

令和 4 年 10 月 19 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19679

研究課題名(和文)4次元イメージングで解明する毛包形成過程の細胞動態

研究課題名(英文)Understanding hair follicle morphogenesis using 4D imaging

研究代表者

藤原 裕展(Fujiwara, Hironobu)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：20615744

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)：上皮と間充織との相互作用は、ヒトを含めた様々な脊椎動物の様々な器官発生を支える普遍的な細胞間相互作用である。本研究ではマウスの毛包をモデルに、その相互作用がどのような細胞動態によって支えられているのかを、新しいイメージング方法を確立することで明らかにすることを旨とした。我々は、毛包の培養条件を工夫することで、毛包発生が始まる前の最も初期のステージから、毛包発生を長期間ライブイメージングできる実験系の確立に成功した。この実験系を用いて、細胞の系譜を網羅的に追跡することで、様々な毛包表皮細胞の発生起源と系譜を明らかにした。その結果、毛包が陥入する前の表皮に特徴的な細胞運命地図があることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

器官発生は、異なる細胞間のダイナミックかつ協調的な相互作用の結果生み出される。そのため、固定されたサンプルを中心とした従来の解析方法では、そのような動的な特徴に迫れず、解析手法として明らかに限界があった。4次元ライブイメージング法により、器官形成の動的なメカニズムにはじめて迫ることができる。この方法により、各分化層を生み出す細胞の供給源、系譜、移動、細胞分化の分岐点、細胞間の協調的な動態といった、これまで殆ど理解されていない現象を一気に理解できる機会が得られる。ヒト器官にも応用可能なため、将来的にはヒト疾患の病態の解明に大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Epithelial-mesenchymal interaction is a universal cell-cell interaction that supports organogenesis in various vertebrate organs, including humans. In this study, by developing new 4D imaging system, we aimed to elucidate cellular dynamics that underpins morphogenesis. We used the mouse hair follicle as a model organ. We developed a new imaging system that enables live imaging of developing hair follicle for long period from the hair placode stage to later maturation stage. Using this experimental system, we traced the cell lineages of almost all cells in the organ and revealed the developmental origin and cellular lineages of various types of hair follicle epidermal cells. As a result, we identified a characteristic cell fate map in the epidermis before hair follicle invagination.

研究分野：皮膚生物学、発生生物学

キーワード：皮膚 ライブイメージング 毛包 発生

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

皮膚やそれに付属するほとんどの皮膚付属器官（毛包、汗腺、爪、乳腺など）は、上皮-間充織相互作用により形成される。毛包においては、毛包先端部（毛球部）での表皮前駆細胞と毛乳頭細胞との相互作用により、表皮前駆細胞から7種類もの異なる分化細胞が「正しい場所に、正しい時に」生み出されることで、毛包と毛の発生と再生が達成される。この極めて複雑で動的なプロセスの解明は、毛包をはじめとする皮膚付属器官の正常及び異常発生の分子細胞レベルでの理解に必須であるが、従来の固定組織を中心とした解析方法では、理解が十分進まなかった。つまり、これまでの研究では、主に固定された2次元組織切片からの断片的な情報をつなげることで、毛包や毛の形成過程における細胞挙動の連続性や、組織要素の関係性が推測されてきた。このように、データの時空間的な解像度が低いため、表皮前駆細胞がどこで分裂し、どのように移動し、どのように細胞運命が分岐していくことで毛包や毛の構造が構築されるのかという時空間ダイナミクスは、殆ど理解されていない。

2. 研究の目的

本研究では、マウスの同一毛包の毛球部における表皮と毛乳頭細胞の細胞動態と分化過程を、4次元（3次元+時間）イメージングにより1細胞レベルの解像度で撮像することで、表皮前駆細胞と毛乳頭細胞の移動・分裂・分化の様子を連続的に捉える。これらデータを用い、毛包前駆細胞と毛乳頭細胞の全細胞トラッキングを行うことで、7種類の表皮分化細胞の供給源、系譜、移動、分化運命の分岐点、連続的な組織変形、毛乳頭細胞との位置関係等を明らかにする。さらに、ライブイメージングで得た細胞動態の計測データから数理モデルを構築し、計算機の中でバーチャル毛包を作成する。数理モデル内のパラメータを変化させることで、直毛や縮毛など多様な形態の毛や、脱毛など病的な毛包が構築される細胞動態を探索する。

3. 研究の方法

研究計画は以下の2段階からなり、順次達成を目指す。

(1) 4次元イメージングによる毛包表皮前駆細胞と毛乳頭細胞の全細胞トラッキング

本研究では、マウス胎仔ヒゲ毛包の *ex vivo* 4次元イメージング法を用いる。蛍光標識されたマウス胎仔のヒゲ毛包を摘出し、2光子顕微鏡下で器官培養を実施しながら、細胞の動態と状態変化を連続的に撮影する。毛球部の全ての細胞の位置、移動、分裂、系譜を追跡するため、全ての細胞の核（染色体）が *mCherry* で蛍光標識される遺伝子改変マウス「*R26-H2B-mCherry*」を準備する。さらに、毛へ分化する表皮細胞を蛍光標識するため、*Lef1* 遺伝子のプロモーター下で *eGFP* を発現する「*Lef1-eGFP*」マウスを準備する。これら二つの蛍光レポーターを持つマウスを用いることで、毛包形成過程における細胞動態と細胞状態の変化（分化）をリアルタイムで追跡することが可能となる。

取得イメージにおける細胞の系譜、位置、移動、分裂を4次元的に追跡することで、毛包と毛の形成に関与する細胞動態を同定する。細胞の系譜や運命決定様式を直感的に理解するため、組織内における細胞の番地を作成し、それに細胞の位置をリンクさせる。この番地を用いた細胞挙動の計測データを解析することで、各分化層を生み出す細胞の供給源、系譜、移動、分化系譜の分岐点、表皮細胞と毛乳頭細胞との協調的な動態を明らかにする。また、数理モデルを構築するために、画像上のピクセル位置と時間情報から、細胞の時空間的な位置情報を数値データとして得る。

(2) 4次元定量データによるバーチャル毛包の作成

連携研究者の長山（表皮数理モデル、北大電子研）らのグループと協働して、数理モデルの構築に着手する。その際、細胞 *i* の形態変化は無視して、細胞は球（radius $r_i(t)$ ）として表現し、各細胞に位置情報 $x_i(t) = (x_i(t), y_i(t), z_i(t))$ を持たせる。さらに、以下の特徴量を考慮する。

【1. 細胞分裂】ライブイメージングデータに基づいて、A-C 層での細胞分裂様式を決定する。パラメータとしては1) 細胞分裂の周期、2) 分裂回数（幹細胞 = 無限; transit amplifying (TA) 細胞 = 有限) 3) 分裂様式（対称・非対称分裂）を考慮する。【2. 細胞分化】基底層（A層）から離脱した細胞は、基底膜への接着能と増殖能を失い、分化が促進される。【3. 細胞間の動力学】基底層で作られた細胞は、排除体積効果により上層へ移動する。基底細胞は基底膜に強く接着する。ライブイメージングから、各1-8層の分化細胞層の移動速度が異なっていることがわかっているので、層間の細胞間接着力は弱く、層内の細胞間接着力は強く見積もる。【4. 組織構造】毛包が毛の産生を始めると、表皮組織が毛乳頭を包むように釣鐘型形態をつくる。シミュレーションでは、その形態変化を誘導できる細胞間の動力学を探索する。バーチャル毛包が完成したら、数式を構成するパラメータを変化させることで、波状毛や縮毛などの多様な毛を形成する際に関わる細胞挙動を探る。また、表皮組織の釣鐘型への形態変化の意義を、バーチャル毛包の毛球部をフラットに近い形態に保つことで検証する。

4. 研究成果

(1) 毛包発生の長期ライブイメージング法の確立

毛包の培養条件を改良することで、毛包発生の最も初期のステージ（プラコード期：1層の表皮組織と細胞増殖を停止した線維芽細胞の集団が相互作用を開始するステージ）から毛包発生を長時間ライブイメージングできる実験系の確立に成功した。また、全ての細胞の核（染色体）が mCherry で蛍光標識される遺伝子改変マウス「R26-H2B-mCherry」を用いることで、全ての細胞を1細胞の解像度で追跡できる撮像条件を決定した（XY 軸: 512 x 512 pix, 0.33 $\mu\text{m}/\text{pix}$ | Z 軸: 60 slice - 1 $\mu\text{m}/\text{slice}$ | 撮影間隔: 10 分）。さらに、毛へ分化する表皮細胞を蛍光標識するため、Lef1 遺伝子のプロモーター下で eGFP を発現する「Lef1-eGFP」マウスを準備し、これが Lef1 遺伝子の発現パターンと一致する GFP の発現パターンを示すことを明らかにした。また、2光子顕微鏡での撮像条件を検討することで、赤と緑の蛍光を同時に撮影できる条件を確定させた。これら二つの蛍光レポーターを持つマウスを用いることで、毛包形成過程における細胞動態と細胞状態の変化（分化）をリアルタイムで追跡することが可能となった（図1）。

(2) 細胞系譜の網羅的追跡

取得イメージにおける細胞の系譜、位置、移動、分裂を4次元的に追跡することで、毛包と毛の形成に関与する細胞動態を同定した。細胞の系譜や運命決定様式を直感的に理解するため、組織内における細胞の番地を作成し、それに細胞の位置をリンクさせた。毛芽領域から毛に分化する細胞を追跡する際に用いた番地を例示する（図2）。毛乳頭部の基底膜に接している基底細胞をA層とし、そこから順にB層、C層と分類した。次に、各層の細胞を毛包での位置に応じて尾部から頭部側に数字を割り振った。これで、細胞を位置情報とリンクさせて2次元座標上にプロットできるようになった。各細胞のIDはtime = 0の位置情報に基づき「Zの位置・層・数字」のように付与する（例）「8.83-A-1」。この番地を用いた細胞挙動の計測データを解析することで、各分化層を生み出す細胞の供給源、系譜、移動、分化系譜の分岐点、表皮細胞と毛乳頭細胞との協調的な動態を具体的に記述可能となった。

この実験系を用いて、毛形成の際の細胞の系譜を網羅的に追跡した結果、毛形成において細胞を供給するのはA層の細胞のみで、細胞が基底膜から離れると増殖することはなかった。細胞分裂の際に、基底膜から遠い位置に押し出された細胞が分化系列に入り、基底膜に近い細胞は、そのままどまって細胞分裂能を維持した。A層の細胞がどの細胞系譜に別れていくかは、細胞の組織内の配置によってほぼ決まっていた。ただし、A層の細胞の系譜が配置によって完全にfixされているわけではなく、分裂した後に、近傍の細胞の分化系譜に組み込まれることで、複数の細胞系譜を生み出すA層細胞も存在した。よって、細胞の分化運命は、A層の細胞の組織内配置によって大まかにはspecifyされているが、分裂後にもある程度のflexibilityは維持しているものと考えられた。

さらに、2次元の細胞シートの毛包形成予定領域（プラコード）から3次元の毛包形態が形成される過程の細胞動態の解析を行った。興味深いことに、プラコード期の表皮基底層には、特有のパターンを持つ細胞運命地図が描かれた。そして、その運命地図のパターンが、3次元的に変形発展することで、毛包発生後期に形成される細胞コンパートメントが形成されることを明らかにした。

(3) 毛包発生過程の1細胞トランスクリプトーム解析

当初の予定にはなかったが、毛包発生過程における細胞状態（遺伝子発現）の変化を1細胞の解像度でゲノムワイドに解析するために、発生過程の毛包の1細胞トランスクリプトームを実施した。E11-17の組織内の同一位置の毛包を採取するため、色変換蛍光蛋白質 KikGR が核に集積する nKikGR を作製し、顕微鏡下でターゲットの毛包を色変換できる実験系を確立した。FACS のインデックスソーティング機能により、色変換された細胞のみを単一細胞として 96 well plate に採取し、1細胞 RAN-seq を実施した。トランスクリプトームの解析から、各表皮

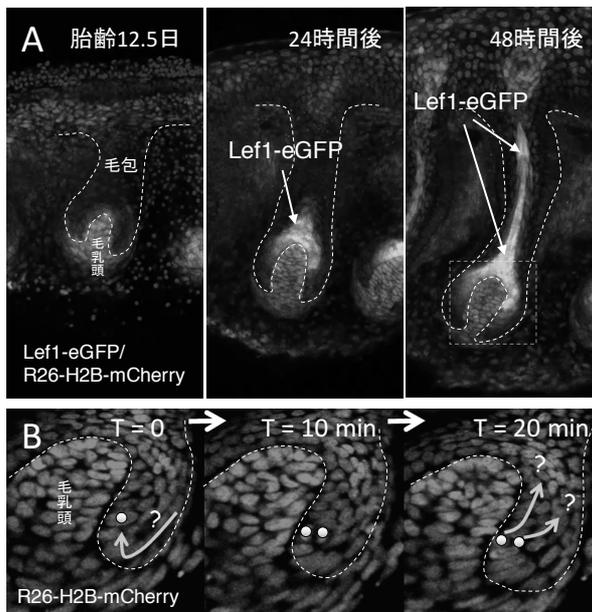


図1. 毛包の ex vivo 4次元イメージング

(A) 全ての細胞の核がmCherryで、毛に分化する1-3層の細胞がeGFPでラベルされる。(B) 全細胞トラッキングが可能な時空間解像度を達成した。

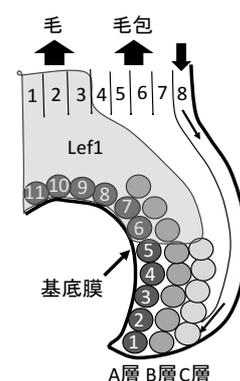


図2. 細胞位置の定義付け

細胞の遺伝子発現パターンが、イメージングで見いたした細胞運命地図に沿って変化していく様子が明らかとなった。ライブイメージングの細胞系譜やダイナミクスのデータと統合させることにより、毛包発生における細胞の4次元動態だけでなく、その過程で起こる遺伝子発現の変化をも同時に計測できる器官発生の「統合1細胞マルチオミクス解析」の基盤が確立できた。このマルチモダルなデータを含有する数理モデルを構築するために、画像上のピクセル位置と時間情報から、細胞の時空間的な位置情報を数値データとして得るための作業を進めた。

当初予定していた数理モデルの構築まではたどり着けなかったが、ライブイメージングから予想していなかった毛包発生の上皮細胞の系譜のパターンが明らかとなり、その時空間発展に伴う細胞状態の変化も、1細胞トランスクリプトームで明らかにすることができた。このことから、本研究により、毛包発生のダイナミクスに関わる新しい重要な成果と、今後の研究のためのユニークな解析基盤が得られたと判断している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2件)

1. Chun-Chun Cheng, Ko Tsutsui, Toru Taguchi, Noriko Sanzen, Asako Nakagawa, Kisa Kakiguchi, Shigenobu Yonemura, Chiharu Tanegashima, Sean D Keeley, Hiroshi Kiyonari, Yasuhide Furuta, Yasuko Tomono, Fiona M Watt, Hironobu Fujiwara.
Hair follicle epidermal stem cells define a niche for tactile sensation. *eLife* (2018) 7, 38883. 10.7554/eLife.38883 査読あり
2. Hironobu Fujiwara, Ko Tsutsui, Ritsuko Morita.
Multi-tasking epidermal stem cells: Beyond epidermal maintenance. *Development, Growth and Differentiation* (2018) 60, 531-541, 10.1111/dgd.12577 査読あり

〔学会発表〕 (計 13件)

1. Fujiwara H. Developmental origin and induction processes of hair follicle stem cells.
1st Crick-Bedington Developmental Biology Symposium, The Francis Crick Institute, London, UK (4-5 February 2019)
2. 藤原裕展
毛包発生の1細胞マルチオミクス解析
第26回毛髪科学研究会 特別講演 大手町サンケイプラザ、東京 (8 December 2018)
3. Fujiwara H.
Developmental origin and induction processes of hair follicle stem cells.
41st Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Symposium “Tissue stem cell systems in homeostasis and regeneration”, Pacifico Yokohama, Japan (28-30 November 2018)
4. 藤原裕展
皮膚の上皮-間充織相互作用
第69回日本皮膚科学会中部支部学術大会 シンポジウム「基礎研究の最新の話題—皮膚研究は拓く、皮膚科の未来」大阪国際会議場 (27-28 October 2018)
5. 藤原裕展
「Intelligent Glue」異なる組織をつなぐ細胞外マトリックスの多様性
第91回日本生化学会 シンポジウム「組織の構築と修復を統御する微小環境の分子実体：細胞外マトリックス再発見」京都国際会議場 (24-26 September 2018)
6. 藤原裕展
毛包表皮幹細胞の発生起源と誘導機構
第39回日本炎症・再生医学会 シンポジウム「体表の恒常性維持と再生を担う機構」慶応プラザホテル、東京 (11-12 July 2018)
7. Fujiwara H.
Developmental origin, induction processes and unconventional functions of heterogeneous hair follicle stem cells.
CDB Symposium 2018, Dynamic Homeostasis: from Development to Aging, Kobe, Japan (26-28 March 2018)
8. Fujiwara H.
Reciprocal interactions between epidermal stem cells and their environment
Japanese Society for Investigative Dermatology 2017, Kochi, Japan (15-17 December 2017)
9. 藤原裕展
「Intelligent Glue」異なる組織をつなぐ細胞外マトリックスの多様性
理研シンポジウム：理研/iCONM/物材機構医工学ネットワーク, iCOMN, Kawasaki, Japan (12 December 2017)
10. Fujiwara H.
Plenary Lecture: Reciprocal interactions between epidermal stem cells and their environment.

World Congress for Hair Research 2017, Kyoto, Japan (31 October – 3 November 2017)

11. Fujiwara H.
Origin and induction processes of hair follicle stem cells.
Human Cell Atlas Asia Meeting, OIST, Okinawa, Japan (30 Nov – 1 Dec 2017)
12. 藤原裕展
表皮幹細胞と周囲環境とのシグナルの双方向性
第3回幹細胞研究会, RIKEN Yokohama Campus, Japan (29th November 2017)
13. Fujiwara H.
Plenary Lecture: Reciprocal interactions between epidermal stem cells and their environment.
World Congress for Hair Research 2017, Kyoto, Japan (31 October – 3 November 2017)

〔図書〕 (計 2件)

1. 藤原裕展 (2018)
皮膚再生における幹細胞と微小環境の双方向性シグナリング
コスメティックステージ 12 (3): 1-7
2. 筒井仰、藤原裕展 (2018)
感覚器としての毛・毛包
わかりやすい感覚器疾患. 日本医師会. S76-77

〔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.cdb.riken.jp/tme/>

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：長山雅晴

ローマ字氏名：Masaharu Nagayama

研究協力者氏名：二階堂愛

ローマ字氏名：Itoshi Nikaido

※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。