

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月11日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16317

研究課題名（和文）創傷治癒における上皮系幹細胞のダイナミクス

研究課題名（英文）Dynamics of epithelial stem cells upon wounding

研究代表者

夏賀 健（Natsuga, Ken）

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：70645457

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：表皮を選択的に除去した創傷においては、HE染色において創傷作成24時間後には1-3層の上皮化が見られた。6インテグリンを発現する表皮基底層はこの時点で認められており、再上皮化した層の細胞は汎ケラチンで染色された。表皮顆粒層への分化を示すロリクリンの染色は創傷作成48時間後で見られないうが、72時間後には確認された。HE染色でも創傷作成48時間後で顆粒層がみられないものの、72時間後には認められるため、この時点で最終的な上皮化が完了する。また、lineage tracingで毛包上部幹細胞の娘細胞が創傷の上皮化に関与することが解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

創傷は、病原体の繁殖に伴い感染母地となるとともに、皮膚癌の発生基点ともなりうることから、人類の健康維持において制御すべき非常に重要な疾患である。本研究で確立した実験系は、実験動物を使いつつ、再現性のある表皮選択的除去が可能であり、新しい創傷実験である。この方法をlineage tracingや薬物投与実験と組み合わせることで、上皮創傷の治癒促進因子を探索することが可能となる。特に、転倒の頻度が高い高齢者の皮膚創傷や、自己免疫性・遺伝性水疱性疾患などの患者に対する治療法開発へとつなげることができる。

研究成果の概要（英文）：In wounds in which the epidermis was selectively removed, there was 1-3 reepithelialization at 24 hours after wounding as visible through HE staining. The basal layer of the epidermis expressing 6 integrin was present at this point, and cells in the re-epithelialized layer were stained with pan-cytokeratin. Loricrin staining, showing differentiation into epidermal granular layer, was not seen 48 hours after wound creation but was confirmed 72 hours later. HE staining also shows no granular layer at 48 hours after wounding, but at 72 hours after wounding, the final reepithelialization is complete. Lineage tracing also revealed that daughter cells of hair follicle upper stem cells are involved in wound reepithelialization.

研究分野：皮膚科学分野

キーワード：創傷治癒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚は、全身を覆う人体最大の臓器であり、外界に対するバリアを担うとともに、体内からの水分の喪失を抑制している。皮膚が外力によって損傷し、そのバリア機能を喪失することを「創傷」と呼称している。創傷は、病原体の繁殖に伴い感染母地となるとともに、皮膚癌の発生源ともなりうることから、人類の健康維持において制御すべき非常に重要な疾患である。創傷は全ての年齢において罹患しうるが、下記の場合で特に大きな問題となる。1) 高齢者は、加齢に伴う皮膚の脆弱化によって、転倒など軽微な外力が皮膚に加わる程度で、容易に皮膚のびらん・潰瘍を呈する。2) 先天的に皮膚が脆弱となる疾患として、表皮水疱症が知られている。表皮水疱症は、表皮基底膜分子の遺伝的異常によって、出生後すぐから全身の皮膚にびらん・潰瘍形成を繰り返す。

皮膚のうち上皮成分は、表皮と毛包等の表皮付属器によって構成され、それぞれの小組織は対応する幹細胞によって維持されている。創傷の治癒過程においても、表皮や毛包幹細胞の寄与が報告されているが、その詳細は明らかとなっていない。創傷の治癒機構を解明する研究は、培養細胞や実験動物を用いて多様な実験系が組み立てられている。このうち最も多く用いられているものは、マウスやラットなどの実験動物の皮膚に小さい潰瘍を人為的に作成し、その治癒過程を観察するものである。しかしながら、この潰瘍作成実験における創傷治癒観察実験において、表皮や毛包・付属器の幹細胞の寄与を解明するのは困難であった。

最も大きな技術的問題点は、潰瘍を作成する過程の手技によって表皮のみならず毛包その他の付属器も同時に喪失してしまい、創傷治癒つまり上皮化が、表皮幹細胞によって起こされるのか、毛包その他の付属器の幹細胞が必要か判別できないことである。どの組織幹細胞が創傷治癒に必要なか、またそれぞれの組織幹細胞の寄与の度合が不明であるため、創傷治癒を促進する治療法の開発において注目すべき組織幹細胞を絞り込むことができないのが現在の課題であった。

2. 研究の目的

申請者は、毛包などの皮膚付属器由来の幹細胞あるいは毛包以外の表皮幹細胞のいずれかが創傷治癒に寄与するか峻別するために、新しい創傷モデルを確立した。このモデルでは、野生型マウス皮膚の表皮を選択的に除去し、その後の創傷治癒を観察する。本研究では、申請者のこれまでの経験を活かして、人類の健康維持に大きな負担をもたらしている創傷に早期治癒をもたらすための基盤的知識を獲得することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 選択的表皮除去モデルの形態学的・組織学的観察

野生型マウス背部皮膚の表皮を選択的に除去する。その後、1日ずつ治癒過程を組織学的に観察する。最終的に完全な上皮化するまでの日数を決定するとともに下記の項目について評価する。

HE染色(創傷治癒過程の形態観察)

汎ケラチンの染色(再上皮化する全ての表皮を可視化)

ロリクリンの染色(顆粒層の可視化)

6インテグリンの染色(表皮除去部位の決定と再上皮化した表皮基底膜の可視化)

Alkaline phosphataseの染色(毛乳頭の可視化)

(2) 創傷部における Lineage tracing による組織幹細胞の動的追跡

選択的表皮除去創傷を、組織幹細胞特異的プロモーター下で蛍光色素を発現させるマウスに応用し、どの組織幹細胞が上皮化するかわち創傷治癒に寄与するかを明らかにする。

組織幹細胞特異的プロモーター下で Cre リコンビナーゼを薬剤で誘導させるマウスとして下記を用いる。

KRT14-Cre/ERT マウス(タモキシフェン投与 表皮幹細胞で Cre リコンビナーゼが発現)

Lrig1-Cre/ERT マウス(タモキシフェン投与 毛包峽部幹細胞で Cre リコンビナーゼが発現)

KRT15-Cre/PGR マウス(RU486投与 毛包隆起部幹細胞で Cre リコンビナーゼが発現)

これとともに、Cre リコンビナーゼによってレポーターを発現するマウスとして下記を用いる。

R26R-H2B-mCherry マウス(Cre リコンビナーゼによって細胞核に mCherry が発現)

Brainbow マウス 2.1(Cre リコンビナーゼによって CFP/GFP/YFP/RFP がランダムに発現)

～ とあるいは の交配によって得られるマウスの表皮を選択除去することで、組織幹細胞の動的追跡を行う。 の Brainbow マウスは、4色の蛍光色素が Cre リコンビナーゼ発現下にランダムに発現することで、いくつのクローンが創傷治癒に貢献するかを明らかにすることができる。しかしながら、複数の蛍光色素を同時に検出することで全てのクローンが技術的に描出されない可能性も考慮し、Cre リコンビナーゼ存在下に mCherry が単色で発現する の R26R-H2B-mCherry マウスも同時に用いる。

4. 研究成果

(1) 選択的表皮除去モデルの形態学的・組織学的観察

表皮を選択的に除去した創傷においては、HE染色において創傷作成24時間後には1-3層の上皮化が見られた。6インテグリンを発現する表皮基底層はこの時点で認められており、再上皮化した層の細胞は汎ケラチンで染色された。表皮顆粒層への分化を示すロリクリンの染色は創傷作成48時間後で見られないが、72時間後には確認された。HE染色でも創傷作成48時間後で顆粒層が見られないものの、72時間後には認められるため、この時点で最終的な上皮化が完了している。創傷底面には毛包が残存しており、alkaline phosphataseで染色される毛乳頭は真皮に認められた。

(2) 創傷部におけるLineage tracingによる組織幹細胞の動的追跡

表皮幹細胞のlineage tracingでは、上皮化の完了する創傷作成72時間後の時点で、表皮創傷の病変部と非病変部の境界部分に表皮幹細胞の娘細胞が蓄積していたが、病変部ではほとんどこれらの細胞を認めなかった。

毛包上部幹細胞のlineage tracingでは、創傷が上皮化した部位でこれらの娘細胞が多数認められた。

毛包バルジ幹細胞のlineage tracingでは、創傷上皮化部位にバルジ幹細胞の娘細胞は認められなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 17 件)

Takashima S, Shinkuma S, Fujita Y, Nomura T, Ujiie H, Natsuga K, Iwata H, Nakamura H, Vorobyev A, Abe R, Shimizu H:
Efficient reframed gene therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa using CRISPR/Cas9.
J Invest Dermatol, in press 査読あり

Oulès B, Rognoni E, Hoste E, Goss G, Fiehler R, Natsuga K, Quist S, Mentink R, Donati G, Watt FM:
Mutant Lef1 controls Gata6 in sebaceous gland development and cancer.
EMBO J 38:e100526, 2019 査読あり

Tie D, Da X, Natsuga K, Yamada N, Yamamoto O, Morita E:
Bullous pemphigoid IgG induces cell dysfunction and enhances the motility of epidermal keratinocytes via Rac1/proteasome activation.
Front Immunol 10: 200, 2019 査読あり

Iwata H, Kamaguchi M, Ujiie H, Ujiie I, Natsuga K, Nishie W, Shimizu H:
Fc-binding proteins enhance autoantibody-induced BP180 depletion in pemphigoid.
J Pathol 247:371-80, 2019 査読あり

Kosumi H, Natsuga K, Watanabe M, Okada K, Shimizu H:
Multiple cutaneous reticulohistiocytomas after hematopoietic cell transplantation: contribution of donor and host-derived cells.
Br J Dermatol 180:680-81, 2019 査読あり

Natsuga K, Oiso N, Kurokawa I, Tsubura A, Nakamura H, Maya Y, Nishie W, Kawada A, Shimizu H:
Congenital nevi with hypomelanosis and fine scales.
Eur J Dermatol 29:45-48, 2019 査読あり

Kamaguchi M, Iwata H, Nishie W, Toyonaga E, Ujiie H, Natsuga K, Kitagawa Y, Shimizu H:
The direct binding of collagen XVII and collagen IV is disrupted by pemphigoid autoantibodies.
Lab Invest 99:48-57, 2019 査読あり

Kobayashi Y, Yasugahira Y, Kitahata H, Watanabe M, Natsuga K, Nagayama M:
Interplay between epidermal stem cell dynamics and dermal deformations.
NPJ computational materials 4:1-9, 2018 査読あり

Muramatsu K, Ujiie H, Kobayashi I, Nishie W, Izumi K, Ito T, Yoshimoto N, Natsuga K,

Iwata H, Shimizu H:
Treg dysfunction induces autoantibodies to bullous pemphigoid antigens in mice and humans.

J Allergy Clin Immunol 142:1818-1830, 2018 査読あり

Kamaguchi M, Iwata H, Ujiie H, Natsuga K, Nishie W, Kitagawa Y, Shimizu H:
High expression of collagen XVII compensates for its depletion induced by pemphigoid IgG in the oral mucosa.

J Invest Dermatol 138:1707-1715, 2018 査読あり

Takashima S, Shinkuma S, Fujita Y, Natsuga K, Nomura T, Hida T, Ishikawa S, Nakamura H, Nishie W, Abe R, Shimizu H:

A novel COL7A1 mutation in a family with bullous dermolysis of the newborn: Phenotypic variability associated with a COL7A1 mutation within the same family.

J Dermatol 45:e260-e261, 2018 査読あり

Sasaoka T, Ujiie H, Nishie W, Iwata H, Ishikawa M, Higashino H, Natsuga K, Shinkuma S, Shimizu H:

Intravenous immunoglobulin reduces pathogenic autoantibodies, serum IL-6 levels and disease severity in experimental bullous pemphigoid models.

J Invest Dermatol 138:1260-1267, 2018 査読あり

Kamaguchi M, Iwata H, Ujiie H, Izumi K, Natsuga K, Nishie W, Asaka T, Kitagawa Y, Shimizu H:

Oral mucosa is a useful substrate for detecting autoantibodies of mucous membrane pemphigoid.

Br J Dermatol 178:e119-121, 2018 査読あり

Natsuga K, Nishie W, Nishimura M, Shinkuma S, Watanabe M, Izumi K, Nakamura H, Hirako Y, Shimizu H:

Loss of interaction between plectin and type XVII collagen results in epidermolysis bullosa simplex.

Hum Mutat 38:1666-70, 2017 査読あり

Toyonaga E, Nishie W, Izumi K, Natsuga K, Ujiie H, Iwata H, Yamagami J, Hirako Y, Sawamura D, Fujimoto W, Shimizu H:

C-terminal processing of collagen XVII induces neoepitopes for linear IgA dermatosis autoantibodies.

J Invest Dermatol 137:2552-2559, 2017 査読あり

Izumi K, Nishie W, Mai Y, Ujiie H, Iwata H, Natsuga K, Shimizu H:

Detection of mucous membrane pemphigoid autoantibodies by full-length BP180 enzyme-linked immunosorbent assay.

J Dermatol Sci 88:247-248, 2017 査読あり

Watanabe M, Natsuga K, Nishie W, Kobayashi Y, Donati G, Suzuki S, Fujimura Y, Ujiie H, Shinkuma S, Nakamura H, Murakami M, Ozaki M, Nagayama M, Watt FM, Shimizu H:

Type XVII collagen coordinates proliferation in the interfollicular epidermis.

Elife 6:e26635, 2017 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

夏賀 健:

表皮の恒常性維持と外的刺激に対する応答

第1回炎症性皮膚疾患集中セミナー 東京、2019.3

Natsuga K, Watanabe M, Shimizu H:

Organization of the epidermal basement membrane zone determined through super-resolution microscopy.

7th SSSR and SCUR meeting, Asahikawa, Japan, 2018.10

夏賀 健:

表皮化水疱症 発症機序/新規治療法の最新の進歩

第 117 回日本皮膚科学会総会 広島、2018.05

Natsuga K, Watanabe M, Hata H, Kobayashi Y, Nagayama M, Shimizu H:
Clavus serves as a model of epidermal stem cell responses to mechanical forces.
International Investigative Dermatology 2018, Orlando, US, 2018.5.

Natsuga K, Nishie W, Watanabe M, Nakamura H, Shinkuma S, Shimizu H:
Abnormalities in laminin-332 have post-translational effects on laminin 2.
EB2017 - 5th World Conference of EB Research & 4th Conference of EB-CLINET. Salzburg,
Austria, 2017.9

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：渡邊 美佳、藤村 悠

ローマ字氏名：Mika Watanabe, Yu Fujimura

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。