

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16209

研究課題名(和文) 真皮の硬さに起因する表皮幹細胞老化機構の解明

研究課題名(英文) Dermal stiffness induces epidermal stem cell ageing

研究代表者

一條 遼 (Ichijo, Ryo)

京都大学・医生物学研究所・助教

研究者番号：50804382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：表皮幹細胞の老化メカニズムは、酸化ストレスなどによって生じるDNA損傷など細胞内部の変化、つまり細胞老化が要因であることは報告されていた。しかし、表皮幹細胞周囲の環境の加齢変化やそれが表皮幹細胞に及ぼす影響については未解明であった。本研究では、加齢に伴い真皮線維芽細胞からPtx3の発現が上昇し、それが血管の減少と真皮の硬化を誘導し、Piezo1を介したカルシウムの長期流入による表皮幹細胞の加齢変容を誘発するという新たな皮膚老化機構が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織幹細胞に隣接する細胞外基質が硬化することで、その性質が変化するという概念は癌研究でよく行われてきた。しかし、恒常性の観点からは行った研究がほぼなく、生体における研究は非常に少ない。本研究では硬さと組織幹細胞の恒常性の破綻という新しい観点でのアプローチである。

本研究により新たな皮膚老化のメカニズムを解明できる可能性がある。この新たなメカニズムの解明は老化による組織修復の遅延を改善することや、有効な治療法の存在しない皮膚癌などの新しい治療戦略の開発に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Stem cell loss causes tissue deterioration associated with ageing. The accumulation of genomic and oxidative stress-induced DNA damage is an intrinsic cue for stem cell loss. However, whether there is an external microenvironmental cue that triggers stem cell loss remains unknown. Our study revealed Ptx3 expression level increases with age in dermal fibroblast, and it induces vascular atrophy and dermal stiffening. Finally the change induces age-related changes in epidermal stem cells due to prolonged calcium influx via Piezo1.

研究分野：細胞生物学

キーワード：老化 皮膚 表皮幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚は表皮、真皮、皮下組織からなり、表皮は基底層、有棘層、顆粒層、角質層から形成される。表皮では、表皮基底細胞全てが均一な表皮幹細胞であると考えられている(Clayton et al., *Nature*. 2007; Doupé et al., *Dev Cell*. 2010; Lim et al., *Science*. 2013; Rompolas et al., *Science*. 2016)。表皮幹細胞の増殖、分化は、皮膚の表面積拡張や新陳代謝、恒常性維持に必須の役割を果たすが、肥満、老化によって、表皮幹細胞の機能は低下する(Liu et al., *Nature*. 2019; Ge et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020; Oestreich et al. *Cell Stem Cell*. 2020)。皮膚は3層構造をもつが、表皮と真皮の相互関係に着目した肥満、老化研究はこれまでほとんど行われてこなかった。そこで本研究では、肥満、老化によって真皮が変化し、その影響を受けて表皮幹細胞の機能が低下するメカニズムを解明する。

本研究では、マウスの足裏表皮と真皮に着目する。マウス足裏皮膚は毛が他の領域と比較し少なく、ヒトと類似するからである。若齢、肥満、老化マウスの足裏真皮を用いて Single cell RNA sequencing (scRNA seq)を行った。線維芽細胞の cluster を抽出し、tSNE を作成した。その結果、cluster 1 の割合が肥満、老化マウスで高いことがわかった。各 cluster の遺伝子発現レベルを確認すると、細胞外基質に関連する遺伝子の発現が、肥満、老化マウスで減少し、cross link に関連する遺伝子が増加していることがわかった。そこで atomic force microscope (AFM)を用いて、真皮の硬さを測定すると肥満、老化マウスで硬化していることがわかった。この硬化によって、表皮幹細胞がいかに変化するのかを明らかにする。

2. 研究の目的

本研究では免疫染色、scRNA seq、AFM を用いて真皮の硬さに起因する新たな皮膚表皮幹細胞老化メカニズムを明らかにすることを研究目的とする。

3. 研究の方法

加齢の要因となる因子を同定するため、若齢マウスと高齢マウスの表皮幹細胞を RNA sequence により遺伝子発現比較を行った。その結果からカルシウムシグナルの表皮幹細胞における流入を観察するため二光子顕微鏡を用いた in vivo ライブイメージングを行った。次に若齢、高齢マウスの真皮の硬さを AFM を用いて測定した。Keratin14 creERT マウスと Piezo1 flox マウスを交配し、表皮幹細胞特異的に Piezo1 をノックアウトしたマウスを作製した。このマウスを老化させ、免疫染色などにより表皮幹細胞の加齢変容を観察した。

加齢による真皮硬化の原因を探るため、若齢、高齢マウス皮膚真皮の血管を染色した。さらに皮膚真皮の scRNA seq を行った。scRNA seq の結果、老化マウスの真皮線維芽細胞から Pentraxin 3(Ptx3)が分泌されることが分かった。Ptx3 KO マウスを加齢させ、表皮、真皮の加齢変容を AFM、免疫染色などにより確認した。

4. 研究成果

加齢変容の原因を探るため、表皮幹細胞の遺伝子発現を若齢マウスと高齢マウスで比較したところ、Geneontology 解析により、高齢マウスで発現上昇した遺伝子群には、カルシウムシグナルに関する遺伝子が有意に濃縮していることがわかった。そこでカルシウムシグナルをライブイメージングできるマウスを用意し、若齢、高齢マウスで in vivo ライブイメージングを行った。その結果、高齢マウスではカルシウムの流入時間が長期化することが分かった。次に皮膚真皮の硬さを測定したところ、高齢マウスでは若齢マウスよりも硬くなっていた。さらに、基質のかたさを認識して活性化するメカノイオンチャネルである Piezo1 を表皮基底細胞特異的にノックアウトしたところ、加齢で誘発される長期カルシウムパルスが抑制されるとともに、表皮基底細胞

の加齢変容、つまり表皮基底細胞の分裂方向の変化、早期分化、Collagen17 の発現量が抑制された。従って、加齢による真皮の硬化が表皮基底細胞での Piezo1 の持続的活性化を誘導し、カルシウムが持続的に流入することによって、表皮幹細胞の加齢変容が誘発されることが分かった。

次に、加齢による真皮硬化の原因を検討した。免疫染色により、加齢マウスでは真皮の血管が減少していることが分かった。そこで K14VEGF マウスを用意し、このマウスの真皮の血管を定量した。すると、高齢の野生型マウスと比較し、K14VEGF 高齢マウスでは真皮の血管が増加していた。そこで、表皮の老化に伴う表現型を観察した。すると、K14VEGF 高齢マウスでは表皮基底細胞の分裂方向、早期分化、Collagen17 の発現がレスキューされていた。次に Keratin14creERT/ VEGF flox マウスを作製し血管新生を阻害したところ、高齢マウスで観察される表皮の表現型が観察された。

真皮で血管が減少する原因を解明するため、若齢、高齢マウスの真皮 scRNAseq を行った。その結果、高齢マウス真皮で増加する線維芽細胞のクラスターを発見した。その遺伝子群を免疫染色により確認したところ、Ptx3 が加齢に伴って顕著に増加することを確認した。そこで、Ptx3 ノックアウトマウスを用意し、高齢 Ptx3 ノックアウトマウスの表皮、真皮の表現型を観察した。その結果、高齢マウス Ptx3 ノックアウトマウスでは高齢マウスで観察される加齢に伴う表現型がレスキューされていた。Ptx3 の発現はヒトサンプルでも加齢に伴って発現が上昇することを確認している。以上から、加齢によって線維芽細胞が Ptx3 を分泌し、それにより血管減少が誘導され、真皮の硬化を誘導すること、この硬化を表皮基底細胞が感知し、表皮の機能低下が誘導されることが明らかとなった(図1)。

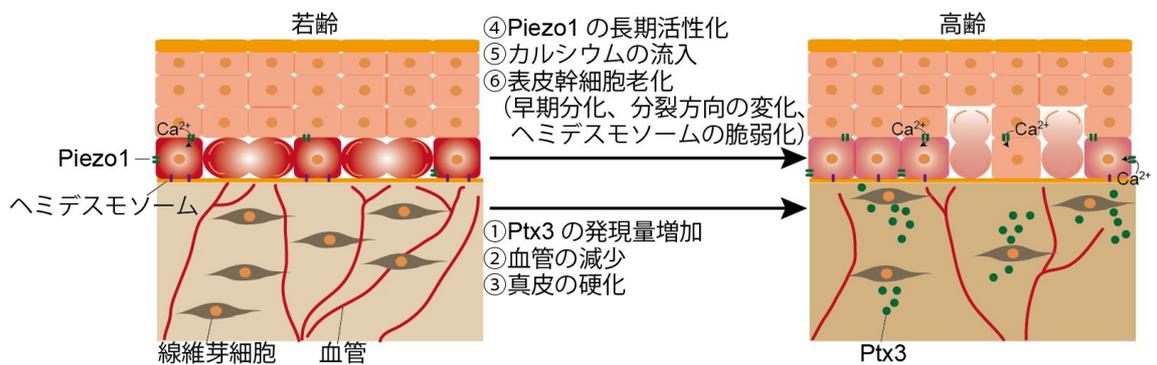


図1、Ptx3、Piezo1 を介した新たな皮膚老化機構の解明

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ichijo Ryo, Maki Koichiro, Kabata Mio, Murata Teruasa, Nagasaka Arata, Ishihara Seiichiro, Haga Hisashi, Honda Tetsuya, Adachi Taiji, Yamamoto Takuya, Toyoshima Fumiko	4. 巻 2
2. 論文標題 Vasculature atrophy causes a stiffened microenvironment that augments epidermal stem cell differentiation in aged skin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Aging	6. 最初と最後の頁 592 ~ 600
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s43587-022-00244-6	査読の有無 無
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0件

〔図書〕 計3件

1. 著者名 一條遼、豊島文子	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 3
3. 書名 実験医学12月号	

1. 著者名 一條遼、豊島文子	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 2
3. 書名 医学のあゆみ	

1. 著者名 一條遼、豊島文子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 2
3. 書名 進化する皮膚科学	

〔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
---------	---------