

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09775

研究課題名(和文) 表皮角化幹細胞の外部環境変化による糖尿病性足潰瘍発症機序の解明

研究課題名(英文) Changes in the epidermal stem cell niche during the development of diabetic foot ulcers

研究代表者

松崎 恭一 (Matsuzaki, Kyoichi)

国際医療福祉大学・医学部・主任教授

研究者番号：20278013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究から、糖尿病性足潰瘍では表皮角化幹細胞の遊走能が低下していることが明らかになった。さらに、培養ヒト表皮角化幹細胞培養系を用いた研究から、表皮角化幹細胞の遊走能の維持には、EGF受容体活性化によるTIMP-1の発現上昇と、それによるXVII型コラーゲンタンパク質の安定化が必須であることを見出した。以上の結果から、糖尿病性足潰瘍発症の一因は、EGF受容体シグナルの低下によるTIMP-1の発現低下およびXVII型コラーゲン分解による表皮角化幹細胞の遊走能の減弱であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGF受容体シグナルの活性化によってヒト表皮角化幹細胞周辺のタンパク質分解酵素の活性が低下し、その結果、表皮角化幹細胞の機能が維持されることが明らかとなった。この結果は、学術的にはヒト表皮角化幹細胞ニッチの条件を明らかにしたものである。この条件を制御することで糖尿病性足潰瘍の治療法開発につながる可能性があり、本研究は大きな社会的意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：These studies revealed that the migratory ability of epidermal keratinocyte stem cells is decreased in diabetic foot ulcers. Furthermore, studies using cultured human epidermal keratinocyte stem cell lines revealed that increased expression of TIMP-1 by EGF receptor activation and the resulting stabilization of type XVII collagen protein are essential for maintaining the migratory ability of epidermal keratinocyte stem cells. These results suggest that one of the factors contributing to the development of diabetic foot ulcers is a decrease in TIMP-1 expression due to reduced EGF receptor signaling and a decrease in the migratory ability of epidermal keratinizing stem cells due to type XVII collagen degradation.

研究分野：形成外科

キーワード：糖尿病 難治性潰瘍 表皮角化細胞 幹細胞 XVII型コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

表皮角化幹細胞は、分化能を維持するとともに高い増殖活性も兼ね備えたホロクローンである。ホロクローンは、増殖活性の低いパラクローンへ変化する。この現象はクローナル・コンバージョンと呼ばれ、表皮角化幹細胞の機能不全に関与すると考えられている。

糖尿病性足潰瘍は体幹部の創傷に比べて、治癒の遷延がみられることから、表皮角化幹細胞にクローナル・コンバージョンを生じている可能性が考えられた。そこで糖尿病性足潰瘍の創縁と体幹部から表皮角化細胞を単離し、両者のクローナル・コンバージョンを検討したところ、有意差はなく、創縁においても表皮角化幹細胞は維持されていた (Toki et al, Regen Ther 2020)。しかし幹細胞の機能は外部環境にも影響されるため、表皮角化幹細胞の周辺環境を検討する必要性が新たに生じた。

ヘミデスモゾーム構成蛋白で膜貫通型接着分子である $\alpha 6 \beta 4$ インテグリンと XVII 型コラーゲンは複合体を形成している。この複合体を介して、表皮角化幹細胞は基底膜内分子のラミニン 332 と結合している。研究分担者の難波は、 $\alpha 6 \beta 4$ インテグリンや XVII 型コラーゲンが、表皮角化幹細胞の遊走能や自己複製能に必須であることを明らかにした (Nanba et al, J Cell Biol 2015; Liu et al, Nature 2019)。XVII 型コラーゲンは生体内で種々のタンパク質分解酵素によって分解される。XVII 型コラーゲンの分解は表皮角化幹細胞の動態に直接作用し、創傷治癒に大きな影響を与える (Jackow et al, J Invest Dermatol 2016)。そのため表皮角化幹細胞の外部環境、特に XVII 型コラーゲン分解系の変化が、糖尿病性足潰瘍の発症に関与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

糖尿病性足潰瘍創縁の表皮角化幹細胞の動態と外部環境変化を、XVII 型コラーゲンとその制御に関与する分子に着目して解析する。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病性足潰瘍創縁における表皮角化幹細胞動態の解析

糖尿病性足潰瘍罹患患者より再建手術の際に得られる余剰皮膚を採取し、細胞培養用ディッシュに静置し、Explant 法によってヒト皮膚片からの角化細胞の遊走 (再上皮化) が、どのように変化するかを明らかにした。

(2) ヒト表皮角化幹細胞における XVII 型コラーゲンの発現制御機構の解明

3T3 フィーダー細胞を用いた Green 型ヒト表皮角化幹細胞培養系において、生化学的手法を用い、XVII 型コラーゲンの発現や、XVII 型コラーゲンタンパク質の分解制御に関与する分子の同定や機能解析を行った。

(3) XVII 型コラーゲンの再上皮化における役割の解明

ヒト表皮角化幹細胞培養系において、細胞生物学的手法を用い、XVII 型コラーゲンの発現や、XVII 型コラーゲンの再上皮化における役割の解明を行った。

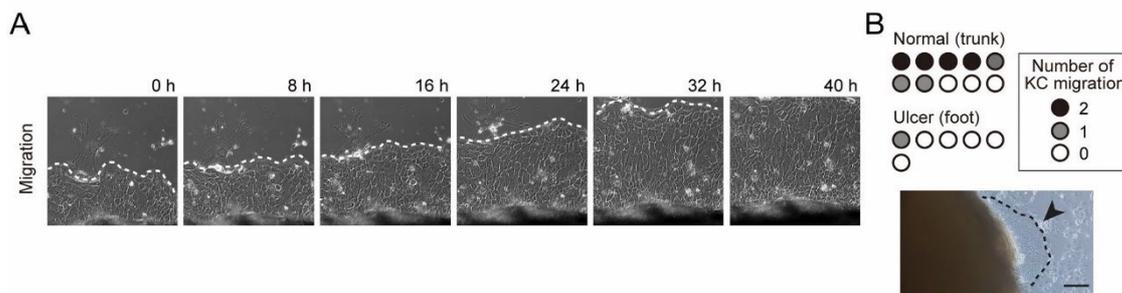
4. 研究成果

(1) 糖尿病性足潰瘍創縁における表皮角化幹細胞動態の解析

糖尿病性足潰瘍罹患患者の再建手術の際に生じる余剰皮膚を用い、Explant 法で培養することで、皮膚片より、角化細胞が集団として遊走してくることを確認した【下図 A】。これは、創傷治癒における再上皮化のモデルとなる実験系である。初めに、潰瘍が存在しない体幹部の皮膚を解析したところ、10 個の皮膚片のうち、4 つの皮膚片で、2 つの角化細胞集団の遊走が見られた。また残りの 3 つの皮膚片では 1 つの細胞集団の遊走を認めたが、3 つの皮膚片では、遊走が見られなかった【下図 B】。

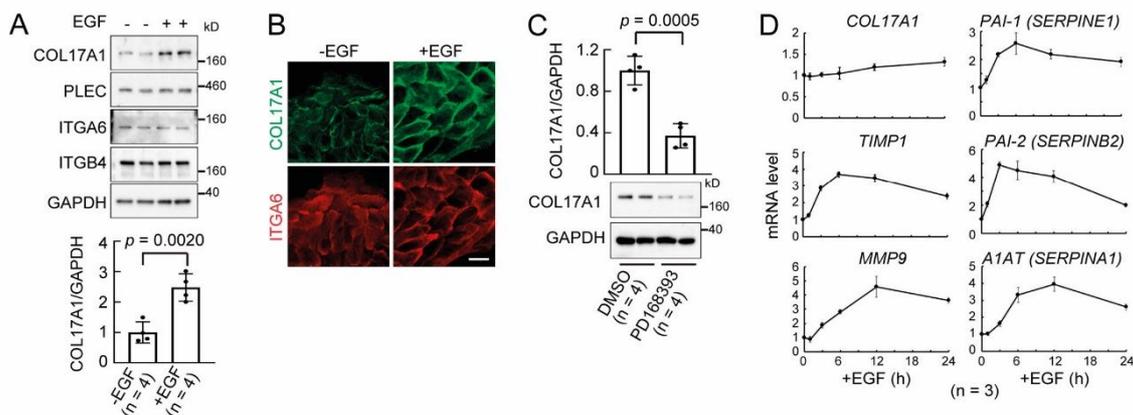
一方、下肢にある潰瘍部分の皮膚片を解析したところ、6 つの皮膚片のうち、1 つの皮膚片において、1 つの角化細胞集団の遊走を認めたが、残りの 5 つの皮膚片では、細胞集団の遊走がみられなかった【下図 B】。以上の結果は、培養 3 週間における角化細胞集団の遊走を評価したものであり、潰瘍部分において、表皮角化細胞集団の遊走は抑制されていることが明らかになった。

しかしながら、培養 3 週間以上を経過した後は、潰瘍部位の皮膚からも角化細胞集団の遊走を観察することができた。この結果は、以前に我々が報告しているように (Toki et al, Regen Ther 2020)、潰瘍部分においても、表皮角化幹細胞や角化細胞の能力は保持されており、周辺環境の影響が減弱することで、本来の角化幹細胞や角化細胞の能力が健在化したものと考えられる。



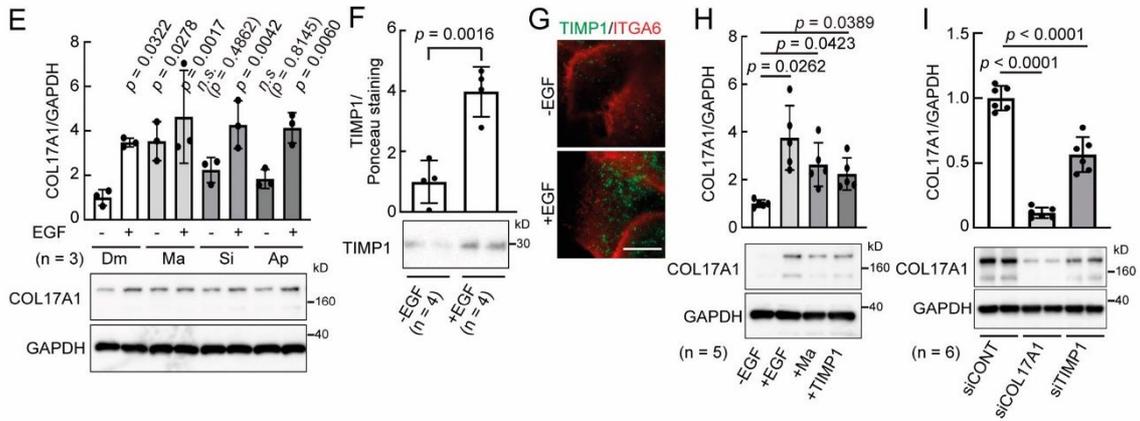
(2) ヒト表皮角化幹細胞における XVII 型コラーゲンの発現制御機構の解明

我々は、表皮角化幹細胞の遊走に関与すると考えられている XVII 型コラーゲン (COL17A1) の制御機構を明らかにするため、ヒト表皮角化幹細胞培養系を用いて実験を行った。まず表皮角化細胞の遊走に必須である表皮成長因子 EGF で角化細胞を刺激したところ、角化細胞の遊走に関与するヘミデスモソーム構成分子群の中で、唯一、XVII 型コラーゲンの発現上昇が観察された【下図 A-C】。mRNA の発現解析を行ったところ、XVII 型コラーゲンの mRNA は、EGF 刺激によっても上昇しないことが判明したため、EGF による XVII 型コラーゲンの発現上昇は、タンパク質分解制御によるものと考えた。そこで XVII 型コラーゲンの分解制御に関与する分子群 (タンパク質分解酵素および内在性酵素阻害タンパク質) の発現解析を行ったところ、メタロプロテアーゼである MMP-9、内在性のタンパク質分解酵素阻害タンパク質である TIMP-1、PAI-1、PAI-2、A1AT の mRNA が、EGF 刺激によって発現上昇することを見出した【下図 D】。



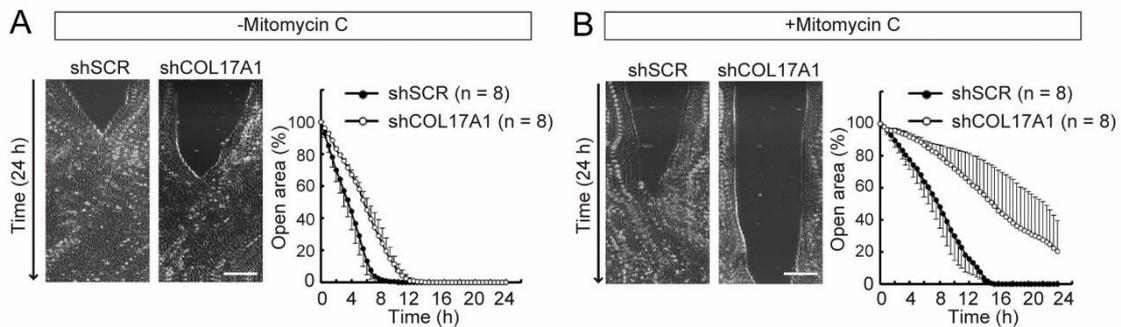
次に、これらの発現上昇した XVII 型コラーゲン分解制御タンパク質のうち、どれが EGF による XVII 型コラーゲンの分解制御に関与しているかを明らかにするため、まず、様々なプロテアーゼ阻害剤をヒト表皮角化幹細胞培養系に添加した。その結果、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤である Marimastat (Ma) の添加は、EGF を添加した場合と同様に、XVII 型コラーゲンの分解を抑制した。一方、セリンプロテアーゼの阻害剤である Sivelestat (Si) や Aprotinin (Ap) は、XVII 型コラーゲンの分解を抑制しなかった【下図 E】。以上の結果から、マトリックスプロテアーゼ阻害タンパク質である TIMP-1 が EGF による XVII 型コラーゲンタンパク質の発現上昇に関与していることが推測された。

そこで、EGF によってヒト表皮角化幹細胞で TIMP-1 タンパク質の発現が上昇するかを確認したところ、EGF 添加によって、TIMP-1 タンパク質の発現が有意に上昇した【下図 F&G】。続いて、TIMP-1 タンパク質が、実際にヒト表皮角化幹細胞において、XVII 型コラーゲンの分解抑制に関与しているかを明らかにするため、リコンビナント TIMP-1 を培養系に添加したところ、EGF を添加せずとも、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤 Marimastat を添加した際と同様に、XVII 型コラーゲンタンパク質の分解を抑制した【下図 H】。さらに、TIMP-1 の siRNA を用いて、その発現を培養系で抑制したところ、XVII 型コラーゲンタンパク質の分解が促進された【下図 I】。以上のことは、EGF 刺激によって EGF 受容体が活性化し、TIMP-1 の発現上昇から XVII 型コラーゲンの安定化につながる分子経路が存在していることを示している。



(3) XVII 型コラーゲンの再上皮化における役割の解明

最後に、XVII 型コラーゲンが、ヒト表皮角化細胞の遊走に關与しているかを明らかにするために、細胞遊走実験を行った。まずヒト表皮角化細胞において、shRNA による XVII 型コラーゲン発現抑制系を確立し、角化細胞集団に生じた間隙を埋める時間を測定したところ、XVII 型コラーゲン抑制によって、間隙の閉鎖時間が遅延した【下図 A】。さらに、マイトマイシンによって、細胞の増殖能を抑制した状態で同様の実験を行ったところ、閉鎖時間の大幅な遅延が觀察された【下図 B】。



以上のことは、ヒト表皮角化幹細胞には、EGFR 活性化による TIMP-1 の発現上昇によって、XVII 型コラーゲンタンパク質を安定化し、細胞の遊走能を維持する分子機構が存在することを表しており、糖尿病性足潰瘍などでは、この機構に何らかの障害が起き、再上皮化の遅延等が誘発されていると考えられる。本研究成果は、Nanba et al, J Cell Biol 2021 に誌上報告した。

< 引用文献 >

- Jackow et al, Generation of a Functional Non-Shedding Collagen XVII Mouse Model: Relevance of Collagen XVII Shedding in Wound Healing. J Invest Dermatol 136:516-525, 2016.
- Liu et al, Stem cell competition orchestrates skin homeostasis and ageing. Nature 568:344-350, 2019.
- Nanba et al, Cell motion predicts human epidermal stemness. J Cell Biol 209:305-315, 2015.
- Nanba et al, EGFR-mediated epidermal stem cell motility drives skin regeneration through COL17A1 proteolysis. J Cell Biol 220:e202012073, 2021
- Toki et al, Evaluation of the proliferative potential of skin keratinocytes and fibroblasts isolated from critical limb ischemia patients. Regen Ther 14:222-226, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	難波 大輔 (Nanba Daisuke) (10380255)	東京大学・医科学研究所・准教授 (12601)	

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