

# 妊娠期における皮膚リモデリング機構の解析

東京科学大学総合研究院難治疾患研究所

豊島 文子

During pregnancy, the mother's abdominal skin expands rapidly as the fetus grows. Disruption of this mechanism is expected to induce skin diseases such as stretch marks, but the control mechanism has remained largely unexplored. We have previously found that in the abdominal skin of pregnant mice, cells with high proliferative potential appear in the epidermal basal layer. This population of cells is induced by secretory signals from the dermis. In this study, we show that dermal fibroblasts induce remodeling of extracellular matrix to increase the dermal stiffness, which is necessary for epidermal proliferation. In addition, fibroblasts transduce the stiffened matrix signal into the chemical signal via the mechano-sensing transcription factor YAP, leading to epidermal proliferation during pregnancy.

## 1. 緒言

皮膚は、ライフステージにおける体型変化に応じて、ダイナミックに拡張・収縮する。特に妊娠期には、胎児の成長に伴って母体の腹部皮膚が急速に伸展する。この腹部皮膚の伸展機構の破綻は、妊娠線などの皮膚疾患を誘発すると予想されるが、その制御機構はほとんど解明されていない。

皮膚表皮は、毛包とその周囲の毛包間表皮の領域に区分される。毛包間表皮の新陳代謝は皮膚の恒常性維持に必須であり、表皮基底層に存在する表皮基底細胞の増殖と分化のバランスに依存している。クローン系譜追跡技術と数理モデルを用いた研究により、表皮基底細胞の多様性と動態を説明するモデルが複数提唱されてきた。代表例として、表皮基底細胞が確率的に自己複製と分化を行う single type of progenitor モデル<sup>4-6)</sup>、幹細胞から前駆細胞へ段階的に分化する階層モデル<sup>1,2)</sup>、各細胞系譜を個々のマーカーや増殖能の違いによって区別できる基底細胞多様性モデル<sup>3-5)</sup>などがある。さらに、マウスとヒトの表皮における単一細胞トランスクリプトーム解析から、遺伝子発現の不均一性に基づく複数の基底細胞クラスターが明らかにされている<sup>6-9)</sup>。これらの研究は定常状態や創傷治癒をモデルとして研究されてきたが、体型変化時などの生理的な皮膚リモデリングにおける解析はなされていない。

我々はこれまでに、急速に伸展する妊娠マウスの腹部皮膚において、表皮基底層に高い増殖能を持つ細胞が出現することを見出した。この細胞群は真皮からの分泌シグナルによって誘導され、転写因子 Tbx3 依存的に増殖すること

を示した<sup>10)</sup>。また、Tbx3 陽性基底細胞は血管依存的に幹細胞性を維持する特徴があり、妊娠期には体表血管の増加に依存して出現し、出産後には血管退縮とともに分化して表皮から排出されることが分かった。さらに、皮膚に張力負荷をかけると非妊娠においても体表血管が増加し、血管に依存して Tbx3 陽性基底細胞が誘導された。また、体表血管の豊富な足底部皮膚では、Tbx3 陽性基底細胞は恒常的に存在していた<sup>11)</sup>。一方、加齢した皮膚では、体表血管の退縮による真皮の過剰な硬化が、表皮基底細胞のメカノセンサー Piezo1 の持続的活性化を介して早期分化を誘導していた<sup>12)</sup>。これらのことから、体表血管による真皮の組織内力場(剛性)の調整が皮膚の恒常性維持に重要であることが示唆された。

本研究では、妊娠期の腹部皮膚伸展における皮膚組織剛性の調整機構について、真皮線維芽細胞の観点から研究を進めた。

## 2. 方法

### 2.1. 真皮線維芽細胞の単一細胞遺伝子発現解析

非妊娠と妊娠各ステージのマウス腹部皮膚から皮下脂肪をメスで取り除き、トリプシン処理により表皮と真皮に分離した。真皮組織をコラゲナーゼ処理し真皮細胞を単一細胞に分離させた。各群の単細胞懸濁液を 10 × Chromium Controller (10 × Genomics) でバーコード化した。その後、各サンプルのバーコード化された細胞からの RNA を逆転写し、Chromium Single Cell Reagent Kit の試薬を用いて製造元の指示に従ってシーケンスライブラリーを構築し、シーケンスを実施した。10 × Genomics の Cell Ranger パイプラインを用いて各細胞の遺伝子カウントを行った。Seurat RunUMAP 関数により UMAP 解析とクラスタリングを行った。

### 2.2. 真皮線維芽細胞クラスターの空間マッピング

5つの線維芽細胞クラスターそれぞれについて、10



Skin remodeling during pregnancy

Fumiko Toyoshima

Medical Research Laboratory, Institute of Integrated Research, Science Tokyo

以上のマーカー遺伝子を選別した。各遺伝子について padlock probe を合成し、in situ seq (Hybridization-based In Situ Sequencing, HybISS 法) を用いて各遺伝子産物の皮膚切片上での空間配置を同時検出した。各線維芽細胞の核から一定距離内にある遺伝子産物の個数を定量化し、probabilistic cell typing by in situ sequencing (pciSeq) 法によって、切片上の各線維芽細胞を 5 クラスターに分類した。

### 2.3. 原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた真皮剛性マッピング

凍結切片化した皮膚サンプルを融解後 Hoechst 染色し、真皮領域に対して AFM を用いた QITM imaging (quantitative imaging; Bruker JPK Nanowizard 3) を実施した。数~数十  $\mu\text{m}$  四方の測定領域に対して高密度に測定点を設け、各点で高速の押し込み試験を行うことにより、測定領域の表面形状と剛性を同時にマッピングした。qp-BioAC cantilever B (spring constant  $\sim 0.1\text{N/m}$ ; tip radius  $< 10\text{ nm}$ ) を使用した。

### 2.4. マウス実験

すべてのマウス実験は、京都大学動物実験規程ならびに東京科学大学動物実験規定のガイドラインに従って行われた。動物実験は京都大学医生物学研究所動物実験委員会ならびに東京科学大学動物実験委員会の承認を得た。WT マウスの解析には C57BL/6J 系統を用いた。Pdgfra-CreERT2, Yap1 flox/flox, Wwtr1 flox/flox マウスは Jackson Laboratories から入手した。

## 3. 結果

### 3.1. 妊娠期における細胞外基質リモデリングを担う真皮線維芽細胞クラスターの同定

非妊娠、妊娠 4 日目、9 日目、17 日目の腹部皮膚真皮の細胞について scRNAseq 解析を実施した。このうち線維芽細胞についてクラスタリング解析し、5 クラスターに分類した。各クラスターの皮膚組織内での空間配置を特定するため、それぞれに特異的な複数マーカー遺伝子を 10 遺伝子以上選別し、HybISS によって全てのマーカー遺伝子の mRNA を同一切片上でマッピングした。次に、pciSeq 法を用いて核から一定距離内にある各 mRNA の個数を定量化することによって、切片上の各線維芽細胞を 5 クラスターに分類した。その結果、細胞数の多い二つのクラスターのうち、一つは表皮に近い真皮の上層部に存在し、もう一つのクラスターは皮下組織に多く存在していた。また、5 クラスター間での遺伝子発現を比較した結果、真皮上層部に存在する線維芽細胞では、細胞外基質関連遺伝子群 (マトリソーム) が有意に濃縮していた。さらに、このクラス

ターでは、妊娠の進行に伴い発現するマトリソームが大きく変化することが分かった。これらの結果から、妊娠期の腹部皮膚では、真皮上層部において線維芽細胞による細胞外基質のリモデリングが誘導されていることが示唆された。

### 3.2. 妊娠期における真皮剛性の変化

細胞外基質のリモデリングは、組織の剛性 (かたさ) や形状を変化させることが予想される。そこで、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた QITM imaging (quantitative imaging) を実施した。本手法は、数~数十  $\mu\text{m}$  四方の測定領域に対して高密度に測定点を設け、各点で高速の押し込み試験を行うことにより、測定領域の表面形状と剛性を同時にマッピングする手法である。非妊娠、妊娠 9 日、妊娠 17 日のマウス腹部皮膚を測定したところ、妊娠 8 日目で真皮線維が束化する現象が認められ、かたさも 1.5 倍程度上昇することが分かった。この現象は、16 日目においても同等のレベルに維持されていた。

### 3.3. 真皮線維芽細胞におけるメカノシグナルの活性化

真皮線維の形状や剛性の変化は、線維に接着している線維芽細胞のシグナル伝達を変化させる可能性がある。そこで、非妊娠と妊娠 9 日目を比較して線維芽細胞で変化のある遺伝子群の pathway 解析を実施したところ、focal adhesion pathway が妊娠 9 日目で有意に上昇していた。さらに、妊娠 9 日目で上昇する遺伝子群の上流転写因子を予測解析したところ、メカノトランスデューサーである YAP が有意に濃縮していた。また、YAP の下流遺伝子群も、妊娠の進行に伴い線維芽細胞で発現上昇することが分かった。さらに、妊娠 9 日、妊娠 17 日の腹部皮膚真皮の線維芽細胞において、YAP の核移行が誘導されていた。

YAP の活性化が基質のかたさに依存することを検証するため、非妊娠と妊娠の真皮のかたさと同等のハイドロゲルを作成し、腹部皮膚から単離・培養したプライマリー線維芽細胞を培養した。その結果、非妊娠と同等のかたさ (柔らかい) のハイドロゲル上に比べ、妊娠と同等のかたさ (かたい) のハイドロゲル上では、YAP の核移行が有意に上昇した。

以上の結果から、細胞外基質リモデリングによる真皮線維の剛性変化が、線維芽細胞において YAP の活性化を誘導することが明らかとなった。

### 3.4. メカノシグナルから化学シグナルへの転換による表皮増殖の誘導

これまでの研究で、妊娠期においては真皮からの分泌シグナルが表皮細胞の増殖を誘導することが明らかとなった。そこで、真皮線維芽細胞における YAP の活性化が表皮細胞

胞の増殖を誘導する可能性を検証した。

このため、線維芽細胞特異的にYAP/TAZをノックアウトするマウスを作出した。タモキシフェンを妊娠マウスの腹部皮膚に塗布することにより、妊娠期腹部特異的にYAP/TAZを線維芽細胞でノックアウトしたところ、妊娠期における表皮基底細胞の増殖が有意に低下した。同様の現象は、真皮上層部に存在する線維芽細胞クラスターでYAP/TAZをノックアウトした場合も認められた。

次に、YAPの下流で発現し、表皮増殖を誘導する分泌因子の同定を試みた。このため、線維芽細胞と表皮基底細胞間でのNicheNet解析を実施した。Sender(分泌因子・リガンド)とReceiver(受容体)を線維芽細胞と表皮基底細胞にそれぞれ設定し、妊娠期で発現上昇し、かつYAP/TAZノックアウトマウスで発現が低下する分泌因子を選別し結果、3種類のSender-Receiverが候補として挙げられた。そのうちの一つであるTgfb2-Tgfr2/3は、細胞の増殖や分化に関与することが報告されていた。また、YAPがTgfb2のプロモーター領域に結合することが、公共データベースChIP Atlasで示されていた。そこで、Tgfr2を表皮基底細胞でノックアウトしたところ、妊娠期における表皮基底細胞の増殖が有意に低下した。これらの結果から、真皮剛性の変化が線維芽細胞においてYAPの活性化を誘導し、YAPがTgfb2の転写を誘導することでTgfb2-Tgfr2シグナルを介して表皮基底細胞の増殖を促進することが明らかとなった。

#### 4. 考察と総括

皮膚のリモデリングには、真皮と表皮のクロストークが重要である。本研究では、妊娠期の皮膚伸展において、真皮の剛性変化が表皮への化学シグナルに変換されるメカニズムを明らかにした。この機構においては、真皮上層部に存在する線維芽細胞クラスターが主要な役割を担っていた。すなわち、妊娠中期(妊娠9日目)においてマトリソームの遺伝子発現を変化させて細胞外基質リモデリングを誘導すると共に、自らが剛性変化を感知してYAPを介した表皮へのTgfb2シグナルを分泌していた。従って、この線維芽細胞クラスターは、力場シグナルを化学シグナルへ変換する役割を果たしていることが示唆される。

真皮上層部に存在する線維芽細胞クラスターでは、妊娠9日目ですでにマトリソーム遺伝子の発現が誘導され、真皮剛性や形状も変化していた。妊娠9日目は腹囲の変化はほとんど認められないため、胎仔の成長にともなう腹部の張力負荷は増加していないと考えられる。従って、マトリソーム発現を誘導するシグナルは張力以外の要因であると予想される。妊娠期に増加するホルモンや胎仔からのシグナルなど、上流シグナルの同定が今後の課題である。これまでの研究で、妊娠期には体表血管が発達し、体表血管依存

的に表皮基底細胞の増殖が誘導されることを示した。体表血管の発達がホルモンなどの循環因子を真皮に到達させるために必要である可能性も考えられる。体表血管と真皮線維芽細胞・真皮剛性との関連を明らかにすることが、生理的皮膚リモデリングの理解につながると予想される。

妊娠線は、真皮線維の損傷が原因とされている。しかし、そのメカニズムはほとんど不明である。本研究によって、真皮線維芽細胞による細胞外基質リモデリングが、妊娠中期ですでに開始されていることが明らかとなった。妊娠の早い段階での真皮のケアが妊娠線の予防には重要かもしれない。マトリソームの発現を誘導する上流因子や体表血管を発達させる因子を特定することで、それらを標的としたスキンケアの技術開発が望まれる。

#### 謝辞

本研究は、京都大学iPS細胞研究所の山本拓也教授、京都大学医生物学研究所の牧功一郎准教授との共同研究として実施した。

#### (引用文献)

- 1) G. Mascré, S. Dekoninck, B. Drogat, K. K. Youssef, S. Broheé, P. A. Sotiropoulou, B. D. Simons, C. Blanpain, Distinct contribution of stem and progenitor cells to epidermal maintenance. *Nature* 489: 257-262, 2012.
- 2) A. Sánchez-Danés, E. Hannezo, Jean-Christophe L. M. Liagre, K. K. Youssef, B. D. Simons, C. Blanpain, Defining the clonal dynamics leading to mouse skin tumour initiation. *Nature* 536: 298-303, 2016.
- 3) C. Gomez, W. Chua, A. Miremedi, S. Quist, D. J. Headon, F. M. Watt, The interfollicular epidermis of adult mouse tail comprises two distinct cell lineages that are differentially regulated by Wnt, Edaradd, and Lrig1. *Stem Cell Reports* 1: 19-27, 2013.
- 4) E. Roy, Z. Neufeld, L. Cerone, H. Y. Wong, S. Hodgson, J. Livet, K. Khosrotehrani, Bimodal behaviour of interfollicular epidermal progenitors regulated by hair follicle position and cycling. *EMBO J* 35: 2658-2670, 2016.
- 5) A. Sada, F. Jacob, E. Leung, S. Wang, B. S. White, D. Shalloway, T. Tumber, Defining the cellular lineage hierarchy in the interfollicular epidermis of adult skin. *Nat. Cell Biol.* 18: 619-631, 2016.
- 6) D. W. M. Tan, K. B. Jensen, M. W. B. Trotter, J. T. Connelly, S. Broad, F. M. Watt, Single-cell gene expression profiling reveals functional heterogeneity of undifferentiated human epidermal cells. *Development* 140: 1433-1444, 2013.

- 7) S. Joost, A. Zeisel, T. Jacob, X. Sun, G. L. Manno, P. Lönnerberg, S. Linnarsson, M. Kasper, Single-Cell Transcriptomics Reveals that Differentiation and Spatial Signatures Shape Epidermal and Hair Follicle Heterogeneity. *Cell Syst.* 3: 221-237, 2016.
- 8) J. B. Cheng, A. J. Sedgewick, A. I. Finnegan, P. Harirchian, J. Lee, S. Kwon, M. S. Fassett, J. Golovato, M. Gray, R. Ghadially, W. Liao, B. E. P. White, T. M. Mauro, T. Mully, E. A. Kim, H. Sbitany, I. M. Neuhaus, R. C. Grekin, S. S. Yu, J. W. Gray, E. Purdom, R. Paus, C. J. Vaske, S. C. Benz, J. S. Song, R. J. Cho, Transcriptional Programming of Normal and Inflamed Human Epidermis at Single-Cell Resolution. *Cell Rep.* 25: 871-883, 2018.
- 9) A. Ghahramani, G. Donati, N. M. Luscombe, F. M. Watt, Epidermal Wnt signalling regulates transcriptome heterogeneity and proliferative fate in neighbouring cells. *Genome Biol.* 19: 3, 2018.
- 10) Ichijo, R., Kobayashi, H., Yoneda, S., Iizuka, Y., Kubo, H., Matsumura, S., Kitano, S., Miyachi, H., Honda, T., and Toyoshima, F. Tbx3-dependent amplifying stem cell progeny drives interfollicular epidermal expansion during pregnancy and regeneration. *Nat. Commun.* 8: 508, 2017.
- 11) Ichijo R, Kabata M, Kidoya H, Muramatsu F, Ishibashi R, Abe K, Tsutsui K, Kubo H, Iizuka Y, Kitano S, Miyachi H, Kubota Y, Fujiwara H, Sada A, Yamamoto T, Toyoshima F. Vasculature-driven stem cell population coordinates tissue scaling in dynamic organs. *Sci. Adv.* 7: ea2575, 2021.
- 12) Ichijo R, Maki K, Kabata M, Murata T, Nagasaka A, Ishihara S, Haga H, Honda T, Adachi T, Yamamoto T, Toyoshima F. Vasculature atrophy causes a stiffened microenvironment that augments epidermal stem cell differentiation in aged skin. *Nat. Aging* 2: 592-600, 2022.