

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 10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790326

 研究課題名（和文）幹細胞性の維持におけるインターフェロンシグナル制御システムの意義
 研究課題名（英文）Significance of the interferon signal regulation in the maintenance of tissue stem cells

研究代表者

佐藤 卓 (SATO TAKU)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任助教

研究者番号：40375259

研究成果の概要（和文）：本申請研究では、表皮幹細胞を題材とし、幹細胞性の維持におけるインターフェロンシグナル制御の重要性について検討した。その結果、I型IFNシグナルの調節因子であるIRF2を欠損するマウス（Irf2^{-/-}マウス）では、コントロールマウスに比べ表皮幹細胞数が、加齢に伴い著しく減少することが判明した。また、細胞系譜追跡実験を行うことで、このような生体内環境では、表皮幹細胞サブセットの早期分化が起こっている可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, I examined the significance of the interferon signal regulation in the maintenance of epidermal stem cells (EpSCs). As a result, we found that the mice deficient for IRF2, which is a physiological attenuator of type-I IFN signaling, the number of EpSCs decreased with aging in comparison with a control mouse. Combined with the results from lineage tracing studies, it was expected that the premature differentiation of EpSCs was promoted in the environments of excessive IFN signaling.

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 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：幹細胞性、インターフェロン、造血幹細胞、表皮幹細胞

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞(HSC)は、主に骨髄中に存在し、すべての種類の成熟造血細胞を生み出す源となる細胞である。造血が起こる過程では、HSCが活発に細胞分裂することで分化の進んだ造血前駆細胞が生み出されるが、実際に生理的な条件では活発に増殖しているHSCはごく一部あり、ほとんどのHSCは細胞分裂を行っていない、いわば「休眠状態」の細胞として存在している。一方で、放射線照射や抗がん剤の投与など何らかの骨髄損傷が起こる場合には、これらの「休眠状態」のHSCが一過性に活性化し、たくさんの造血前駆細胞

を生み出すことで、成熟造血細胞を補充する。これまでに、このようなHSCの「増殖」と「休眠」の選択を調節する分子の解明が精力的に行われており、様々な内的、あるいは外的な要因が明らかにされている(*Curr Opin Genet Dev.* 19:461 (2009))。

申請者は、これまでの研究において、この「増殖」と「休眠」の選択を調節する新たなメカニズムを明らかにした(*Nature Medicine* 15:696-700 (2009))。具体的には、「抗ウイルス作用」や「細胞増殖抑制作用」をもつサイトカインとして既に広く知られているI型IFNが*in vivo*において骨髄HSCに直接的

作用し、休眠状態にある HSC を活性化し細胞周期へと動員することである。Interferon Regulatory Factor-2 (IRF2) は、IFN シグナルによる遺伝子発現を負に制御する転写因子であり、実際に *Irf2* 欠損 (*Irf2*^{-/-}) マウスでは生理的な条件下において、あらゆる臓器で IFN 誘導性遺伝子の発現亢進が認められる。興味深いことに、骨髄移植実験を行うと、野生型マウスの骨髄細胞に比べ *Irf2*^{-/-} マウス由来の骨髄細胞は成熟した造血細胞を生み出す能力が著しく低下していることが判明した。一方、このような *Irf2*^{-/-} マウス骨髄細胞における造血系再構築不全は、*Irf2* と同時に I 型 IFN 受容体遺伝子を欠損する (*Irf2*^{-/-} *Ifnar1*^{-/-}) ことで有意に回復した。以上の事実は、生理的に分泌される I 型 IFN シグナルの制御不全が HSC の機能異常をもたらすことを示すと同時に、*Irf2* が、この I 型 IFN ストレスから HSC の機能的な疲弊や枯渇を防ぎ、また休眠状態を維持するという重要な役割を担っていることを意味する。

2. 研究の目的

本申請研究の最大の目標は、これまでに申請者が見いだしてきた、IFN シグナル制御不全による組織幹細胞減少のメカニズムを解明することである。この点を明らかにする上では、申請者がこれまでに解析を進めてきた、*Irf2*^{-/-} マウスが極めて有用である。また、I 型 IFN の遺伝子発現は、造血組織のみならず、皮膚、脳、肝臓、腎臓、心臓などでも恒常的に検出され (*Immunity* 13:643 (2000))、これは生体が感染に対する備えとして、I 型 IFN システムを常に“アイドリング状態”に保つ必要があるためと考えられている (*Nat Rev Mol Cell Biol* 2:378 (2001)) が、この事実は、あらゆる臓器の幹細胞が HSC と同様に慢性的な I 型 IFN ストレス受け、またこれを適切にコントロールする術を備えている可能性を示唆するものである。実際に、*Irf2*^{-/-} マウスは、HSC の機能不全に伴う造血異常のみならず、脱毛や表皮過形成など皮膚組織にも極めて特徴的な表現形を呈することから、皮膚組織に分布する幹細胞についても HSC 同様の機能破綻を認める可能性が考えられた。また、毛包及び表皮幹細胞は、HSC の場合とは違い、幹細胞に由来する細胞系譜を *in vivo* で追跡可能であり、これをリードアウトとすることで幹細胞機能を容易に解析できることから、本研究期間においては、特に毛包及び表皮幹細胞を題材とし検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 抜毛実験

麻酔下において、8 週齢 (毛周期は、休止期) の *Irf2*^{-/-}、*Irf2*^{-/-}、*Irf2*^{-/-} *Ifnar1*^{-/-} 及び *Irf2*^{-/-} *Ifnb1*^{-/-} マウスの背部の毛を抜毛し、10 日後の毛の再生を観察するとともに、皮膚組織を採取し組織学的な解析から、毛包の成長について検討する。

(2) コロニー形成試験

マウス皮膚より採取した表皮細胞を、皮膚ケラチノサイト培養用培地を含むコラーゲンコートディッシュにまき、37°C、5%CO₂条件下で2週間培養し、コロニー形成を誘導した。培地を除去後、コロニーを4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、1%Rhodamine Bにより染色後、コロニー数を計数した。

(3) 組織染色

採取した組織を10%中性緩衝ホルマリン溶液にて固定後、パラフィンに包埋する。これを5µmの厚さに薄切し組織切片とした。常法に従い脱パラ後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。また、同組織を熱処理による抗原賦活化を行った後、抗Ki67抗体を用いた免疫染色を行った。検出は、Biotin標識抗rat-IgG抗体と2次反応後、HRP標識一streptアビジンとインキュベーションし、さらに発色基質であるヒストファイン (ニチレイ) を用いて行った。X-Gal染色は、採取した皮膚組織を2%パラホルムアルデヒド-0.2%グルタルアルデヒド溶液で固定後、X-Gal溶液と一晚インキュベーションし行った。発色後の組織を、同様にパラフィン包埋後、切片を作製した。

(4) フローサイトメーター解析

マウス皮膚より表皮細胞を調製し、これらを、幹細胞の同定を目的とし、抗Sca1抗体、抗α6integrin抗体、抗CD34抗体、抗CD45.2抗体で染色した。解析には、FACS CantoII (BD) 及び、Moflo Legacy (Beckman Coulter) を用いた。

(5) 細胞系譜追跡実験

交配により作製した、*Irf2*^{-/-} : *Lgr5-EGFP-Ires-CreERT2* : *Rosa26-LacZ* マウス、*Irf2*^{-/-} : *Lgr5-EGFP-Ires-CreERT2* : *Rosa26-LacZ* マウス及び *Irf2*^{-/-} : *Lgr6-EGFP-Ires-CreERT2* : *Rosa26-LacZ* マウス、*Irf2*^{-/-} : *Lgr6-EGFP-Ires-CreERT2* : *Rosa26-LacZ* マウスに2mg/日のタモキシフェンを5日

間投与し、2か月後に皮膚組織を採取し上記の方法でX-Gal染色を行った。

4. 研究成果

(1) *Irf2*^{-/-}マウスにおける生理的毛周期の観察と抜毛実験

通常、マウスの場合、背部の体毛の生え変わりには決まった周期性があり「毛周期」と呼ばれている。毛周期は、特に生後から13週齢ごろまでの間は、背部皮膚全体において一様に起こることが知られており、休止期→活動期→退行期→休止期というように、毛包組織が成長と退縮を繰り返す。この一連の現象は、毛包幹細胞の活性化を起点として起こっていることから、毛周期の異常は幹細胞機能異常を反映する可能性がある。そこで、まず最初のステップとして、この生理的な毛周期を *Irf2*^{-/-}マウスにおいて組織学的に観察した。しかしながら、少なくとも13週齢ごろまでの背部体毛の生理的毛周期は、コントロール (*Irf2*^{+/+}) マウスとほとんど違いはなかった。

そこで、「研究の方法」の項に示す方法で、抜毛実験を行うことで、その際におこる急激な体毛や毛包組織の再生が *Irf2*^{-/-}マウスでどのように影響されるかを検討した。抜毛によって刺激される体毛再生も、生理的毛周期と同様、毛包幹細胞の活性化によって誘導される現象である。毛周期上、休止期にある8週齢の *Irf2*^{-/-}マウス及び *Irf2*^{+/+}マウスの背部の体毛を抜毛し、その後の体毛の再生を観察したところ、*Irf2*^{-/-}マウスでは、抜毛10日後には、皮膚が黒ずみ、新たな体毛が再生していることを確認した(図1)。

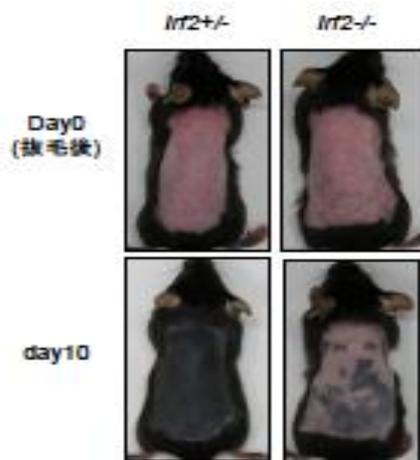


図1. 抜毛実験
8週齢の *Irf2*^{+/+}マウス及び *Irf2*^{-/-}マウスの背部の体毛を抜毛し、その10日後の体毛の再生を観察した。

皮膚組織組織を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行うと、確かに毛包が拡張するとともに、毛根部には新たな体毛の生成を認め、毛周期が活動期にあることが確認された。実際に、増殖細胞マーカーである Ki67 抗原を染色すると、毛根部の細胞は、そのほとんどが Ki67 陽性の増殖細胞であった。一方、*Irf2*^{-/-}マウスでは、このような体毛の再生を認めず、毛包組織の成長も極めて貧弱であった。これに相関し、毛根部における Ki67 陽性細胞もコントロールマウスに比べ明らかに少ないことが分かった。他方、*Irf2* 遺伝子と同時に I 型 IFN 受容体遺伝子 (*Ifnar1*)、または IFN-β 遺伝子 (*Ifnb1*) を欠損するマウスでは、体毛の再生は誘導された。この結果から、*Irf2*^{-/-}マウスでは、潜在的に毛包幹細胞の数や機能に欠陥があることが示唆され、しかもこれは、type-I IFN シグナルの制御不全に起因することが明らかになった。

(2) コロニー形成試験

表皮細胞中の幹細胞性について検討するために、コロニー形成試験を行った。本申請研究では、脱毛の進んだ加齢 *Irf2*^{-/-}マウス及び同腹仔コントロールマウスより表皮細胞を調製し、コロニーアッセイに用いた。その結果、加齢 *Irf2*^{-/-}マウスの表皮細胞では、コロニー形成能が著しく低下しており、脱毛が機能的な毛包幹細胞の減少によるものであることが明らかになった。

(3) フローサイトメーター解析

表皮組織には、複数の種類の幹細胞プールが存在することが明らかにされている。毛包バルジ領域には、生理的には、毛包や体毛のオリジンとなる CD34 陽性幹細胞、Lgr5 陽性幹細胞が分布する。また、バルジ領域直上の毛包狭部には、生理的には皮脂腺や毛包間表皮のオリジンとなる Lgr6 陽性幹細胞が分布する。そこで、表皮細胞中の、これらの細胞分画の頻度について、フローサイトメーターにより解析した。その結果、特に脱毛や表皮の過形成が亢進した加齢 *Irf2*^{-/-}マウスでは、同月齢のコントロールマウスに比べ、これらの幹細胞の頻度が著しく低下しており、コロニーアッセイの結果を反映するものであった(図2)。

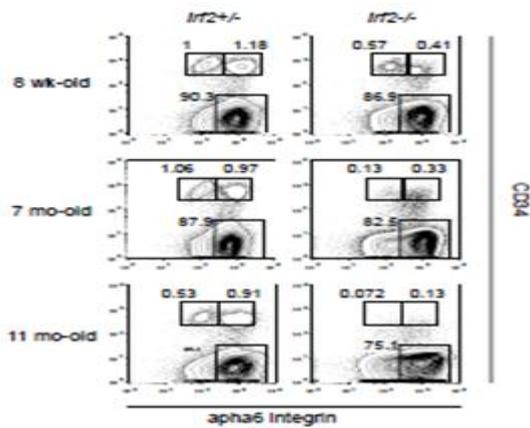


図2. 加齢に伴う表皮幹細胞減少
Irf2^{-/-}マウスでは、表皮細胞中のCD34+alpha6 integrin(hi)及びCD34+alpha6 integrin(lo)分画が減少している。

(4) 細胞系譜追跡実験

表皮幹細胞機能を *in vivo* で評価するために、Irf2^{-/-}マウスと表皮幹細胞からの細胞系譜を追跡可能なレポーターマウスを交配し、Irf2^{-/-}:Lgr5-EGFP-Ires-CreERT2:Rosa26-LacZマウス及びIrf2^{-/-}:Lgr6-EGFP-Ires-CreERT2:Rosa26-LacZマウスを作製した。これらに、タモキシフェンを投与し、その2ヶ月後に、各々の幹細胞から生じた表皮細胞の分布を組織学的に検討した。その結果、Irf2^{-/-}マウスの場合にも、コントロールマウス同様、Lgr6 幹細胞由来表皮細胞は、毛包あるいはバルジ領域に局限して分布し、他方Lgr6 幹細胞由来表皮細胞は、バルジ直上の毛包狭部（本来のLgr6 幹細胞の分布箇所）、皮脂腺および（過形成した）表皮に分布しており、その分化の方向性そのものに何ら違いはないと考えられた。但し、コントロールマウスとは異なり、Irf2^{-/-}マウスでは、毛包狭部においてLgr6 幹細胞の progeny が増加している部位が認められた。

加齢とともに幹細胞が減少する一方で、その子孫細胞が積極的に表皮の過形成に関わっている事実から、これらの幹細胞レベルにおいて早期分化 (premature differentiation) が起こっている可能性が考えられた (図3)。

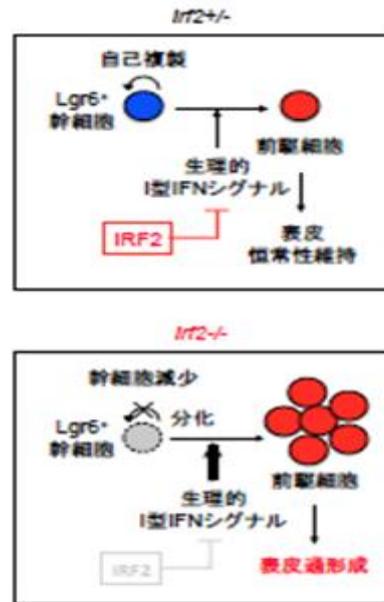


図3. Irf2^{-/-}マウスにおける表皮幹細胞減少メカニズム(仮説)

(5) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト。

組織幹細胞は、感染、炎症、老化など、絶えず様々な環境ストレスにさらされながらも、自身が枯渇しないように、これらを回避する戦略を備えていると考えられ、このシステムを明らかにすることは、自己複製や多分化能の維持メカニズムを明らかにすることと同様に、幹細胞の性質を深く理解する上で重要なテーマである。しかしながら、これまでにそのようなストレス環境におかれた幹細胞がどのように振る舞い、いかなる運命をたどるのか？ほとんど明らかにされていない。

本申請研究では、HSCの場合同様、生理レベルのIFNシグナルが、環境ストレスとして少なからず表皮幹細胞の性状に影響を与える可能性があることを明らかにし、同幹細胞の維持においては、IRF2を介したIFNシグナルの制御が必要であると考えられた。また、IRF2は、乾癬やアトピー性皮膚炎といった皮膚疾患の疾患関連遺伝子であることから (*J Invest Dermatol.* 122:61 (2004), *J Hum Genet.* 46:664 (2001))、本研究は、これらの疾患の発症メカニズム解明の一助となる可能性がある。

(6) 今後の展望

本申請研究期間内においては、Irf2^{-/-}マウスに生じる幹細胞減少が、表皮幹細胞への直接的なIFNの作用により生じた結

果なのか、あるいは間接的な作用によるものなのかが明らかにできなかった。*Irf2*^{-/-}マウスの皮膚病変は、骨髄移植により改善し、また CD8 T 細胞の非存在下では生じないことから、同細胞に依存した自己免疫現象であることが判明している (*Immunity* 13:643 (2000))。また、これまでの報告において、type-I IFN が CD8T 細胞を活性化し、これが分泌する type-II IFN (IFN-g) が一連の表皮の異常に関与することが明らかにされている (*J Immunol.* 179:3249. (2007))。また、HSC の場合には、I 型 IFN 同様、II 型 IFN (IFN-g) が、その増殖を引き起こすことが示されており、同サイトカインは幹細胞に直接作用しその数や機能を修飾するポテンシャルを持つと考えられる。これらの知見を踏まえ、現在、IFN-g の表皮幹細胞サブセットへの直接的な作用があるのか？そうであれば、IFN-g が表皮幹細胞の性質にどのような影響を及ぼすのか？に注目し、鋭意検討を行っている。

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)

Sato T, Ikeda M, Yotsumoto S, Shimada Y, Higuchi T, Kobayashi H, Fukuda T, Ohashi T, Suda T, Ohteki T. Novel interferon-based pre-transplantation conditioning in the treatment of a congenital metabolic disorder. *Blood.* 121:3267-73 (2013)

[学会発表] (計 1 件)

Taku Sato, Satoshi Yotsumoto, Toshiaki Ohteki Novel interferon (IFN)-based pre-transplantation conditioning in the treatment of congenital metabolic disorder. 第40回日本免疫学会総会・学術集会, 2011年11月27-29日, 千葉

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 卓 (SATO TAKU)