

XVII型コラーゲン分解制御による表皮幹細胞の遊走制御

難波 大輔

1. はじめに

高齢者に多い皮膚潰瘍や褥瘡（床ずれ）は、生活の質（QOL）ならびに寿命に大きく関わることから、超高齢化社会においてその対策が喫緊の課題となっている¹⁾。加齢そのものによる皮膚の損傷修復能力の低下に加え、糖尿病など加齢に関連する基礎疾患が、糖尿病性足潰瘍や静脈性下肢潰瘍、褥瘡（床ずれ）に大きく関与している。これらの難治性皮膚潰瘍では、細菌感染を伴うことが多く、細菌叢バイオフィームが形成されてさらに難治性となり、重症例では下肢切断が必要となる。したがって、難治性皮膚潰瘍の重症化を防ぐため、早期段階からの治療が必要であるが、効果的な治療法はいまだに開発されていない。そのため、加齢が、皮膚の損傷修復過程に、どのような影響を与えるかを理解することが必須である。

2. 皮膚の損傷修復と再上皮化

皮膚の損傷修復は、さまざまな細胞種が関与する複雑な生物学的プロセスであるが、止血期、炎症期、増殖期、再編成期の四つのステージに分けることができる^{2,3)}。皮膚が損傷を受けた場合、まず直後に血塊形成が起き（止血期）、その後、免疫細胞の損傷部位への遊走と活性化が起る（炎症期）。損傷部位周辺では、欠損箇所を埋めるために、表皮細胞や線維芽細胞、そして血管内皮細胞の遊走と増殖が観察される。その結果、再上皮化、血管新生、および肉芽組織の形成が起き、この過程は増殖期と呼ばれる。最後に、不必要となった細胞のアポトーシスや過剰に産生された細胞外マトリックスの分解が起き、組織の再

編成が起きる（再編成期）。この中で、再上皮化は、皮膚の傷を埋め表皮を再構築することで、皮膚バリア機能を再生させる損傷修復に必須のプロセスである。加齢によって、上記のすべての過程が影響を受けると考えられているが⁴⁾、健常者の皮膚創傷治癒を解析した臨床研究から、加齢は再上皮化の遅延をもたらすことが報告されている⁵⁾。

常に細胞が入れ替わる組織である表皮の恒常性は表皮幹細胞が担っており、皮膚損傷修復時の再上皮化にも、この表皮幹細胞が関与していることが知られている⁶⁾。加齢や基礎疾患などによって難治性皮膚潰瘍が誘発される環境では、この表皮幹細胞の機能が障害されている可能性が示唆されていたが^{7,8)}、その仕組みについてはいまだに解明されていない。最近、我々は、加齢による皮膚損傷修復能力低下の原因が、ヘミデスマソーム構成分子の一つであるXVII型コラーゲンの分解による表皮幹細胞の運動能低下であることを明らかにしたので、その詳細を以下に紹介する⁹⁾。

3. 再上皮化における表皮幹細胞動態

1) ヒト表皮幹細胞の運動能と自己複製能の相関

採取されたヒト皮膚を培養すると、表皮細胞が分裂しながら、細胞のない空間に向かって集団として前進する様子が観察された。この表皮細胞の集団移動は、皮膚の傷が治る際の再上皮化と同じ表皮細胞集団の運動形態であり（図1A, 上段）、表皮再生医療に使用されているフィーダー細胞を用いたヒト表皮幹細胞培養系¹⁰⁾において、表皮幹細胞がコロニーとして成長する際にも観察された（図1A, 下段）。このことは、ヒト表皮幹細胞のコロニー形成が、再上皮化研究の優れたモデルであり、培養系でのヒト表皮幹細胞の運動様式の解明が再上皮化の仕組みの解明につながることを示している。そこで、ヒト表皮幹細胞コロニーと幹細胞ではない表皮細胞が作るコロニー内の細胞の移動速度を調べたところ、幹細胞コロニー内の細胞の方が、速度が大きいことが明らかとなった（図1B）。さらに、コロニー形成時のヒト表皮幹細胞の増殖や運動パターンを解析し、我々が以前に開発した表皮幹細胞の集団動態を記述するモデル¹¹⁾に細胞増殖のパラメーターを導入することで、コンピューター内で表皮幹細胞の増殖を再現することに成功した。このモデルを用いたシミュレーショ

東京大学医科学研究所老化再生生物学分野（〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1）

Type XVII collagen proteolysis regulates epidermal stem cell motility

Daisuke Nanba (Division of Aging and Regeneration, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan)

本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950365

© 2023 公益社団法人日本生化学会

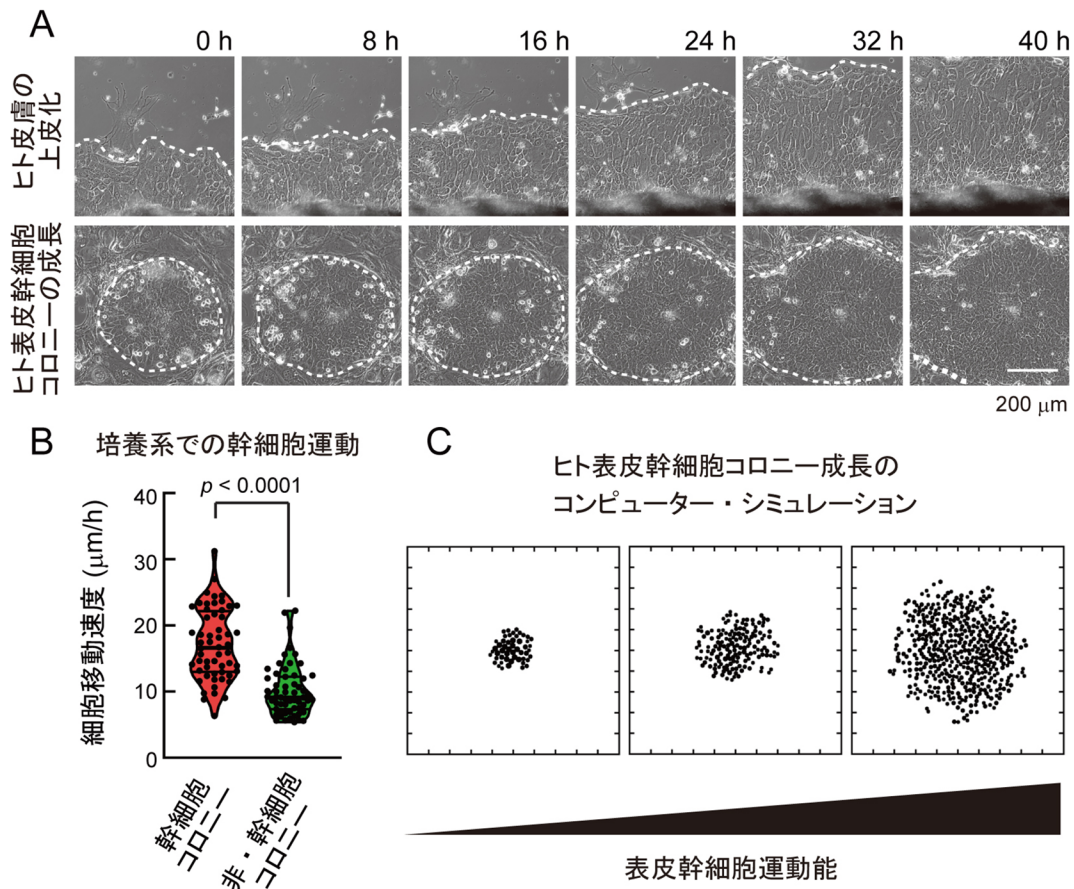


図1 ヒト表皮幹細胞の運動能と自己複製の相関

(A)ヒト皮膚からの表皮細胞の遊走とヒト表皮幹細胞コロニー形成の類似性. 白い点線は, 遊走中の表皮細胞および幹細胞コロニーの先端を示している. (B)ヒト表皮幹細胞コロニーおよび非幹細胞コロニーにおけるコロニー内の細胞移動速度. (C)コンピューター・シミュレーションによるヒト表皮幹細胞コロニー形成の再現. 表皮幹細胞に運動能を与えると, 増殖能が同じでも, コロニーの成長が著しく増大した. Nanba et al. (2021) *J. Cell Biol.*, 220, e202012073 を改変.

ンから, 表皮幹細胞が自己複製し, コロニーが成長するには, 表皮幹細胞の運動能力が必須であることが明らかになった (図1C).

2) 加齢によるEGF受容体シグナルの低下およびEGF受容体シグナルによるCOL17A1の安定化

加齢による皮膚損傷修復能力の低下には, 再上皮化の速度低下が関与していることが報告されている⁵⁾. 再上皮化の過程では, さまざまな受容体型チロシンキナーゼの活性が関与していることから, 我々は, 若齢マウスと老齢マウスの皮膚に傷を作製し, 傷が治る過程でのさまざまな受容体型チロシンキナーゼの活性状態を調べたところ, 表皮増殖因子 (epidermal growth factor: EGF) 受容体の活性化が, 加齢に伴って減少することを見いだした (図2A). そこで, 培養系にEGFを添加し, ヒト表皮幹細胞のEGF受容体を活性化したところ, 実際に表皮幹細胞の運動能力 (図2B) だけでなく, 細胞分裂 (図2C) も増大することを

確認した. このように, コンピューター・シミュレーションで示されたヒト表皮幹細胞の運動能と自己複製能の相関性を, 培養系で実証することができた. 続いて, EGF受容体の活性化が, 表皮幹細胞の維持に必須であるXVII型コラーゲン (COL17A1) の量を増加させることを見いだした (図2D). COL17A1は細胞-基底膜間接着に関与するヘミデスモソームを構成する膜タンパク質であり, さまざまなプロテアーゼによって, 細胞外領域が切断されることが知られている^{12,13)} (表1). 我々は, ヒト表皮幹細胞では, EGF受容体が活性化すると, マトリックスメタロプロテアーゼの活性を阻害するtissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP1) の発現が誘導され (図2E), このTIMP1によって, 細胞膜にあるCOL17A1が分解されずに安定化することを明らかにした (図2F). 以上の結果は, これまで知られていなかったEGF受容体シグナルによるCOL17A1の安定化という, まったく新しいCOL17A1の制御機構の存在を示している.

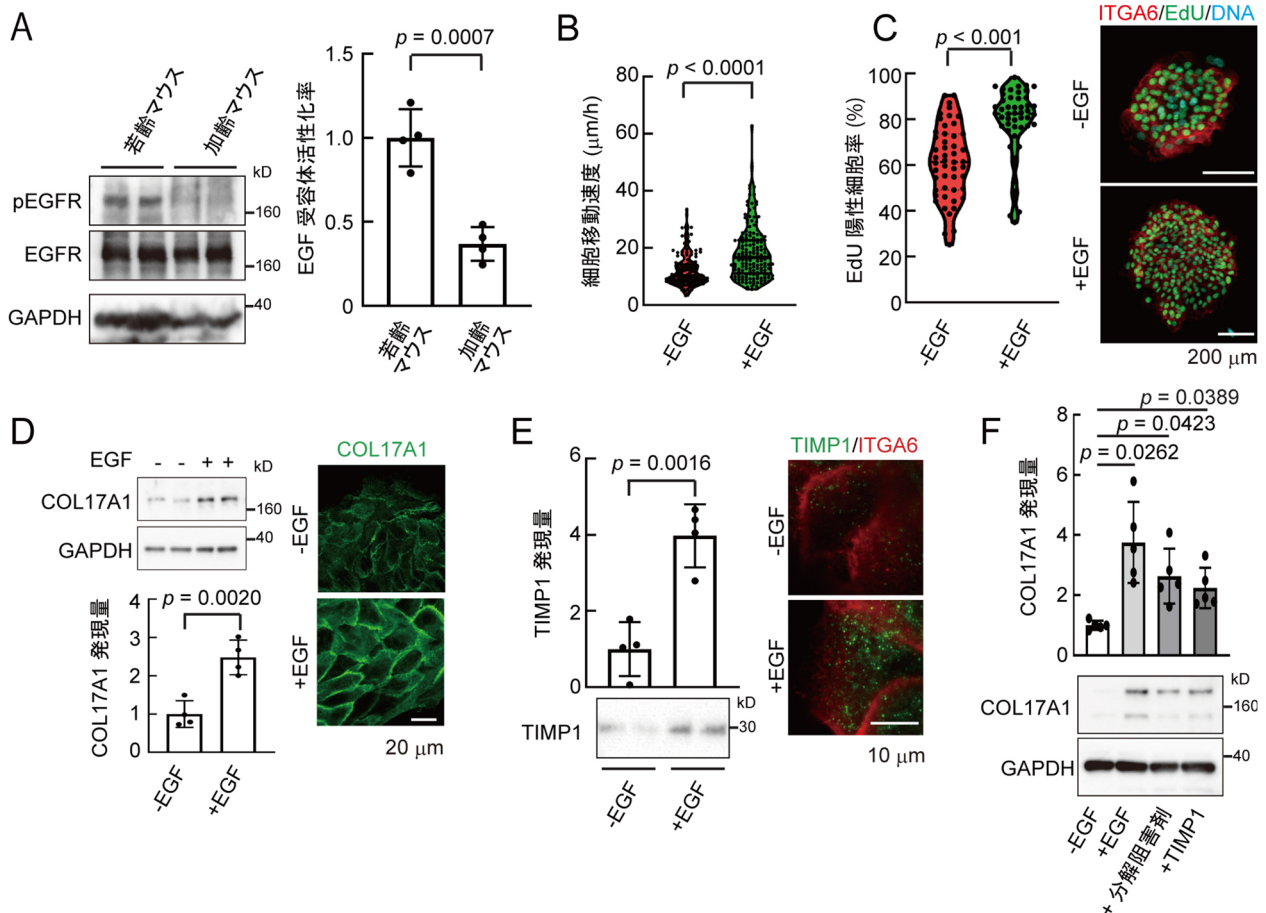


図2 加齢によるEGF受容体シグナルの低下およびEGF受容体シグナルによるCOL17A1の安定化
 (A)ウエスタンブロットによるEGF受容体リン酸化の測定. 加齢マウスでは, 若齢マウスに比べEGF受容体のリン酸化が低下していた. (B) EGF添加によるヒト表皮幹細胞コロニー内での細胞移動速度の変化. (C) EGF添加によるEdu陽性細胞(増殖細胞)率の変化. EGF添加で, コロニーが増大し, 増殖細胞がコロニーの中心にも観察されるようになった. (D) EGF添加によるCOL17A1の発現上昇. (E) EGF添加によるTIMP1の発現上昇. ウエスタンブロットで細胞培養液中のTIMP1を測定した. (F)分解阻害剤(メタロプロテアーゼ阻害剤)およびリコンビナントTIMP1によるCOL17A1の安定化. EGF非存在下でも分解阻害剤とTIMP1存在下では, COL17A1の発現量が上昇した. Nanba et al. (2021) *J. Cell Biol.*, **220**, e202012073を改変.

3) COL17A1によるヒト表皮幹細胞の遊走制御

我々は, COL17A1が表皮幹細胞の機能維持に必須であることを報告してきたが¹⁴⁾, 細胞レベルでの詳細な仕組みははまだ明らかになっていない. そこで, 表皮幹細胞でのCOL17A1の発現量を抑制する実験を行ったところ, 表皮幹細胞の運動性が低下し, 表皮細胞集団が移動する速度が大きく低下することを見いだした(図3A). 続いて, 詳細な観察を行った結果, 表皮幹細胞が移動する場合, その先端部分で細胞の運動性に関与する細胞骨格であるアクチン線維とケラチン線維の排他的な分布パターンが観察されるが, COL17A1の発現量を抑制すると, このパターンが変化し, アクチン線維の領域が大きく減少した(図3B). 我々は, アクチン線維の構造が, ヒト表皮幹細胞の遊走方向の制御に大きく関与していることを報告しており¹⁵⁾, このCOL17A1の減少によるアクチン線維など細胞骨格の変

表1 COL17A1の構造

プロテアーゼ	阻害タンパク質
ADAM9	—
ADAM10	TIMP1&3
ADAM17	TIMP3&4
ELANE	A1AT
MMP9	TIMP1~4
Plasmin	PAI-1&2

(上段) COL17A1の構造とプロテアーゼによる切断部位.

(下段) COL17A1切断に関与する酵素および阻害タンパク質のリスト.

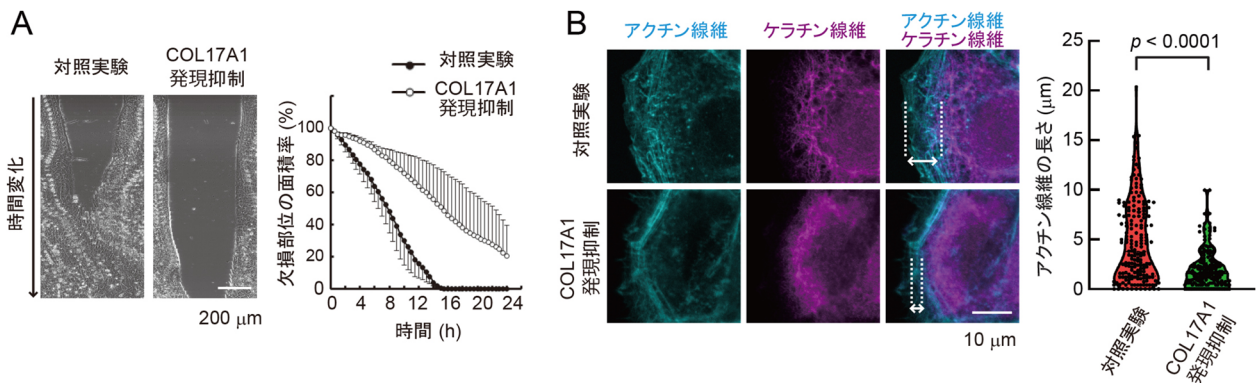


図3 COL17A1発現抑制による運動能の低下と細胞骨格の変化

(A)ヒト表皮細胞を用いた細胞遊走アッセイ。細胞集団中に間隙を形成し、その間隙が閉じる過程の時間変化を測定。shRNAによるCOL17A1発現抑制で、遊走能が大きく低下した。(B)ヒト表皮細胞におけるアクチン線維およびケラチン線維の分布。通常、アクチン線維が細胞の先端、ケラチン線維がその後方に分布しているが、shRNAによるCOL17A1発現抑制で、細胞先端部におけるアクチン線維の領域が大きく減少した。Nanba et al. (2021) *J. Cell Biol.*, **220**, e202012073 を改変。

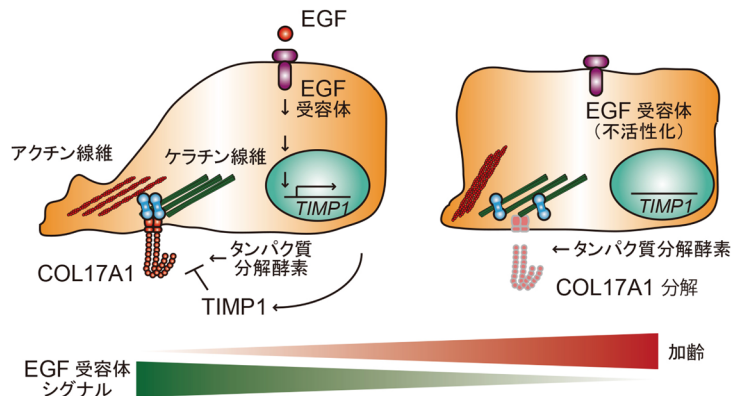


図4 EGF受容体-TIMP1-COL17A1経路によるヒト表皮幹細胞運動能の制御

若齢期の再上皮化では、EGF受容体シグナルの活性化によってTIMP1の発現が上昇、その結果、COL17A1が安定化し、アクチンおよびケラチン線維の協調によって、表皮幹細胞の運動能が上昇する。加齢によって、EGF受容体リガンドが減少し、EGF受容体シグナルが活性化されないと、COL17A1の不安定化により、アクチンおよびケラチン線維が協調できず、表皮幹細胞の運動能が低下し、再上皮化不全が起こる。Nanba et al. (2021) *J. Cell Biol.*, **220**, e202012073 を改変。

化が、表皮幹細胞の遊走能の低下に直接的に関与していると考えられる。

以上の結果をまとめると、通常の表皮幹細胞では、EGF受容体にEGFなどのEGF受容体リガンドが結合することで、EGF受容体シグナルが活性化し、タンパク質分解を阻害するTIMP1が細胞外に分泌される。このTIMP1が、COL17A1の分解を防ぎ、COL17A1が細胞膜上で安定に存在することで、アクチン線維とケラチン線維のネットワーク形成により、表皮幹細胞の高い運動能力が維持される。しかしながら、加齢によってEGFなどが減少し、EGF受容体が不活性化状態になると、TIMP1が継続的に供給されずに細胞膜上のCOL17A1が分解され、最終的に細胞骨格のネットワーク形成の破綻により、表皮幹細胞の運動能力が大きく低下する。このEGF受容体-TIMP1-COL17A1経

路の不活性化が、加齢に伴う再上皮化の遅延に大きく関与していると考えられる(図4)。

4. 表皮幹細胞動態と老化および病態との関係

ヒトにおいては、加齢に伴って皮膚でのCOL17A1の量が減少することが報告されているが⁹⁾、同様にEGF受容体を活性化するEGFの量も、加齢に伴って血液中や尿中、皮膚損傷部の浸出液などで減少することが報告されている¹⁶⁻¹⁸⁾。一方、EGFの投与が糖尿病性潰瘍の治癒を促進することが、いくつかの臨床研究で報告されている¹⁹⁾。したがって、我々が見いだした加齢によるEGF受容体-TIMP1-COL17A1経路の不活性化は、再上皮化の遅延とそれに伴う皮膚損傷修復能力の低下の引き金になると考え

られることから、糖尿病性潰瘍や床ずれなどの難治性皮膚潰瘍の発症とも、大きく関連している可能性がある。EGF受容体-TIMP1-COL17A1経路の発見は、難治性皮膚潰瘍の発症機構の解明に大きく貢献するものである。また、この経路を活性化することで、加齢によって低下した皮膚損傷修復能力の改善や、難治性皮膚潰瘍に対する新しい治療法の開発が期待される。

謝辞

本研究は、東京大学医科学研究所・老化再生生物学分野（西村栄美教授）のメンバー、大阪大学の土岐博特任教授、国際医療福祉大学の松崎恭一主任教授、愛媛大学の佐山浩二教授および白石研講師との共同研究の成果であり、文部科学省科学研究費補助金、新学術領域研究「数理解析に基づく生体シグナル伝達システムの統合的理解」、武田科学振興財団、ならびに国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）『老化メカニズムの解明・制御プロジェクト』の支援のもとで行われた。ここに感謝申し上げます。

文 献

- Eming, S.A., Martin, P., & Tomic-Canic, M. (2014) Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci. Transl. Med.*, **6**, 265sr6.
- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., & Longaker, M.T. (2008) Wound repair and regeneration. *Nature*, **453**, 314–321.
- Sun, B.K., Siperashvili, Z., & Khavari, P.A. (2014) Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science*, **346**, 941–945.
- Sgonc, R. & Gruber, J. (2013) Age-related aspects of cutaneous wound healing: a mini-review. *Gerontology*, **59**, 159–164.
- Holt, D.R., Kirk, S.J., Regan, M.C., Hurson, M., Lindblad, W.J., & Barbul, A. (1992) Effect of age on wound healing in healthy human beings. *Surgery*, **112**, 293–297, discussion, 297–298.
- Park, S., Gonzalez, D.G., Guirao, B., Boucher, J.D., Cockburn, K., Marsh, E.D., Mesa, K.R., Brown, S., Rompolas, P., Haberman, A.M., et al. (2017) Tissue-scale coordination of cellular behaviour promotes epidermal wound repair in live mice. *Nat. Cell Biol.*, **19**, 155–163.
- Mazzalupo, S., Wawersik, M.J., & Coulombe, P.A. (2002) An ex vivo assay to assess the potential of skin keratinocytes for wound epithelialization. *J. Invest. Dermatol.*, **118**, 866–870.
- Keyes, B.E., Liu, S., Asare, A., Naik, S., Levorse, J., Polak, L., Lu, C.P., Nikolova, M., Parolli, H.A., & Fuchs, E. (2016) Impaired epidermal to dendritic T cell signaling slows wound repair in aged skin. *Cell*, **167**, 1323–1338.
- Nanba, D., Toki, F., Asakawa, K., Matsumura, H., Shiraishi, K., Sayama, K., Matsuzaki, K., Toki, H., & Nishimura, E.K. (2021) EGFR-mediated epidermal stem cell motility drives skin regeneration through COL17A1 proteolysis. *J. Cell Biol.*, **220**, e202012073.
- Nanba, D. (2019) Human keratinocyte stem cells: From cell biology to cell therapy. *J. Dermatol. Sci.*, **96**, 66–72.
- Nanba, D., Toki, F., Tate, S., Imai, M., Matsushita, N., Shiraishi, K., Sayama, K., Toki, H., Higashiyama, S., & Barrandon, Y. (2015) Cell motion predicts human epidermal stemness. *J. Cell Biol.*, **209**, 305–315.
- Hirako, Y. & Owaribe, K. (1998) Hemidesmosomes and their unique transmembrane protein BP180. *Microsc. Res. Tech.*, **43**, 207–217.
- Nishie, W. (2020) Collagen XVII processing and blistering skin diseases. *Acta Derm. Venereol.*, **100**, adv00054–adv00107.
- Liu, N., Matsumura, H., Kato, T., Ichinose, S., Takada, A., Namiki, T., Asakawa, K., Morinaga, H., Mohri, Y., De Arcangelis, A., et al. (2019) Stem cell competition orchestrates skin homeostasis and ageing. *Nature*, **568**, 344–350.
- Nanba, D., Toki, F., Matsushita, N., Matsushita, S., Higashiyama, S., & Barrandon, Y. (2013) Actin filament dynamics impacts keratinocyte stem cell maintenance. *EMBO Mol. Med.*, **5**, 640–653.
- Uchihashi, M., Hirata, Y., Fujita, T., & Matsukura, S. (1982) Age-related decrease of urinary excretion of human epidermal growth factor (hEGF). *Life Sci.*, **31**, 679–683.
- Shurin, G.V., Yurkovetsky, Z.R., Chatta, G.S., Tourkova, I.L., Shurin, M.R., & Lokshin, A.E. (2007) Dynamic alteration of soluble serum biomarkers in healthy aging. *Cytokine*, **39**, 123–129.
- Farinas, A.F., Bamba, R., Pollins, A.C., Cardwell, N.L., Nanney, L.B., & Thayer, W.P. (2018) Burn wounds in the young versus the aged patient display differential immunological responses. *Burns*, **44**, 1475–1481.
- Yang, Q., Zhang, Y., Yin, H., & Lu, Y. (2020) Topical recombinant human epidermal growth factor for diabetic foot ulcers: A meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Ann. Vasc. Surg.*, **62**, 442–451.

著者寸描

●難波 大輔（なんば だいすけ）

東京大学医科学研究所 准教授。博士（理学）。

■略歴 1996年大阪大学理学部卒業。2001年同大学院理学研究科修了。博士（理学）取得。愛媛大学プロテオサイエンスセンター、東京医科歯科大学難治疾患研究所を経て、21年より現職。

■研究テーマと抱負 皮膚の恒常性維持や老化・再生過程における幹細胞動態を理解し、皮膚の様々な疾患に対する治療法や再生医療技術を開発するため、既存の生命科学の手法だけでなく、情報科学や数理科学の手法も駆使し、総力戦で臨みたい。

■趣味 散歩、料理、園芸、フラメンコ。