

令和 6 年 4 月 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12678

研究課題名(和文) 三次元器官の生体外構築を目指した哺乳類成体器官における形態形成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Identification of the morphogenetic mechanism of adult mammalian organs with the aim of in vitro construction of three-dimensional organs

研究代表者

武尾 真 (Takeo, Makoto)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：50782116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では哺乳類成体における形態形成メカニズムの解明を目的とし、マウスジグザグ毛をモデルに研究を行い、ジグザグ毛は約3.5日という新たな長日周期に従って形態変化することが明らかとなった。また、形態変化に先立ち、毛幹前駆細胞である毛母細胞と、そのマイクロニッチである毛乳頭クラスタの組み合わせが切り替わることが明らかとなった。このタイミングで発現量の増加するAff3、Ptnについて発現抑制または過剰発現を行った結果、変曲点形成リズムの乱れが生じた。また、老化マウスにおいても変曲点形成に乱れが認められた。これらのことから、哺乳類成体における形態形成メカニズムの細胞/分子メカニズムの一端が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、哺乳類成体における組織の形態形成メカニズムの一端が明らかになるとともに、老化個体では、この形態形成パターンが乱れることが明らかになった。これらの結果は、単に出生後の組織・器官形態がどのように維持されているかという発生学的問題を明らかにしただけでなく、幹細胞分野においてもニッチと前駆細胞の組み合わせが周期的に変化するという新たな視点をもたらした。また、老化現象が、生体リズムの乱れに起因する形態形成パターンの秩序性低下と考えられることから、本研究結果は加齢医学研究へも貢献できるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research, we aimed to identify the cellular and molecular mechanism of morphogenesis of tissue/organ in adult mammals. To this end, we used mouse zigzag hair shaft, which always bend 3 times, as a model system. By time course analysis of hair shaft morphology, we found that hair bend was formed according to the novel infradian rhythm with 3.5-day interval. We also found that the combination of hair matrix, a progenitor cell of hair shaft, and their micro-niche, dermal papilla, changes right before bend formation (niche switching). At this time point, Aff3 and Ptn genes are upregulated and suppression of forced activation of these genes result in the disturbance of the timing of niche switching and bend formation. In addition, the disturbance of the bend formation was observed aged mice. These results show the cellular and molecular mechanism of tissue morphogenesis in adult mammals.

研究分野：発生生物学

キーワード：器官再生 形態形成 リズム 毛包

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の器官は様々な細胞からなる複数の組織が三次元的配置することにより形作られる。器官再生研究はこの10年に発生生物学および幹細胞生物学との発展に伴い大きなブレイクスルーがもたらされ、胎児性の器官誘導能のある幹細胞からの外胚葉性器官の機能的な再生、および生物発生におけるボディープランを生体外で再現した多能性幹細胞や成体組織幹細胞からの多様なミニ器官の誘導が可能となった。しかしながら、成体の器官における形態形成メカニズムはいまだ明らかとなっておらず現在までにこれらの細胞を適切に組み上げて機能的な立体器官を作り出す技術は確立しておらず、三次元器官再生の実現のためには新たなブレイクスルーが必要とされている。

2. 研究の目的

本研究では機能的な三次元器官の生体外構築を目指した基盤技術の開発のため、成体器官における内在的形態形成メカニズムの解明と生体外における器官形態形成制御の実証のため、モデルシステムとして一本の毛幹が必ず3回変曲するという形態的特徴を持つ成体マウスジグザグ毛を用いて、1. 成体マウスジグザグ毛の周期的形態形成タイミングの特定、2. 形態形成過程の細胞および分子メカニズムの解明、3. 生体外における器官形態形成制御の実証を目的とした。

3. 研究の方法

1) 成体マウスジグザグ毛の周期的形態形成タイミングの特定

変曲点の形態的特徴を明らかにするため光学顕微鏡による毛幹の形態の解析に加え、共焦点顕微鏡による3次元画像の取得と高解像度形態解析を行った。また、変曲点の形態的特徴が毛幹形成過程のどのタイミングで形成されるのか明らかにするため、成体マウスの背部皮膚毛包を抜毛により同調的に成長期に誘導したのち、経時的に皮膚を採取し、皮膚内外の毛幹の形態的特徴の解析およびその定量解析を行った。

2) 形態形成過程の細胞および分子メカニズムの解明

細胞周期レポーターマウス(H2B-EGFP/Fucci594)を用いて *in vivo* におけるイントラバイタルイメージング、および変曲点形成過程において経時的に毛包を採取、共焦点顕微鏡により高解像度イメージを取得することにより、毛幹形成に参与している毛母細胞と毛乳頭細胞の挙動解析を行った。また、分子メカニズムを明らかにするため、RNA-Seqによって変曲点形成過程における遺伝子発現プロファイルを取得し、変曲点形成時期に発現量が増加すると予想された遺伝子について、リアルタイム qPCR および whole mount *in situ* hybridization による時空間的遺伝子発現解析を実施した。胎齢18日胚の背部皮膚から採取した表皮細胞または真皮細胞において、変曲点形成直前に発現量の増加が確認された遺伝子について、CRISPE-Cas9 システムまたはレンチウイルスシステムによってノックアウトまたは強制発現し、器官原基法による毛包再構成実験を行い、遺伝子の機能解析を行った。

3) 生体外における毛包発生方法の確立

生体外において形態形成過程を制御することにより三次元器官の構築が可能であるか明らかにするための基盤技術として、成体マウスから採取した毛包上皮性幹細胞と毛乳頭細胞を用いて、生体外において毛包の発生が可能な実験系の検討を行った。

4. 研究成果

1) マウスジグザグ毛の変曲点形成タイミングの特定

光学顕微鏡下における形態学的解析から、ジグザグ毛の変曲点(図1a-ii)では、他の領域(図1a-i および iii)と比較して毛幹の幅が細くなるとともに、色素が格納される構造である毛髄構造の間隔が広くなるということが明らかとなった(図1b)。また、ジグザグ毛を共焦点顕微鏡で三次元的に撮影し、各変曲点間の距離や変曲点の確度を解析したところ、7-8週齢マウスにおいては、各変曲点によってばらつきはあるものの、変曲点間距離は1.5~1.8mm、変曲点の角度は約160度と一定であることが明らかとなった(図1c および d)。一方、老齢マウス(86週齢)では、変曲点間隔と変曲角度にばらつきがあり、結果として毛幹の3次元形態に大きなばらつきが認められた(図1c および d)。これらの結果は、老化によって変曲点形成タイミングに乱れが生じることを示している。

変曲点の形態的特徴が毛幹成長過程のどのタイミングで形成されるか明らかにするため、毛幹成長中の毛包を解析した結果、毛幹が作り出される毛球部直上において既に変曲点の形態的特徴が認められた。このことから、変曲点は毛幹形成直後に作られることが明らかとなった。そこで、マウス背部体毛において同調的に毛包再生を誘導、経時的に毛包を採取し、各変曲点と毛球部間の距離を測定したところ、毛包再生誘導後17日目までは変曲点-毛球部間の距離は等比級数的に増加し、その後一定となることが明らかとなった(図1e)。また、各タイムポイント

の平均距離に対して設定した近似曲線からの逆算的計算から、毛幹の形成が誘導されてから 9.0 日後、12.3 日後、15.8 日後に、それぞれ第一、第二、第三の変曲点が形成されると推定された。これらの結果から、ジグザグ毛においては約 3.5 日間隔の長日周期に従い、変曲点が形成されることが明らかとなった。

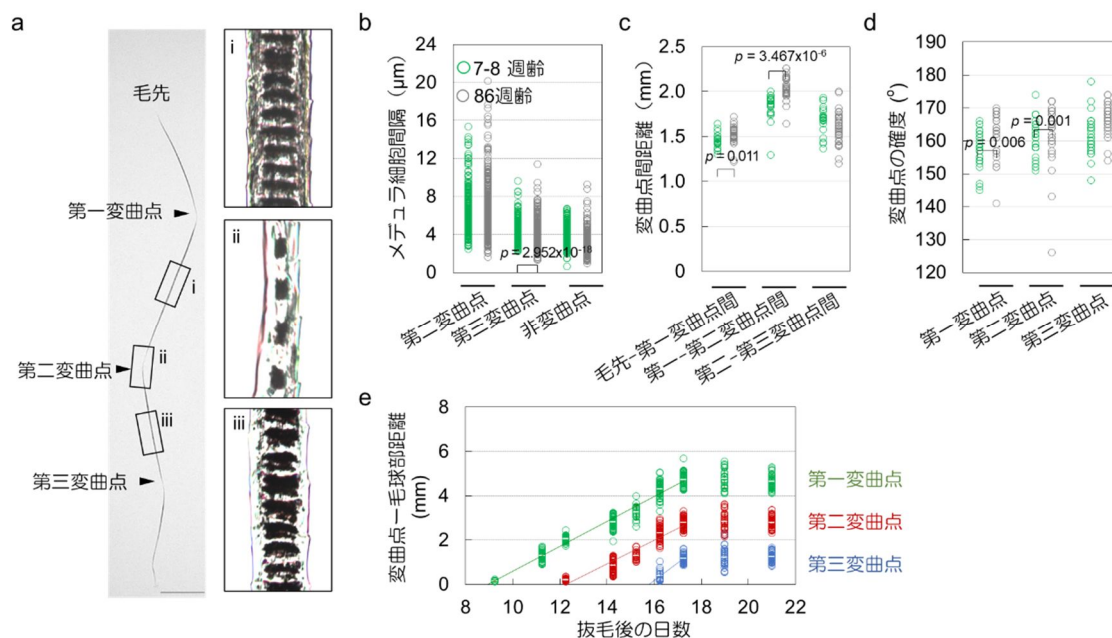


図 1. 成体マウスジグザグ毛幹の形態学的解析

2) 変曲点形成におけるの細胞および分子メカニズムの解明

毛は、毛包の根元にある毛球部において毛母細胞と毛乳頭の相互作用によって作られる。過去の研究から、毛乳頭細胞は C1 ~ C4 の 4 種類の細胞群 (クラスター) で構成され、それぞれ異なるマイクロニッチとして機能することが示されている。変曲点形成の細胞機構を明らかにするために、第二変曲点形成期の毛球部における毛母細胞と毛乳頭細胞の動態をライブイメージングおよび経時的に採取した皮膚サンプルを用いて解析した結果、3 日間の変曲点形成過程において、1 日に 1 回の周期で、毛乳頭を挟んで常に同じ側で左右非対称に、毛母細胞の一部に増殖停止領域が形成されること (図 2a 白丸) この増殖停止領域が、変曲点形成 3 日間のうち、1 日目と 2 日目では毛乳頭マイクロニッチの C2 クラスターのみ面に面するのに対し、変曲点が形成される 3 日目には C2 と C3 クラスターの両方に接するように切り替わることが明らかとなった (図 2a 赤矢頭)。また、C2 と C3 クラスターに接するように形成された毛母の増殖停止領域は、毛幹の成長に合わせて毛包上部へと移動するとともに肥大化することによって毛幹を押しつぶし、変曲点が形成されることも明らかになった。

次に、変曲点形成の分子機構を明らかにするために、変曲点形成過程 2 日目、2.5 日目、3 日目の毛球部をマイクロダイセクションによって単離し、RNA-Seq によって遺伝子発現解析を行った。その結果、細胞の挙動と複数の器官の上皮間葉相互作用の調節に関与する成長因子 (分泌因子) であるプレイオトロフィン遺伝子 (*Ptn*) と、複数の生物学的プロセスに関与する転写因子である ALF 転写伸長因子 3 遺伝子 (*Aff3*) が、変曲点形成直前の変曲点形成過程 3 日目に有意に発現量が増加することが明らかとなった。Whole mount *in situ* hybridization による時間的空間的遺伝子発現解析では、変曲点形成期間の 2 日目と 3 日目において、*Ptn* は毛母細胞の増殖停止領域で発現し、一方、*Aff3* は毛乳頭マイクロニッチ C3 において強く発現することが明らかとなった (図 2b 矢頭)。そこで、変曲点形成における *Ptn* と *Aff3* の機能を明らかにするために、胎齢 18 日胚の背部皮膚から採取した表皮細胞において *Ptn* を、真皮細胞において *Aff3* を CRISPR-Cas9 システムによって遺伝子発現を抑制、またはレンチウイルスシステムによって強制発現させた細胞を用いて器官原基法に依って再生毛包原基を作成し、ヌードマウス背部皮膚へ移植することによる機能解析を行った。再生した毛を観察すると、正常群では変曲点が 3 回形成されているのに対し、*Ptn* もしくは *Aff3* の発現を抑制した場合は変曲形成のタイミングがばらついたり、変曲点回数の減少が認められた (図 2c)。さらに、発現抑制系では毛母細胞の増殖停止領域の形成のタイミングが正常群とは異なることや、*Aff3* の発現抑制系においてはマイクロニッチの切り替えが阻害されることが明らかになった。これらの結果から、成体マウスジグザグ毛の形態形成においては毛乳頭の増殖停止領域と毛乳頭マイクロニッチの切り替えが重要であり、この過程に *Ptn* と *Aff3* が重要な役割を果たしていることが示された。

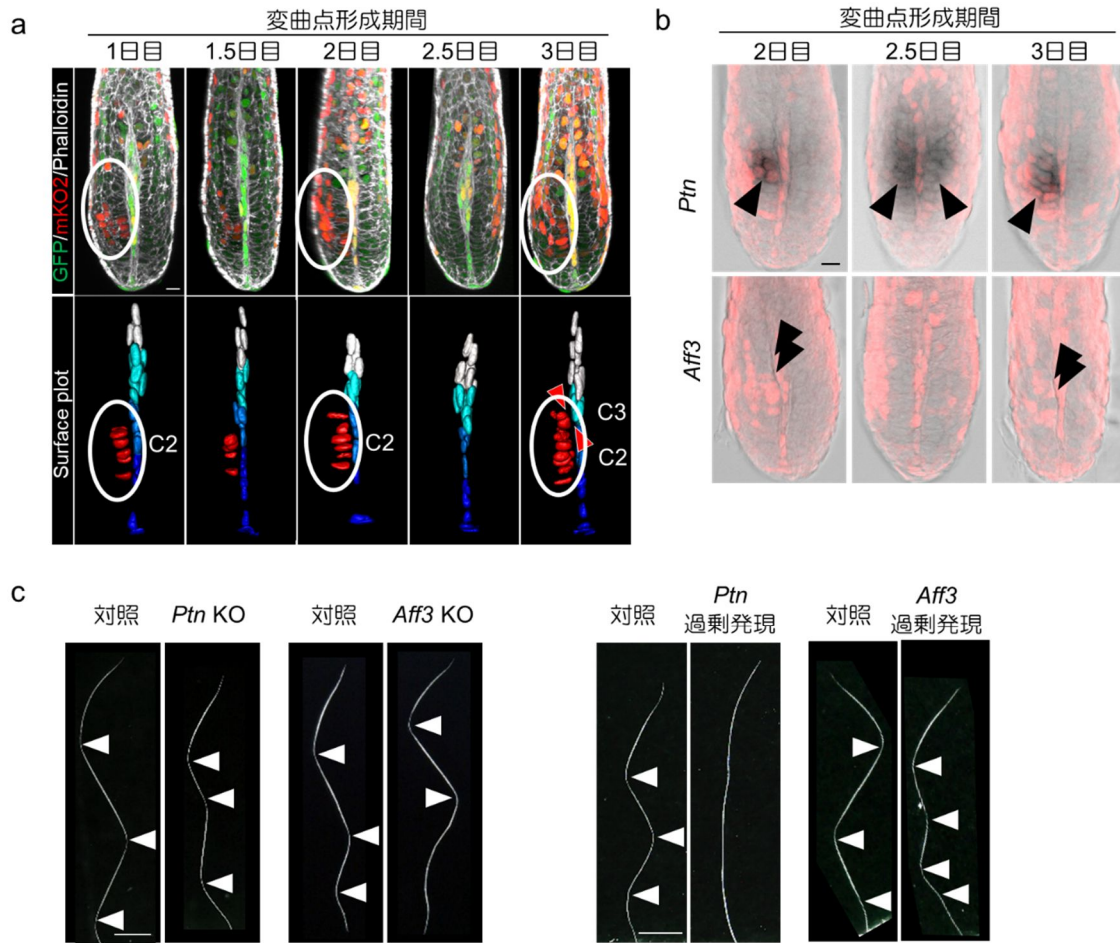


図2 変曲点形成過程における細胞動態、遺伝子発現解析および機能解析

3) 生体外における毛包発生方法の確立

生体外において形態形成過程を制御することにより三次元器官の構築が可能であるか明らかにするための基盤技術を確立するため、マウス胎児皮膚由来細胞を用いて「器官原基法」により再生毛包原基を作製し、生体外で発生させる培養条件の検討を行った。その結果、毛包発生時に作用するシグナル経路を活性化させることにより、生体外において再生毛包原基から成熟した毛包の形成が可能となった。

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 Takeo Makoto, Toyoshima Koh-ei, Fujimoto Riho, Iga Tomoyo, Takase Miki, Ogawa Miho, Tsuji Takashi	4. 巻 14
2. 論文標題 Cyclical dermal micro-niche switching governs the morphological infradian rhythm of mouse zigzag hair	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4478
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-39605-z	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 1.Makoto Takeo, Tomoyo Iga, Riho Fujimoto, Miki Takase, Koh-ei Toyoshima, Takashi Tsuji.
2. 発表標題 Cyclical dermal micro-niche switching governs the morphological infradian rhythm of mouse zigzag hair.
3. 学会等名 分子生物学会第45回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武尾真、豊島公栄、小川美帆、辻孝
2. 発表標題 周期的なニッチの切り替えがマウス体毛の形態リズムを司る
3. 学会等名 第11回皮膚の会
4. 発表年 2024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
研究分担者	辻 孝 (Tsuji Takashi) (50339131)	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・チームリーダー (82401)	

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
---------	---------