

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08763

研究課題名(和文)毛包幹細胞へのlineage primingに寄与する遺伝子ネットワークの同定

研究課題名(英文) Identification of gene networks contributing to lineage priming to hair follicle stem cells.

研究代表者

森田 梨津子 (Morita, Ritsuko)

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・上級研究員

研究者番号：20700040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：成体毛包の再生能を生涯にわたって支える毛包上皮幹細胞が、胎仔期に正しい場所、正しいタイミングで誘導される機構については、いまだ十分に理解されていない。そこで本研究では、毛包幹細胞へのlineage primingのメカニズムを理解することを目指した。私たちはこれまでに、1細胞解像度のライブイメージングと1細胞トランスクリプトーム解析を組み合わせたマルチオミクス解析から、毛包幹細胞の発生源と形成過程を明らかにした。さらに将来の毛包幹細胞は、発生過程においてWnt low/Bmp highの領域から生まれ育まれることを見出した (Morita et. al, Nature 2021)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、毛包発生過程において、「幹細胞になる細胞」と「ならない細胞」の違いと形成メカニズムをこれまでにはない解像度で明らかにしている。一見均質な細胞から幹細胞と分化細胞が生まれ組織の秩序や恒常性が形成されていく仕組みを理解することは、毛包だけでなく多くの器官発生に普遍的に存在する「可塑性と頑強性」の理解に繋がると期待される。さらに、幹細胞の形成、適切な維持・制御の機構が解明されれば、生体外における毛包培養や胎仔性幹細胞の誘導・増殖・分化の制御技術の開発に大きく寄与することが期待され、将来的には薬剤評価系の確立など、皮膚や毛包に伴うがんや疾病に向けた創薬開発に貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms underlying the formation of hair follicle stem cells at the right place and time, which contribute to the regeneration of hair follicles throughout adult life, are still not fully understood. Therefore, this study aimed to investigate the mechanism of lineage priming in hair follicle stem cells. Through a multi-omics approach that integrates single-cell live imaging and single-cell transcriptome analysis, we have previously elucidated the origin and formation process of hair follicle stem cells. Furthermore, our investigations have revealed that prospective hair follicle stem cells emerge and mature within a specific region characterized by low Wnt signaling and high Bmp signaling during the developmental process (Morita et al., Nature 2021).

研究分野：皮膚科学

キーワード：毛包幹細胞 ライブイメージング 1細胞トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

皮膚付属器官の一つである毛包は、生涯にわたって周期的に再生を繰り返すユニークな器官である。この毛包の高い再生能を支える成体毛包表皮幹細胞は、解剖学的に明確な領域 (バルジ) に維持されていることから、幹細胞と周囲微小環境 (幹細胞ニッチ) の研究の良いモデルと考えられてきた。Krt15 や CD34 などの幹細胞マーカーが特定されたことで、成体の幹細胞の研究は一気に加速し、現在では幹細胞の詳細な遺伝子発現プロファイルや、幹細胞ニッチとの相互作用による増殖や分化制御のメカニズムについての理解が進んでいる。

一方で、毛包の基本的な構造と恒常性を維持するための仕組みが形成される「発生過程」において、一見均一な胎仔性の表皮前駆細胞の集団から、どのようにして毛包表皮幹細胞が正しい場所に正しい時に誘導されるのか、ニッチと幹細胞の相互依存的な関係が胎仔期にどのように生み出されるのかについてはほとんど理解されておらず、本研究分野の重要な未解決問題として残されている。 発生過程における毛包幹細胞の「誘導メカニズム」の理解が進まない最大の要因として、胎仔期の表皮前駆細胞の中で「毛包表皮幹細胞」になる細胞を特異的に標識するマーカー遺伝子がいまだ同定されていない (または存在しない) ことが挙げられる。そこで私たちは、既存の分子マーカーに依存せず、1細胞解像度での毛包器官発生の長期ライブイメージングと、1細胞トランスクリプトームを統合させたマルチオミクスデータの統合的解析を行うことで、これまで同定不可能であった幹細胞が生み出される過程の連続的かつ網羅的な解析を可能とし、①将来幹細胞になる細胞は毛包プラコードの辺縁から誘導されること、②細胞の発生系譜、③各系譜の遺伝子発現の変化を明らかにした。

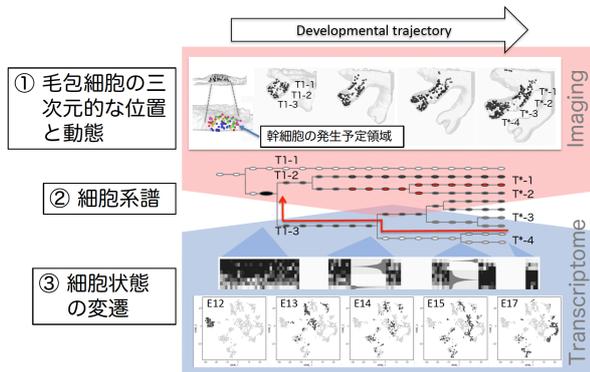


Fig.1 毛包幹細胞の誘導過程解明のストラテジー

2. 研究の目的

本研究では、我々がこれまでに見出した幹細胞誘導過程で働く遺伝子群から、未分化な胎仔性の表皮前駆細胞を毛包幹細胞へと priming するコアな遺伝子発現ネットワークを同定し、幹細胞が正しい場所に正しいタイミングで誘導され組織の秩序が形成されるまでの機構を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

成体毛包幹細胞で発現する *Nfatc1* は、hair peg 期毛包の胎仔性幹細胞において発現を開始することが知られている。しかしながら、我々の1細胞トランスクリプトームデータにおいて、*Nfatc1* をはじめとする成体毛包幹細胞マーカーは、プラコード期から転写レベルでの発現が確認され、プラコード期に幹細胞誘導の priming はすでに始まっていることが示唆される。そこで本研究では、*Nfatc1* の発現を指標に、幹細胞系譜の発現変動遺伝子群から、幹細胞への lineage priming に寄与する遺伝子群を明らかにすることを目指す。

(1) 幹細胞誘導の priming を促進する遺伝子ネットワークの理解

1細胞トランスクリプトーム解析から見出された発現変動遺伝子群の毛包内における発現パターンを免疫染色や *in situ* ハイブリダイゼーションにより時空間的に明らかにする。さらに、胎仔表皮細胞や *ex vivo* 胎仔毛包において各制御因子の発現を攪乱した時の、互いの遺伝子発現レベルや局在の変化、幹細胞関連遺伝子の発現変化を解析し、制御因子候補間の関係性を理解する。

(2) 毛包細胞社会の秩序形成に寄与する細胞間相互作用の理解

表皮前駆細胞と相互作用して幹細胞誘導と恒常的な維持に寄与する周囲環境 (外的要因) を明らかにするため、毛包表皮細胞に隣接した毛包間充織細胞の動態解析と1細胞トランスクリプトーム解析を実施する。

4. 研究成果

幹細胞誘導過程の細胞状態の変化を明らかにするため、毛包プラコードが形成される前の胎齢 11 日、毛包プラコード形成が認められる胎齢 12.0 日、肥厚した表皮組織が陥入する胎齢 13.0 日、幹細胞領域が形成され発達する胎齢 13.5 日、14.0 日、15.0 日、胎仔性幹細胞集団の区画化が完成する胎齢 17.0 日の 7 ステージについて、幹細胞前駆細胞と分化細胞を含む毛包構成細胞を分取し、1細胞 RNA-seq を実施した。この時、光変換型蛍光タンパク質である KikGR を全身性に発現する遺伝子改変

動物を用いて、特定の発生ステージの毛包のみを顕微鏡下で標識することにより、毛包間表皮細胞を除く同時期の毛包表皮細胞を、マーカー非依存的に網羅的かつ高精度に単離した。発生過程を通して経時的に取得した 1000 細胞を超える 1 細胞トランスクリプトーム解析から細胞系譜と個々の細胞の組織内での時空間配置を再構築した結果、1) 毛包プラコード上には、毛包の中心から辺縁にかけて同心円状の遺伝子発現パターンが認められること、2) プラコード期から徐々に細胞運命が分岐して、それぞれの細胞系譜ごとに分化・成熟していくこと、3) 成体毛包幹細胞の性質は、毛包の形態形成過程を通じて徐々に獲得されていくことなどを明らかにした (Fig. 2)。さらに、毛包プラコードの二次元同心円パターンと将来の幹細胞を生み出す制御因子の同定を目指して、1 細胞 RNA-seq データを掘り下げて解析した結果、幹細胞系譜では、プラコード期から発生後期まで成体幹細胞の分子マーカーや Bmp シグナルパスウェイ下流のターゲット遺伝子が多数発現していることが判明した。このことから幹細胞の前駆的な細胞は Wnt シグナル活性が低く、Bmp シグナル活性の高い領域から生まれ、育まれることが示唆された (Fig. 2)。この結果は、Bmp や Wnt シグナルパスウェイのレポーターマウスを使用した毛包発生のライブイメージングの結果からも支持された。

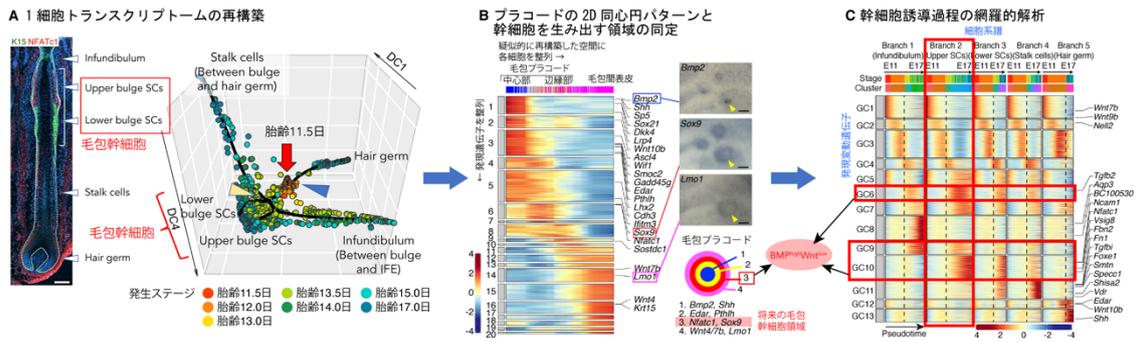


Fig.2 毛包上皮細胞の網羅的 1 細胞トランスクリプトーム解析

- A. 発生期の毛包上皮細胞の網羅的な疑似時系列解析。青矢頭:毛芽細胞への分岐点、黄矢頭:毛包幹細胞への分岐点。
 B. 胎齢 12.0 日毛包上皮細胞由来の 1 細胞トランスクリプトームの詳細な解析(左)と代表的な三つの発現変動遺伝子の *in situ* hybridization (右)。Scale bar, 100 μ m。
 C. 各細胞系譜の誘導過程の網羅的解析。赤枠: 毛包幹細胞の誘導過程で発現変動する遺伝子。

これまでに 1 細胞解像度の長期毛包発生のライブイメージングにおいて、時間を遡って細胞系譜の発生を追跡した結果、幹細胞の発生起源を解明するとともに、毛包プラコードにおいては細胞運命の異なる細胞系譜が同心円状に配置しており、各々の領域が拡大しながら間充織側へ陥入・伸長することで円筒状の毛包が形成されることを明らかにしていた。このライブイメージングでの解析結果と 1 細胞トランスクリプトーム解析の結果から、毛包プラコードには異なる遺伝子発現パターンを有する上皮細胞系譜が同心円上に配置し、このプラコード上の二次元同心円パターンが間葉側へ突出するように陥入して、その後各領域が長軸方向に伸長することで、三次元的な筒状の毛包構造を作るといふ毛包発生の様式-テレスコープモデル-を見出した。これは毛包を構成する細胞区画形成と幹細胞誘導を同時に可能とする新しい器官発生モデルとなると考えられた (Fig. 3; Morita et al, Nature. 2021)。

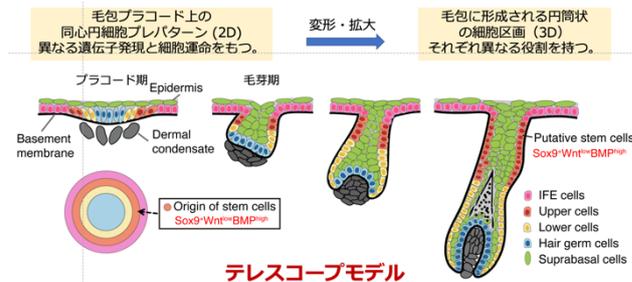


Fig.3 毛包発生様式「テレスコープモデル」

さらに、毛包幹細胞の誘導と成熟の過程を支える周囲環境との相互作用を 1 細胞レベルで理解するために、光変換型の蛍光タンパク質が結合したヒストン (H2B-Dendra2) を全身性に発現するマウスを作製するとともに、Bmp や Wnt シグナルパスウェイのコンディショナルノックアウトマウスを入手し、ライブイメージングの取得と動態解析を実施した。毛包幹細胞領域と隣接する毛包周囲間充織細胞の連続的な動態解析を実施した結果、発生過程を通じて、将来の幹細胞と対をなして挙動を共にするような間充織細胞はいないものの、幹細胞領域の発展に対応するように発達する隣接間充織細胞領域が存在することが明らかになった。さらに毛包上皮幹細胞と周囲間充織細胞の発生過程を通じた相互作用を詳細に解析するため、これまでに、胎齢 11.5 日から胎齢 17 日までの発生期毛包細胞を経時的に採取し、毛包上皮細胞と周囲間充織細胞を含む毛包全全体の 1 細胞 RNA-seq データを新たに取得し解析を進めている。本データは今後の毛包幹細胞および毛包発生研究を支える基盤データになると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6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 Ritsuko Morita, Hironobu Fujiwara	4. 巻 64
2. 論文標題 Tracing the developmental origin of tissue stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 66-576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12816	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 森田 梨津子, 藤原 裕展	4. 巻 73
2. 論文標題 組織幹細胞の起源の探索	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 179-184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.2425201493	査読の有無 無
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 森田梨津子, 藤原 裕展	4. 巻 39
2. 論文標題 毛包幹細胞の発生起源の解明	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学2021年10月号 (羊土社)	6. 最初と最後の頁 2585-2589
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 無
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 森田梨津子, 藤原 裕展	4. 巻 73
2. 論文標題 組織幹細胞の起源の探索	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生体の化学 (医学書院)	6. 最初と最後の頁 179-184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.2425201493	査読の有無 無
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 Morita Ritsuko, Sanzen Noriko, Sasaki Hiroko, Hayashi Tetsutaro, Umeda Mana, Yoshimura Mika, Yamamoto Takaki, Shibata Tatsuo, Abe Takaya, Kiyonari Hiroshi, Furuta Yasuhide, Nikaido Itoshi, Fujiwara Hironobu	4. 巻 594
2. 論文標題 Tracing the origin of hair follicle stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 547 ~ 552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-021-03638-5	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 Tsutsui Ko, Machida Hiroki, Nakagawa Asako, Ahn Kyungmin, Morita Ritsuko, Sekiguchi Kiyotoshi, Miner Jeffrey H., Fujiwara Hironobu	4. 巻 12
2. 論文標題 Mapping the molecular and structural specialization of the skin basement membrane for inter-tissue interactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22881-y	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22件 (うち招待講演 13件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 Ritsuko Morita
2. 発表標題 "Telescope model" for coordinated organ morphogenesis and stem cell formation
3. 学会等名 The 4th RIKEN BDR-Kobe University Joint Symposium (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森田梨津子
2. 発表標題 1細胞解析から明らかにする毛包発生と幹細胞誘導のしくみ
3. 学会等名 シングルセルゲノミクス研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ritsuko Morita
2. 発表標題 "Telescope model" for coordinated organ morphogenesis and stem cell formation
3. 学会等名 日本遺伝学会第94回札幌大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田梨津子
2. 発表標題 毛包発生と幹細胞誘導を支える「テレスコープモデル」
3. 学会等名 第73回日本皮膚科学会中部支部学術大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ritsuko Morita
2. 発表標題 "Telescope model" for coordinated organ morphogenesis and stem cell formation
3. 学会等名 ISRB Webinars (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ritsuko Morita
2. 発表標題 "Telescope model" for coordinated organ morphogenesis and stem cell formation
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ritsuko Morita, Noriko Sanzen, Hiroko Sasaki, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Takaki Yamamoto, Tatsuo Shibata, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Yasuhide Furuta, Itoshi Nikaido, and Hironobu Fujiwara.
2. 発表標題 Origin and induction process of hair follicle stem cells
3. 学会等名 The 18th Stem Cell Research Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田梨津子
2. 発表標題 マルチオミクス解析による毛包幹細胞の起源と毛包発生モデルの解明
3. 学会等名 定量生物学の会 夏の会2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田梨津子
2. 発表標題 マルチオミクス解析による毛包幹細胞の起源と毛包発生モデルの解明
3. 学会等名 資生堂オンライン講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ritsuko Morita, Noriko Sanzen, Hiroko Sasaki, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Takaki Yamamoto, Tatsuo Shibata, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Yasuhide Furuta, Itoshi Nikaido, and Hironobu Fujiwara.
2. 発表標題 Tracing the origin of hair follicle stem cells
3. 学会等名 BDR Retreat 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ritsuko Morita, Noriko Sanzen, Hiroko Sasaki, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Takaki Yamamoto, Tatsuo Shibata, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Yasuhide Furuta, Itoshi Nikaido, and Hironobu Fujiwara.
2. 発表標題 Tracing the origin of hair follicle stem cells
3. 学会等名 Tokyo 2021 International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ritsuko Morita, Noriko Sanzen, Hiroko Sasaki, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Takaki Yamamoto, Tatsuo Shibata, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Yasuhide Furuta, Itoshi Nikaido, and Hironobu Fujiwara.
2. 発表標題 Tracing the origin of hair follicle stem cells
3. 学会等名 13th GfE School 2020 (now 2021) joint with JSDB (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ritsuko Morita, Noriko Sanzen, Hiroko Sasaki, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Takaki Yamamoto, Tatsuo Shibata, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Yasuhide Furuta, Itoshi Nikaido, and Hironobu Fujiwara.
2. 発表標題 Tracing the origin of hair follicle stem cells
3. 学会等名 第 44 回日本分子生物学会年会(MBSJ2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田梨津子
2. 発表標題 マルチオミクス解析による毛包幹細胞の起源と毛包発生モデルの解明
3. 学会等名 オリンパス：イノベーションフォーラム2021「次世代研究者が拓く、最先端ライブイメージングの未来」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ritsuko Morita, Noriko Sanzen, Hiroko Sasaki, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Takaki Yamamoto, Tatsuo Shibata, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Yasuhide Furuta, Itoshi Nikaïdo, and Hironobu Fujiwara.
2. 発表標題 Origin and induction process of hair follicle stem cells
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ritsuko Morita & Hironobu Fujiwara
2. 発表標題 Origin and induction process of hair follicle stem cells
3. 学会等名 2nd Skin Research Mini-Symposium 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ritsuko Morita
2. 発表標題 マルチオミクス解析による毛包幹細胞の起源と毛包発生モデルの解明
3. 学会等名 最先端循環代謝学の若手研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ritsuko Morita, Noriko Sanzen, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Itoshi Nikaïdo, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Yasuhide Furuta and Hironobu Fujiwara
2. 発表標題 The origin and induction processes of hair follicle stem cells
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting -2019 Single Cell Analyses (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ritsuko Morita, Noriko Sanzen, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Itoshi Nikaido, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Yasuhide Furuta and Hironobu Fujiwara
2. 発表標題 The origin and induction processes of hair follicle stem cells
3. 学会等名 The 2019 Epithelial Differentiation & Keratinization Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ritsuko Morita, Noriko Sanzen, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Itoshi Nikaido, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Yasuhide Furuta and Hironobu Fujiwara
2. 発表標題 The origin and induction processes of hair follicle stem cells
3. 学会等名 The 2019 Epithelial Differentiation & Keratinization Gordon Research Seminar (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ritsuko Morita, Noriko Sanzen, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Itoshi Nikaido, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Yasuhide Furuta and Hironobu Fujiwara
2. 発表標題 The origin and induction processes of hair follicle stem cells
3. 学会等名 EMBO Workshop on Single Cell Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ritsuko Morita, Noriko Sanzen, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Itoshi Nikaido, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Yasuhide Furuta and Hironobu Fujiwara
2. 発表標題 The origin and induction processes of hair follicle stem cells
3. 学会等名 Japan-Singapore International Skin Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------