

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791080

研究課題名（和文） 表皮角化細胞の増殖能力と運動能力の相関性の解明とその制御

研究課題名（英文） Analysis and regulation of proliferative and migratory capacities of epidermal keratinocytes

研究代表者

難波 大輔（NANBA DAISUKE）

愛媛大学・上級研究員センター・講師

研究者番号：10380255

研究成果の概要（和文）：我々はヒト表皮角化幹細胞培養系を用いて、増殖能力の異なる角化細胞コロニー内での細胞移動速度を測定した。その結果、角化細胞の増殖能力と移動能力に正の相関性があることを見出した。さらにあるインテグリン分子が、増殖性の高い角化細胞の細胞移動に関与していること、および細胞集団内での活発な細胞移動の基盤となる細胞動態を明らかにすることに成功した。この成果は幹細胞や腫瘍細胞などの増殖性の高い細胞集団動態の理解に役立つ。

研究成果の概要（英文）： We examined the association of proliferative and migratory capacities of human cultured epidermal keratinocytes and found that proliferative capacity was positively correlated with migratory capacity in keratinocytes. We also found that a kind of integrin was involved in migratory capacity of proliferative keratinocytes and that a cell behavior generated collective dynamics in the keratinocyte colony. This result leads to understanding the collective behaviors of cells with higher proliferative capacity including stem cells and tumor cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚炎症・再生学、表皮角化幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚の最外層に位置する表皮は外部からの障害や内部からの体液の蒸発を防ぐバリアとして重要な働きを担っている。主要なバ

リア機能は表皮の外側である角質層が担うが、それは基底層に存在する角化細胞の連続的な分裂および分化によって供給される。そして生涯に渡って細胞を供給するために基底層には表皮角化細胞の幹細胞が存在する

ことが知られている。

表皮の角化幹細胞は分裂による細胞の供給だけでなく、大きな創傷を受けた場合には損傷修復およびその後の長期的な維持のためにその部位へ直接移動する必要がある。実際にマウスでは毛包バルジに存在する角化幹細胞や角膜上皮の角化幹細胞は創傷治癒過程で移動していることが報告されている (Oshima et al., Cell 2001; Majo et al., Nature 2008)。またこのような組織損傷修復に関与する遺伝子群の機能破綻が腫瘍の形成や浸潤、さらには転移にも関与していると考えられている。幹細胞や増殖能の高い細胞の移動能力の解明は創傷治癒や腫瘍形成・浸潤などのプロセスを理解する上で最も重要なものの一つであるが、これまで表皮角化細胞の増殖能力と運動能力の正の相関性を明確にした研究は報告されていなかった。

さらに現在、ヒト表皮角化細胞の培養によって、生体外での培養表皮シートの作製が可能となり、広範囲重度熱傷の治療などに用いられている。この場合、培養上での増殖性の高い角化細胞を如何に多く保持するかが、治療の成否を大きく左右する。増殖能力と移動能力の相関性が解明されることで、非侵襲的な細胞の品質管理が可能と考えられる。

## 2. 研究の目的

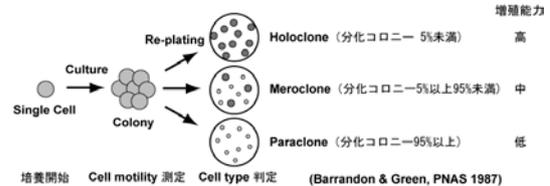
ヒト表皮角化幹細胞は培養初期には自己複製を繰り返すが、次第に増殖能力が低下し、最終的には分裂を停止する。この現象はクローナル・コンバージョンと呼ばれ、培養角化細胞を用いた再生医療にとって問題となる。本研究では、3T3 フィーダー細胞を利用したヒト表皮角化細胞培養系 (Rheinwald & Green, Cell 1975) を用いて、幹細胞などの増殖性の高い細胞と、増殖性の低い細胞を比較解析することで、角化細胞の増殖能力と運動能力の定量的なデータを取得することで、培養角化細胞における増殖と運動の正の相関性を明確に証明することを目的とした。さらにこの相関性を担う分子を同定、その制御を行うことで、創傷治癒やがんの浸潤・転移に対する新しい治療法を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト表皮角化幹細胞培養系における細胞移動能力の測定と細胞タイプの判別

マウス 3T3 細胞をフィーダー細胞としてヒ

ト表皮角化細胞は細胞のコロニーを形成する。角化細胞の運動能を評価するため、角化細胞のコロニー内での細胞移動距離を time-lapse 観察によって測定し、その後、個々のコロニーをまた別の培養ディッシュに移し、Barrandon & Green (PNAS 1987)の方法によって、角化細胞の増殖能力による分類を行った (下図参照)。



### (2) 角化細胞の増殖能力と移動能力の相関性に関与する分子機構と細胞動態の解明

角化細胞の移動や増殖に関与している分子群に候補を絞り、免疫染色やフローサイトメトリーの手法によって、候補分子の発現量やそのパターンと、角化細胞の増殖能力および移動能力との関連を明らかにした。さらに細胞動態を time-lapse 観察によって詳細に観察することで、どのような細胞動態がコロニー内での速い細胞移動をもたらすかを明らかにした。この結果を基にコンピューターによるシミュレーション解析を行い、コロニーのような100個ほどの細胞集団になったときの細胞動態を解析し、増殖能力と移動能力の相関性の基礎となる細胞動態の様式を明らかにした。

### (3) 変異型 Rac1 タンパク質導入による幹細胞制御

これまでの我々の研究から、表皮角化幹細胞の維持に Rac1 タンパク質が重要であることが明らかとなっている。そこで安全に幹細胞の増殖能力を運動能力を制御するために、細胞膜透過性のシグナルペプチドであるポリリジン配列を付加した活性型及び不活性型 Rac1 タンパク質を無細胞タンパク質合成系を用いて作製し、マウスの創傷治癒やがんの部位に直接投与し、角化細胞の増殖と運動を同時に制御することで創傷治癒やがんの増大・浸潤への影響を評価する方法の開発を目指した。

## 4. 研究成果

### (1) ヒト表皮角化細胞の増殖能力と移動能力の相関性

マウス線維芽細胞である 3T3 細胞をフィーダー細胞として、ヒト表皮角化細胞培養を行

い、角化細胞コロニーを形成させた。角化細胞コロニーは形態的に増殖性の高い細胞からなる **growing colony** と終末分化し分裂停止した細胞からなる **terminal colony** の2種類のコロニーを判別することが可能である。この2種のコロニー内での角化細胞の移動速度を測定したところ、**growing colony** 内の細胞の移動速度が **terminal colony** 内の細胞に比べ約3倍速いことを見出した。

さらに **growing colony** 内での平均細胞移動速度と、**growing colony** を構成する細胞の長期的な増殖活性の相関性を解析した結果、角化細胞の増殖活性とコロニー内での細胞移動速度に明確な正の相関性を見出すことができた。

以上のことから、ヒト表皮角化細胞は少なくとも培養系において、増殖能力と移動能力に正の相関性があるという結論を導くことができた。

### (2) 増殖能力と移動能力に関与する分子の探索

角化細胞における増殖能力と移動能力の相関性に関与する分子機構を明らかにするため、角化細胞の基質との接着や移動に関与するインテグリン分子の発現パターンと角化細胞の増殖および移動能力との関連性を調べた。その結果、あるインテグリン分子が移動速度の速い細胞に多く発現していること、さらにその分子を多く発現している分子は、長期的な増殖能力も高いことを見出した。

さらにこの分子の角化細胞移動における役割を解析するために、接着阻害抗体を用いた実験と、マイクロ RNA を用いたノックダウン実験を行った。その結果、このインテグリン分子の機能を阻害する、または発現量を低下させることで、角化細胞の移動速度が有意に低下することが明らかとなった。

また幾つかの低分子化合物を用いた実験から、角化細胞コロニー内における細胞移動機構を解析した結果、細胞移動には ATP は必要であるが、アクチン・ミオシンによる収縮力は必要でないことが明らかとなった。以上のことは、角化細胞コロニー内での細胞移動は、強力な収縮力や牽引力を必要としない、すなわち、集団細胞移動の主体となるリーダー細胞のようなものはないと考えられた。

### (3) 角化幹細胞のコロニー内での高い細胞移動能力獲得機構の解明

コロニーという細胞が密集した状態で如何に移動しているかは、これまで明らかにされていない。本研究のこれまでの結果は、高い増殖能力を持つ細胞は、コロニー内で活発に移動している。この機構を解明するため、まず培養角化細胞の動態を解析した。特に(2)の結果から見出されたように、特定の

細胞の強い力ではなく、個々の細胞の特性そのものが細胞移動の要因と考えられ、特に個々の角化細胞や2個や数個までのコロニーを詳細に観察した。その結果、2個の細胞からコロニーである特徴的な細胞動態が見出された。この細胞動態はすでに角化細胞の増殖活性との相関性が示唆されていたことから、このような細胞動態を示す細胞を100個集団として密集させた場合の、細胞集団運動のシミュレーションを行った。その結果、培養角化細胞コロニーでの細胞動態を再現することに成功した。さらにシミュレーション実験から、特別な細胞動態を示す角化細胞がある割合で存在することで、最も効率よく、角化細胞コロニー内での速い細胞移動をもたらすことが明らかとなった。

これらの結果から、2個の細胞からなるコロニーの動態と、その後の長期的な増殖活性の相関性を解析した結果、2個の細胞動態から、その後の長期的な細胞増殖をある程度予測することが可能であることが見出された。

以上の(1)～(3)の結果を纏めて、現在論文投稿準備中である。

### (4) 無細胞タンパク質合成系を用いた角化幹細胞制御

以前の我々の研究から、**Rac1** というタンパク質が、角化細胞の増殖能力や運動能力の関与していることが明らかになっている。この **Rac1** タンパク質を角化細胞に導入することで、高い増殖能と運動能の両者を誘導可能であると考え、細胞膜透過性のシグナルペプチドであるポリリジン配列を付加した活性型及び不活性型 **Rac1** タンパク質を無細胞タンパク質合成系を用いて作製し、角化細胞に直接、**Rac1** タンパク質を導入する実験を行った。

無細胞タンパク質合成系によって **Rac1** タンパク質を合成することは成功したが、角化細胞に効率よく合成タンパク質を導入することができなかった。またタンパク質合成の際に用いられる溶液成分中に、角化細胞に毒性のあるものがあり、培養をうまく継続出来なかった。

現在、合成タンパク質を精製し、また導入効率を増加させるため、幾つかの試薬を用いて実験を継続中である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

#1. Higashiyama S, Nanba D, Nakayama H, Inoue H, Fukuda S. Ectodomain shedding and remnant peptide signaling of EGFRs and

their ligands. Journal of Biochemistry (査読有), Vol 150, p15-p22, 2011.

[学会発表] (計 5 件)

#1. **難波大輔**, Switching modes of keratinocyte response to EGF through clonal conversion by actin filament remodeling, 日本研究皮膚科学会, 2011年12月10日, 宜野湾市

#2. **難波大輔**, Kinetic biology on stem cell colonies and their geometrical shapes: why stem cells make round colonies?, 日本発生物学会, 2011年5月20日, 京都市

#3. **難波大輔**, Collective migration of keratinocytes induced by EGF requires their proliferative capacity, 日本研究皮膚科学会, 2010年12月3日, 和歌山県民文化会館

#4. **難波大輔**, Collective migration of keratinocytes induced by EGF requires their proliferative capacity, 国際分化学会, 2010年11月16日, 奈良県新公会堂

#5. **難波大輔**, Collective migration of keratinocytes induced by EGF requires their proliferative capacity, 日本発生物学会, 2010年6月20日, 京都国際会議場

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ccr.ehime-u.ac.jp/srf/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

難波 大輔 (NANBA DAISUKE)

愛媛大学・上級研究員センター・講師

研究者番号: 10380255