなく、ヒト皮膚や口腔、眼の角結膜、膺など、外胚葉由来の上皮組織において共通に見られ、普遍的なシステムである可能性を見出している。しかし、上皮幹細胞コンパートメントを制御する因子や、上皮幹細胞が領域化していることの機能的役割は不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、皮膚などの上皮組織に存在する不均一な幹細胞集団の領域化に着目し、制御メカニズムを組織—細胞—分子レベルで解明することを目的として以下2つの柱で実施した。

- ① *In vitro* において、領域化された幹細胞局在や挙動のパターンを再構築するため、組織の凹凸構造=力学的環境を模倣したマイクロパターンゲル培養を確立する。
- ② 表皮幹細胞の領域化を規定する遺伝子候補を欠損または過剰発現させ、領域化の乱れが幹細胞や組織の機能不全を引き起こすかを調べることで、幹細胞が領域化していることの機能的な重要性を理解する。

3. 研究の方法

3-1. *In vitro* 幹細胞領域化モデルの確立

分担者・泉との連携により、上皮脚の凹凸構造を模倣したマイクロパターンをコラーゲンゲルに転写した足場を作成する。本培養系はヒト口腔ケラチノサイトにおいて三次元培養が可能であることが確認されており、本研究ではマウスおよび皮膚ケラチノサイトにおける最適条件(凹凸構造の間隔、大きさ、深さ、ゲルの硬さ等)を検討した。さらに、老化した上皮脚を再現するため、平坦化した凹凸構造をデザインし、同様の実験を行った。

3-2. 幹細胞領域化に働く遺伝子群の同定と機能解析

若年、加齢マウス表皮から単離した分裂頻度の異なる表皮幹細胞を用いた RNA シークエンス解析により、網羅的な遺伝子発現プロファイリングを行った。幹細胞領域化に働く遺伝子候補を RNA-seq 解析より選定し、分担者・柳沢との連携のもと、細胞外マトリクス Fibulin-7 について、ノックアウトマウスを用いた表現型解析、細胞系譜解析、遺伝子発現プロファイリングを実施した。さらに、Fibulin-7 の免疫沈降を行い、Fibulin-7 が結合すると想定される目的バンドを切り出し、質量分析を行った。候補タンパク質は、固相結合アッセイ法を用い、Fibulin-7 との相互作用

を検証するとともに、Fibulin-7の有無による局在・機能の変化を調べた。

4. 研究成果

4-1. In vitro 幹細胞領域化モデルの確立

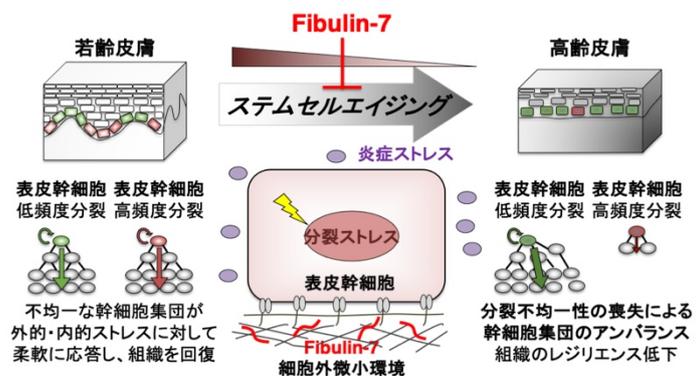
本研究では、ヒト皮膚や口腔粘膜上皮で見られる組織の凹凸構造を *in vitro* で再構築することで、表皮幹細胞制御への影響を検討した。ヒト皮膚ケラチノサイトを用いて、培養条件の検討を行い、マイクロパターン上で安定的に培養を行う条件を確立した。マイクロパターンゲルと平坦なゲルを比較し、凹凸構造の付与により厚みをもった表皮組織が形成されることを見出した。また凹凸構造(力学的環境)によって表皮幹細胞集団の増殖不均一性が一部再現できることを発見した(投稿準備中)。さらに、今まで単離・培養法の確立されていなかったマウス口腔ケラチノサイトの培養法を確立し、責任著者として論文発表した(Ngo et al., *J Vis Exp*, 2021)。

4-2. 幹細胞領域化に働く遺伝子群の同定と機能解析

本研究は、皮膚などの上皮組織に存在する不均一な幹細胞集団の領域化を制御するメカニズムの解明を目的に実施した。若年、加齢マウス表皮から単離した分裂頻度の異なる表皮幹細胞を用いたRNAシーケンズ解析により、網羅的な遺伝子発現プロファイリングを行った。その結果、分裂頻度の低い幹細胞と高い幹細胞では、細胞外マトリクス、細胞骨格や移動、代謝関連因子等、何千もの遺伝子群が異なる発現パターンを示すことを見出した。

上皮幹細胞の領域化を担う候補因子として細胞外マトリクス fibulin-7 の解析を行った。マウス皮膚において、2年間にわたる細胞系譜解析を行ったところ、加齢とともに Slc1a3 陽性の分裂頻度の高い表皮幹細胞が徐々に失われることを見出した。細胞外マトリクス Fibulin-7 を欠損すると、Slc1a3 陽性の高分裂表皮幹細胞クローンの減少促進、創傷治癒の遅延、炎症関連遺伝子の上昇が見られ、皮膚老化様の表現型を示すことが分かった。Fibulin-7 をマウス初代培養表皮幹細胞にレンチウイルスを用いて過剰発現させることで、分裂速度が遅くなり、炎症性サイトカインに対して保護作用を持つことが示唆された。興味深いことに、表皮幹細胞の増殖と分化の制御は fibulin-7 タンパク質の異なるドメインに依存している可能性が示唆された。

Fibulin-7 の生化学的な機能を明らかにするために、fibulin-7 と結合するタンパク質をアフィニティークロマトグラフィーと質量分析により同定したところ、基底膜構造タンパク質、増殖調整因子、マトリセルラータンパク質、マトリクス分解酵素が含まれていた。Fibulin-7 は基底膜構造タンパク質である Collagen IV など



相互作用を示し、fibulin-7 欠損マウスでは基底膜の不規則な肥厚パターンや発現異常が生じていた。以上の結果より Fibulin-7 は、表皮幹細胞周囲の微小環境をつくりだすことで、幹細胞の老化を防ぐ鍵となるマトリクスであることが示された。以上の結果は、責任著者として論文発表した(図、Raja et al., *EMBO Rep*, 2022)。

4-3. 本研究の意義

これまでに幹細胞不均一性を *in vitro* で再構築することは技術的に困難であったが、今回凹凸を保持した足場を用いた新しい三次元培養系の確立に成功した。さらに、表皮幹細胞の領域化が加齢と共に乱れることを見出し、その制御因子として fibulin-7 を介した幹細胞の微小環境制御の重要性を提唱した。本研究で得られた知見は、将来的に、表皮幹細胞の不均一性や領域化が破綻する皮膚の老化や炎症性皮膚疾患の理解と克服につながる可能性があり、基礎・応用の両面において意義が大きい。

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 Raja Erna, Changarathil Gopakumar, Oinam Lalhaba, Tsunazumi Jun, Ngo Yen Xuan, Ishii Ryutaro, Sasaki Takako, Imanaka Yoshida Kyoko, Yanagisawa Hiromi, Sada Aiko	4. 巻 23
2. 論文標題 The extracellular matrix fibulin 7 maintains epidermal stem cell heterogeneity during skin aging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e55478
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.202255478	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 Xuan Ngo Yen, Haga Kenta, Suzuki Ayako, Kato Hiroko, Yanagisawa Hiromi, Izumi Kenji, Sada Aiko	4. 巻 175
2. 論文標題 Isolation and Culture of Primary Oral Keratinocytes from the Adult Mouse Palate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 e62820
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/62820	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 Ishii Ryutaro, Yanagisawa Hiromi, Sada Aiko	4. 巻 147
2. 論文標題 Defining compartmentalized stem cell populations with distinct cell division dynamics in the ocular surface epithelium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev197590
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.197590	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20件（うち招待講演 9件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 佐田亜衣子
2. 発表標題 細胞外環境制御から紐解く表皮幹細胞老化メカニズム
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐田亜衣子
2. 発表標題 幹細胞－微小環境を介した皮膚再生・老化の仕組み
3. 学会等名 Cross-disciplinary Conference 2023 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐田亜衣子
2. 発表標題 表皮幹細胞集団バランスから理解する皮膚再生と老化
3. 学会等名 埼玉県立春日部高校SSH事業 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐田亜衣子
2. 発表標題 表皮幹細胞集団バランスから理解する皮膚再生と老化
3. 学会等名 北海道皮膚科特別講演 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐田亜衣子
2. 発表標題 細胞の分裂頻度に着眼した皮膚幹細胞老化メカニズム
3. 学会等名 第1回GDN多分野交流セミナー (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐田亜衣子
2. 発表標題 表皮幹細胞の分裂不均一性から紐解く皮膚再生と老化
3. 学会等名 第86回日本皮膚科学会東部支部学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐田亜衣子
2. 発表標題 細胞外マトリクスfibulin-7は、皮膚老化において表皮幹細胞の不均一性維持にはたらく
3. 学会等名 第54回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐田亜衣子
2. 発表標題 Loss of matrix integrity underlies age-dependent impairment of epidermal stem cell heterogeneity
3. 学会等名 日本発生物学会第55回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Aiko Sada
2. 発表標題 Unraveling the mechanisms of skin regeneration and aging: from the perspective of stem cell proliferative heterogeneity
3. 学会等名 3rd SFBD-JSDB conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐田亜衣子
2. 発表標題 分裂不均一性から考える幹細胞システム：皮膚再生と老化の理解へ向けて
3. 学会等名 第10回皮膚の会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Aiko Sada
2. 発表標題 The extracellular matrix fibulin-7 maintains epidermal stem cell population balance during skin aging
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会 第 47 回年次学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐田亜衣子
2. 発表標題 表皮幹細胞の分裂不均一性から紐解く皮膚再生と老化
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐田亜衣子
2. 発表標題 ステムセルダイナミクスから紐解く皮膚再生と老化
3. 学会等名 第 2 回反分野的生物医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Aiko Sada
2. 発表標題 Elucidating the cellular and molecular mechanisms of epidermal stem cell aging
3. 学会等名 ISSCR/JSRM 2021 Tokyo International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐田亜衣子
2. 発表標題 細胞外微小環境を介した皮膚幹細胞老化制御
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Aiko Sada
2. 発表標題 Stem cell dynamics in skin regeneration and aging
3. 学会等名 The 18th Stem Cell Research Symposium (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細胞外マトリクスから紐解く皮膚幹細胞制御メカニズム
2. 発表標題 細胞外マトリクスから紐解く皮膚幹細胞制御メカニズム
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐田亜衣子
2. 発表標題 角結膜上皮における幹細胞ダイナミクス解析
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐田亜衣子
2. 発表標題 皮膚再生・老化を担う幹細胞ダイナミクス：老化制御や再生医療の新たなステージに向けて
3. 学会等名 日本皮膚科学会第231回熊本地方会スポンサードセミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 3.Ryutaro Ishii
2. 発表標題 Defining stem cell dynamics in the mouse ocular surface epithelium
3. 学会等名 ISSCR 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

表皮幹細胞を老化から守る仕組みの解明 ～皮膚の抗老化因子として細胞外マトリクスに期待～
<https://www.kumamoto-u.ac.jp/whatsnew/seimei-sentankenkyu/20221024-2>
 成体マウス初代口蓋上皮細胞（ケラチノサイト）の単離と培養
<https://www.usaco.co.jp/article/detail.html?itemid=1568&dispmid=610>

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
研究分担者	泉 健次 (Izumi Kenji) (80242436)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	柳沢 裕美 (Hiromi Yanagisawa) (40746301)	筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・教授 (12102)	
研究分担者	水野 秀信 (Hidenobu Mizuno) (00567159)	熊本大学・国際先端医学研究機構・特任准教授 (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関