

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2020

課題番号：20K22624

研究課題名（和文）ヒト表皮オルガノイド系譜解析確立と環境因子に対するヒト表皮幹細胞進化適応機構解明

研究課題名（英文）Genetic lineage tracing in human epidermal organoids reveals the evolutionary adaptedness of epidermal stem cells to environmental factors

研究代表者

下川 真理子（Shimokawa, Mariko）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・プロジェクト助教

研究者番号：70627017

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,100,000円

研究成果の概要（和文）：紫外線に長期間暴露した正常皮膚組織において、ヒト扁平上皮がん遺伝子変異を獲得した細胞が、正常な生理学的機能を保ちながらクローン化する現象が報告されているがその仕組みは明らかではない。本研究では、表皮基底層に存在する表皮幹細胞による組織恒常性維持メカニズムである細胞競合との関係性に着目し、マウス表皮オルガノイド培養法を用いて、変異導入オルガノイドにおける表皮幹細胞動態観察による変異細胞および近隣細胞との相互作用観察のための系を作成した。この成果は、マウスモデルにとどまっていた老化の遺伝学的解析をヒト細胞への応用を可能にするもので、ヒト老化およびがんの相互理解への大きな進歩と期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存のマウス表皮オルガノイドの培養条件を改善することで、短期間で生体内表皮の組織構造を再現することを可能にし、表皮オルガノイド幹細胞解析系を確立した。さらに当研究室で保有している条件的に遺伝子変異を導入することが可能なマウスを用い、条件的変異導入可能なオルガノイド作製にも成功した。このオルガノイドが組織構造を再現した後変異獲得幹細胞の動態観察にも成功した。この成果は、マウスにとどまっていた老化の遺伝学的解析をマウス細胞における解析、およびヒト細胞への応用を可能にするもので、ヒト老化およびがんの相互理解への大きな進歩と期待される。

研究成果の概要（英文）：It has been reported that long-period UV-exposed normal skin cells spread clonally with maintaining physiological function, after acquiring human skin cancer mutation. The mechanism of the clone expansion is unclear, although it is expected that normal epidermal cells adapt to the tumor-promoting environment by selecting mutant clones. In this study, we focus on the association with stem cell competition as a system that the epidermal stem cells maintain the epidermal tissue homeostasis. Using the mouse epidermal organoid culture method, a system was created for observing the interaction between mutant cells and neighboring cells by observing the epidermal stem cell dynamics in the mutant-introduced organoid. This result enables the application of genetic analysis of aging to human cells, which has remained in the mouse model, and is expected to be a major advance in mutual understanding of human aging and cancer.

研究分野：皮膚老化

キーワード：表皮オルガノイド 皮膚老化 変異獲得細胞クローン拡大

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年のシーケンス技術進歩により、ヒトのがんが獲得する遺伝子変異の全貌が明らかになりつつある。一方で、紫外線に長期間暴露したヒト正常皮膚組織において、ヒト扁平上皮がんに見られる遺伝子変異を獲得した正常角化細胞クローンが多数出現し拡大することが報告されている。正常な生理学的機能を保ったままクローン拡大していることがわかっている (Martincorena I et al., Science 2015, Yokoyama A., Nature 2019)。発がん促進性環境下において正常細胞が変異クローン選択により生理学的機能を保ちながら環境適応することが想定されるが、その仕組みは明らかでない。本研究室では、表皮基底層に存在する表皮幹細胞が細胞競合によって正常皮膚組織恒常性を維持することを明らかにした。表皮の分化シグナル NOTCH1 の機能阻害によって YAP/TAZ が活性化されるが (Totaro et al., Nature Communications 2017) 変異を獲得した表皮幹細胞クローンの取捨選択における細胞競合の関与は明らかではない。また正常表皮細胞におけるがん抑制遺伝子 TP53 の欠損は表皮幹細胞の分化・脱落メカニズムを促進することでがん化を抑制することがわかっている (Freige et al., Cell Reports 2014) が、隣接する正常細胞との間で細胞競合を起こすことによるのか否か、その仕組みについても明らかではない。ヒト表皮幹細胞が紫外線などの環境因子・炎症などの局所の環境変化に対してどのようにして進化適応し、がん化を回避しているのか？この問いを明らかにすることは組織のがん化・老化の原理を理解する上で重要である。

2. 研究の目的

本研究では細胞競合との関係に着目し、変異獲得細胞がクローン化する仕組みを解明することを目指す。ヒト表皮オルガノイド *in vitro* 細胞系譜解析を確立し、遺伝学的なプロスペクティブ解析を行う。遺伝子変異獲得細胞のシングルセル RNAseq やエピゲノム解析を組み合わせ、マウス *in vivo* 解析結果と相互に検証し、組織のがん化・老化の原理の理解を目指す。

3. 研究の方法

- 1) 生体内表皮組織構造を模倣する表皮オルガノイド培養方法の確立
既存のマウス表皮オルガノイド培養方法 (Boonekamp et al., PNAS 2018) の問題点を克服するため、培地に添加するニッチ因子を精査し、樹立後に生体内表皮組織構造を短期間で再現できる培養条件を新たに見出す。
- 2) K14 幹細胞トレーシングシステムを用いた変異細胞動態解析
幹細胞競合を観察可能な K14 陽性表皮幹細胞の生体内トレーシングが可能なマウスを保有しているため、マウス表皮オルガノイド培養法 (Boonekamp KE et al., PNAS 2019) に倣って表皮幹細胞トレーシングが可能なマウス表皮オルガノイドを作製する。レポーター活性化後の蛍光観察によって表皮幹細胞の動態を観察する。
- 3) 変異オルガノイドを用いた変異細胞動態解析
当研究室で保有している Tamoxifen 依存的に遺伝子変異を導入することが可能なマウスを用い、1) の新たに見出した方法を用いて条件的変異導入可能なオルガノイド作製する。このオルガノイドが組織構造を再現した後、培地への Tamoxifen 添加によって遺伝子変異を導入し、変異獲得細胞の動態を観察する。
- 4) オルガノイド *in vitro* 解析とマウス *in vivo* 解析の相互検証
当研究室で保有している Tamoxifen 依存的に遺伝子変異を導入することが可能なマウスを用い、変異獲得細胞の動態をオルガノイド (*in vitro*) およびマウス (*in vivo*) にて相互に結果を検証する。

4. 研究成果

紫外線に長期間暴露した正常皮膚組織において、ヒト扁平上皮がん遺伝子変異を獲得した細胞が多数出現し、正常な生理学的機能を保ちながらクローン化する現象が報告されている。正常細胞が発がん促進性環境にもクローン化によって適応することが想定されるが、その分子生物学的仕組みは明らかではなく、これを解明することが老化とがん化の相互理解に不可欠である。我々はこれまでに、マウス表皮基底層に存在する幹細胞同士の細胞競合によって正常表皮組織恒常性が維持されるメカニズムを解明している。この幹細胞相互作用に着目し、本研究では、オルガノイド培養技術を応用することで、変異獲得正常幹細胞と周辺細胞との相互作用を精査し、クローン化メカニズム解明を目指した。オルガノイド培養技術は、変異細胞を用いたプロスペク

タイプ解析を可能にし、マウスのみならずヒトにおいても変異細胞動態解析を可能にする。本研究では、マウス表皮オルガノイド培養法(Boonekamp KE et al., PNAS 2019)の条件を改善し、生体内表皮構造を短期間に再現できる系を新たに確立し、幹細胞競合を観察可能な K14 陽性表皮幹細胞の生体内トレーシングが可能なマウスからオルガノイドを作製した。表皮重層組織構造を再現していることを確認し、レポーター活性化後の蛍光観察によって表皮幹細胞の動態観察に成功した。このように既存保有の幹細胞解析用マウスを活用した上で既報の培養条件を改善することで、迅速に表皮オルガノイド幹細胞解析系を確立した。さらに当研究室で保有している Tamoxifen 依存的に遺伝子変異を導入することが可能なマウスを用い、条件的変異導入可能なオルガノイド作製にも成功した。このオルガノイドが組織構造を再現した後、培地への Tamoxifen 添加によって遺伝子変異を導入し、変異獲得幹細胞の動態観察にも成功した。この成果は、マウスにとどまっていた老化の遺伝学的解析をマウス細胞における解析、およびヒト細胞への応用を可能にするもので、ヒト老化およびがんの相互理解への大きな進歩と期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

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

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
---------	---------