

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03681

研究課題名(和文) 妊娠における表皮幹細胞の運命制御と生殖における役割の解析

研究課題名(英文) Epidermal stem cell dynamics during pregnancy

研究代表者

豊島 文子 (Toyoshima, Fumiko)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：40397576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚は、ライフステージに伴い表面積を変化させる。特に妊娠期には、胎児の成長に伴って腹部皮膚が急速に拡張するが、その生体機構は不明である。我々は、妊娠期において表皮幹細胞から高い増殖能を持つ細胞群(Tbx3+基底細胞)が産生されることを報告した。本研究では、Tbx3+基底細胞は血管依存性表皮幹細胞であり、妊娠期には体表血管の増加に依存して出現し、出産後には血管退縮とともに分化して表皮から排出されることを明らかにした。また、皮膚に張力負荷をかけると、非妊娠においても体表血管が増加し、それに依存してTbx3+基底細胞が誘導されたことから、血管と張力が皮膚伸展に重要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

妊娠期の皮膚リモデリング機構において、皮膚拡張を担う表皮細胞増殖クラスターの形成機構を解明し、その分子基盤を示した。また、血管新生を阻害すると表皮細胞増殖クラスターの出現が抑制されることを示し、皮膚リモデリング機構における血管の重要性を明らかにした。さらに、張力負荷により血管新生と表皮増殖クラスターが誘導されることを見出し、妊娠と張力による皮膚リモデリングの共通性を明らかにした。皮膚の医療・美容領域においては、力刺激を用いたケアが広く普及している。本研究は、これらの力学セラピーに対する生物学的根拠を提示するものである。

研究成果の概要(英文)：The skin surface area changes during life course. During pregnancy, the abdominal skin expands rapidly to accommodate the fetus grows, but its biological mechanism remains unknown. We previously reported that epidermal stem cells generate high proliferative basal cell progeny (Tbx3 + basal cells) that promotes skin expansion during pregnancy. In this study, we showed that Tbx3 + basal cells are vasculature-dependent epidermal stem cell population, which appear during pregnancy with a concomitant angiogenesis and undergo differentiation after parturition upon vasculature involution. In addition, when tension load was applied to the skin, skin vasculature increased even in non-pregnancy, and Tbx3 + basal cells were induced concomitantly, demonstrating that vasculatures and tension are important for skin extension. rice field.

研究分野：生物学

キーワード：幹細胞 皮膚 妊娠

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

妊娠期には、肝臓、心臓、脾臓、胸腺、乳腺など、母体の様々な臓器の形態と機能が変化する。この臓器リモデリングは、妊娠期特有の代謝機能の獲得や胎児の発生・成育を支える母体機能に必須であるが、その根底にあるメカニズムや胎児成長との関連は不明である。近年、妊娠期には、神経幹細胞、乳腺幹細胞、造血幹細胞など、母体の様々な組織幹細胞が増殖・分化することが明らかとなってきた。組織幹細胞・前駆細胞の増殖・分化は、組織を構成する細胞の数と種類を変え、臓器の形態と機能の変化を誘導する。したがって、妊娠における臓器リモデリングを解明する上で、組織幹細胞・前駆細胞を基軸とした細胞生物学・発生生物学的アプローチが必須である。

妊娠期には、胎児の成長に伴い母体腹側の皮膚が急速に拡張する。成体皮膚の恒常性維持には、表皮の基底層に存在する表皮幹細胞が重要であるが、妊娠における急速な表皮拡張を担う表皮幹細胞ダイナミクスは不明であった。我々は、妊娠期母体マウスの腹側皮膚において、表皮幹細胞が基底膜に対して平行に非対称分裂し、増殖能の高い細胞を産生すること、この細胞がさらに平行分裂することで皮膚の拡張が誘導されることを見出した。また、高増殖性細胞の産生に必須の遺伝子として転写因子 Tbx3 を同定し、母体マウスの腹側表皮で Tbx3 をノックアウト (Tbx3cKO) すると、妊娠期腹側の皮膚拡張が顕著に抑制されることを見出した。さらに、この表皮特異的 Tbx3cKO 母マウスの胎児は、体のサイズと体重が低下する傾向が認められた。これらのことから、妊娠期の腹側皮膚では、表皮幹細胞が非対称分裂によって Tbx3 陽性基底細胞を産生することで、表皮の拡張と胎児の成長を促すことが分かった。さらに、妊娠期腹側表皮の表皮幹細胞と Tbx3 陽性基底細胞のダイナミクスは、真皮に存在する α -SMA/vimentin 陽性細胞が分泌する Wnt 阻害因子 Sfrp1 ならびに IGF シグナル制御因子である IGFBP2 によって制御されることを見出し、これまで未知であった表皮-真皮連携による表皮拡張機構の存在を明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究を進展させ、妊娠期における表皮幹細胞の制御機構を解明することを目的とする。特に、申請者らが発見した、妊娠マウス腹部皮膚に出現する高い増殖性の細胞群 (Tbx3 陽性基底細胞) に着目し、妊娠期における表皮幹細胞から Tbx3 陽性基底細胞への遷移機構を明らかにする。また、妊娠に伴う真皮の再編成機構を解析し、表皮幹細胞制御における真皮の役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) Tbx3 陽性基底細胞を産生する表皮幹細胞の特異性の検証

マウス表皮基底層には、増殖の早い表皮幹細胞と遅い表皮幹細胞が、領域を分けて存在することが報告された (Sada et al., Nat. Cell Biol. 2016)。本項目では、それぞれの表皮幹細胞を特異的にラベルトレースできるマウスを用いて、妊娠期にどちらの幹細胞から TA 細胞が産生されるかを検証する。

(2) Tbx3 陽性基底細胞から表皮幹細胞への可逆性の検証

Tbx3 陽性基底細胞をラベルトレースできるマウス (Tbx3-CreERT2/H2BGFP マウス) を用いて、Tbx3 陽性基底細胞が分化コミットしているのか、表皮幹細胞に戻る可逆性を有するのかを検証する。妊娠期に Tbx3 陽性基底細胞をラベルし、出産後のラベル残存率で可逆性を評価する。

(3) 妊娠期における表皮幹細胞/ Tbx3 陽性基底細胞系譜の時系列トランスクリプトーム解析

表皮幹細胞系譜の 1 細胞トランスクリプトーム解析を行った結果、非妊娠期と妊娠期では、表皮幹細胞の細胞運命が異なることが分かった。そこで本項目では、表皮基底層の 1 細胞解析により、妊娠・出産に伴う基底層の細胞構成の変化を明らかにする。Tbx3 を発現量する細胞クラスターを特定し、幹細胞から Tbx3 陽性基底細胞への遷移に伴う遺伝子発現変化を解明する。妊娠・出産に伴う Tbx3 陽性基底細胞系譜の遺伝子発現を解析し、細胞運命を特定する。

(4) 妊娠期における Tbx3 陽性基底細胞の増殖機構の解明

表皮幹細胞系譜の 1 細胞トランスクリプトーム解析の結果、妊娠期には非妊娠期とは異なる増殖シグナルが表皮基底層で活性化されている可能性が示唆された。本研究では特にパラクラインシグナルに着目し、Tbx3 陽性基底細胞の増殖ニッチの実態を明らかにする。

(5) 妊娠期における真皮の再編機構の解析

妊娠期には、vimentin+/ α -SMA+細胞の増加や細胞の形態変化など、真皮を構成する細胞の種類や遺伝子発現が変化することを示唆する結果が得られている。そこで本項目では、非妊娠、妊娠、

出産後の腹部真皮の1細胞トランスクリプトーム解析を行い、妊娠に伴う真皮の細胞構成の変化を明らかにする。特に繊維芽細胞に着目し、細胞クラスターと遺伝子発現プロファイルの変化を解明する。

(6) 妊娠期皮膚リモデリング機構の普遍性

妊娠期で起こる皮膚リモデリング機構が、張力負荷時の皮膚伸展機構や、新陳代謝の高い足底部皮膚の恒常性においても機能する可能性について検証した。

4. 研究成果

(1) 表皮基底細胞の増殖と Tbx3⁺基底細胞の相関を解析するため、H2BGFP の蛍光希釈により細胞分裂回数をモニタリングできるマウスを検討した結果、Tbx3⁺基底細胞の近傍に分裂回数が多い細胞集団がクラスターとなって存在する様子が観察され、epidermal proliferation cluster (EPC) と名付けた。EPC の形成機構を探るため、非妊娠、妊娠、Tbx3cKO 妊娠マウスの腹部表皮基底細胞の RNaseq 解析を行った結果、Tbx3 によって制御される妊娠期の遺伝子として 113 遺伝子を同定した。この遺伝子群のネットワーク解析の結果、MAPK の関連が予測された。pERK を観察したところ、妊娠中に基底細胞で pERK が上昇し Tbx3cKO マウスでは低下することが観察された。そこで、113 遺伝子の中の一つである ADAM8 に着目した。ADAM8 は、HB-EGF を切断し、近傍の細胞に EGF-EGFR-ERK シグナルを活性化することが知られている。ADAM8 は妊娠期中において、Tbx3⁺基底細胞の周辺の細胞で発現上昇すること、ADAM8 KO マウスでは ERK 活性化と細胞増殖が抑制されることが分かった。さらに、HB-EGF cKO マウスにおいても増殖が低下した。これらの結果から、Tbx3⁺基底細胞は周囲の細胞に ADAM8 の発現を誘導し、EGF-EGFR-ERK シグナルを活性化することで EPC を形成することが分かった。

(2) Tbx3⁺基底細胞から分泌される表皮増殖クラスター誘導因子について解析を行った。野生型と表皮特異的 Tbx3cKO マウスの妊娠期中における腹部皮膚表皮の RNAseq 解析により、Pyy ペプチドの発現量が Tbx3cKO マウスで顕著に低下していることが分かった。また、腹部表皮の scRNAseq 解析により Tbx3⁺基底細胞に高く発現する遺伝子を同定した結果、表皮分化遺伝子と共に Pyy も同定された。さらに抗 Pyy 抗体を用いた組織染色により、妊娠期中の腹部表皮において Pyy タンパク質の存在量が増加することを確認した。さらに、人工合成した Pyy ペプチドを皮内投与した結果、表皮基底細胞の増殖が促進され、表皮増殖クラスターの形成も誘導された。このことから、Tbx3⁺基底細胞は Pyy を分泌することにより、表皮増殖クラスターを誘導することが分かった。

(3) Tbx3 陽性細胞の細胞運命を検証するため、Tbx3⁺基底細胞をラベルトレースできるレポーターマウスを作成し、クローン解析と scRNAseq を用いた偽時系列解析を実施した。その結果、Tbx3⁺基底細胞は、出産後には分化して表皮から排除される運命をたどることが分かった。一方で、足底部表皮のように増殖性が高い領域では Tbx3⁺基底細胞が幹細胞として存在し、表皮増殖クラスターを恒常的に維持することが分かった。

(4) Tbx3⁺基底細胞を誘導する真皮の要因を探るため、真皮の scRNAseq 解析を実施した。その結果、妊娠期中には血管新生に関与する血管クラスターの割合上昇が認められた。実際、妊娠期中では腹部皮膚で血管新生が観察され、かつ足底部皮膚では恒常的に血管網が発達していた。また、血管新生を阻害すると妊娠期中における Tbx3⁺基底細胞と表皮増殖クラスターの出現が抑制され、血管新生を誘導すると背側皮膚でも Tbx3⁺基底細胞が誘導された。さらに腹側皮膚に張力を負荷して伸展させたところ、血管新生が誘導され、血管に依存して Tbx3⁺基底細胞と表皮増殖クラスターが出現した。また、真皮における Tbx3⁺基底細胞誘導因子 Igfbp2 の発現上昇も、張力と血管新生に依存することが分かった。これらの結果から、張力と血管が真皮と表皮のリモデリングを誘導し、体表領域や生理変化に合わせた皮膚の形態や伸展を制御していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ichijo R., Kabata M., Kidoya H., Muramatsu F., Ishibashi R., Abe K., Tsutsui K., Kubo H., Iizuka Y., Kitano S., Miyachi H., Kubota Y., Fujiwara H., Sada A., Yamamoto T., Toyoshima F.	4. 巻 7
2. 論文標題 Vasculature-driven stem cell population coordinates tissue scaling in dynamic organs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabd2575
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abd2575	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 -

1. 著者名 Ishibashi Riki, Abe Kota, Ido Nanami, Kitano Satsuki, Miyachi Hitoshi, Toyoshima Fumiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Genome editing with the donor plasmid equipped with synthetic crRNA-target sequence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-70804-6	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 -

1. 著者名 Kozuki S, Sakurai S, Suzuki A, Yamamoto T, Toyoshima F.	4. 巻 27
2. 論文標題 Delineation of biliary epithelial cell dynamics in maternal liver during pregnancy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 192-201
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12918	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8件（うち招待講演 3件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 豊島文子
2. 発表標題 妊娠期における臓器スケーリング
3. 学会等名 ライフコースと個体および臓器スケーリング（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo Ichijo, Fumiko Toyoshima
2. 発表標題 Defining the highly proliferative IFE stem cell state in regional skin homeostasis and remodeling
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 一條遼、佐田垂衣子、山本拓也、豊島文子
2. 発表標題 皮膚表皮幹細胞の性質は体表領域により異なる
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo Ichijo, Fumiko Toyoshima
2. 発表標題 Defining the highly proliferative IFE stem cell state in regional skin homeostasis and remodeling
3. 学会等名 Gordon Research Conference ((国際学会))
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toyoshima, F
2. 発表標題 Skin remodeling during physiological body shape changes.
3. 学会等名 Japan-Singapore Skin Webinar Series ((招待講演)) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryo Ichijo
2. 発表標題 Vasculature-driven stem cell population coordinates tissue scaling in dynamic organs
3. 学会等名 27st East-Asia Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toyoshima, F
2. 発表標題 Vascular-driven stem cell states coordinates tissue scaling in dynamic skin
3. 学会等名 第94回日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 一條遼
2. 発表標題 皮膚拡張時における増殖能の高い表皮幹細胞の出現には血管が重要である
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------