

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21601

研究課題名(和文)組織の硬さと新陳代謝の関連解析

研究課題名(英文)Tissue stiffness and metabolism

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、皮膚のかたさが表皮幹細胞の形質におよぼす影響と皮膚老化との関連の解明を目的とした。マウス足底部皮膚をモデルとして、皮膚のかたさを測定した結果、加齢に伴い真皮が硬くなることが分かった。またメカノセンサーPiezo1がかたさに依存して活性化し、長期カルシウムパルスが発生することにより、表皮幹細胞の分化とヘミデスモソームの減弱化が誘導されることが明らかとなった。加齢に伴う真皮の硬化は体表血管の退縮が原因であり、体表血管を増強したマウスでは、真皮の硬化や表皮幹細胞の老化形質が抑制された。また、加齢皮膚では真皮線維芽細胞から炎症性タンパク質Pt3が分泌され、血管退縮が誘導されることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

表皮幹細胞の老化は、酸化ストレスによるDNAダメージなどの細胞内要因により誘導されることが知られているが、幹細胞を取り巻く微小環境との因果関係については不明であった。本研究では、老化にともなう体表血管の退縮が真皮の硬化を誘導し、かたさ依存的に表皮幹細胞のメカノセンサーが過剰に活性化することで老化形質が誘発されることを明らかにした。また、体表血管の退縮を引き起こす分泌因子としてPt3を同定し、幹細胞微小環境での生化学シグナルと力学シグナルの協働による皮膚老化機構を提唱した。本成果は、皮膚のインチエイジング技術開発の新たなシーズを提示するものである。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the relationship between skin stiffness and interfollicular epidermal stem cell (IFESC) dysregulation during aging. We found that skin dermis stiffened with age in mouse planter skin. The dermal stiffness causes prolonged activation of mechanosensor Piezo1 in IFESC, that leads to augmented epidermal stem cell differentiation and hemidesmosome fragility via prolonged calcium influx. The dermal stiffening with aging was caused by the vasculature involution, and ectopic angiogenesis soften the dermis and ameliorate epidermal stem cell aging. In aged skin, dermal fibroblasts secrete the inflammatory protein Pt3, which induces vascular involution.

研究分野：生物学

キーワード：幹細胞 メカノバイオロジー 皮膚 加齢・老化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚は、「触」「圧」などの外因的機械刺激や、体形変化に伴う表面積の「拡張」「収束」などの内因的機械刺激を常に受けている。これらの機械刺激に対応して皮膚の恒常性を維持するためには、表皮細胞の新陳代謝が必須である。しかし、機械刺激と皮膚の新陳代謝をつなぐ分子メカニズムや、メカノセンサーの役割は不明である。研究代表者は、胎児の成長に伴い急速に伸展する母体腹部の伸展機構について研究を進めてきた。これまでに、妊娠マウスの腹部皮膚において、表皮幹細胞から高い増殖能を持つ transit amplifying (TA)細胞が表皮基底層に産生されることを見出した。この細胞群は、転写因子 Tbx3 発現細胞 (Tbx3+基底細胞) を含み、腹部表皮特異的に Tbx3 をノックアウト (Tbx3cKO) すると TA 細胞が減少し、妊娠に伴う皮膚伸展が顕著に抑制される。この Tbx3+基底細胞は、妊娠期に真皮で増加する α -SMA/vimentin 陽性細胞からの分泌シグナル (Igfbp2 など) によって誘導されることから、真皮 表皮の相互作用による皮膚の伸展機構の存在が明らかとなった。さらに、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が分かった。また、皮膚に張力負荷をかけると、非妊娠マウス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。

組織内の機械刺激として、張力に加えて「かたさ」が挙げられる。生体は、体の部位によって組織の硬さが異なる。同一の器官の中でも領域によって組織の硬さは異なり、例えば皮膚は、足裏に限ってみても、踵や足先は硬いが、中央部 (土踏まず) は柔らかい。このような組織の硬さの違いは、内部に存在する細胞のダイナミクスや組織の新陳代謝の違いに反映されると予想されるが、その実態は不明である。皮膚表皮の新陳代謝では、表皮幹細胞の増殖、分化、分裂軸、基底膜離脱が重要な要因であるが、加齢マウスでは、表皮基底細胞の分化と非対称分裂が亢進し、ヘミデスモソームが脆弱化することが報告されている。組織の硬さはライフステージによっても変化すると考えられるが、その定量的な測定や加齢に伴う表皮幹細胞の変容との関連も不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、皮膚をモデルとして皮膚の硬さが表皮幹細胞の増殖・分化に及ぼす影響を明らかにし、老化にともなう幹細胞枯渇のメカニズムを、組織の硬さとメカノセンサーの観点から解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 真皮の硬さが表皮幹細胞の形質に及ぼす影響の解析

成体マウスの足底部皮膚をモデルとして、老化に伴う皮膚のかたさの変化と表皮幹細胞の形質変化を定量化する。基質の硬さ依存的に表皮幹細胞の増殖・分化が制御される機構を解明する。基質の硬さを感知する表皮幹細胞のメカノセンサーを特定し、野生型とメカノセンサーKOのマウス新生仔から表皮幹細胞を単離し、真皮の弾性率を模倣したコラーゲンゲル上、あるいは若齢・加齢マウスの真皮上で培養し、増殖・分化の割合を計測する。KO マウスを加齢させ、表皮基底層の増殖・分化率を計測する。メカノセンサーが、基質の硬さ依存的に表皮幹細胞の分化を促進することで、表皮の新陳代謝を誘導する可能性を検証する。

(2) 真皮の硬さと血管の関連解析

組織構築には、血管が必須の役割を果たす。我々は以前の研究で、体表血管の増加が皮膚の伸展と新陳代謝を促すことを見出した。そこで本研究では、血管の退縮が皮膚の硬化を誘導する可能性を検証する。また、老化に伴う表皮幹細胞の枯渇と血管退縮の関連を解析する。

(3) 皮膚の老化に伴う真皮硬化を誘導する分子の探索

若齢、加齢マウスの後肢皮膚から真皮を単離し、scRNAseq 解析を行う。特に線維芽細胞に着目し、加齢マウスで発現変動する遺伝子群を特定する。血管新生に関わる液性因子に焦点を当て、KO マウスを加齢させて、真皮の硬さと表皮幹細胞の形質について野生型マウスと比較する。

4. 研究成果

(1) 真皮の硬さが表皮幹細胞の形質に及ぼす影響の解析

加齢マウスでは、皮膚表皮基底細胞のヘミデスモソーム脆弱化と、それに伴う非対称分裂、細胞分化が亢進することが報告されている。これらの形質変化の原因を探るため、足底部の表皮基底細胞の RNAseq 解析を実施した。GO 解析の結果、加齢マウスで発現低下する遺伝子群には細胞外基質関連因子が濃縮していた。一方、加齢マウスで発現上昇する遺伝子群にはカルシウムシグナルに関わる遺伝子発現が共通に上昇していることが分かった。カルシウムはケラチノサイトの分化やヘミデスモソームの乖離を誘導することが培養細胞で報告されている。そこで、K14creERT2; R26GCaMP3 マウスを用いて足底部皮膚のカルシウムイメージングを行ったところ、加齢マウスでは、ともに、40 秒以上の持続的な長期カルシウムパルスが優位に頻発して

いることが分かった。次に、AFMによる2次元フォースマップにより皮膚のかたさを測定した結果、加齢マウスでは真皮がかたくなっていることが分かった。また、メカノセンサであるPiezo1を表皮基底細胞特異的にKOしたところ加齢皮膚で起こる長期カルシウムパルスの頻度が減少した。さらに、Piezo1 cKOマウスでは、加齢による表皮基底細胞の分化亢進、ヘミデスマソームの脆弱化、非対称分裂の亢進が抑制されており、基底細胞の形質が改善していることが分かった。次に、若齢と加齢マウス皮膚のかたさを模倣したハイドロゲルを作成し、その上でprimaryケラチノサイトを培養したところ、加齢皮膚と同等の硬いゲルの上では、若齢皮膚と同等の柔らかいゲル上での培養と比べ、ケラチノサイトの分化とヘミデスマソームの減弱が亢進した。一方、Piezo1 cKOマウスから単離したケラチノサイトは、硬いゲル状での分化亢進やヘミデスマソームの減弱が抑制された。以上の結果から、加齢による真皮の硬化が表皮基底細胞でのPiezo1の持続的活性化を誘導し、カルシウムが持続的に流入することによって、表皮幹細胞の分化やヘミデスマソームの脆弱化が起こることが示された。

(2) 真皮の硬さと血管の関連解析

加齢マウスの足底部の皮膚では、体表血管が減少しコラーゲン繊維も脆弱化していることが分かった。そこでK14-VEGFマウスを用いて体表血管を人為的に増やしたところ、このマウスでは老化しても体表血管は維持されるとともに、コラーゲン繊維も若齢マウスと同レベルに発達していた。さらに、血管誘導した皮膚では、加齢に伴う真皮の硬化も抑制され、表皮基底細胞の老化表現型(COL17の減少、分裂軸異常)も緩和された。次に、血管内皮細胞特異的VEGFR2 cKOマウスを用いて血管新生を阻害したところ、若齢マウスにおいてコラーゲン繊維が脆弱化し、真皮の硬化と表皮基底細胞の老化表現型が誘導された。従って、体表血管の減少により皮膚の老化が誘導されることが示された。

(3) 皮膚の老化に伴う真皮硬化を誘導する分子の探索

次に、加齢による体表血管の退縮を誘発する因子を探った。このため、加齢マウスの皮膚真皮の単一細胞遺伝子発現解析を実施した。真皮の全細胞情報から線維芽細胞クラスターを抽出しクラスター解析を実施した結果、線維芽細胞は4つのクラスターに分類され、そのうちの一つのクラスターの割合が、加齢で減少していた。GO解析から、このクラスターでは活性酸素や代謝関連因子が濃縮されていることが分かった。興味深いことに、多くのGOクラスターに炎症性タンパク質であるPtx3が含まれており、加齢により真皮で発現が上昇していた。Ptx3は、補体の活性化やマクロファージの貪食促進など多様な機能を持つ液性因子であり、血管新生阻害効果も報告されている。そこで、加齢による体表血管の退縮におけるPtx3の関与を検証した結果、Ptx3 KOマウスでは、加齢による血管退縮が抑制され、真皮の硬化が改善され、表皮基底細胞の分化亢進、ヘミデスマソームの脆弱化、非対称分裂の亢進も抑制されていた。さらに、ヒトの皮膚臨床検体において、高齢(60歳)の皮膚では若齢(25歳)に比べて真皮でのPtx3の発現が亢進していた。これらの結果から、加齢に伴い、真皮線維芽細胞からPtx3の発現が上昇し、それが血管の退縮と真皮の硬化、表皮基底細胞の機能低下を誘発していることが示された。

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 Ryo Ichijo, Koichiro Maki, Mio Kabata, Teruasa Murata, Arata Nagasaka, Seiichiro Ishihara, Hisashi Haga, Tetsuya Honda, Taiji Adachi, Takuya Yamamoto, Fumiko Toyoshima | 4. 巻 in press |
| 2. 論文標題 Vasculature atrophy causes a stiffened microenvironment that augments epidermal stem cell differentiation in aged skin | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Nature Aging | 6. 最初と最後の頁 in press |
| 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 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 1件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 豊島文子 |
| 2. 発表標題 Vasculature atrophy causes a stiffened microenvironment that augments epidermal stem cell differentiation in aged skin |
| 3. 学会等名 第19回幹細胞シンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年 2022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 |
|---------|---------|
|---------|---------|