133　マウス表皮をモデルとした幹細胞老化メカニズムの解明	佐田（西村）亜衣子

【目的】古典的なモデルにおいて、組織幹細胞は、細胞分裂頻度を低く抑えることで、分裂に伴って起こるDNA損傷・テロメア短縮等の影響を最小限にし、がん化や老化を防ぐと考えられてきた。しかし我々は近年、マウス表皮において、活発に分裂する幹細胞の存在を見いだした。従って、幹細胞の分裂頻度と老化メカニズムを再考する必要が生じた。本研究は、分裂頻度の異なる2つの独立した幹細胞を持つマウス表皮をモデルとし、幹細胞の老化メカニズムを、細胞・分子レベルで明らかにすることを目的として遂行した。

【方法】始めに、分裂頻度の異なる幹細胞間で老化表現型に違いが見られるかを野生型2歳齢マウス皮膚の組織学的解析により解析した。次に、分裂頻度の低い表皮幹細胞と高い表皮幹細胞では、細胞の性質や老化に対する応答・制御メカニズムに違いがあるのではないかという仮説のもと、若年マウスにおいて、分裂頻度の低い表皮幹細胞と高い表皮幹細胞の単離、トランスクリプトーム解析を行った。最後に、老化によって幹細胞ダイナミクスがどのような影響を受けるかを明らかにするため、細胞系譜解析を遂行した。

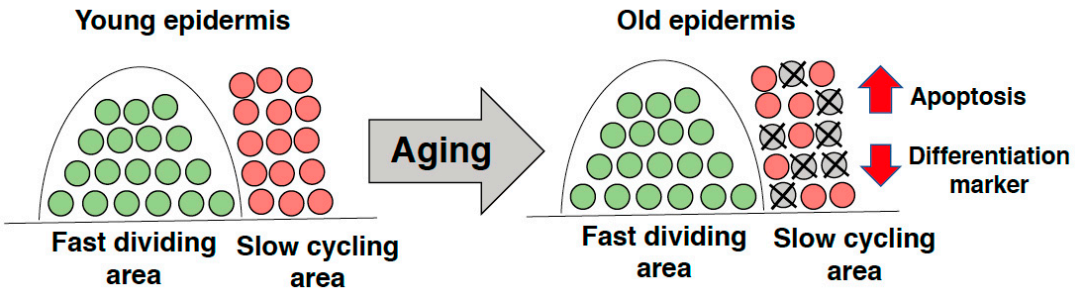
【結果】加齢マウスでは、分裂頻度の低い表皮幹細胞の局在領域において、アポトーシスの増加、DNA損傷の蓄積、分化マーカーの発現低下が見られた。細胞増殖は分裂頻度の低い表皮幹細胞でも高い表皮幹細胞でも全体的に減少傾向にあった。このように、当初の予想とは異なり、分裂頻度の高い幹細胞よりも、低い幹細胞でより顕著に加齢の影響が見られた。

分裂頻度の異なる幹細胞で2倍以上発現が高い遺伝子群のGene Ontology解析の結果から、分裂頻度の低い表皮幹細胞では、アポトーシス抑制に関わる遺伝子が高発現していることが推定された。さらに、2つの幹細胞集団では、代謝に関わる遺伝子群に発現の違いが見られることも分かった。このような遺伝子発現の違いが、老化、特にDNA損傷や分裂ストレスに対する細胞の応答性を変えている可能性が示唆された。

細胞系譜解析の結果、タモキシフェン投与1年後までは、2種類の表皮幹細胞は、それぞれ特異的な領域に位置しており、互いのニッチへの移動はほとんど観察されなかった。今後、一方の幹細胞の機能が低下した際に、もう一方の幹細胞が機能を補完するような現象が見られるかを、タモキシフェン投与2年後まで、時間経過を追って解析していく。

今後は、加齢マウス皮膚の組織学的解析の結果と、遺伝子プロファイリング、細胞系譜解析で得られた結果を総合的に解釈することで、組織・細胞レベルでの加齢変化を、分子レベルでの加齢変化と結びつける。また、表皮幹細胞の老化メカニズムが、表皮以外の幹細胞システムにも普遍的に存在するかに迫るため、他の組織においても、候補遺伝子群の発現・機能解析を遂行する。

分裂頻度の異なる表皮幹細胞の加齢変化



133. マウス表皮をモデルとした幹細胞老化メカニズムの解明

佐田（西村）　亜衣子

筑波大学 生命領域学際研究センター 細胞外環境応答研究プロジェクト

Key words：表皮幹細胞，老化，細胞分裂頻度，アポトーシス

緒　言

加齢に伴い、組織幹細胞の細胞増殖の低下・停止、早発分化、細胞死の増加、がん化、ニッチへの応答性の変化等が、単独、あるいは複合的に起こり、組織の機能不全や病変の一因となることが明らかにされつつある。しかし、マウス表皮においては、幹細胞の実態が長年不明であり、幹細胞レベルで、皮膚の老化や皮膚がん発症のメカニズムを解析することが困難であった。

古典的なモデルにおいて、組織幹細胞は細胞分裂頻度を低く抑えることで、DNA 損傷・テロメア短縮等の影響を最小限にし、老化やがん化を防ぐと考えられてきた［1，2］。一方、活発に分裂する細胞は TA 細胞と呼ばれ、幹細胞能力を持たないとされていた。このような概念は、「階層的幹細胞/TA 細胞モデル」として提唱され、ショウジョウバエ生殖巣や、マウス毛包など、多くの幹細胞システムに当てはまる。

皮膚の上皮組織は、毛包と毛包間表皮から主に構成され、それぞれの細胞系譜を生む幹細胞が、恒常的なターンオーバーと損傷からの再生を担う。毛包間表皮は多層構造をとり、表皮幹細胞を含む増殖細胞は最深部の基底層に位置する。基底細胞は、上層へ移行するとともに増殖能を失い、分化を開始する。分化へと進んだ細胞は、有棘層、顆粒層、角質層を経て、最終的に皮膚の表層から剥がれおちる。このような表皮の分化形式は、正常角化と呼ばれ、マウス背部をはじめとする皮膚の多くの部位で見られる。一方、マウス尾部の表皮では、正常角化と不全角化とが混在している。不全角化を示す表皮では、顆粒層を欠き、角質層の細胞も核を保持する。マウス尾部を注意深く眺めると、魚の鱗のような規則的な円状構造が肉眼でも確認できる。この円状領域をスケール、スケールとスケールの間の領域をインタースケールと呼ぶ。マウス尾部の皮膚では、毛包が 3 つずつクラスターとなって規則正しく並んでおり、インタースケール領域で、毛髪が表皮を貫通している。インタースケールの表皮は正常角化を示すが、スケールの表皮は不全角化を示す。両者でケラチンやその他の遺伝子の発現パターンにも違いがみられる［3］。

毛包を産生する幹細胞については比較的研究が進んでいるが、表皮幹細胞については、特異的な分子マーカーが同定されていなかったため、どの細胞が真の幹細胞であるか長年議論であった［3〜5］。我々はこれまでに、分裂頻度の異なる細胞を可視化・単離することが可能な Tet-Off マウスの系［6］を用い、階層的幹細胞／TA 細胞モデルを、マウス表皮で検証した。その結果、マウス表皮では、分裂頻度の低い細胞だけでなく、活発に分裂する細胞も幹細胞として働くことを発見した［7］。マウス尾部においては、分裂頻度の低い表皮幹細胞はインタースケール領域に、分裂頻度の高い表皮幹細胞はスケール領域に局在し（図 1A）、異なる種類の分化細胞を産生する能力を保持していた。このように我々は、従来のモデルに反して、マウス表皮においては活発に分裂する細胞も幹細胞として働くことを見いだした。従って、幹細胞の分裂頻度と老化メカニズムを再考する必要が生じた。本研究は、分裂頻度の異なる 2 つの独立した幹細胞を持つマウス表皮をモデルとし、幹細胞の老化メカニズムを、細胞・分子レベルで明らかにすることを目的として遂行した。

方法および結果

1. 加齢マウス表皮では、分裂頻度の低い幹細胞の局在領域で分化マーカーの発現が低下し、アポトーシスが亢進する

始めに、分裂頻度の異なる幹細胞間で老化表現型に違いが見られるかを明らかにするため、分化、アポトーシス、増殖、基底細胞マーカーの発現解析を行った。この解析には、2 ヶ月齢（若年）と 2 歳齢（加齢）の野生型 C57BL6 マウスから採取した尾部表皮を用いた。ホールマウント免疫染色の結果から、加齢マウスでは、分裂頻度の低い表皮幹細胞の局在領域において、分化マーカー（K10）の発現低下（図 1B）、アポトーシス（活性型 Caspase3 陽性細胞）の増加（図 2）、DNA 損傷の蓄積が観察された。細胞増殖は分裂頻度の低い表皮幹細胞でも高い表皮幹細胞でも全体的に減少傾向にあった。基底細胞マーカーの発現は、加齢マウスで減少傾向にあったが、シグナルをより定量的に調べる必要がある。さらに、老化促進モデルマウス SAMP1、SAMP8 においても、野生型加齢マウスと同様の表現型が観察された。マウスの性別によって、上記の表現型に違いは見られなかった。このように、当初の予想とは異なり、分裂頻度の高い幹細胞よりも、低い幹細胞でより顕著に加齢の影響が見られることが分かった。

2. 分裂頻度の低い表皮幹細胞では、アポトーシス抑制因子が高発現している

次に、分裂頻度の低い表皮幹細胞と高い表皮幹細胞では、細胞の性質や老化に対する応答・制御メカニズムに違いがあるのではないかという仮説のもと、若年マウスにおいて、分裂頻度の低い表皮幹細胞と高い表皮幹細胞の単離、トランスクリプトーム解析を行った。表皮幹細胞は、細胞表面抗原マーカーが同定されていない理由から、組織から特異的に単離することが難しい。我々はこれまでに、ヒストン H2B-GFP Tet-OFF マウスと CreER を導入した 4 重トランスジェニックマウスを用い、表皮基底層に局在する分裂頻度の低い細胞と、高い細胞を可視化・単離する実験系を確立している。それぞれの幹細胞で 2 倍以上発現が高い遺伝子群の Gene Ontology 解析の結果から、分裂頻度の低い表皮幹細胞では、アポトーシス抑制に関わる遺伝子が高発現していることが推定された。さらに、2 つの幹細胞集団では、代謝に関わる遺伝子群に発現の違いが見られることも分かった。このような遺伝子発現の違いが、老化、特に DNA 損傷や分裂ストレスに対する細胞の応答性を変えている可能性が示唆された。

3. 表皮幹細胞の細胞系譜解析

最後に、老化によって幹細胞ダイナミクスがどのような影響を受けるかを明らかにするため、細胞系譜解析を遂行した。本解析には、先行研究にて同定した分裂頻度の低い表皮幹細胞で特異的に発現する Dlx1-CreER マウスと、分裂頻度の高い表皮幹細胞で特異的に発現する Slc1a3-CreER マウス、および Cre レポーターである Rosa-tdTomato マウスを使用した。それぞれの CreER と Cre レポーターを持つマウスに、タモキシフェンを投与することで、Cre リコンビネーションが誘導され、幹細胞が蛍光標識される。幹細胞に導入した標識は子孫細胞に受け継がれるため、幹細胞の細胞運命を長期にわたって追跡することが可能である。このシステムを用い、標識された細胞由来のクローンの数（＝幹細胞の数）、クローン内に含まれる基底・分化細胞の数（＝幹細胞の自己複製・分化能）、局在パターン（＝幹細胞のニッチへの応答性）の変化を、タモキシフェン投与から 2 年にわたって、経時的・定量的に解析する。

本研究では、タモキシフェンの投与量を調整することで、異なる CreER 間で同じ数の幹細胞がラベルされる条件を最適化するとともに、初期のタイムポイントにおける解析を完了させた。タモキシフェン投与 1 年後までは、2 種類の表皮幹細胞は、それぞれ特異的な領域に位置しており、互いのニッチへの移動はほとんど観察されなかった。今後、一方の幹細胞の機能が低下した際に、もう一方の幹細胞が機能を補完するような現象が見られるかを、タモキシフェン投与 2 年後まで、時間経過を追って解析していく。

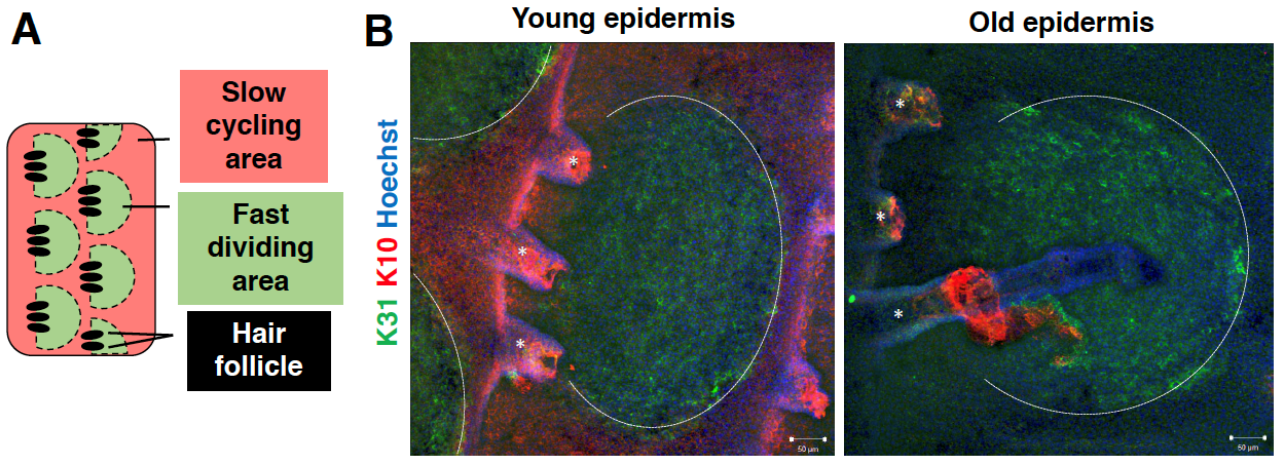


図 1. 加齢マウス表皮における分化マーカーの発現

(A) 分裂頻度の低い表皮幹細胞と高い表皮幹細胞の局在を示した模式図。図は、マウス尾部の表皮をホールマウント染色法により観察し、基底層側から眺めたところ。点線は、両細胞群の局在する領域の境界を示す。

(B) 分裂頻度の低い表皮幹細胞由来の分化マーカーK10 (赤) と、分裂頻度の低い表皮幹細胞由来の分化マーカーK31 (緑) の発現。加齢 (2 歳齢) マウスの表皮では、K10 の発現が顕著に減少している。

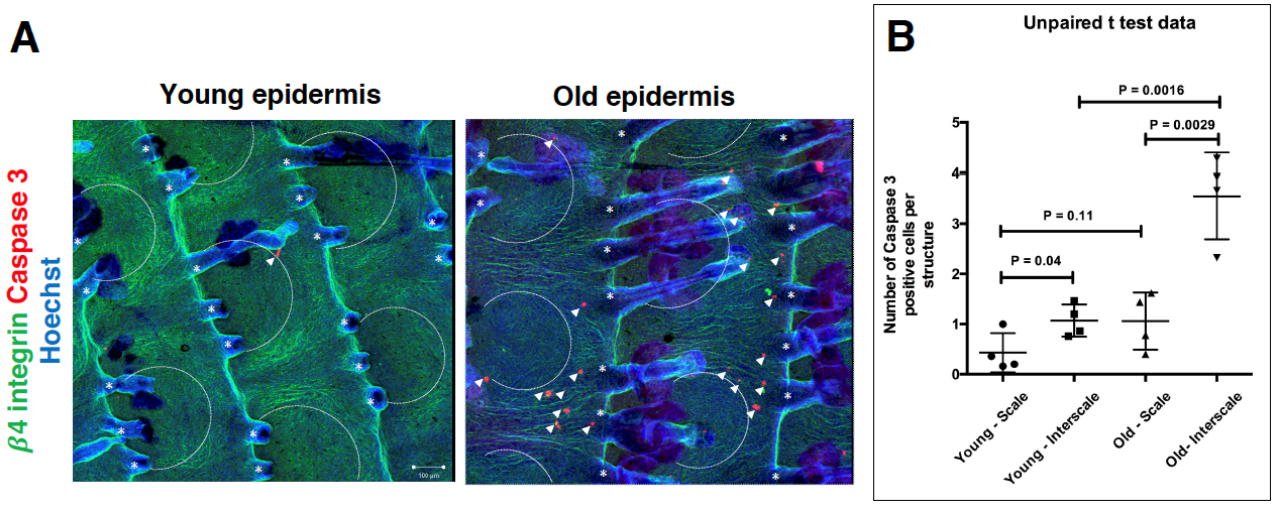


図 2. 加齢マウス表皮におけるアポトーシスマーカーの発現

(A) 活性型 Caspase3 (赤) と、基底細胞マーカーβ4 integrin (緑) の発現。加齢 (2 歳齢) マウスの表皮では、活性型 Caspase3 陽性細胞が、分裂頻度の低い表皮幹細胞が局在する領域で増加している。

(B) 活性型 Caspase3 陽性細胞を、分裂頻度の低い表皮幹細胞が局在する領域 (インタースケール) と分裂頻度の高い表皮幹細胞が局在する領域 (スケール) で、定量化したグラフを示す。統計処理は、t 検定を用いた。

考　察

本研究から、細胞分裂頻度の低い表皮幹細胞は、より顕著に老化の影響を受けるといった予想外の観察結果を得た。そのメカニズムとして、表皮幹細胞が持つ抗アポトーシス機構や、代謝調節機構が関わっている可能性が示唆された。今後は、加齢マウス皮膚の組織学的解析の結果と、遺伝子プロファイリング、細胞系譜解析で得られた結果を総合的に解釈することで、組織・細胞レベルでの加齢変化を、分子レベルでの加齢変化と結びつける。また、表皮幹細胞の老化メカニズムが、表皮以外の幹細胞システムにも普遍的に存在するかに迫るため、他の組織においても、候補遺伝子群の発現・機能解析を遂行する。

共同研究者・謝辞

本研究は、筑波大学生命領域学際研究センター柳沢裕美研究室にて、Lalhaba Oinam、Gopakumar Changarathil と行った。

文　献

1) Fuchs E. The tortoise and the hair: slow-cycling cells in the stem cell race. Cell. 2009;137(5):811-9. Epub 2009/06/06. doi: S0092-8674(09)00523-6 [pii] 10.1016/j.cell.2009.05.002. PubMed PMID: 19490891.

2) Li L, Clevers H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. Science. 2010;327(5965):542-5. Epub 2010/01/30. doi: 327/5965/542 [pii] 10.1126/science.1180794. PubMed PMID: 20110496.

3) Gomez C, Chua W, Miremadi A, Quist S, Headon DJ, Watt FM. The interfollicular epidermis of adult mouse tail comprises two distinct cell lineages that are differentially regulated by Wnt, Edaradd, and Lrig1. Stem cell reports. 2013;1(1):19-27. doi: 10.1016/j.stemcr.2013.04.001. PubMed PMID: 24052938; PubMed Central PMCID: PMC3757744.

4) Clayton E, Doupe DP, Klein AM, Winton DJ, Simons BD, Jones PH. A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. Nature. 2007;446(7132):185-9. Epub 2007/03/03. doi: nature05574 [pii] 10.1038/nature05574. PubMed PMID: 17330052.

5) Mascre G, Dekoninck S, Drogat B, Youssef KK, Brohee S, Sotiropoulou PA, et al. Distinct contribution of stem and progenitor cells to epidermal maintenance. Nature. 2012;489(7415):257-62. Epub 2012/09/04. doi: nature11393 [pii] 10.1038/nature11393. PubMed PMID: 22940863.

6) Tumbar T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M, et al. Defining the epithelial stem cell niche in skin. Science. 2004;303(5656):359-63. Epub 2003/12/13. doi: 10.1126/science.1092436 1092436 [pii]. PubMed PMID: 14671312.

7) Sada A, Jacob F, Leung E, Wang S, White BS, Shalloway D, et al. Defining the cellular lineage hierarchy in the interfollicular epidermis of adult skin. Nat Cell Biol. 2016;18(6):619-31. doi: 10.1038/ncb3359. PubMed PMID: 27183471; PubMed Central PMCID: PMC4884151.