

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791159

研究課題名(和文)細胞内張力によるヒト表皮角化細胞の増殖制御

研究課題名(英文) Intracellular tension-dependent regulation of regulation in human 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト表皮角化細胞の性質を理解することは、表皮の恒常性維持や創傷治癒に対する新たな治療法の開発、さらに表皮角化幹細胞を用いた再生医療にも直結している。本研究では、ヒト表皮角化幹/前駆細胞と一過的にのみ増殖するTA細胞では、細胞内アクチン繊維の配向性が異なること、また、このアクチン繊維配向性の違いが Rac1タンパク質の活性の違いによるものであることを明らかにした。さらに、Rac1はヒト表皮幹細胞の維持に必須であり、細胞運動性と増殖性に相関関係が見られた。以上の結果から、細胞内張力やそれに関与する細胞内骨格の制御がヒト表皮角化細胞の増殖に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Understanding of the nature of human epidermal keratinocytes is significant for advances in therapies for dysregulation of epidermal homeostasis and wound healing, and also in keratinocyte stem cell biology and regenerative medicine for burns. In this study, we revealed that the actin filament organization was differently organized in keratinocyte stem/progenitor cells and transient amplifying (TA) cells, which was due to differential activity of Rac1 proteins in each type of keratinocytes. Furthermore, Rac1 was essential for maintenance of human epidermal keratinocyte stem cells. We also found that cell motility which is associated with intracellular tension was correlated with proliferation of human epidermal keratinocytes. These results indicate that cytoskeletal organization and intracellular tension are involved in proliferation of human epidermal keratinocytes.

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：表皮角化幹細胞

1. 研究開始当初の背景

表皮角化細胞の性質を理解し、その増殖・分化および遊走を制御することは、表皮の恒常性維持や創傷治癒に対する新たな治療法の開発、さらに培養表皮シートを用いた再生医療など、皮膚科学領域のみならず幹細胞生物学・再生医療研究にも直結している。

最近、我々は培養ヒト表皮角化細胞において、アクチン・ミオシン収縮系が強く働いている細胞集団と、収縮系の働きが弱い細胞集団の2種類が存在することを明らかにした。アクチン細胞骨格系が角化細胞の増殖・分化に関与することを示した研究はあるものの(Connelly et al., Nat. Cell Biol., 2010)、通常培養条件下で上記のような2種類の細胞集団の存在は、これまで全く知られていない。さらに、アクチン・ミオシン収縮系の角化細胞における役割を解析するため、アクチン・ミオシン収縮系を阻害する低分子化合物をヒト表皮角化細胞培養系に添加する実験を行った。その結果、収縮力を低下させると、角化細胞の増殖能力が大きく亢進することを見出した。また、我々はヒト表皮角化細胞の増殖能力の異なるクローンを単離して解析を行った結果、増殖能力の低下したクローンにおいてもアクチン・ミオシン収縮活性を阻害することで、増殖能力の回復を確認した。これらの実験結果は、アクチン・ミオシン骨格系による収縮力が低い(=細胞内張力が低い)細胞集団こそが、角化幹/前駆細胞であり、人為的に細胞内張力を低下させることで、分化角化細胞を角化幹/前駆細胞へリプログラミングできることを示唆している。

2. 研究の目的

これまでの我々の研究から、アクチン・ミオシン骨格系による細胞内張力と角化細胞の増殖能力に相関性があることが示唆される。本研究では、上記のことを証明することを目的とし、以下の4つの実験を行った。(1)アクチン・ミオシン収縮系にとって重要な要因であるアクチン繊維の配向性と角化細胞の増殖能の関連を証明する。また、(2)アクチン繊維の配向性を規定する分子を同定する。さらに(3)アクチン・ミオシン収縮系が規定する細胞の運動性と幹細胞性の相関性を証明する。最終的に、(4)低分子化合物による細胞内張力制御によって、角化細胞の増殖を促進し、創傷治癒の促進や培養表皮シート作製の迅速化を実現する。

3. 研究の方法

(1) 培養ヒト表皮角化幹細胞におけるアク

チン繊維配向性と幹細胞性の関係

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。コロニー形態より、そのコロニーが幹細胞/前駆細胞由来、または一過的のみ増殖するTransient amplifying cells (TA細胞)由来かを判別することができる。そこで、アクチン繊維を特異的に可視化する分子プローブ、ローダミン・ファロイジンをを用いて実験を行った。

(2) 培養ヒト表皮角化幹細胞におけるアクチン繊維配向性を規定する因子の同定

低分子化合物による活性阻害、及びレンチウイルスを用いた誘導型 shRNA 発現系を利用したアクチン繊維制御に関わる因子のノックダウンを行い、角化細胞におけるアクチン繊維制御因子の同定を行った。またこの因子が幹細胞性に影響を与えるかもコロニー形成実験によって解析した。

(3) 角化細胞の運動性と幹細胞性の相関性

培養ヒト表皮角化細胞をフィーダー細胞上に播種し、角化細胞の運動性の指標と、その後の増殖能に関して相関解析を行った。

(4) 若年及び中年患者由来の表皮角化細胞に対するアクチン・ミオシン収縮系阻害の効果

我々はアクチン・ミオシン収縮系を阻害する低分子化合物がヒト表皮角化細胞の増殖性を亢進することを見出した。この結果が、新生児由来の角化細胞だけでなく、加齢した角化細胞でも再現できるかを、若年及び中年患者由来の表皮角化細胞を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) 培養ヒト表皮角化幹細胞におけるアクチン繊維配向性と幹細胞性の関係

幹細胞/前駆細胞由来コロニーとTA細胞由来コロニーでアクチン繊維の配向性が明確に異なることを見出した。特に、幹細胞/前駆細胞由来コロニーでは、アクチン繊維は細胞核に対して放射状に配向しているのに対し、TA細胞由来コロニーでは、アクチン繊維は、細胞の形質膜に平行に配向していた。以上の結果は、幹細胞とTA細胞でアクチン繊維の配向性が大きく異なることを示している。

(2) 培養ヒト表皮角化幹細胞におけるアクチン繊維配向性を規定する因子の同定

低分子化合物及びshRNAによるノックダウン実験から、低分子Rhoファミリーの一員であるRac1が幹細胞のアクチン繊維配向に必須であることが分かった。さらにRac1は幹細胞の自己複製能の維持に必須であることも明らかとなった。以上の結果は、Rac1によって規定されるアクチン繊維の配向性が、幹細胞維持に関与していることを示している。

(3) 角化細胞の運動性と幹細胞性の相関性

ヒト角化細胞を4分の1量のフィーダー細胞上に播種することで、個々の角化細胞が1回分裂してできる2細胞コロニーを観察することが出来た。さらに、このコロニーの細胞回転速度が増殖能力と相関していることを見出した。コンピューターを用いたシミュレーション実験から、角化幹細胞由来のコロニーは、個々の細胞の移動速度が最大となることが予測されたので、通常培養条件下で、約数百個の細胞からなるコロニー内の細胞移動速度の平均値と、幹細胞性を比較したところ、予測どおり、角化細胞の移動速度の最大のものが幹細胞由来コロニーであった。以上の結果は、細胞の運動性というアクチン・ミオシン収縮系によって制御される要因と、幹細胞性に密接な関係があることを示している。

(4) 若年及び中年患者由来の表皮角化細胞に対するアクチン・ミオシン収縮系阻害の効果

5ヶ月齢及び55歳の患者由来の表皮角化細胞培養系に、アクチン・ミオシン収縮系阻害活性のある低分子化合物を添加したところ、どちらの角化細胞においてもその増殖性の亢進が確認できた。以上の結果は、アクチン・ミオシン収縮系を阻害することで、加齢した患者由来の角化細胞の増殖性も亢進可能であり、本方法が再生医療に応用できることを示している。

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4件)

すべて査読あり

1. Nanba D, Toki F, Matsushita N, Matsushita S, Higashiyama S, Barrandon Y. Actin filament dynamics impacts keratinocyte stem cell maintenance. *EMBO Mol Med* 5, 640-653, 2013.

2. Nanba D, Toki F, Barrandon Y, Higashiyama S. Recent advances in the epidermal growth factor receptor/ligand biology on skin homeostasis and keratinocyte stem cell regulation. *J Dermatol Sci* 72, 81-86, 2013.

3. Toki F, Honkura N, Shirakata Y, Imamura T, Higashiyama S, Nanba D. Second harmonic generation reveals collagen fibril remodeling in fibroblast-populated collagen gels. *Cell Struct Funct* 38, 227-236, 2013.

4. Nanba D, Matsushita N, Toki F, Higashiyama S. Efficient expansion of human keratinocyte stem / progenitor cells carrying a transgene with lentiviral vector. *Stem Cell Res Ther* 4, 127, 2013.

[学会発表](計7件)

1. 難波大輔. ヒト表皮角化幹細胞のダイナミクス. 第3回細胞再生医療研究会, 2013.07.27, 神戸.

2. Nanba D, Toki F, Tate S, Imai M, Matsushita N, Toki H, Higashiyama S, Barrandon Y. Collective motion dynamics of human epidermal keratinocyte stem cells. *Stem Cells in Translation*, 2013.09.15-18, Florence, Italy.

3. Nanba D, Toki F, Tate S, Imai M, Matsushita N, Toki H, Higashiyama S, Barrandon Y. A cell motion predicts keratinocyte stemness. *The Physical Biology of Stem Cells*, 2013.07.08-09, Cambridge, UK.

4. 難波大輔, 土岐富士緒, 松下夏樹, 田手壮太, 今井統, 土岐博, 東山繁樹, Yann Barrandon. ヒト表皮角化幹細胞コロニー動態を集団動力学で読み解く. 日本再生医療学会第12回大会, 2013.03.21-23, 横浜.

5. Nanba D, Toki F, Matsushita N, Toki H, Higashiyama S, Barrandon Y. Collective motion dynamics of human epidermal keratinocyte stem cells. 日本研究皮膚科学会第37回大会, 2012.12.07-09, 那覇.

6. Nanba D, Toki F, Higashiyama S, Barrandon Y. Dynamics of cultured human epidermal keratinocyte stem cells. *International Society of Stem Cell Research, 10th Annual Meeting*, 2012.6.13-16, Yokohama.

7. Nanba D, Toki F, Matsushita N, Toki H, Higashiyama S, Barrandon Y. Dynamics of cultured human epidermal keratinocyte stem cells. 日本発生物学会第45回大会, 2012.05.28-31, 神戸.

[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.m.ehime-u.ac.jp/school/biochem2/>

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし