

令和元年5月27日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19514

研究課題名(和文)皮膚発癌におけるヘミデスモソーム構成因子の役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of roles of hemidesmosomal components in skin tumor initiation.

研究代表者

松村 寛行(Matsumura, Hiroyuki)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：70581700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞競合は、適応度の高い細胞と低い細胞が共存した際に、適応度の高い細胞が勝者として生き残り、適応度の低い細胞が敗者として組織から排除されるという機構のことである。しかしながら、表皮基底細胞のRAS変異細胞やヘミデスモソーム構成因子が、細胞競合を通して、組織恒常性維持と関わるのか、全く分かっていない。本研究では、遺伝子改変マウスを駆使して、表皮基底細胞におけるマウス細胞競合の解析システムの実験系を構築し、その検証を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、遺伝子改変マウスを用いて、今まで全く明らかにされてこなかった、ヘミデスモソーム構成因子が、表皮基底細胞における細胞競合に関与している可能性を示すことができた。この細胞競合現象と組織恒常性維持機構との関係性の全容が解明できれば、皮膚の癌化・老化機構の基本原理の解明や細胞競合を介した新規薬剤開発へ繋がる可能性も高い。これらのことから、学術的・社会的観点からも大変意義深い研究成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cell competition is a mechanism in which high fitness cells outcompete as winners and low fitness cells are eliminated from tissues as losers when high fitness cells and low cells coexist. However, it is largely unknown whether RAS mutant cells or hemidesmosomal components by epidermal basal cells are involved in the maintenance of tissue homeostasis through cell competition. In this study, we have generated an experimental system for analysis of in vivo cell competition in epidermal basal cells utilizing genetically modified animals, and verified those phenomena.

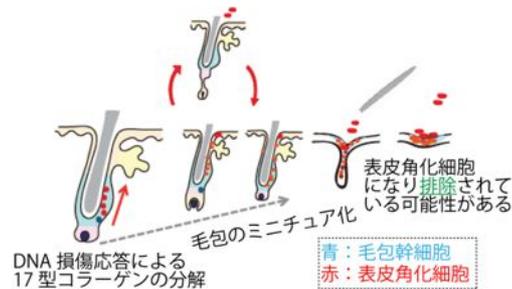
研究分野：幹細胞生物学

キーワード：細胞競合 RAS変異細胞 ヘミデスモソーム COL17A1 遺伝子改変マウス

## 1. 研究開始当初の背景

細胞競合は、適応度の高い細胞と低い細胞が共存した際に、異なる細胞の境界で生じる作用によって、適応度の高い細胞が勝者として生き残り、適応度の低い細胞が敗者として組織から排除されるという機構のことである。最近では、哺乳類の胸腺において、細胞競合による組織恒常性維持機構に抗腫瘍作用があることが示されている。そのため、細胞競合には、『免疫細胞を介さない抗腫瘍効果を持つ組織恒常性維持機構』としての役割があり、新たな癌根治療法開発への期待から、世界中から注目を集めている。我々の皮膚を構成する表皮組織は、成熟分化段階の異なる細胞層により構成され、その最下層にある1層の表皮基底細胞は、角化細胞の幹細胞を含んでおり、表皮と真皮を結合させるためにヘミデスモソーム構造を有している。ヘミデスモソームは、構成因子としてインテグリン 6や17型コラーゲンなどが挙げられ、その全身欠損症患者や欠損マウスの解析により、表皮水泡症を引き起こすことから、表皮の維持や再生などに必要不可欠な役割を果たすことが知られている。また、7型コラーゲン欠損患者で、創傷治癒不全の点から扁平上皮癌の発生に関与していることが知られている。しかしながら、表皮基底細胞のヘミデスモソームが、細胞競合を通して、皮膚癌発症と関わるのかどうか、ほとんど明らかにされていない。

申請者は、17型コラーゲンが、毛包なかほどのバルジ領域(ニッチ領域)に局在し、毛包幹細胞の維持に必須であること、その欠損により幹細胞プールを枯渇し、脱毛を発症することを明らかにしてきた(Tanimura et al., Cell Stem Cell 2011)。また、加齢に伴い毛包幹細胞がゲノム損傷ストレスを受け、17型コラーゲンの分解を亢進し、それに伴い毛包がミニチュア化し、永久脱毛に至る一連の過程を『加齢に伴う脱毛症』の1つの機構として明らかにしてきた(Matsumura et al., Science 2016)。この研究の過程で、17型コラーゲンを欠損したバルジ基底細胞は、表皮角化細胞へと運命を転換する際に、周りの細胞から排除されて角層になって脱落することを見出した(図1)。この現象は、



(図1) 毛包老化の模式図

癌の初期発生の最初期段階において、ゲノム損傷ストレスを受けた幹細胞が、17型コラーゲンの発現制御を介して、細胞競合を受けて排出されることで、癌の発生を抑制している可能性がある。また、癌細胞変異であるRAS変異は、皮膚癌発症を促進することが知られているが、イヌ腎上皮(MDCK)細胞実験系において、RAS変異細胞は、細胞競合により排除される現象が観察されている(Hogan et al., Nature Cell Bio 2009)。しかしながら、表皮角化細胞の癌変異細胞において細胞競合が引き起こされているのかどうかさえ、全く明らかにされていない。そこで、申請者は、癌遺伝子変異獲得した細胞とかヘミデスモソームが、表皮基底細胞における細胞競合に関わる可能性を検証し、癌の最初期段階に対する役割を解明することを着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、表皮角化細胞において、細胞競合機構を介して、癌変異獲得角化細胞が、正常角化細胞を取り囲まれたのち、排除されるのかを検証する。癌細胞変異を加えた細胞の運命を追跡できる成体マウスで表皮基底細胞の運命を解析できるマウス実験系を用いて、癌変異を獲得した後、細胞競合が起こるのかを検証し、その仕組みを解明する。これにより、正常角化細胞での、細胞競合の基本原理解明や発癌抑制の機構解明に繋げることを目的とした。

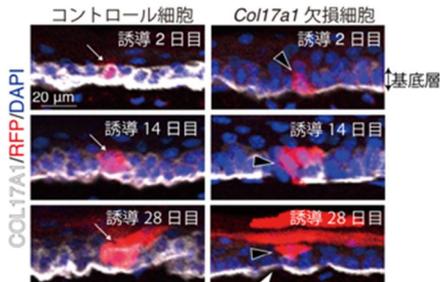
## 3. 研究の方法

成体マウスの表皮基底細胞において細胞競合が起こりうるのか、*in vivo*細胞競合実験系の構築を行う。具体的には、Cre酵素がない時には、EGFPを発現せず、Cre酵素発現により組換えを引き起こすとCAGプロモーター下でGFPを発現するレポーターマウス(CAG-CAT-GFP)若しくは、Cre酵素発現により組換えを引き起こすと確率的にGFP,YFP,RFP,CFPのいずれかを基底細胞で発現し、その後のクローンの運命を解析することができるレポーターマウス( $R26P^{rainbow2.1}$ )と表皮基底細胞特異的に薬剤タモキシフェン依存性にCre酵素を発現するマウス( $K14creERT2$ )を用いて、微量のタモキシフェン投与により、個々の表皮基底細胞のマーキングを試みる。さらに、この*in vivo*マウスモデル実験系にCre酵素依存性にRAS変異を発現するマウス( $LSL-G12V-KRAS$ )とCre酵素依存性にヘミデスモソーム欠損を引き起こすマウス( $Col17a1$  flox, 或いは  $ITGA6$  flox)を交配し、微量のタモキシフェン投与により、レポーターマウス(CAG-CAT-GFP)の場合は、変異GFP、若しくは、レポーターマウス( $R26P^{rainbow2.1}$ )の場合は、GFP,YFP,RFP,CFP陽性細胞と野生型細胞とで細胞競合が起こるのか、検証を行う。

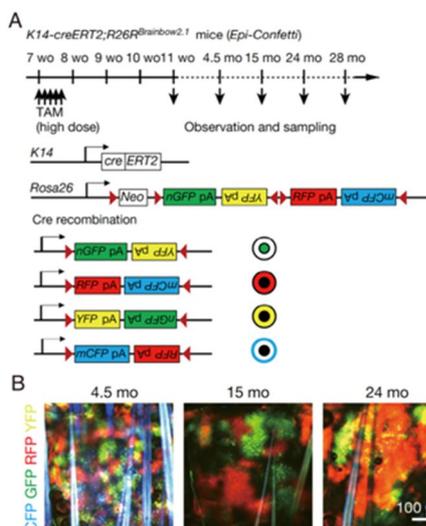
## 4. 研究成果

2018年度では、表皮基底細胞において、細胞増殖促進するRAS変異などの癌遺伝子変異を獲得

した細胞が、細胞競合を引き起こすのか、その検証とその実態の解明を目的として、Cre 酵素発現により組換えを引き起こすと確率的に GFP, YFP, RFP, CFP のいずれかを発現し、その後のクローンの運命を解析することができるレポーターマウス ( $R26R^{rainbow2.1}$ ) と表皮基底細胞特異的に薬剤タモキシフェン依存性に Cre 酵素を発現するマウス ( $K14creERT2$ ) を用いて、表皮基底細胞における *in vivo* マウス細胞競合の解析システムの実験系の構築に成功した(図2、論文1)。これにより、加齢に伴い表皮幹細胞のクローンの拡大とクローンの減少が観察された。また、微量タモキシフェン投与によりコントロール細胞と比較して、*Col17a1* 欠損細胞が、細胞競合様現象を介して顕著に基底層から剥離する像が、観察された(図3、論文1)。2019年度では、細胞増殖促進する KRAS 変異獲得細胞と野生型細胞とで実際に細胞競合が起こるのか、検証を行っている。



(図3) 生体マウスでの表皮基底細胞クローンの細胞競合の検出  
Cre 誘導 28 日目には、コントロール細胞 (矢印) は、基底細胞クローンを形成するのに対して、*Col17a1* 欠損クローン (黒矢頭) は排除され、野生型 *Col17a1* 陽性クローンがそれに応じて基底層を占拠した (白矢頭)。



(図2) 表皮幹細胞クローンの加齢に伴う変化

(A) 実験スキーム、7週齢でタモキシフェン (TAM) 投与により表皮幹細胞にランダムに蛍光マーカーの Cre-LoxP 組換えによりいずれかを発現させて、その後の運命を4.5ヶ月、15ヶ月、24ヶ月と尾部ホルマウントにより解析した。(B) 加齢に伴い表皮幹細胞のクローンの拡大とクローン数の減少が観察された。

コントロール細胞と比較して、*Col17a1* 欠損細胞が、細胞競合様現象を介して顕著に基底層から剥離する像が、観察された(図3、論文1)。2019年度では、細胞増殖促進する KRAS 変異獲得細胞と野生型細胞とで実際に細胞競合が起こるのか、検証を行っている。

## 5. 主な発表論文等 (2016-2019)

[雑誌論文](計 3 件) 査読有り

- Liu N#, **Matsumura H\*#**, Kato T, Ichinose S, Takada A, Namiki T, Asakawa K, Morinaga H, Mohri Y, De Arcangelis A, Georges-Labouesse E, Nanba D, Nishimura E K\*  
**Stem cell competition orchestrates skin homeostasis and ageing.**  
*Nature* 658, 344-350 (2019) (IF:41.5 (2017)) doi: 10.1038/s41586-019-1085-7.
- Noguchi S, Honda S, Saitoh T, **Matsumura H**, Nishimura E K, Akira S, Shimizu S\*  
**Beclin 1 regulates recycling endosome and is required for skin development in mice.**  
*Communications Biology* 2, 37 (2019) doi: 10.1038/s42003-018-0279-0.
- Matsumura H#**, Mohri Y#, Binh N T#, Morinaga H, Fukuda M, Ito M, Kurata S, Hoeijmakers J, Nishimura K\*  
**Hair follicle aging is driven by transepidermal stem cell elimination via COL17A1 proteolysis.**  
*Science* 351.6273, aad4395 (2016) (IF:37.2 (2016)) doi: 10.1126/science.aad4395.

[学会発表](計 19 件) °Speaker

- Nan Liu, **Hiroiyuki Matsumura**, Tomoki Kato, Shizuko Ichinose, Aki Takada, Takeshi Namiki, Kyosuke Asakawa, Hironobu Morinaga, Yasuaki Mohri, Daisuke Nanba, Emi K. Nishimura:  
Stem cell competition and division govern skin homeostasis and ageing.  
**International skin conference Japan-Singapore.** Singapore. April 10-12, 2019
- 松村 寛行**、Nan Liu、高田 亜紀、西村 栄美

ヘミデスモソーム構成因子による幹細胞競合における役割の解明

**第8回細胞競合コロキウム** 北海道大学医学部学友会館フラテホール、定山溪ビューホテル(北海道、札幌市) 2019年3月14-15日

3. 劉 楠、松村 寛行、加藤 智起、市野瀬 志津子、高田 亜希、並木 剛、浅川 杏祐、森永 浩伸、毛利 泰彰、Adèle De Arcangelis、Elisabeth Geroges-Labouesse、難波 大輔、西村 栄美  
幹細胞競合が皮膚の恒常性と老化を制御する  
**第8回細胞競合コロキウム** 北海道大学医学部学友会館フラテホール、定山溪ビューホテル(北海道、札幌市) 2019年3月14-15日
4. Nan Liu, Hiroyuki Matsumura , Tomoki Kato, Daisuke Nanba, Emi K. Nishimura  
Epidermal stem cell competition coupled with stem cell divisions in mammalian epidermis  
**Keystone Symposia 2019, Cell Competition in Development and Disease**  
Granlibakken Tahoe (Tahoe City, California, 24-28, Feb, 2019)
5. 松村 寛行  
表皮基底細胞の細胞競合におけるヘミデスモソーム構成因子の役割の解明  
**第6回細胞競合領域班会議**  
医療イノベーション推進センター(兵庫県、神戸市、2018年6月14-15日)
6. 松村 寛行  
毛包の老化メカニズム  
**第6回皮膚の会**  
天の丸(愛知県、蒲郡市) 2018年3月10-11日
7. 松村 寛行  
毛包の老化メカニズム  
**第7回細胞競合コロキウム**  
北海道大学医学部学友会館フラテホール、定山溪ビューホテル(北海道、札幌市) 2018年3月8-9日
8. 加藤 智起、松崎 健、松村 寛行、Nan Liu、村口 太一、森永 浩伸、西村 栄美  
毛包の老化における好中球エラストラーゼの役割の解析  
**新学術領域「幹細胞老化と疾患」・「細胞競合」合同若手の会**  
KKR 熱海(静岡県、熱海市、2018年2月2-3日)
9. Namiki T. , Matsumura H., Yaguchi T., Kawakami Y., Nishimura E., Yokozeki H.  
NUAK2 promote melanoma development by regulating mTOR pathway  
**International Investigative Dermatology (IID) 2018**  
Rosen Shingle Creek Resort (Orlando, Florida, 16-19, May, 2018)
10. Hiroyuki Matsumura , Yasuaki Mohri, Nguyen Thanh Binh, Hironobu Morinaga, Makoto Fukuda, Mayumi Ito, Sotaro Kurata, Jan Hoeijmakers, Emi K. Nishimura  
Defective maintenance of hair follicle stem cells through COL17A1 loss orchestrates the hair follicle aging program  
**47th European Society for Dermatological Research (ESDR) Annual Meeting**

Salzburg conference center (Salzburg, Austria, 27-30, September, 2017)

11. D.Nanba , F.Toki, H.Matsumura, H.Toki, E.K.Nishimura  
Locomotive ability of human keratinocyte stem cells is an intrinsic property for stem cell expansion and epidermal reconstruction  
**47th European Society for Dermatological Research (ESDR) Annual Meeting**  
Salzburg conference center (Salzburg, Austria, 27-30, September, 2017)
12. 松村 寛行  
表皮基底細胞の細胞競合におけるヘミデスモソーム構成因子の役割の解明  
**新学術領域細胞競合第3回班会議**、北海道大学クラーク会館  
(北海道、札幌市、2017年8月30-31日)
13. Hiroyuki Matsumura , Yasuaki Mohri, Nguyen Thanh Binh, Hironobu Morinaga, Makoto Fukuda, Mayumi Ito, Sotaro Kurata, Jan Hoeijmakers, Emi K. Nishimura  
Hair follicle aging is driven by transepidermal elimination of stem cells via COL17A1 proteolysis  
**3rd International Symposium on Cell Competition Cell Competition in Development and Cancer**, Clark memorial student center  
(Hokkaido University) (Sapporo, Hokkaido prefecture, 29. August 2017)
14. Hiroyuki Matsumura , Nan Liu, Daisuke Nanba, Shizuko Ichinose, Aki Takada, Makoto Fukuda, Elisabeth Geroges-laboohouse, Shigeo Ohno, Emi K Nishimura  
Hemidesomosomal components-mediated cell polarity and the cell division axis determine hair follicle stem cell fates during aging  
**15th Stem Cell Research Symposium**, Tokyo University  
(Bunkyo-ku, Tokyo, 26-27. May 2017)
15. 松村 寛行  
Hair follicle aging is driven by transepidermal elimination of stem cells via COL17A1 proteolysis (毛包老化のメカニズム)  
**東京医科歯科大学第2回再生学領域合同セミナー**  
東京医科歯科大学 (東京都、千代田区 2017年5月15日)
16. Hiroyuki Matsumura , Yasuaki Mohri  
Hair follicle aging is driven by transepidermal elimination of stem cells via COL17A1 proteolysis (毛包老化のメカニズム)  
**平成28年度東京医科歯科大学難治疾患研究所最優秀論文賞発表**  
東京医科歯科大学 (東京都、千代田区、2017年3月10日)
17. Hiroyuki Matsumura, Yasuaki Mohri, Hironobu Morinaga, Makoto Fukuda, Sotaro Kurata, Emi K. Nishimura.  
Hair follicle aging is driven by COL17A1 proteolysis  
**日本研究皮膚科学会第41回年次学術大会・総会**、  
仙台国際センター (仙台市青葉区、2016年12月9-12日)
18. 松村 寛行  
毛包の老化メカニズム:  
**東京医科歯科大学公開シンポジウム「若手が開く新しい再生医療の世界」**  
東京医科歯科大学(東京都・千代田区、2016年7月25日)
19. Hiroyuki Matsumura , Mohri Yasuaki, Morinaga Hironobu, Emi K Nishimura Hair

follicle aging is driven by COL17A1 proteolysis.  
14th Stem Cell Research Symposium, Awaji Yumebutai (Hyogo prefecture, Awaji city, 2016.5.20-21.)

〔図書〕(計 2 件)

1. 毛包老化と17型コラーゲン: 松村 寛行、西村 栄美  
医学のあゆみ、2016年11月11日号、NO.7, Vol.259, 794-796 項、査読無
2. 毛包が老化するしくみ: 松村 寛行、毛利 泰彰、西村 栄美  
実験医学、2016年7月号、NO.11, Vol.34 1775-1778 項、査読無

〔産業財産権〕

取得状況(計 2 件)

名称: COMPOSITION FOR PREVENTING OR AMELIORATING LOSS OF HAIR AND GRAYING OF HAIR, AND USE THEREOF

発明者: Emi K nishimura, Hiroyuki Matsumura

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 2017JP000610

取得年: 2017年1月11日

国内外の別: 国際

名称: 脱毛および白毛化を抑制もしくは改善するための組成物ならびにその使用

発明者: 西村 栄美、松村 寛行

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2017-561131 (国内)

取得年: 2017年1月11日、

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ

<http://www.tmd.ac.jp/mri/scm/index.html>

[http://reins.tmd.ac.jp/html/100007546\\_ja.html](http://reins.tmd.ac.jp/html/100007546_ja.html)

## 6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 西村 栄美

ローマ字氏名: Emi K Nishimura

研究協力者氏名: 難波 大輔

ローマ字氏名: Daisuke Nanba

研究協力者氏名: 劉 楠

ローマ字氏名: Nan Liu

研究協力者氏名: 高田 亜希

ローマ字氏名: Aki Takada

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。