

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 3 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658246

研究課題名（和文）皮膚・胸腺上皮細胞間の分化転換を応用した人工胸腺構築法の開発

研究課題名（英文）Generation of artificial thymus using trans-differentiation potentials between skin and thymic epithelial cells

研究代表者

後飯塚 僚 (GOITSUKA RYO)

東京理科大学・生命医科学研究所・教授

研究者番号：50301552

研究成果の概要（和文）：

皮膚環境に胸腺上皮細胞を移植すると皮膚の幹細胞へと分化転換することから、免疫系の中心的器官である胸腺と皮膚の上皮細胞には共通した分化制御機構が存在する可能性が示唆されている。本研究では、皮膚上皮と胸腺上皮の前駆細胞・幹細胞に共通して発現する転写因子を見いだした。今後、本転写因子を起点として、皮膚上皮細胞を胸腺上皮細胞へ分化転換させ、人工的に機能的な胸腺を構築する技術が開発され、免疫病に対する再生医療法が確立されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

Given that it has been demonstrated that thymic epithelial cells have a potential to trans-differentiate into skin epithelial stem cells when exposed to inductive skin microenvironment, these two epithelial cells appears to share similar regulatory mechanisms for stem cell maintenance and differentiation. We sought that there is a possibility to trans-differentiate skin epithelial cells into thymic epithelial cells, eventually to generate the artificial thymus from the skin for regenerative medical application. In the present study, we demonstrated that Meis1, a homeodomain family transcription factor expressed in postnatal thymic epithelial stem cells, is also expressed in skin epithelial stem cells. By applying Meis1 as a marker shared by skin and thymic epithelial stem cells, we may challenge to establish the above-mentioned method to generate the artificial thymus in near future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：移植・再生医療、再生医学、細胞・組織、発生・分化、免疫学

1. 研究開始当初の背景

胸腺は、第三鰓囊の内胚葉由来の特殊な上皮細胞から構成される免疫系の中枢器官である。

外胚葉由来の皮膚などの上皮細胞は単層或いは重層の細胞シートを形成し、体内外の液性成分を区画するために、タイトジャンクションなどの細胞間接着構造を発達させているが、一方、胸腺上皮細胞はシートを形成

せずに突起により連結し、リンパ球の接触到に適した3次元の網目構造を構築している。

このような発生由来や構造的な差異があるにも関わらず、転写因子である FoxN1 の変異によるヌードマウスでは胸腺上皮および毛胞上皮の分化異常が認められ、また、ごく最近、胸腺上皮細胞を皮膚環境に移植すると、皮膚の幹細胞へと分化転換することが報告され、胸腺と皮膚の上皮細胞には共通した分

化制御機構が存在する可能性が示唆されている。

しかしながら、現在までのところ、皮膚上皮細胞から胸腺上皮細胞への分化転換や皮膚上皮細胞を用いた胸腺再構築に成功した報告は存在しない。

2. 研究の目的

本研究は、皮膚上皮と胸腺上皮の前駆細胞・幹細胞に共通して発現する転写因子を指標として、皮膚上皮細胞の胸腺上皮細胞への分化転換の可能性について、転写因子による分化転換の面から検討を行い、人工的に機能的な胸腺を構築する技術開発の基盤形成を目指すものである。

3. 研究の方法

転写因子としては、胸腺上皮前駆細胞に高発現するホメオドメイン転写因子である Meis1 ならびにそれと協調して機能する転写活性化因子 Yap1 に焦点を絞って研究を行った。

4. 研究成果

まず、皮膚における各毛包時期での Meis1 の発現を詳細に解析した結果、形態形成期において Meis1 の発現は毛包上皮細胞及び真皮細胞に認められ、特に真皮集塊や毛包上部に隣接する真皮細胞で高発現していた。また、Meis1 遺伝子ローカスに EGFP 遺伝子をノックインした BAC トランスジェニックマウスを用いた成体での各毛周期における発現解析でも Meis1 は毛包上皮細胞及び真皮細胞に発現しており、特に毛包幹細胞が存在するバルジ領域や毛乳頭で高発現していた (図 1)。

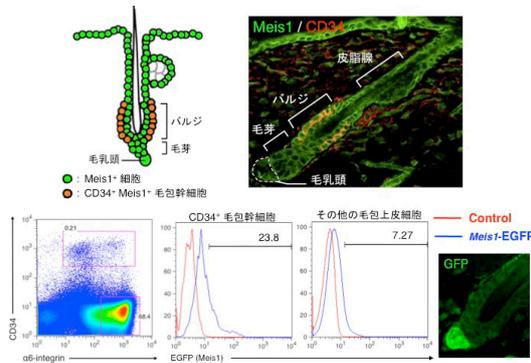


図 1 毛胞における Meis1 の発現

また、ケラチン 14(K14)遺伝子プロモーター制御下でタモキシフェン誘導性に Meis1 を欠損可能な K14-CreER-Meis1^{fl/fl} コンディショナル欠損マウスを用いて、Meis1 を皮膚組織で欠損させ、毛の再生における Meis1 の機能について解析した結果、Meis1 を欠損すると毛の成長に数日の遅れが認められ、Meis1 は胸腺上皮細胞の場合と同様、毛包幹細胞の維持



図 2 Meis1 欠損による毛胞再生の遅延

に関与していることが示唆された (図 2)。

次に、皮膚上皮細胞への転写因子発現による分化転換誘導系の確立のために、薬剤により遺伝子発現が制御できる胸腺上皮細胞株の樹立を試みた (図 3)。

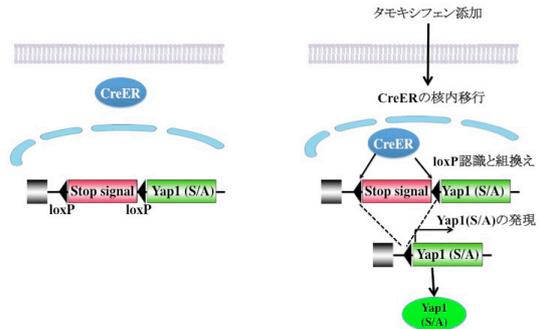


図 3 Cre-loxP システムを用いた薬剤誘導的な遺伝子発現遅延

胎仔皮膚ならびに胸腺から単離した上皮細胞を、 γ 線照射 Swiss 3T3 フィーダー細胞上で、ハイドロコーチゾンを添加した Ca^{2+} 不含 MEM 培地を用いて、 35°C で培養した結果、約 3 週間には上皮細胞コロニーが形成され、一部の細胞は二次継代後、フィーダー細胞非依存的に増殖することが明らかになった (図 4)。

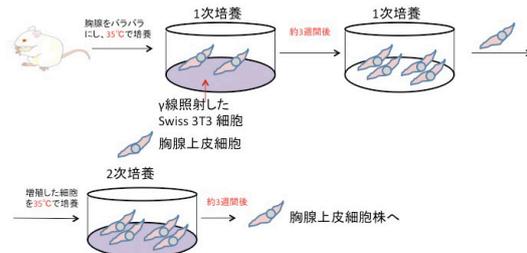


図 4 胸腺上皮細胞株の樹立法

これらの細胞株におけるケラチンの発現を解析した結果、ケラチン5 (K5)ならびにケラチン8 (K8)陽性の上皮細胞であることが明らかになった (図5)。

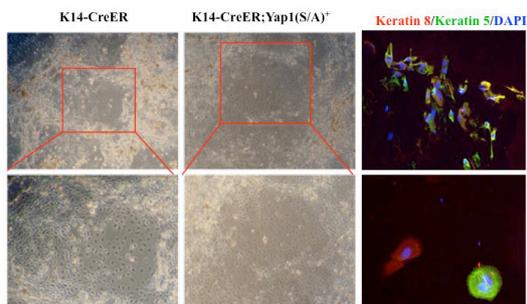


図5 樹立した胸腺上皮細胞株とそれら細胞における K5/K8 の発現

しかしながら、タモキシフェン添加により、転写因子の欠失ならびに過剰発現を誘導したが、血清中のエストロジェンの影響か、目的遺伝子の発現制御が不完全であり、今後、検討すべき課題と考えられた。

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 7件)

- ① Hidano S., Kitamura, D., Kumar, L., Geha, R. S., and Goitsuka, R.: SLP-76 is required for high affinity IgE receptor- and IL-3 receptor-mediated activation of basophils. *Int. Immunol.* 2012 (in press) (査読有)
- ② Fujii, Y., Hirayama, T., Ohtake, T., Ono, N., Inoue, T., Sakurai, T., Takayama, T., Matsumoto, K., Tsukahara, N., Hidano, S., Harima, N., Nakazawa, K., Igarashi, Y., and Goitsuka, R.: Amelioration of collagen-induced arthritis by a novel S1P₁ antagonist with immunomodulatory activities. *J. Immunol.* 2012, 188(1):206-215. (査読有)
- ③ Iida, H., Suzuki, M., Goitsuka, R., and Ueno, H.: Hypoxia induces CD133 expression in human small cell lung cancer cells by up-regulation of OCT3/4 and SOX2. *Int. J. Oncol.*, 2012, 40(1):71-79. (査読有)
- ④ Fujii, Y., Ohtake, H., Ono, N., Hara, T., Sakurai, T., Takahashi, S., Takayama, T., Fukasawa, Y., Shiozawa, F., Tsukahara, N., Hirayama, T., Igarashi, Y., and Goitsuka, R.: Lymphopenia induced by a novel selective S1P₁ antagonist structurally unrelated to S1P.

Biochim. Biophys. Acta. 2012, 1821(4):600-606. (査読有)

- ⑤ Fujii, Y., Ueda, Y., Ohtake, H., Ono, N., Takayama, T., Nakazawa, K., Igarashi, Y. and Goitsuka, R.: Blocking S1P interaction with S1P₁ receptor by a novel competitive S1P₁-selective antagonist inhibits angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012, 419 (4):754-760. (査読有)
- ⑥ 平山雄啓、後飯塚僚: 胸腺上皮細胞の分化と転写因子 「臨床免疫・アレルギー科」第56巻第3号 262-268頁 2011 科学評論社 (査読無)
- ⑦ 後飯塚僚: 消滅する免疫系器官としての胸腺: その維持と再生の制御機構 「日生研たより」第57巻第6号 78-85頁 2011 (査読無)

[学会発表] (計 8件)

- ① Yasuhiro Kawai, and Ryo Goitsuka: Homeodomain transcription factor pKnox1 positively regulates proliferation and survival of c-Kit-positive spermatogonial cells. 第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月11-14日
- ② Takehiro Hirayama and Ryo Goitsuka: T cell egress from the thymus is regulated by the transcriptional coactivator Yap1 expressed in thymic epithelial cells. 第41回日本免疫学会学術集会、神戸、2012年12月5-7日.
- ③ 平山雄啓、後飯塚僚: 胸腺上皮細胞における転写活性化因子 Yap1 の機能 第22回 Kyoto T Cell Conference (KTCC)、京都、2012年、7月6-7日.
- ④ 奥村 和弘, 佐藤 美穂, 廣瀬 哲史, 後飯塚僚, 中村 卓郎, 若林 雄一: マウス皮膚正常幹細胞における Meis1 の機能解析、第34回日本分子生物学会、横浜、2011年12月13-16日
- ⑤ Yasuhiro Kawai, Yoshimi Aiyama, Yoshiakira Kanai, Ryo Goitsuka: Homeodomain transcription factor pKnox1 is required for the differentiation of spermatogonial stem cells. 第34回日本分子生物学会、横浜、2011年12月13-16日
- ⑥ Takehiro Hirayama, Narutochi Tsukahara, and Ryo Goitsuka: Subcellular localization of transcriptional coactivator Yap1, a target of the Hippo pathway, in thymic epithelial cells is regulated by interaction with thymocytes. 第40回日本免疫学会学術集会、千葉、2011年11月27-29日.
- ⑦ 河合 康洋, 小池 紘子, 青木 悠亮, 後飯塚僚: 卵子形成過程におけるホメオドメイン転写因子 pKnox1 の発現と機能 第104回日本繁殖学会、盛岡、2011年9月15-17日

- ⑧ 平山雄啓、後飯塚僚: 未知のリガンド・レセプターシステムを介した胸腺細胞・胸腺上皮細胞間のクロストーク機構 第 21 回 Kyoto T Cell Conference (KTCC)、京都、2011 年、6 月 10-11 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後飯塚 僚 (GOITSUKA RYO)
東京理科大学・生命医科学研究所・教授
研究者番号 : 50301552