

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14709

研究課題名(和文) 組織の凹凸に着眼した上皮幹細胞の局在・機能制御とその加齢変化の解明

研究課題名(英文) Epithelial stem cells: cellular dynamics and future use in regenerative therapy

研究代表者

佐田 亜衣子 (Sada, Aiko)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特任准教授

研究者番号：80779059

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)：ヒト皮膚において、表皮と真皮の境目は平坦ではなく、「上皮脚」と呼ばれる表皮が真皮に入り込んだ凹凸構造をとることが知られている。組織学的・病理学的観察により、上皮脚は、表皮幹細胞の局在と関係すること、皮膚の加齢や病変により形状が変化することが示唆されている。しかし、上皮脚構造と幹細胞機能との関連を実証するのは困難であった。本研究では、マウスで唯一上皮脚を持つ口腔粘膜組織に着目し、組織構造、幹細胞局在・挙動の解析と遺伝子発現プロファイルを行った。さらにin vitroにおいて、組織の凹凸構造を模倣した幹細胞培養系の構築を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚の表皮幹細胞は高い再生能を持ち、重症熱傷の治療を目的とした移植医療に古くから利用されてきたが、結合組織も含めた複雑な皮膚の構造を完全に再生することは技術的に困難である。一方、口腔粘膜上皮は、角膜移植の細胞ソースとして広く使われ、再生医療の観点からも利用価値が高いが、幹細胞の基礎的特性の理解が遅れている。本研究は、上皮幹細胞の性質や制御メカニズムを包括的に理解し、より高度な再生医療の実現を目指す。幹細胞の増殖や分化に最適な凹凸構造を同定することは、将来的に、より質の良い人工皮膚の形成などにつながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The development of in vitro culture of primary keratinocytes and transplantation of epidermal autografts led to the first breakthrough for skin tissue engineering. However, it still remains a major scientific and clinical challenge to engineer complete skin substitutes that contain both epidermal and dermal components. Our work provided cellular and molecular basis of stem cell dynamics in skin and oral epithelia, which will lead the future development of new tissue engineering targets and strategies for tissue regeneration.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：上皮幹細胞
ニアリング 口腔粘膜上皮
再生医療 表皮幹細胞 幹細胞ニッチ 細胞系譜解析 オミクス解析 バイオエンジニアリング

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。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

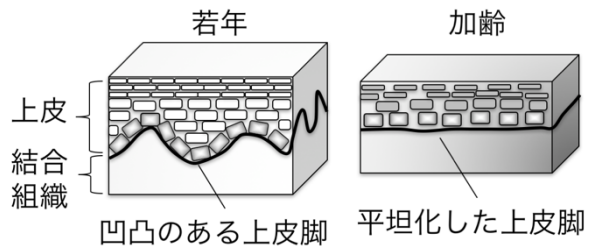
1-1. 上皮幹細胞を用いた再生医療

1980年代、ヒト表皮幹細胞の体外培養と自家移植による熱傷治療が世界で初めて成功して以来、皮膚に関する再生医療は大きく発展してきた。2017年には、遺伝性難病である表皮水疱症患者に対し、遺伝子導入幹細胞を含む表皮シートを移植することで、全身の約8割以上の皮膚再生に成功した。しかし、臨床的な有用性が示されているのは、組織の最も表層にある「表皮」の再建にとどまり、結合組織も含めた複雑な皮膚の構造を完全に再生することは技術的に困難である。現在、真皮に及ぶ皮膚欠損に対しては、培養真皮を移植後に表皮を移植する方法や、真皮と表皮を結合させた培養皮膚の移植等が試みられているが、安定した成果が得られていない。一方、口腔粘膜上皮は、角膜移植の細胞ソースとして広く使われ、再生医療の観点からも利用価値が高いが、幹細胞の基礎的特性の理解が遅れている。

1-2. 皮膚・口腔粘膜の機能と組織構造

私たちの身体の最も表層に位置する皮膚や粘膜は、外界からの様々な刺激や、病原体・異物の侵入から体内を保護する役割を果たす。皮膚と口腔粘膜は、口唇を介して連続しており、外胚葉由来の重層扁平上皮細胞とその直下の結合組織からなる共通の基本構造を持つ。ヒトの両組織において、上皮が結合組織に向かって伸長する特徴的な凹凸構造が観察され、組織学的には「上皮脚」と呼ばれる(図1)。興味深いことに、上皮脚は、加齢に伴いその形状が平坦化することが知られており、老化表現型の一つとして認識されているが、その生理的意義については未だ謎が多い。また、モデル生物であるマウスの皮膚は上皮脚を欠くため、ヒトとマウスの共通性の理解が難しく、当該研究分野の課題として残されている。

図1. 皮膚・口腔粘膜の組織構造



1-3. これまでの研究成果：マウス表皮における新しい幹細胞モデルの提唱

古典的なモデルにおいて、組織幹細胞は、分裂頻度を低く抑えることで、がん化や老化を防いでいると考えられてきた。一方、活発に分裂する細胞は、Transit-Amplifying (TA) 細胞と呼ばれ、幹細胞能力を持たないとされていた。申請者は、新たに同定した分子マーカーを用い、マウス表皮においてこのモデルを再検証したところ、驚くべきことに、マウス表皮では、分裂頻度の低い細胞と高い細胞が、2種類の独立した幹細胞として働くことを発見した (Sada et al., Nat Cell Biol 2016)。しかし、ヒトとマウス皮膚の組織学的相違から、マウスで明らかになった幹細胞モデルが、ヒトに当てはまるかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、上皮脚を再現した三次元培養と、上皮脚を持つマウス口腔粘膜をモデルとし、組織の凹凸構造と幹細胞の関係性を明らかにすることを目的とする。さらに、加齢に伴い上皮脚が平坦化するという現象を、実験的に検証することで、組織構造の加齢変化が、幹細胞機能に及ぼす影響を解明する。本研究は、皮膚、口腔粘膜の2つの組織を解析に用いることで、上皮幹細胞の性質を包括的に理解し、より高度な再生医療の実現を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、in vitro、in vivo の上皮脚モデルを確立し、組織の凹凸構造が、幹細胞の局在や挙動に与える影響を検証した。

3-1. in vivo モデルを用いたアプローチ

マウスで唯一上皮脚を持つ口腔粘膜において、Dlx1-CreER と Slc1a3-CreER を用いた細胞系譜解析を行った。もし Cre 発現細胞が幹細胞である場合、標識された細胞は自己複製と分化を行うため、全ての上皮細胞で長期にわたって標識が観察される。一方、Cre 発現細胞が幹細胞ではない場合、標識された細胞は一過的に増殖・分化するが、やがて組織から失われる。この原理に基づき、細胞分裂頻度の低い細胞と高い細胞が、幹細胞であるか否かを検証する。

次に、同様の実験を加齢マウスで行い、in vivo の条件下で上皮脚が平坦化したとき、標識されたクローンの数 (= 幹細胞の数)、クローンに含まれる基底・分化細胞の数 (= 幹細胞の自己複製・分化能)、局在パターン (= 幹細胞のニッチへの応答性) が、どのように変化するかを検証する。

最後に、細胞外マトリクスの欠陥により、若年マウスにおいても上皮脚が平坦化する表現型を示す Fbln5 ノックアウトモデルを用い、組織の構造維持を介した幹細胞制御の分子基盤に迫る。より網羅的に遺伝子発現パターンの変化を調べるため、若年、加齢マウスの皮膚、口腔から幹細胞を単離し、RNAseq 解析を行う。

3-2. in vitro モデルを用いたアプローチ

凹凸構造上で2種類の表皮幹細胞を培養し、その局在と挙動を解析する。表皮幹細胞の培養には、分裂頻度の低い表皮幹細胞で発現する Dlx1-CreER と、分裂頻度の高い表皮幹細胞で発現する Slc1a3-CreER マウスから単離した初代培養細胞を用いる。培地中にタモキシフェンを添加すると、Cre が活性化され、細胞が蛍光標識される。標識は子孫細胞に受け継がれるため、細胞運命を追跡することができる。この系を用い、Dlx1 陽性細胞、Slc1a3 陽性細胞が、凹凸構造に対して、①どこに位置するか、②どこで分裂・分化するかを観察する。さらに、老化した上皮脚を再現するため、平坦化した凹凸構造をデザインし、組織の構造変化が幹細胞に与える影響を明らかにする。

4. 研究成果

4-1. in vivo モデルを用いたアプローチ

我々は、異なる組織構造を持つヒトとマウスの幹細胞システムの共通点を探るため、ヒト皮膚・口腔粘膜、およびヒトと同様に上皮脚を持つマウス口腔粘膜において、Dlx1-CreER と Slc1a3-CreER を用いた細胞系譜解析を行った。その結果、分裂頻度の低い細胞と高い細胞が、上皮脚の凹凸構造と対応した規則的な局在パターンを示すことを見出した(図2)。さらにこれらの標識細胞は、1年以上自己複製と分化を行う幹細胞であることを示した。

加齢に伴う幹細胞や組織構造の変化を明らかにするため、野生型老年マウスや、老化促進モデルマウス SAMP1、SAMP8 を用いた表現型解析により、分裂頻度の高い表皮幹細胞では加齢に伴い顕著に増殖能が低下すること、一方で分裂頻度の低い表皮幹細胞では分化マーカーの発現低下や異所的発現が見られることを見出した。SAM マウスの解析結果は、PLOS ONE 誌に責任著者として論文投稿した。さらに老年皮膚では、幹細胞の領域化が乱れ、分裂頻度の高い幹細胞が有意に失われる可能性を見出した。このメカニズムとして、分裂頻度の高い表皮幹細胞で発現する細胞外マトリクス Fibulin-7 が、幹細胞の増殖抑制や領域化の制御を介して抗老化に働く可能性を示した。同じ Fibulin ファミリータンパク質である Fibulin-5 についても同様にノックアウトマウスの解析を進めたが幹細胞における顕著な表現型は認められなかった。

最後に皮膚や口腔から単離した分裂頻度の異なる幹細胞の RNA シークエンス解析を行い、幹細胞関連因子を網羅的にプロファイルした基盤データを得た。

4-2. in vitro モデルを用いたアプローチ

マウス口腔粘膜上皮において、幹細胞の単離・培養法を確立した。また分裂頻度の低い表皮幹細胞で発現する Dlx1-CreER と、分裂頻度の高い表皮幹細胞で発現する Slc1a3-CreER マウスの皮膚、口腔から初代培養細胞を確立し、40HT による発現誘導の確認と、標識細胞の性質を免疫染色や QRT-PCR 法により検証した。凹凸構造上で2種類の表皮幹細胞を培養し、その局在と挙動を解析したところ、in vivo における不均一な配置がある程度観察されるものの完全ではなく、さらなる因子が必要であることが予想された。今後は、凹凸構造の大きさや形などを変え、さらなる検討を続ける。

4-3. 本研究の意義

幹細胞を制御する機構として、細胞自律的なメカニズムや、ニッチ細胞からの分泌因子、幹細胞-ニッチの接着を介した相互作用に焦点が当たっていた。組織を立体的に捉え、凹凸構造そのものが幹細胞に及ぼす影響に着眼した本研究は、幹細胞研究分野において新しい切り口や概念をもたらす可能性を秘める。

マウス表皮において、細胞の分裂頻度と幹細胞能力との関係については、相反する複数のモデルが乱立していた (Clayton et al., Nature 2007, Mascré et al., Nature 2012, Gomez et al., Stem cell reports 2013)。ヒト表皮では、組織学的解析により、上皮脚と幹細胞の関連は古くから示唆されていたものの (Jensen et al., Development 1999)、決め手となる実験的証拠に乏しかった。本研究では、独自に同定・確立した幹細胞マーカーや解析ツールを駆使することで、長年実態が不明であったヒト表皮や口腔粘膜上皮幹細胞の詳細な解析を可能とした。幹細胞の正確な同定や制御機構の解明は、生体の恒常性維持機構を理解する上での重要な基盤となると共に、より精度の高い再生医療の実現や、がん化・老化の原因究明へとつながることが期待される。

図2. 上皮脚を持つ組織における分裂頻度の異なる細胞の局在

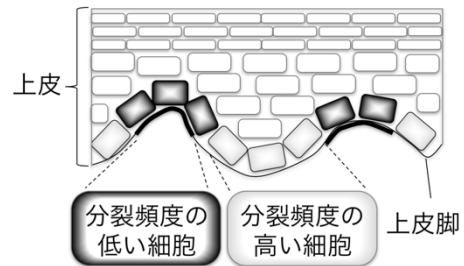
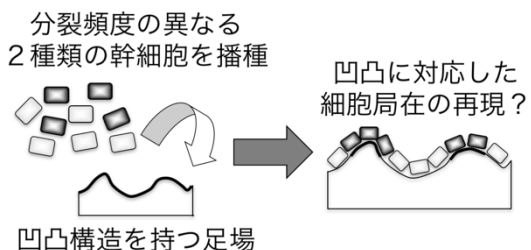


図3. 三次元培養のイメージ図



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Changarathil Gopakumar, Ramirez Karina, Isoda Hiroko, Sada Aiko, Yanagisawa Hiromi	4. 巻 14
2. 論文標題 Wild-type and SAMP8 mice show age-dependent changes in distinct stem cell compartments of the interfollicular epidermis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0215908
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0215908	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐田 亜衣子
2. 発表標題 組織の再生と老化を担う上皮幹細胞のはたらき
3. 学会等名 第42回分子生物学会年会シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐田亜衣子
2. 発表標題 表皮における幹細胞ダイナミクス
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Lalhaba Oinam
2. 発表標題 Maintenance of heterogeneous epidermal stem cell populations by the distinct niche.
3. 学会等名 Gordon Research Conference, Tissue Niches & Resident Stem Cells in Adult Epithelia（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Oinam L, Changarathil G, Ngo YX, Yanagisawa H, Sada A	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Advances in Stem Cells and their Niches	5. 総ページ数 42
3. 書名 Epidermal stem cell lineages.	

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----