

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10231

研究課題名(和文)細胞動態解析による表皮再生原理の解明

研究課題名(英文)Elucidating an epidermal regenerative principal by analyzing cell dynamics

研究代表者

難波 大輔(Nanba, Daisuke)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：10380255

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)：本研究では、実際に表皮再生医療で用いられているヒト表皮角化幹細胞培養系を用いて、表皮角化幹細胞が分裂を繰り返しながら、多層化した培養表皮シートを形成する過程を、タイムラプスイメージングの手法を用いて詳細に観察し、その細胞動態を抽出、数理モデル化とシミュレーションによって、どのような細胞動態が角化幹細胞コロニーの成長や培養表皮シートの形成に必須であるかを検証した。その結果、角化細胞の運動性が表皮再生原理をの主要な要因の一つであることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、表皮組織が再生される際の細胞動態の基本原則が明らかとなった。これは、培養表皮シートによる表皮再生医療の更なる技術開発や創傷治癒の促進による慢性皮膚潰瘍の治療につながる成果である。また、本研究成果は組織再生の細胞動態の基本原則として、他の上皮組織の再生や他の細胞シート形成にも適応可能である。したがって、本研究成果は、培養表皮シートによる再生医療や糖尿病患者での創傷治癒の促進だけでなく、iPS細胞から誘導される角膜などの各種の細胞シートの作製や、他の多くの臓器疾患治療に応用できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed time-lapse imaging of the growth of human keratinocyte colonies from its stem cells. This observation strongly suggested that symmetrical cell division and cell motility drive the keratinocyte colony growth. Therefore, we modeled the keratinocyte behavior and simulated the growth of keratinocyte colonies with a variety of kinetic parameters. The numerical calculations confirmed that cell motility is required for symmetrical cell division and the subsequent keratinocyte colony growth. This study revealed that cell motility is one of essential elements for keratinocyte colony growth and epidermal regeneration.

研究分野：幹細胞生物学

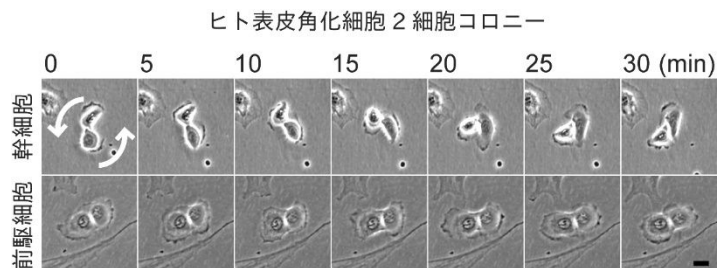
キーワード：表皮角化幹細胞

1. 研究開始当初の背景

患者自身の表皮角化幹細胞を用いた培養表皮シートの作製と移植は、30年以上の歴史を持ち、すでに多く患者の命を救ってきた再生医療の先駆けとして知られているが (Green, *Bioessays* 2008)、その陰で、培養表皮シート移植を必要とする患者の約半数がシートの完成を待たずに死亡し、さらに、移植後の成功率は5~6割という事実がある。また糖尿病に併発する難治性皮膚潰瘍や高齢者の褥瘡(床ずれ)は未だに解決していない。これは、表皮角化幹細胞や分化にコミットした前駆細胞、さらには分化細胞のどのような振る舞いが、組織損傷後の表皮再生や培養表皮シートの形成に必須であるかという角化細胞動態の基本的な理解が不十分であることが一因である。

これまで、マウスを用いた実験において、表皮角化細胞にEGFPなどの蛍光タンパク質を発現させ、それを長期間ライブイメージングすることで、表皮組織内での細胞集団の動態が明らかにされたが (Clayton et al., *Nature* 2007; Mascré et al., *Nature* 2012)、その際に角化幹細胞や角化前駆細胞が、どのように振る舞い、多層化や創傷治癒に関与するかは全く明らかにされていない。また、最近、二光子顕微鏡を用いて生体マウスにおける表皮細胞の恒常性を明らかにした研究が発表されたが (Rompolas et al., *Science* 2016)、この研究においても、時間分解能の低さから、上下の細胞移動と細胞分裂周期の測定が中心であり、恒常性維持や創傷治癒の際の詳細な角化細胞動態は未だに不明である。

最近、申請者らは、ヒト表皮角化幹細胞が2個の細胞から構成される2細胞コロニーを形成した際に、特徴的な回転運動を示すことを見出した (下図: Nanba et al., *J. Cell Biol.*, 2015)。この運動は前駆細胞や分化細胞では見られない。また、申請者らは、以前に幹細胞と前駆細胞において、角化細胞の増殖や運動に関与するEGFRシグナルの作用が異なることを見出している (Nanba et al., *EMBO Mol. Med.* 2013)。つまり、角化幹細胞や前駆細胞、分化細胞それぞれに特異的な細胞分裂様式や細胞運動様式などの細胞動態の形式が存在し、それらが協調的に作用することで、自発的な培養表皮シートの形成や創傷治癒での表皮再生が可能になると考えられる。したがって表皮の再生現象における角化細胞の細胞動態を定量的に解析することで、表皮再生における細胞動態の基本原則を明らかにすることが出来る。



2. 研究の目的

本研究では、培養表皮シートの形成過程や正常及び糖尿病罹患ヒト皮膚片からの角化細胞遊走において、細胞動態(分裂周期、分裂角度、分裂後細胞運命、移動速度)の定量解析を行う。

さらに、これらの過程を全て数理モデル化し、表皮再生現象の *in silico* 再構成を行う。最後に、角化細胞においてその増殖能や運動能に大きく関与するEGFRシグナル伝達経路を人為的に操作することで、表皮再生現象のメカニズムを、分子のレベルから細胞・組織レベルまで階層的に理解する。

3. 研究の方法

(1) 培養表皮シート形成におけるヒト表皮角化細胞のライブイメージング

フィーダー細胞を用いたヒト表皮角化幹細胞培養系では、角化幹細胞が自発的に多層化したコロニーを形成する。我々はすでに角化幹細胞コロニーの成長過程を5分間隔で60時間以上連

続観察を行い、個々の細胞を追跡することで、その細胞系譜を解析することに成功している（右図）。この方法を用いて、シート形成時における細胞分裂周期や細胞移動速度や方向などを解析する。

（２）正常および糖尿病罹患ヒト皮膚組織片からの角化細胞遊走のライブイメージング

皮膚片からの角化細胞の遊走現象は、創傷治癒における再上皮化のモデルとして研究されている（右図：Mazzalupo et al., *J. Invest. Dermatol.*, 2002 より転載）。我々も同様の手法を確立しており、正常および糖尿病ヒト皮膚組織片を用いて、この過程における細胞動態を位相差顕微鏡によるライブイメージングで明らかにする。

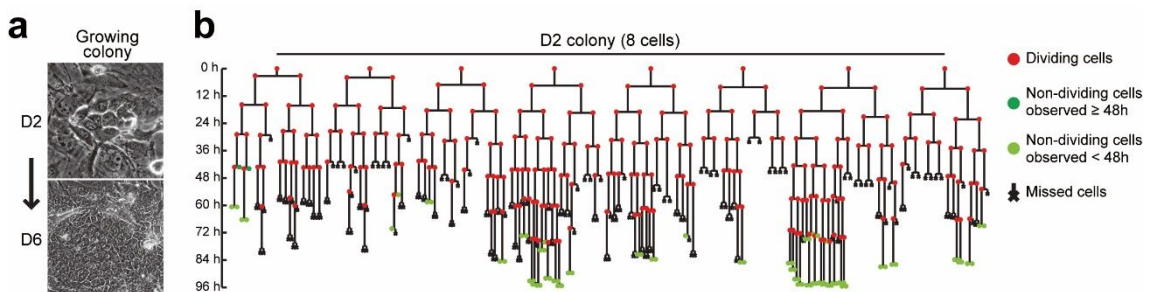
（３）細胞動態の数理モデル化と数値計算による表皮再生に必要な細胞動態の基本原則の抽出

平成 29 年度に得られた細胞分裂や細胞運動などの細胞動態パラメーターの数理モデル化を行う。具体的には細胞分裂周期や分裂方向、さらには移動速度から類推される回転運動の大きさと方向などである。これらを全て導入したプログラムを作製し、計算機内で表皮再生現象を再構成する。完成したプログラムを用い、様々な細胞動態パラメーターを変化させ、数値計算によって最も効率よく表皮再生（培養表皮シート形成や皮膚片からの角化細胞遊走）が起こるパラメーター条件を見出し、表皮再生に必要な細胞動態の基本原則を抽出する。

4. 研究成果

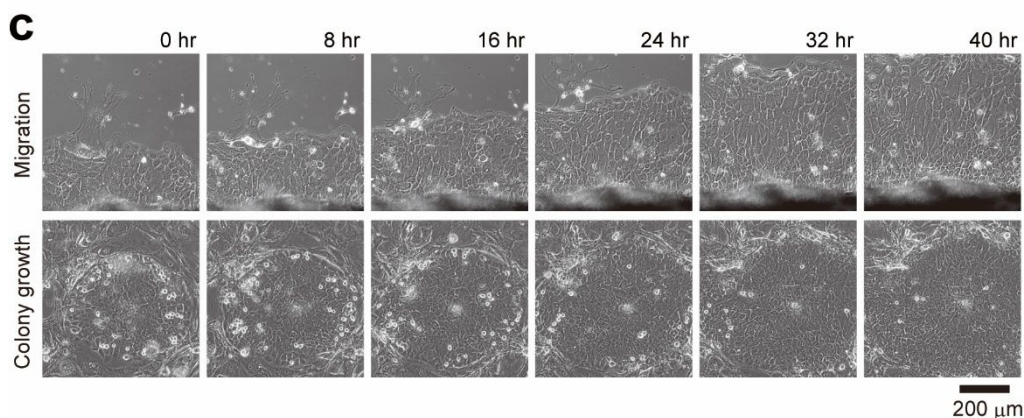
（１）培養表皮シート形成におけるヒト表皮角化細胞のライブイメージング

ヒト表皮角化幹細胞培養系をもちいて、角化細胞コロニーが成長していく過程をタイムラプスイメージングによって観察（下図 a）し、成長過程での細胞系譜解析を行い、幹細胞コロニーでは、以下のように角化細胞が対象分裂を繰り返すことを明らかにした（下図 b）。

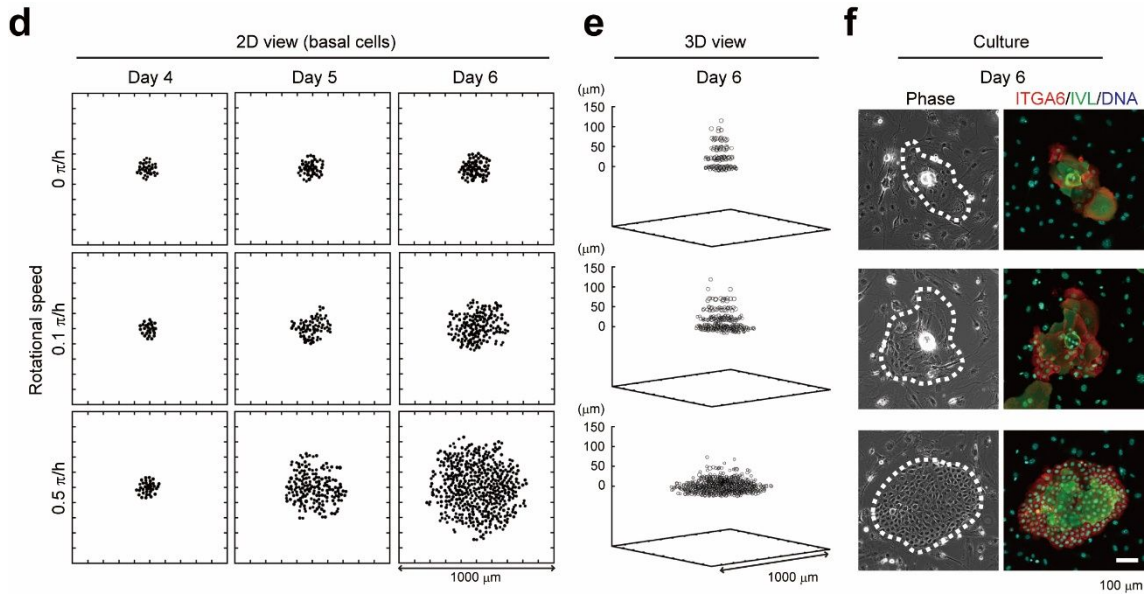


（２）正常および糖尿病罹患ヒト皮膚組織片からの角化細胞遊走のライブイメージング

糖尿病患者由来の皮膚片を explant 法で培養し、皮膚片から角化細胞が遊走してくる過程をタイムラプスイメージングによって観察した。健康者は入手することは出来なかったが、糖尿病患者でも、皮膚片からの角化細胞の遊走が観察され、またその遊走は、角化細胞コロニーの成長と非常に類似していた（下図 c）。以上のことから、角化細胞コロニーの成長を詳細に解析することで、表皮再生原理が解明できることが強く示唆された。



(3) 細胞動態の数理モデル化と数値計算による表皮再生に必要な細胞動態の基本原理の抽出
 表皮角化細胞コロニーの成長過程の詳細な観察から、我々は細胞動態を数理モデル化し、数値計算を行ったところ、表皮角化細胞の運動性が角化細胞コロニーの持続的な成長に必須であることが明らかとなった。角化細胞の運動性を3段階に分け、シミュレーションを行ったところ、まず二次元的なコロニーの成長には運動性が必須であることが明らかとなった(下図 d)。運動性が低い角化細胞からなるコロニーでは、コロニーが平面的でなく立体的に成長することも予測された(下図 e)。以上のシミュレーション結果と同様のコロニー形態が、培養系で観察されることから、本数値計算実験によって得られた結果は、実際のヒト表皮角化幹細胞培養系でも起こっていると考えられ、表皮組織の再生には角化細胞の運動性が重要なパラメーターとして機能していることが強く示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 難波大輔、松崎恭一	4. 巻 60
2. 論文標題 重症下肢虚血における表皮角化幹細胞のクローナル・コンバージョンに関する研究への取り組み	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 形成外科	6. 最初と最後の頁 1264-1274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Liu N, Matsumura H, Kato T, Ichinose S, Takada A, Namiki T, Asakawa K, Morinaga H, Mohri Y, De Arcangelis A, Geroges-Labouesse E, Nanba D, Nishimura EK.	4. 巻 568
2. 論文標題 Stem Cell Competition Orchestrates Skin Homeostasis and Ageing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 344-350
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-019-1085-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Muraguchi T, Nanba D, Nishimura EK, Tashiro T.	4. 巻 94
2. 論文標題 IGF-1R Deficiency in Human Keratinocytes Disrupts Epidermal Homeostasis and Stem Cell Maintenance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci	6. 最初と最後の頁 298-305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2019.05.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hoshikawa E, Sato T, Kimori Y, Suzuki A, Haga K, Kato H, Tabeta K, Nanba D, Izumi K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Noninvasive Measurement of Cell/Colony Motion Using Image Analysis Methods to Evaluate the Proliferative Capacity of Oral Keratinocytes as a Tool for Quality Control in Regenerative Medicine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Tissue Eng.	6. 最初と最後の頁 2.04173E+14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/2041731419881528.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nanba D.	4. 巻 96
2. 論文標題 Human keratinocyte stem cells: From cell biology to cell therapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci.	6. 最初と最後の頁 66-72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2019.10.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakaue T, Hamaguchi M, Aono J, Nakashiro KI, Shikata F, Kawakami N, Oshima Y, Kurata M, Nanba D, Masumoto J, Yamaguchi O, Higashiyama S, Izutani H.	4. 巻 S0003-4975
2. 論文標題 Valve Interstitial Cell-Specific Cyclooxygenase-1 Associated With Calcification of Aortic Valves.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Thorac Surg	6. 最初と最後の頁 31717-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.athoracsur.2019.09.085.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kinoshita K, Munesue T, Toki F, Isshiki M, Higashiyama S, Barrandon Y, Nishimura EK, Yanagihara Y, Nanba D.	4. 巻 9
2. 論文標題 Automated collective motion analysis validates human keratinocyte stem cell cultures.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 18725
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-55279-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Toki F, Nanba D, Nishimura EK, Matsuzaki K.	4. 巻 14
2. 論文標題 Evaluation of the proliferative potential of skin keratinocytes and fibroblasts isolated from critical limb ischemia patients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regen Ther	6. 最初と最後の頁 222-226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2020.03.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Daisuke Nanba
2. 発表標題 Kinetic analysis and modeling of human epidermal stem cell behavior in multilayered sheet formation
3. 学会等名 1st International symposium on Interdisciplinary Approaches to Integrative Understanding of Biological Signaling Networks (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nanba, D., Toki, F., Matsumura, H., Toki, F., and Nishimura E.K.
2. 発表標題 Locomotive ability of human keratinocyte stem cells is an intrinsic property for stem cell expansion and epidermal reconstruction.
3. 学会等名 47th Annual European Society for Dermatological Research (ESDR) Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Daisuke Nanba, Yasuaki Morhi, Sakura Okamoto, Hiroyuki Matsumura, Takako Usami, Tomomi Aida, Koichi Tanaka, Emi K. Nishimura
2. 発表標題 Targeting melanocyte stem cells with Dct locus by cloning-free CRISPR/Cas9 technology
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会 第42回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 難波大輔
2. 発表標題 ヒト表皮角化幹細胞の動態解析と再生医療応用
3. 学会等名 第39回日本光医学・光生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 難波大輔
2. 発表標題 ヒト表皮角化幹細胞の動態解析
3. 学会等名 第26回日本形成外科学会基礎学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nanba D
2. 発表標題 Tracing stem cell motion in human keratinocyte colonies using deep learning-based object tracking
3. 学会等名 1st Japan-Singapore International Skin Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nanba D, Hirose T, Toki F, Nishimura EK, Kotoku J.
2. 発表標題 Label-free identification of human keratinocyte stem cells by deep learning-based quantitative cell motion analysis.
3. 学会等名 49th Annual European Society for Dermatological Research (ESDR) Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞の挙動の解析方法、およびその利用	発明者 古徳純一、弘瀬拓 矢、難波大輔、西村 栄美	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-116303	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	西村 栄美 (Nishimura Emi)		
研究協力者	土岐 博 (Toki Hiroshi)		
研究協力者	松崎 恭一 (Matsuzaki Kyouichi)		