

平成30年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09758

研究課題名(和文) 表皮初期発生制御におけるADAMTS-2の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of ADAMTS-2 in epidermal development

研究代表者

高崎 真美 (TAKASAKI, Mami)

筑波大学・医学医療系・特任助教

研究者番号：80392009

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)：マウスES細胞をBMP4存在下で浮遊培養すると、神経細胞への分化は抑制されるが表皮への分化誘導は見られない。しかし、ES細胞塊をファイブロネクチン上で接着培養すると、高い効率で表皮幹細胞へ分化した。BMP4存在下で接着培養したES細胞の遺伝子発現を網羅的手法で解析すると、メタロプロテアーゼADAMTS-2が同定された。ADAMTS-2の発現開始時期は表皮幹細胞マーカーよりも先行しており、表皮への運命決定における新規機能が示唆される。ヒト表皮発生の分子機序を明らかにするためマウスES細胞で確立した分化法のヒトES細胞への応用を試みたが表皮への分化はみられず、異なるメカニズムの可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In floating culture of mouse ES cells, addition of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) strongly suppress neural differentiation, while epidermal differentiation is not induced. In this study, we found that adherent culture of mouse ES cell aggregates on fibronectin led to epidermal differentiation. Comprehensive analysis by a DNA micro array revealed that the expression of ADAMTS-2 (Procollagen I N-protease) is significantly upregulated in the cells cultured on fibronectin with BMP4. The onset of ADAMTS-2 expression preceded that of epidermal stem cell genes such as CK14 and CK15, suggesting ADAMTS-2 plays a novel role in the determination of epidermal cell fate. We further performed epidermal differentiation of human ES cells, however, the methods developed in mouse ES cells was inapplicable to the human case. Thus, there may be different molecular mechanisms between mouse and human epidermal differentiation.

研究分野：再生医学・幹細胞生物学

キーワード：胚性幹細胞 表皮 ファイブロネクチン メタロプロテアーゼ 分化

## 1. 研究開始当初の背景

外界からの有害物質の侵入を防止し、体内の水分蒸発を防ぐバリアとして働くのが「表皮」である。初期発生における表皮形成は、まず未分化外胚葉から一層の非神経外胚葉への運命付けが起こり、続いて極性を持った角化細胞の重層化プログラムが開始することで進行する。初期発生は、近接した細胞同士が相互作用しつつ連続的に進行する過程であるが、表皮分化においては、直下に位置する真皮前駆細胞と相互作用を起していると考えられる。しかし、胎生であり胚が小さい哺乳類では細胞間のコミュニケーションを *in vivo* レベルで解析する事は困難であるため、表皮発生の分子機構の詳細については未だ不明の点が多い。

そこで研究代表者は、試験管内で哺乳類の初期発生を再現する手段としてマウス胚性幹(ES)細胞を用い、表皮発生の分子メカニズム解明に取り組んできた。SFEBq 法と名付けられた培養法は (Eiraku, Matsuo-Takasaki (研究代表者) *et al.*, 2008)、増殖因子や血清を用いずに ES 細胞を浮遊培養し、細胞塊を形成させる方法である。この培養法において ES 細胞は、まず未分化外胚葉へと運命付けられ、続いて神経外胚葉へと分化する。研究代表者は、この分化法を独自に改変し、両生類胚において神経分化の阻害活性を持つ事が証明されている BMP4 を培養液に添加する事で、ES 細胞の神経分化が抑制されることを示した (Zhao, Matsuo-Takasaki (研究代表者) *et al.*, 2014)。しかし、BMP4 存在下で浮遊培養を続けても表皮への分化は認められず、未分化外胚葉のまま細胞死に至ることが明らかとなった (未発表)。

分化途中の ES 細胞塊を、表皮基底膜下に存在する細胞外マトリックス成分の一つである、ファイブロネクチンをコーティングした培養皿に移して接着培養を試みたところ、

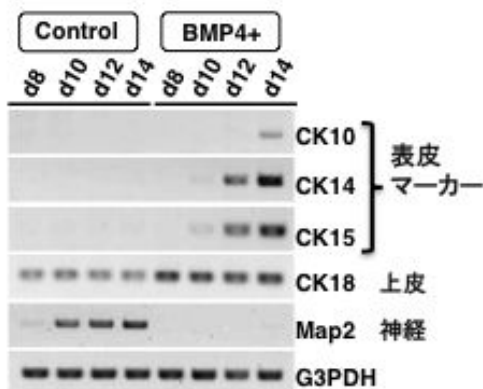


図1. BMP4とファイブロネクチン存在下で培養したES細胞の遺伝子発現(RT-PCR)

高い効率で表皮幹細胞への分化が確認され (CK15、CK14、Np63 陽性) その発現のタイミングも胚発生の時間軸と一致していた (図1、2参照)

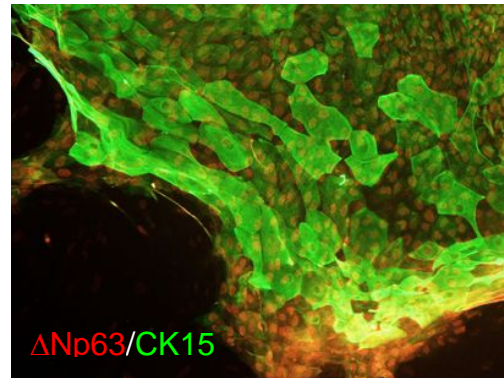


図2. BMP4とファイブロネクチン存在下で培養したES細胞の表皮細胞への分化 (赤: Np63、緑: CK15)

これらの事実は、未分化外胚葉から表皮への運命決定には BMP シグナルだけでは不十分であり、細胞の足場となり増殖や分化に影響を及ぼす細胞外マトリックスとの相互作用が必須であることを示唆する。

さらに研究代表者は、BMP4 存在下にてファイブロネクチン上で培養した ES 細胞塊の遺伝子発現を、マイクロアレイ法により網羅的に解析した。その結果、興味深いことに、細胞外マトリックスの再構成に関与するメタロプロテアーゼ *MMP9* や、同じくメタロプロテアーゼでヒト皮膚の脆弱性を示すエーラスダンロス症候群の原因遺伝子の一つ *ADAMTS-2* (Procollagen I N-protease) の有意な発現上昇が確認された。

以上の背景より、表皮分化において、メタロプロテアーゼが新規の役割を果たす可能性が示唆されたことから、その機能解析を試みることにした。

## 2. 研究の目的

上述の背景に基づき本研究計画では、以下の点を明らかにすることを目的に研究を進めることとした。

(1) マウスES細胞を実験材料に、表皮発生機序におけるメタロプロテアーゼ (ADAMTS-2またはMMP9) の機能を、主に遺伝子機能阻害実験の手法を用いて明らかにする。

(2) マウスES細胞で開発した表皮幹細胞への分化誘導法をヒトES/iPS細胞で最適化した後、ヒト表皮発生におけるメタロプロテアーゼ (ADAMTS-2やMMP9) の挙動と、その機能を分子レベルで明らかにする。

(3) 正常ヒトiPS細胞よりADAMTS-2変異型iPS

細胞を作製し、3次元培養による角化細胞の重層化実験を試み、エーラスダロス症候群の病態解析に寄与するモデル系を確立する。

### 3. 研究の方法

(1)分散浮遊培養法(Eiraku *et al.*, 2008)を用い、マウス ES 細胞 (EB5 株) を未分化外胚葉に分化させた後、BMP4 存在下でファイブロネクチンをコーティングした培養皿にて接着培養を行う。この時、表皮分化のタイムコースに沿ったメタロプロテアーゼの発現解析を、RT-PCR 等の手法で行う。

(2)表皮初期発生への関連が強く示唆されたメタロプロテアーゼの機能を調べるため、当該遺伝子をノックダウンした ES 細胞を作製し、(1)と同様の方法で表皮分化実験を行う。分化のタイムコースに沿って、表皮幹細胞 (CK14, CK15, p63) への分化効率を免疫染色・ウエスタンブロッティング・RT-PCR 等の法を用いて解析・比較する。また、表皮細胞の生存または増殖に関する可能性を検証するため、Tunnel 染色、BrdU 取り込み実験を行う。

(3) ヒト ES 細胞 (KhES-1 株、KhES-2 株) を用い、ヒト表皮分化法の最適化 (培養日数・BMP4 添加時期の検討) と、経時的な表皮関連遺伝子の発現解析を行う。同時に、マウス ES 細胞実験で明らかとなったメタロプロテアーゼの発現動向について、RT-PCR 等の法を用いて検証する。

(4) shRNA 導入法またはゲノム編集技術の手法を用い、ADAMTS-2 をノックダウンしたヒト iPS 細胞を作製する。(3)で検討した方法でヒト表皮幹細胞分化実験を行い、分化した表皮幹細胞を IV 型コラーゲンへの接着性により濃縮後、市販のケラチノサイト用培地にて増幅し、繊維芽細胞を含んだコラーゲングル上に播種し、表面を空気に触れさせることで重層化を誘導する3次元培養に用いる。構築された3次元組織の重層上皮組織構造の組織学的解析、免疫染色による表皮マーカーの発現解析を、コントロールとノックダウン iPS 細胞間で行い、エーラスダロス症候群の病態解析に寄与するモデル実験系を確立する。

### 4. 研究成果

(1) 初期表皮分化におけるメタロプロテアーゼの発現のタイミング

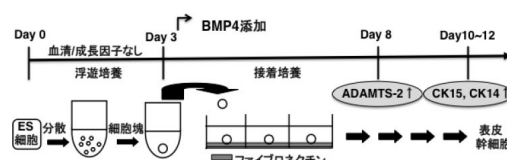


図 3. 表皮分化法と表皮関連遺伝子の発現解析スキーム

図 3 に示した方法で表皮分化実験を行い、メタロプロテアーゼの経時的な発現解析を RT-PCR にて行った。その結果、図 4 に示すように、分化 8~10 日目から、特に ADAMTS-2 の強い発現が検出された。興味深いことは、発現開始のタイミングが、表皮幹細胞マーカー (CK15, CK14) の発現に先行していることである。よって本研究では、主に ADAMTS-2 の機能に着目して実験を進めることとした。

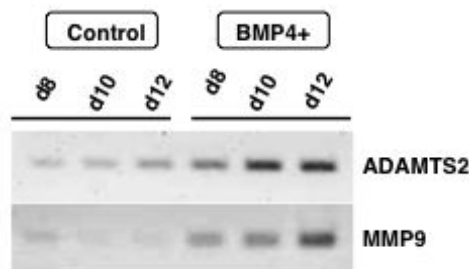


図 4. 表皮マーカーに先行したメタロプロテアーゼの発現 (RT-PCR)

#### (2) ADAMTS-2 の機能阻害実験

表皮分化における ADAMTS-2 の機能を検証するため、siRNA の導入を試みた。ES 細胞塊の状態では導入が困難であったため、分化 3 日目で細胞塊を酵素処理により分散した状態で siRNA の導入を行い、ファイブロネクチン上にて分化実験を行った。しかしながら、機能阻害できる期間が 1-2 日と短く、表皮分化における効果が検証できなかった。今後、shRNA 導入等による時期特異的なサイレンシング法の確立が必要である。また、本実験ではリコンビナント BMP4 の効果にロット差がある影響で、表皮分化の誘導効率が一定しないという問題が続き、困難を極めた。より安定した低分子化合物などの代替法の検討が必要であると考えられる。

#### (3) ヒト ES 細胞の表皮分化

ヒト ES 細胞は、コロニー分散時に細胞死を起こすことが知られており、これを防ぐために Y-27632 を添加して分散し、ES 細胞塊を形成させ (Watanabe *et al.*, 2007)、マウス ES 細胞と同様に実験を行った。しかしながら、分化 3 日目から BMP4 を添加してファイブロネクチン上で培養しても、表皮様細胞への分化は確認できなかった。マウスとヒト ES 細

胞は、それぞれナイーブとプライムという異なる発生状態にある可能性があり、BMP4 の添加時期を早めるなど、培養条件の変更が必要であると考えられる。

ヒト iPS 細胞を用いた実験 (Petrova *et al.*, 2016) で、iPS 細胞から角化細胞への誘導中に、細胞成分を除去したヒトの真皮様組織上で培養し、続いて IV 型コラーゲンのコート上で培養する方法が報告されている。このことは、活性型コラーゲン生成に必須の酵素である ADAMTS-2 が、初期発生における表皮幹細胞の分化と維持に、重要な役割を果たす可能性を強く示唆する。よって、今後さらに ADAMTS-2 の機能解析を進めていく必要があり、最終的には、エーラスダンロス症候群の病態解析に寄与するモデル系を確立したい。

#### < 引用文献 >

Eiraku *et al.*, Cell Stem Cell 3:519-532 (2008)

Zhao *et al.*, Stem Cells Dev 23:2143-2155 (2014)

Watanabe *et al.*, Nature Biotechnol 25:681-686 (2007)

Petrova *et al.*, Stem Cell Reports 2:675-689 (2016)

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Donny Lukmanto, Mami Matsuo-Takasaki, Toshiki Kato, Osamu Ohneda. Low oxygen tension accelerates neuronal differentiation of ES-NSC.  
第 40 回日本分子生物学会年会  
2017 年

高崎 真美  
Oxygen levels regulate cortical neuron development of Embryonic Stem Cell-derived Neural Stem Cells (ES-NSCs).  
第 39 回日本分子生物学会年会  
2016 年

〔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.md.tsukuba.ac.jp/stemcell/per.htm>

#### 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

高崎 真美 (TAKASAKI, Mami)

筑波大学・医学医療系・特任助教

研究者番号 : 80392009