

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461660

研究課題名(和文) ヒト表皮多層化に伴う細胞動態とアクチン繊維動態の全系譜解析

研究課題名(英文) Lineage analysis of human epidermal keratinocytes and their actin filaments during stratification

研究代表者

難波 大輔 (NANBA, Daisuke)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：10380255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：表皮は組織として細胞を重層化させることによってバリア機能を維持しているが、同時に細胞は常に新しいものに置き換えられている。この表皮恒常性は、表皮角化幹細胞が担っているが、角化幹細胞がどのように多層化および自己複製組織である表皮を維持しているかは未だ明らかでない。本研究では、細胞動態に影響を与えるアクチン繊維に注目し、生きた培養ヒト角化幹細胞細胞でアクチン繊維を可視化する方法を確立した。その結果、角化幹細胞特異的な細胞動態や角化細胞の多層化の過程で特徴的なアクチン骨格の再編成が起こること、さらにアクチン骨格が幹細胞性維持に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The epidermis is a stratified squamous epithelium that functions as a bidirectional barrier. However, this barrier is maintained with dynamic behavior of keratinocytes. The epidermal keratinocyte stem cells contribute to epidermal homeostasis by supplying keratinocytes, and yet it is still unclear how the stem cells maintain this stratified epithelial tissue. In this study, we have investigated the actin cytoskeleton in human keratinocyte stem cells, because actin cytoskeletal system regulates cellular behavior. First, we have established the imaging system of actin filaments in living human keratinocytes with lifeact-venus probe. This probe elucidated the dynamics of actin filaments in human keratinocytes, and we found that the remodeling of actin filaments is involved in the migration and stratification of keratinocytes. We also found that actin cytoskeleton is involved in the stem cell maintenance.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：表皮角化細胞

1. 研究開始当初の背景

表皮組織の最大の機能の一つはバリアである。表皮は組織として細胞を重層化させることによって、この機能を維持している。表皮は外部から、角層、顆粒層、有棘層、基底層から構成され、バリア機能は角層と顆粒層に存在するタイトジャンクションが担っている。しかしながら、これらの層が形成されるには、基底層から有棘層を経て、顆粒層、角層へと角化細胞が分化しつつ、移動することが必須である。表皮角化細胞の基底層からの重層化プロセスの解明は、表皮のバリア機能形成を理解する上で最も必要な知識でありながら、未だにその機構は明らかでない。特に細胞動態に直接的に関与している細胞内アクチン繊維の再編成が、多層化に深く関与しており、このことは培養ヒト表皮角化細胞や遺伝子改変マウスの研究から明らかにされている。しかし、3次元構造を持つ表皮組織内で、角化細胞が分化しつつより体表面に近い層へ移動するという過程において、その細胞動態やそれに付随する細胞内アクチン繊維動態は、全く分かっていない。従って、ヒト表皮組織の多層化機構解明のためには、ヒト表皮角化細胞培養技術とライブイメージング技術を組み合わせた新規方法論の開発が必要である。

2. 研究の目的

(1) 申請者らは、最近、培養ヒト表皮角化細胞のライブイメージング観察から、表皮角化幹細胞が増殖活性を低下させるに伴って、上皮成長因子である Epidermal Growth Factor (EGF) に対する反応性を変化させること、そして、それが細胞内のアクチン繊維の配向性の変化によってもたらされることを明らかにした (Nanba et al., EMBO Mol. Med. 2013)。このように、申請者らは2次元のライブイメージング実験によって、ヒト表皮角化幹細胞の新たな細胞動態を明らかにしたが、この手法を3次元的に応用することで、これまで全く未知であった基底層の角化幹細胞集団から、如何にして、多層化した表皮組織が形成されるのかを細胞生物学的に明らかにすることが可能である。

(2) 本研究課題では、生細胞におけるアクチン繊維の可視化とレーザー顕微鏡によるイメージング、ヒト表皮多層化モデルの作製とそのライブイメージングの2つの技術を開発し、『ヒト表皮角化幹細胞から多層化した表皮組織が形成される全過程の細胞動態とアクチン繊維動態』を明らかにし、表皮組織形成の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) <実験系の確立> 生細胞のアクチン繊維蛍光プローブ Lifeact-Venus を導入したヒト表皮角化細胞を用いて、レーザー顕微鏡でライブイメージングが可能な2種類のヒト表

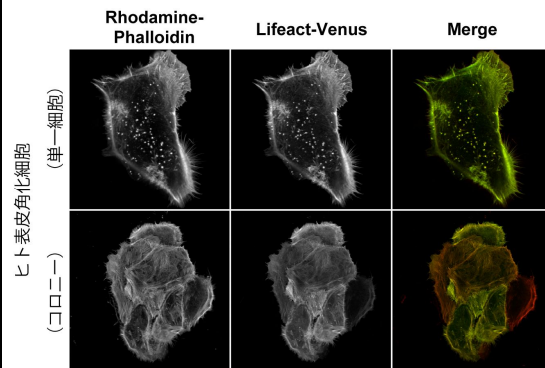
皮多層化モデルを作製する。

(2) <実験> レーザー顕微鏡を用いて、ヒト表皮多層化のライブイメージングを行う。角化細胞は緑色蛍光タンパク質である Venus でアクチン繊維を標識し可視化し、多層化に伴うアクチン繊維の再編成と細胞動態の詳細を明らかにする。

(3) <実験結果の解析> ライブイメージングの3次元の時系列データ解析から、アクチン繊維の動態変化と細胞の位置変化を明らかにする。特に多層化に伴う細胞移動の一般ルール見出し、モデル化することで、コンピューター内でヒト表皮の多層化を再現する。

4. 研究成果

(1) 細胞内アクチン線維に特異的に結合するペプチドに蛍光タンパク質である Venus を融合した Lifeact-Venus プローブをコードする cDNA を、レンチウイルスベクターによって、正常ヒト表皮角化細胞に発現させることに成功した。



【図：正常ヒト表皮角化細胞における Lifeact-Venus プローブの発現】

細胞内アクチン線維に結合する Rhodamine-Phalloidin と Lifeact-Venus は単一の角化細胞内で同一部位に存在する (上段)。また Lifeact-Venus の発現レベルがコロニーにおける細胞間で異なるが、Rhodamine-Phalloidin 染色の強度は同一であることから、Lifeact-Venus プローブが特異的であることが確認できた (下段)

(2) 正常ヒト表皮角化細胞を、マウス線維芽細胞である 3T3-J2 細胞を用いたフィーダー培養系によって培養を行った結果、角化細胞が自発的に多層化する過程を観察することに成功した。

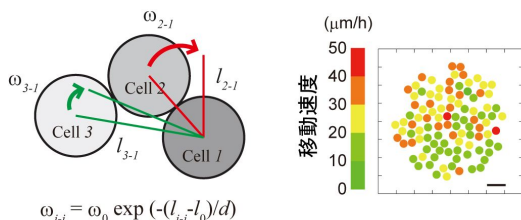
(3) 上記の Lifeact-Venus プローブを発現した正常ヒト表皮角化細胞を、フィーダー系で培養し、共焦点レーザー顕微鏡によるライブイメージングを行った結果、多層化過程での角化細胞動態および細胞内アクチン線維動態を観察することに成功した。

(4) Lifeact-Venus を用いたライブ・イメージング実験から、ヒト表皮角化幹細胞に特異的なアクチン線維動態を見出すことに成功した。このアクチン線維動態と、幹細胞性との関連性については、今後、解析予定である。

(5) ライブ・イメージング画像の詳細な解析から、ヒト表皮角化細胞が分裂しつつ、多層化を可能にする細胞動態を見出すことに成功した。

(6) 画像解析から得られた角化細胞動態をモデル化し、単一角化細胞から、多層化した角化細胞コロニーが形成される過程を計算機内でシミュレーションすることに成功した。このシミュレーション実験から、角化細胞の運動活性が、持続的なコロニーの成長に必須であることが明らかとなった。

表皮幹細胞の回転運動と細胞間相互作用のモデル化 シミュレーションによる表皮幹細胞集団運動の再現



【図：角化細胞動態の数値モデル化とシミュレーション】

角化細胞動態の一つである回転運動のモデル化(左)と、シミュレーションによる回転する100個の細胞が集積した場合の細胞運動の再現(右)。角化細胞の回転運動が、コロニーの成長に必須である細胞集団運動の駆動力であることが明らかとなった。

(7) フィーダーを用いた培養系において、正常に多層化が進行する角化細胞コロニーと、異常な多層化が進行する角化細胞コロニーが存在することを明らかにした。また、これらコロニー形成過程のライブ・イメージングから、角化細胞のある細胞動態が、正常な多層化に関連していること、また、上記のモデル化及びシミュレーション実験からを明らかにした。

この細胞動態を人為的に操作することで、表皮角化細胞の自発的な多層化過程を制御可能か、今後、検討する必要がある。また、可能であった場合には、重度熱傷の治療に用いられる自家培養表皮シートの形成速度や質を向上できる可能性があることから、臨床応用を視野に入れた研究へ発展させたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Hiraoka, C., Toki, F., Shiraiishi, K., Sayama, K., Nishimura, E.K., Miura, H., Higashiyama, S., and Nanba, D. (2016). Two clonal types of human skin fibroblasts with different potentials for proliferation and tissue remodeling ability. *Journal of Dermatological Science*, 82: 84-94. 査読有
doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.01.009.

Fukuda, S., Nishida-Fukuda, H., Nanba, D., Nakashiro, K.-I., Nakayama, H., Kubota, H., and Higashiyama, S. (2016). Reversible interconversion and maintenance of mammary epithelial cell characteristics by the ligand-regulated EGFR system. *Scientific Reports*, 6: 20209. 査読有
doi: 10.1038/srep20209.

Tate, S., Imai, M., Matsushita, N., Nishimura, E.K., Higashiyama, S., and Nanba, D. (2015). Rotation is the primary motion of paired human epidermal keratinocytes. *Journal of Dermatological Science*, 79: 194-202. 査読有
doi: 10.1016/j.jdermsci.2015.05.008.

Nanba, D., Toki, F., Tate, S., Imai, M., Matsushita, N., Shiraiishi, K., Sayama, K., Toki, H., Higashiyama, S., and Barrandon, Y. (2015). Cell motion predicts human epidermal stemness. *The Journal of Cell Biology*, 209: 305-315. 査読有
doi: 10.1083/jcb.201409024.

〔学会発表〕(計 11 件)

難波 大輔, Cell motion predicts epidermal stemness, 第12回幹細胞シンポジウム, 2014年5月31日、九州大学(福岡県福岡市)

難波 大輔, Cell motion predicts epidermal stemness, 日本細胞生物学会 第66回大会, 2014年6月11日、奈良県新公会堂(奈良県奈良市)

難波 大輔, Cell motion predicts epidermal stemness, EMBO|EMBL Symposium, Epithelia: The Building Blocks of Multicellularity, 2014年8月27-30日、ハイデルベルク(ドイツ)

難波 大輔, Cell motion predicts human epidermal stemness, 日本研究皮膚科学会 第39回大会, 2014年12月12-14日、ホテル阪急エキスポパーク(大阪府吹田市)

難波 大輔, Modeling epidermal regeneration

from a single keratinocyte stem cell. Gordon Research Conferences “Epithelial Differentiation & Keratinization”、2015年7月12-17日、ニューリー（米国）

難波 大輔、Two clonal types of human skin fibroblasts with different potentials for proliferation and tissue remodeling ability、日本研究皮膚科学会 第40回大会、2015年12月11日、岡山コンベンションセンター（岡山県岡山市）

難波 大輔、Kinetic analysis and modelling for understanding human keratinocyte behaviour in epidermal sheet formation、Singapore International Conference on Skin Research、2016年4月19日、バイオポリス（シンガポール）

難波 大輔、Kinetic analysis and modeling for understanding human keratinocyte stem/progenitor cell behavior in epidermal sheet formation、第14回幹細胞シンポジウム、2016年5月20日、淡路夢舞台（兵庫県淡路市）

難波 大輔、単一角化幹細胞からの多層化表皮シート形成を記述する細胞動力学モデル、日本細胞生物学会 第68回大会、2016年6月15日、京都テルサ（京都府京都市）

難波 大輔、A mechanistic principle of multilayered epithelial formation from single human epidermal stem cells、日本生物物理学会第54回年会、2016年11月25日、つくば国際会議場（茨城県つくば市）

難波 大輔、ヒト表皮角化幹細胞動態解析による表皮再生原理の解明、第16回日本再生医療学会、2017年3月8日、仙台国際センター（宮城県仙台市）

〔図書〕(計 1件)

難波 大輔、メディカルトリビューン、再生医療用語ハンドブック、2015、252-253

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/scm/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

難波 大輔 (NANBA, Daisuke)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・

准教授

研究者番号：10380255