

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15023

研究課題名（和文）卵巣ステロイドホルモンによる非生殖器官の組織リモデリングメカニズム

研究課題名（英文）Remodeling mechanism of non-reproductive tissues controlled by ovarian steroid hormones

研究代表者

小林 芳彦（Kobayashi, Yoshihiko）

京都大学・医生物学研究所・助教

研究者番号：10919145

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）：卵巣ステロイドホルモンは、子宮内膜や卵管においては組織リモデリングにも役割を果たすことが知られる。それではこれら卵巣ステロイドホルモンは、非生殖器官の機能には影響を及ぼすであろうか。本研究プロジェクトでは、妊娠期の皮膚リモデリングに光を当てた。本研究において、これまでに定義されたことのない細胞群が妊娠期腹部真皮組織に出現することを明らかにした。この細胞群には卵巣ステロイドホルモン受容体が発現し、その下流のシグナルが活性化していることが明らかとなった。また当該細胞はメカノトランスダクションを媒介し、妊娠期皮膚リモデリングに寄与することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、非生殖器官である皮膚が妊娠中に卵巣ホルモンの影響を受けることを明らかにした。血中卵巣ホルモン濃度は妊娠中のみならず、生涯を通して女性の体内で変化することから、妊娠期以外においても皮膚やその他の器官・組織が影響を受け、組織のリモデリングなどを誘導する可能性がある。研究代表者としては、本研究を受け、妊娠中のみならず男女で有病率・重症化率等の異なる疾病に関する研究などにもつなげていきたいと考えている。

研究成果の概要（英文）：Ovarian steroid hormones are known to play a role in tissue remodeling in the endometrium and fallopian tubes. Do these ovarian steroid hormones affect the function of non-genital organs? In this research project, we focused on skin remodeling during pregnancy. In this study, we found that a previously undefined cell population appears in the abdominal dermal tissue during pregnancy. These cells express ovarian steroid hormone receptors and downstream signals are activated. These cells mediate mechanotransduction and contribute to skin remodeling during pregnancy.

研究分野：組織再生学

キーワード：組織リモデリング 卵巣ホルモン 皮膚

1. 研究開始当初の背景

卵巣ステロイドホルモンである estradiol-17 や progesterone は、排卵周期の進行や妊娠に伴い分泌動態が変化し、それによって生殖器官の機能を調節することが知られる。これらのホルモンは子宮内膜や卵管においては組織リモデリングにも役割を果たすことが知られ、このプロセスは受精や胎子の発育に最適な環境を提供するために必須のものである。それでは、これら卵巣ステロイドホルモンは、非生殖器官の機能に影響を及ぼすであろうか。答えは言うまでもなくイエスであり、そこには生理学的・病理学的に認められる性差や、妊娠期に特有の生理現象・疾患など、間接的証拠が多く存在する。

妊娠時において、胎子の成長によって腹部に張力がかかり、皮膚組織が押し広げられる。この際に皮膚表皮は、細胞自体が伸びているわけではなく、毛包間表皮に KRT14⁺/TBX3⁺細胞を起点とした細胞増殖クラスターを形成することで皮膚の表面積を増加させることが近年の研究により明らかとなった (Ichijo et al., Nat Commun 2017)。上皮組織幹細胞には多くの場合、間質層側に niche-providing cells を持つ。たとえば肺胞上皮の組織幹細胞である Ⅱ型肺胞上皮細胞には PDGFRA⁺線維芽細胞が niche を提供し、その機能を支えていると考えられている。皮膚の場合においては、毛包に対して Dermal papilla 細胞や Adipocyte progenitor などが niche として機能し、毛髪の成長などに寄与していると考えられている。しかしながら妊娠時の表皮細胞増殖クラスターにとっての直接の niche が何であるか、現在のところ明らかでない。直接/間接を問わなければ、血管新生が表皮細胞増殖クラスター誘導メカニズムの一翼を担うことが近年報告された (Ichijo et al., Sci Adv 2021)。しかしながら血管新生は妊娠期のうち比較的后期に誘導されることが知られており、これよりも前期の皮内リモデリングメカニズムについては一切わかっていない。

2. 研究の目的

本申請研究ではこの表皮細胞増殖クラスター誘導メカニズム解明を目的とし、その niche が真皮の fibroblasts であると仮定し研究を進めた。表皮細胞増殖クラスター誘導メカニズムの一翼を担うのが卵巣ステロイドホルモンであると考え、解析において着眼した。妊娠初期～妊娠中期において皮膚組織リモデリング自体やそのトリガーなどが検出されるか検討するべく、当該時期のサンプルについても解析対象とした。

3. 研究の方法

非妊娠、妊娠マウス真皮の細胞プロファイリングを single-cell RNA-seq 解析により実施した。これに際し、RNA quality に直結する細胞生存率を改善す

べく、新規真皮 dissociation 法を確立した。Single-cell RNA-seq 解析により明らかとなった重要なターゲットであると思われる因子についてコンディショナルノックアウトマウスモデルを作出し実験に供した。また、当該因子の作動機序等を詳細に解析するために新規マウス線維芽細胞培養モデルを作出した。新規に検出された細胞群の役割を同定する目的で、この細胞群を特異的に ablation することのできるマウス系統を作出した。

4．研究成果

従来法では酵素処理に 3 時間以上を要し細胞生存率が 70%以下となっていた真皮組織 dissociation 法を改良し、酵素処理時間を合計 50 分まで短縮しつつ組織 dissociation 効率や細胞収量を維持し、さらに細胞生存率を 90%以上に保つことを実現した。この真皮組織 dissociation 法を用いて回収した細胞を single-cell RNA-seq (10x Genomics Chromium 3' RNA v3.1 Chemistry) に供し、非妊娠ならびに妊娠各ステージの真皮細胞をシングルセルレベルで解析したところ、妊娠期において、これまでに定義されたことのない線維芽細胞群が腹部真皮組織に出現することを明らかにした。またこの細胞群の一部には卵巣ステロイドホルモン受容体が発現すること、ならびに卵巣ステロイドホルモン受容体下流のシグナルが活性化していることが明らかとなった。さらに当該細胞群において、ECM タンパク質をコードする遺伝子群の発現が妊娠期で顕著に変化していることを明らかにした。これらの変化については妊娠中期またはそれ以前より認められることが明らかとなった。また、当該細胞のマーカー遺伝子をドライバーとする CreERT2 マウス系統を使用したところ、当該細胞が妊娠時に ECM リモデリングに関与することならびにメカノトランスダクションを媒介し、表皮細胞増殖クラスターの出現に寄与できる細胞であることが示唆された。当該コンディショナルノックアウトマウスを single-cell RNA-seq に供し解析したところ、当該線維芽細胞から表皮増殖クラスターへの分泌因子を介したシグナルが複数見付き、表皮増殖クラスター形成に何らかの形で関与する可能性が考えられた。これらの因子群が妊娠期に認められる血管新生に影響を及ぼすのかは現時点で不明であり、検討を進めている。また、当該線維芽細胞群を特異的に ablation することのできるマウス系統の作出に成功し、これを用いて現在解析を進めている。

本研究において開発した真皮組織 dissociation 法で得られたマウス真皮線維芽細胞を、Fibroblast growth medium (FGM) 培地 (Fibroblast medium used in Konkimalla et al., Cell Stem Cell 2023 を改良) および低濃度マトリゲルを用いて培養する技術についても確立できた。この細胞培養技術を、硬さや構成要素が可変である市販ハイドロゲル (TrueGel3D, Sigma Aldrich) と組み合わせ、ECM 性状のみが変化したときの細胞のふるまいの変化についても免疫細胞化学的に検出することができた。ECM 性状に加えてホルモン動態が変化した時の変化についても調べるために現在検討を進めている。

本研究により皮膚は非生殖器官であるにもかかわらず、卵巣ステロイドホルモンの感作を受けてのドラスティックな組織リモデリングメカニズムを有する

可能性が示された。本研究成果については、更なる実験データを追加で集めたのち取りまとめ、国際科学誌へ投稿する準備を進めている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 Yoshihiko Kobayashi, Aleksandra Tata, Purushothama Rao Tata
2 . 発表標題 Reservoir of tissue-resident stem cells for regeneration of airway epithelium
3 . 学会等名 第19回幹細胞シンポジウム
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 小林芳彦
2 . 発表標題 組織修復時に一過性に認められる上皮細胞種と、慢性呼吸器疾患におけるその蓄積
3 . 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会，シンポジウム「肺の微小環境と疾患病態」（招待講演）
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 小林芳彦
2 . 発表標題 肺胞組織修復過程に出現する一過性の上皮細胞状態
3 . 学会等名 日本肺サーファクタント・界面医学会第58回学術研究会，シンポジウム「肺構成細胞からみた肺環境の恒常性と再生修復」（招待講演）
4 . 発表年 2022年

〔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			
米国	Duke University			