

令和 3 年 4 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17796

研究課題名(和文) 妊娠・出産に着目した高増殖能を有する表皮幹細胞のCharacterization

研究課題名(英文) Characterization of highly proliferative epidermal stem cells during pregnancy and parturition

研究代表者

一條 遼 (Ichijo, Ryo)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：50804382

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)：幹細胞は増殖と分化によって組織恒常性を維持している。本研究では、毛包間表皮幹細胞が妊娠期の腹側皮膚、足裏皮膚において増殖クラスターを形成していることを明らかにした。また、細胞系譜解析により、妊娠期腹側皮膚ではTbx3陽性細胞のクローンは出産後に排出されることがわかった。さらに、血管に着目したところ、妊娠期腹側皮膚では真皮中の血管量が多く、足裏皮膚でも同量の血管量であった。以上の結果から、Tbx3を中心とする増殖クラスターは血管に依存してい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

皮膚は、体の生理変化や体形変化に応じて拡張・収縮するダイナミックな臓器である。このような生理的な皮膚リモデリングは、皮膚組織を構成する多様な細胞の不均一性、階層性、相互作用の時空間的な変化により誘導されると予想されるが、それを担う多細胞ネットワークや制御機構は不明である。本研究により、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。これらの成果は皮膚の再生医療に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Stem cell(SC) proliferation and differentiation organize tissue homeostasis. However, how SCs regulate coordinate tissue scaling in dynamic organs remain unknown. We found that interfollicular epidermal SCs (IFESCs) shape basal epidermal proliferating clusters (EPCs) in expanding abdominal epidermis of pregnant mice and proliferating plantar epidermis. Clonal lineage tracing revealed that Tbx3+ BC clones emerge in the abdominal epidermis during pregnancy, followed by differentiation after parturition. In the plantar epidermis, Tbx3+ BCs are sustained as long-lived SCs to maintain EPCs invariably. We showed that Tbx3+ BCs are vasculature-dependent IFESCs and identified mechanical stretch as an external cue for the vasculature-driven EPC formation. Our results uncover vasculature-mediated IFESC regulations, which explain how the epidermis adjusts its size in orchestration with dermal constituents in dynamic skin.

研究分野：細胞生物学

キーワード：皮膚 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

皮膚は表皮、真皮、皮下組織からなり、表皮は基底層、有棘層、顆粒層、角質層から形成される。表皮の恒常性における古典的モデルは、**Epidermal proliferation unit (EPU)**と呼ばれる。細胞周期の遅い幹細胞が各 EPU に 1 つ存在し、幹細胞は非対称分裂により、**Transit-amplifying (TA)**細胞を産生する。TA 細胞は、数回分裂した後、分化細胞になるとされている。一方、基底層は増殖能と分化能をもった前駆細胞の単一集団から形成され、細胞運命は確率論的に決定されるとする確率論的モデル(**Stochastic model**)が近年、提唱されてきている。現在、表皮では表皮基底細胞全てが均一な表皮幹細胞であるとする確率論的モデルが支持され、主流となっている。表皮幹細胞の増殖、分化は、皮膚の面積拡張や新陳代謝、恒常性維持に必須の役割を果たすが、成体での表皮幹細胞に関する報告は少ない。しかし、我々の研究によって、急激な皮膚の増殖が起きると考えられる妊娠期腹側表皮では、性質の異なる表皮幹細胞の出現が明らかとなった。この性質の異なる細胞群は増殖能が高く、転写因子である **T-box3(Tbx3)**を発現していることも明らかにしている。さらに、妊娠期だけでなく、創傷治癒の際にも **Tbx3** 陽性細胞は表皮で出現する。しかし、増殖能の高い **Tbx3** 陽性細胞がその後も幹細胞としての能力を維持しているか、あるいはターンオーバーによって排除されるかなどの性質に関しては不明であった。

2. 研究の目的

本研究では妊娠・出産に着目し、高い増殖能を有する表皮幹細胞の **Characterization** を解明することを研究目的とする。毛包間表皮幹細胞は単一集団と考えられている。本研究による **Single cell RNA sequence** によって各細胞集団を特性化していくことで、毛包間表皮幹細胞の異質性(**heterogeneity**)の可能性を言及でき、**Characterization** を行うことができる。幹細胞が分化する機構というのは多くの研究が報告されてきた。しかし、高い増殖能を獲得した表皮幹細胞それ自体の特性については、着目されてこなかった。そこで本研究では、高増殖能を有する幹細胞が周囲の細胞にシグナルを伝える、あるいは増殖クラスターの同定を目指す。これまで、組織幹細胞が高い増殖能を獲得する機構は報告されている。しかし、高い増殖能を獲得した後、その幹細胞が組織中から排除されるか、もしくは、高い増殖能を獲得する前の状態に戻るのかについては報告が非常に少ない。この問題を明らかにするために、妊娠・出産期における表皮幹細胞は適切なモデルであると考えられる。我々の予備データによって、高い増殖能を獲得した細胞の細胞系譜解析を行った結果、出産後、他の表皮幹細胞と比較し、一時的に高増殖能を獲得した細胞は増殖が抑制されている可能性が示唆されている。つまり、一時的に増殖能を獲得した細胞は過増殖を抑制する機構が備わっている可能性がある。この機構は幹細胞の維持に

重要であると考えられる。過増殖抑制機構の変異が老化、癌に関与していることが予想される。よって、本研究は皮膚科学、幹細胞研究だけでなく、老化、癌研究など、さまざまな分野において意義のある研究である。

3. 研究の方法

(1) 増殖クラスターの同定

野生型、妊娠 16 日目、表皮特異的に Tbx3 をノックアウトしたマウス (Tbx3cKO) の妊娠 16 日目マウスの腹側から表皮基底細胞をセルソーターを用いて回収し、RNA sequence を行った。

(2) Tbx3-CreERT2/R26-H2B-EGFP マウスのラベルトレース

Keratin14-CreERT2/R26-H2B-EGFP マウスと Tbx3-CreERT2/R26-H2B-EGFP マウスの妊娠 16 日目に tamoxifen を投与し、出産後に wholemount staining によって腹側皮膚を観察した。足裏皮膚についても wholemount staining によって腹側皮膚を観察した。

(3) 血管と Tbx3 陽性細胞との関係を解明

非妊娠、妊娠期、出産後の腹側真皮、足裏真皮の血管量を定量する。真皮で血管量が増加するマウス (K14VEGF マウス) を用いて、表皮に Tbx3 陽性細胞が多くなるかについて検討する。

4. 研究成果

(1) 増殖クラスターの同定

RNA sequence の結果、さらにすでに実施していた非妊娠、妊娠 16 日目、出産後腹側表皮基底細胞の Single cell RNA sequence の結果から、Tbx3 が制御する遺伝子として ADAM Metallopeptidase Domain 8 (Adam8) と Peptide YY (Pyy) が同定された。免疫染色を行うと Tbx3 陽性細胞の周囲に Adam8 陽性細胞が存在することがわかった。Adam8 KO マウスの妊娠 16 日目腹側では野生型と比較し、表皮基底細胞の増殖が低下していた。recombinat Pyy を非妊娠腹側皮膚に皮内注射すると表皮基底細胞の増殖が亢進していた。以上のことから、Tbx3 を中心とする増殖クラスターが存在することが明らかとなった。

(2) Tbx3-CreERT2/R26-H2B-EGFP マウスのラベルトレース

Keratin14-CreERT2/R26-H2B-EGFP マウスでは表皮幹細胞をトレースできるので出産後も EGFP 陽性細胞を表皮中に観察できた。しかし、Tbx3-CreERT2/R26-H2B-EGFP マウスでは出産後 30 日目までは EGFP 陽性細胞を観察できたが、出産後 180 日目には観察されなかった。足裏表皮でも同様にラベルトレースを行った結果、腹側皮膚とは異なり、

tamoxifen を投与後、1 年経過しても EGFP 陽性細胞は確認できた。つまり、足裏皮膚では Tbx3 陽性細胞を表皮中に留めておくことのできる機構が存在することが考えられた。

(3) 血管と Tbx3 陽性細胞との関係を解明

非妊娠、妊娠期、出産後の腹側真皮、足裏真皮の血管量を定量した結果、妊娠期腹側真皮と足裏真皮では非妊娠、出産後の腹側真皮と比較し、血管量が多いことがわかった。K14VEGF の非妊娠腹側皮膚を免疫染色すると表皮基底細胞の増殖率、Tbx3 陽性細胞の割合が亢進していた。つまり、Tbx3 が表皮基底層に留まるためには血管が重要であることが明らかとなった。

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 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 - |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 一條遼 |
| 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 |

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|