

## ステムセルエイジングから紐解く上皮の加齢性機能低下

熊本大学 国際先端医学研究機構 皮膚再生・老化研究室  
佐田 亜衣子

### [ I ] 本研究の背景と目的

組織幹細胞は、生涯にわたって自分自身を維持しながら、分化細胞を作り出す能力を持つ特別な細胞である。このような細胞が、私たちの体の中の色々な場所に存在するので、古い細胞が失われても、日々新しい細胞を作り出すことができる。近年、加齢に伴う組織の機能低下の一因として、分化細胞の供給源である幹細胞の老化（ステムセルエイジング）が提唱されている。しかし幹細胞の老化に関する知見の多くは、特定の組織や分子に着目した個別研究であり、幹細胞老化を統合的に理解するための基盤が不足している。

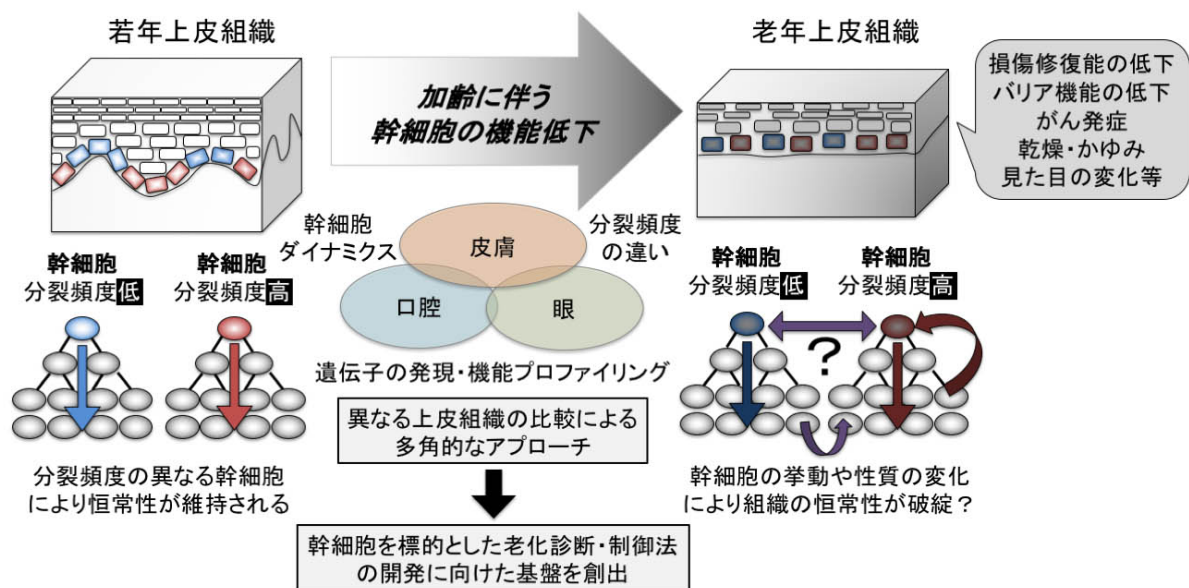
私たちの体の最も表層に位置する上皮（表皮、口腔粘膜、角結膜）は、水分の蒸発を防ぐとともに、外部刺激や異物の侵入から体内を保護する役割を果たす。上皮のバリア機能は加齢とともに低下し、刺激に弱くなり、乾燥や炎症が起こりやすくなる。上皮は、本来高い再生能を持つが、損傷修復能は加齢とともに低下する。上皮性の皮膚がん、口腔がんは、高齢者に多発する。上皮は、加齢の影響が外観にも現れやすいことから、一般的にも老化に強い関心が持たれる組織でもある。上皮は、再生医療の観点からもニーズが高い。1980年代、ヒト表皮幹細胞の体外培養と自家移植による熱傷治療が世界で初めて成功して以来、皮膚に関連する再生医療は大きく発展してきた。細胞の入手が容易である口腔粘膜上皮は、角膜等の上皮組織再生のための優れた材料として注目されている。しかし原材料となるヒト組織から単離した上皮細胞の状態は、年齢によって品質がばらつき、特に幹細胞の数や質は、細胞シートの形成や生着率を左右する大きな要因となっている。このような加齢に伴う上皮組織の機能低下や病変は、組織の恒常性維持や再生を担う上皮幹細胞の老化に起因する可能性が考えられるが、幹細胞を特異的に同定し解析するためのマーカーやツールが未確立であったことから、加齢に伴う上皮の機能低下と、幹細胞レベルで起こる変化を結びつけ、実験的に検証することが困難であった。

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中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。両方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)。

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。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、Dlx1陽性の分裂頻度の低い表皮幹細胞はインタースケール領域に、Slc1a3陽性の分裂頻度の高い表皮幹細胞はスケール領域に局在し、異なる種類の分化細胞を産生する能力を保持していた。この結果を踏まえ、①活発に分裂する幹細胞はより早く老化するのか、それとも②活発に分裂する幹細胞は、生涯にわたる分裂の繰り返しの耐え、幹細胞の品質を維持する特有の抗老化システムを備えているのかという疑問から、本研究の着想に至った。

本研究では、申請者が独自に確立した分裂頻度の異なる上皮幹細胞のマーカーや解析ツールを用い、幹細胞の加齢変化を皮膚、口腔、眼の3つの上皮組織で比較解析することで、幹細胞老化に関わる普遍的な標的因子や作用機序を解明することを目的として遂行した(図)。



## [II] 方法と結果

### 野生型老年マウスと老化促進モデルマウスSAMP1/P8を用いた加齢マウス表皮の表現型解析

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)の発現低下が見られたが、アポトーシス(活性型Caspase3陽性細胞)やDNA損傷、基底細胞マーカーの発現は若年マウス表皮と同程度であった。細胞増殖は分裂頻度の高い表皮幹細胞の領域において有意に減少した(発表論文1)。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。

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解析を行った。老化促進モデルマウスSAMP8では、野生型老年マウスで見られる表現型が時期尚早に現れることから、表皮幹細胞の老化プロセスを解析する新たなツールとしての可能性を示した(発表論文1、学会発表3)。

### 表皮幹細胞の加齢変化の細胞・分子レベルでの解析(未発表)

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、2歳齢までの解析を完了させた。また、異なる上皮組織における幹細胞ダイナミクスを比較する目的で、皮膚、口腔、眼上皮を採取し、同様の細胞系譜解析を行った（学会発表5）。

次に、若年・老年マウスの皮膚から分裂頻度の異なる上皮幹細胞を単離し、RNAシーケンス解析を行った。現在までに、分裂頻度の異なる上皮幹細胞に特異的な細胞表面抗原マーカーは同定されていないため、幹細胞の単離にはH2B-GFP Tet-offシステムを使用する(7)。この系では、ドキシサイクリン非存在下で、上皮細胞特異的なK5プロモーターの下流でGFPが転写され、GFPタンパク質が細胞内に蓄積する。マウスにドキシサイクリンを投与するとGFPの転写が抑制され、細胞内のGFPタンパク質が細胞分裂ごとに半減する。よって、活発に分裂する細胞はGFPを徐々に失うが、分裂頻度の低い細胞は長期にわたってGFPを高レベルに保持し、Label-retaining cellとして検出される。RNAシーケンス解析は、RNA単離からデータ取得まで、筑波大学iLaboratory（つくば臨床検査教育・研究センター）に委託した。得られた遺伝子リストから、①加齢に伴い発現が変化する遺伝子群（→上皮幹細胞老化のコア原因因子・分子マーカーの同定）、および②分裂頻度の異なる幹細胞間で特異的に発現が変化する遺伝子群（→幹細胞の分裂頻度と老化との関係、制御メカニズムの解明）を抽出した。また、幹細胞制御因子の一つとして、分裂頻度の高い表皮幹細胞で発現する細胞外マトリクスFibulin-7が、幹細胞の増殖抑制や領域化の制御を介して抗老化に働く可能性を示す予備データを得ている（学会発表1, 2, 4）。

### [III] 考察

本研究では、分裂頻度の異なる幹細胞に着目し、野生型老年マウスを用いた加齢表皮の表現型解析を行った。その結果、分裂頻度の高い表皮幹細胞では加齢に伴い顕著に増殖能が低下すること、一方で分裂頻度の低い表皮幹細胞は分化マーカーの発現が低下することを見出した。

本研究で得られる成果は、老化した幹細胞やその制御因子を標的とした新たな治療戦略・創薬標的・診断マーカーの創出へとつながり、医療シーズ、社会貢献の観点から、以下の貢献が期待される。

- 1) 高齢者で見られる皮膚、口腔、眼の各種トラブル（乾燥、炎症、脆弱性等）や加齢関連疾患に対する原因究明と幹細胞レベルでの治療介入
- 2) 組織・幹細胞の老化度を測定するための分子マーカーの確立による予防医療への貢献
- 3) 科学的なエビデンスに基づいたアンチエイジングサプリメント、化粧品等の開発
- 4) 年齢による幹細胞の品質のばらつきを管理・抑制し、より安定した再生医療を実現

### [IV] 発表論文

1. Changarathil G, Ramirez K, Isoda H, Sada A\*, Yanagisawa H: Wild-type and SAMP8 mice show age-dependent changes in distinct stem cell compartments of the interfollicular epidermis.  
\* Corresponding author  
PLoS One 14(5): e0215908, 2019
2. Oinam L, Changarathil G, Ngo YX, Yanagisawa H, Sada A\*: Epidermal stem cell lineages.  
\* Corresponding author  
Advances in Stem Cells and their Niches, 2019 (A book chapter)

#### [V] 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Aiko Sada: Maintenance of heterogeneous epidermal stem cell populations by the distinct niche, Japan-Singapore International Skin Conference 2019, Singapore, April 10-12, 2019 (招待講演、国際)
2. Lalhaba Oinam, Gopakumar Changarathil, Jun Tsunozumi, Hiromi Yanagisawa, Aiko Sada: Maintenance of heterogeneous epidermal stem cell populations by the distinct niche, Gordon Research Conference, Epithelial Differentiation and Keratinization, 米国、ポスター発表、July 7-12, 2019 (国際)
3. Gopakumar Changarathil, Karina Ramirez, Hiroko Isoda, Hiromi Yanagisawa, Aiko Sada: Wild-type and SAMP8 mice show age-dependent changes in distinct stem cell compartments of the interfollicular epidermis, Gordon Research Conference, Epithelial Differentiation and Keratinization, 米国、口頭&ポスター発表、July 7-12, 2019 (国際)
4. Lalhaba Oinam, Gopakumar Changarathil, Jun Tsunozumi, Hiromi Yanagisawa, Aiko Sada: Maintenance of heterogeneous epidermal stem cell populations by the distinct niche, 第17回幹細胞シンポジウム、淡路、ポスター発表、2019年5月24-25日 (国内)
5. 石井柳太郎、柳沢裕美、佐田亜衣子: 眼表面上皮における幹細胞ダイナミクス解析、第41回日本分子生物学会年会、横浜、ポスター発表、2018年11月28-30日 (国内)

#### [VI] 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. Tumber 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.