

# 組織幹細胞の起源の探索

森田 梨津子 藤原 裕展

Key words : ライブイメージング, 1 細胞トランスクリプトーム, 毛包幹細胞の起源, テレスコープモデル

成体の組織に存在する組織幹細胞は、自分自身を複製する“自己複製能”と組織を構成する様々な細胞を生み出す“多分化能”を有し、組織や器官の恒常性を支えている。しかし、発生過程において、この“幹細胞”という特別な細胞がどこからどのようにして生み出されるのかについては、多くの器官で十分に解明されていない。本稿では、筆者らが得た知見を交えながら、組織幹細胞の発生起源とその誘導過程の解明に取り組む最近の知見と、その戦略を紹介する。

## I. 組織幹細胞研究の未解決課題

われわれの体からは、毎日何十億個もの細胞が失われている。組織のターンオーバーや損傷などによって失われるこれらの細胞は、組織幹細胞が適切なバランスで増殖・分化することで補充されている。1960年代の造血幹細胞の発見によって、自己複製能と多分化能をあわせ持つ“幹細胞”という概念が確立された。それ以来、組織や器官の修復・再生の鍵を握る存在として世界中で積極的に研究が進められ、今日では、皮膚や腸といった多くの器官において様々な成体組織幹細胞が同定されている。更に、幹細胞で特異的に発現する遺伝子の特定により、幹細胞の標識、分離、操作などが可能になると、成体の組織幹細胞の研究は一気に加速し、幹細胞の遺伝子発現プロファイ

ル、幹細胞の微小環境(ニッチ)の分子・細胞実体、幹細胞-ニッチ相互作用を介した組織幹細胞の増殖・分化制御のメカニズムなどについての理解が大きく進んだ。

その一方で、幹細胞の発生起源と誘導過程については、ほとんどの組織幹細胞においていまだ十分に解明されていない。例えば、器官の恒常性を維持するための基本的なしくみである器官構造や細胞間相互作用が形成される“発生過程”において、どのようにして組織幹細胞が正しい場所に正しいときに誘導されるのか? ニッチと幹細胞の相互依存的な関係がどのように生み出されるのか? 成体の組織幹細胞は胎児期の未分化性が維持された結果なのか、それとも誘導されるのか? 発生過程で器官を形作る細胞と成体の幹細胞は同一なのか? といった問いは、いまだ重要な未解決課題として残されている。こうした問いに答え、幹細胞のルーツを明らかにすることは、発生生物学的に重要であると同時に、器官の恒常性維持機構の設計原理の理解にも大きく貢献する。最近の遺伝子工学、イメージング技術、理論生物学などの進歩により、組織幹細胞の起源や誘導過程についての新しい知見が得られてきているため、紹介したい。

### Tracing the origin of tissue stem cells

Morita Ritsuko, Fujiwara Hironobu: 理化学研究所生命機能科学研究センター細胞外環境研究チーム (〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町 2-2-3)

0370-9531/04/¥500/論文/JCOPY

## II. 組織幹細胞の発生起源の解明に向けた試み

組織幹細胞の起源をたどるうえで、発生過程の細胞系譜の理解は不可欠である。細胞系譜解析は発生生物学において古くから用いられている特定の細胞の子孫を同定する手法で、中性赤、ナイル青、PKH などの生体色素による細胞の標識と追跡に始まり、最近では組織特異のプロモーターと Cre-loxP システムを利用した遺伝学的な標識・追跡手法が多用されている。特定の幹細胞を識別可能な分子マーカーが同定されたことで、遺伝学的手法を用いて胎生期の組織幹細胞の起源や細胞系譜を明らかにしようとする試みがなされてきた。例えば、哺乳類の脳では、Tet-off システムにより細胞の分裂回数と細胞系譜を解析可能なマウスが用いられ、胎生期の神経幹細胞の一部に分裂頻度を低く保った特別な細胞群が存在し、それが成体神経幹細胞の起源になることが報告されている<sup>1)</sup>。

また、最近では、形態形成過程における腸の機械的な変形(腸絨毛の形成)によって局所的な微小環境が生み出され、それが腸管上皮幹細胞の誘導の場として機能する可能性が示された<sup>2,3)</sup>。筆者らは、成体の腸管上皮幹細胞マーカーである LGR5 の発現を指標にした系譜追跡に生物物理学的モデリングを組み合わせることで、①胎生期の腸管細胞は幹細胞マーカーの発現にかかわらず非常に高い可塑性を有しており、どの細胞も幹細胞になり得ること、②胎児期の腸管細胞から、周囲の微小環境依存的に幹細胞のアイデンティティを獲得する細胞が現れることを明らかにした<sup>2,3)</sup>。われわれが器官モデルとして主に用いている毛包でも、2016年に Ouspenskaia らが、成体毛包幹細胞マーカーである SOX9 の発現を指標にした遺伝学的細胞系譜解析に基づいて「毛包原基であるプラコードの基底細胞の非対称分裂により SOX9 陽性の基底上層細胞が生み出され、それが毛包幹細胞の起源になる」と報告している<sup>4)</sup>。そして、これが研究分野での定説となっていた。

このように、遺伝学的細胞系譜解析は、現在の幹細胞研究において欠かせない重要な解析手法となっており、幹細胞の起源の解明に寄与してい

る。しかし、一方で限界や欠点もある(図 1A)。一般的な遺伝学的細胞系譜解析では、細胞標識の特異性と効率はプロモーター活性の時空間的パターンに大きく依存する。したがって、細胞標識の特異性が低い場合、しばしば系譜追跡結果の解釈が難しくなることがある。更に、標識細胞の系譜解析では、固定組織標本を作製して標識細胞の最終分布を確認することが多い。この場合、はじめの標識細胞がどこにいたどのような細胞であったのか、その細胞が標識されてから解析するまでの間にどのような挙動をしたのかを連続的に観察することはできない。複数個体にわたる固定標本を用いた統計解析から原因と結果をつなぐ細胞のふるまいが類推されるため、細胞の起源やふるまいに関する誤解釈を招く可能性があることにも留意する必要がある。造血組織、皮膚、腸など、多くの器官で生じてきた系譜解析の対立的な主張は、これら従来の系譜解析法の弱点に由来することが多いと思われる。

## III. 1 細胞オミクス解析による毛包幹細胞の起源と系譜の同定

毛包は、“周期的に再生を繰り返す”という特徴ゆえに、組織再生や幹細胞の研究が活発に行われてきた器官である<sup>5)</sup>。30 年ほど前に、毛包のバルジ部に組織幹細胞が存在することが報告されたのち、成体幹細胞や幹細胞ニッチの理解が飛躍的に進んだ先駆的なモデル器官であるが、発生過程における幹細胞の起源についての報告は、前述の Ouspenskaia らによる報告 1 報にとどまっていた。

筆者らは、毛包幹細胞の発生起源とその誘導過程を明らかにするために、まず将来の毛包幹細胞を標識可能な分子マーカーの探索を行った。成体毛包幹細胞の代表的な分子マーカーの発現を発生過程を通して解析した結果、発生初期におけるこれらマーカーの発現パターンは時空間的に実に多様であったため、これらの発現を頼りに発生を遡っても毛包幹細胞の起源を推定することは困難であると考えられた。そこで、特定の分子マーカーには依存せず、細胞系譜と細胞状態の変化を 1 細胞解像度で器官全体にわたって網羅的かつ連続的に解析することで、毛包幹細胞の発生起源と誘導過

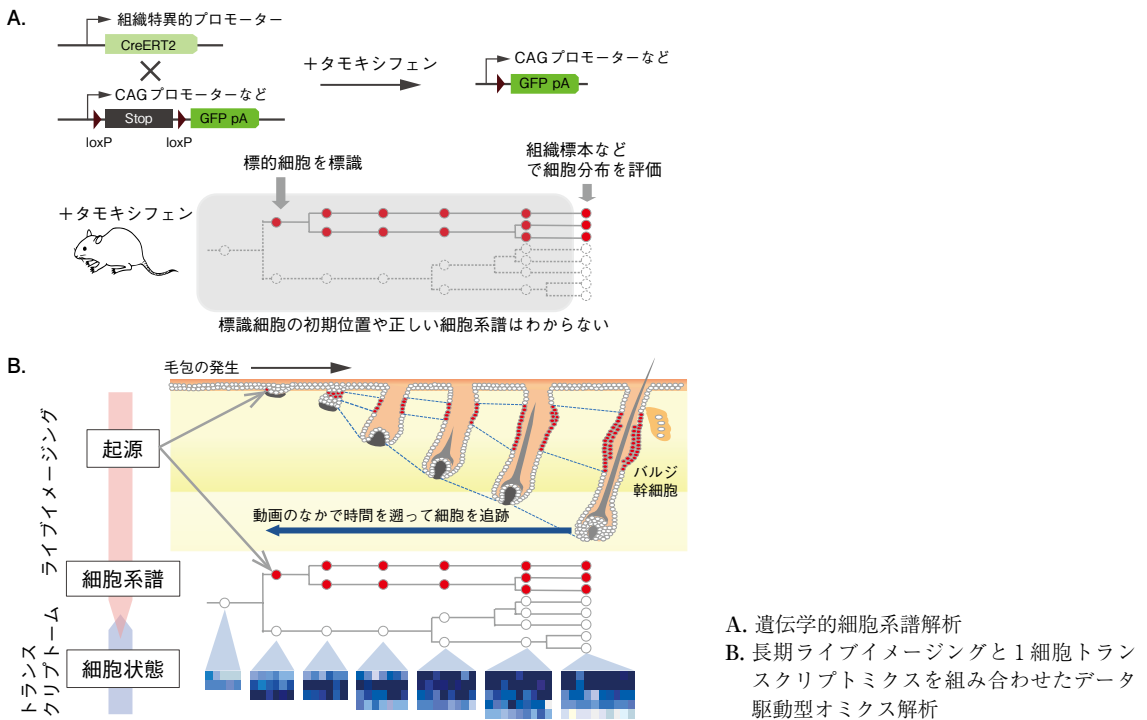


図 1 幹細胞の発生源の解明に向けた戦略

程を解明する戦略をとった。すなわち、1細胞解像度での毛包器官発生の長期ライブイメージングと経時的な1細胞トランスクリプトームを統合させた独自のデータ駆動型解析を選択した(図1B)。

まず、プラコード形成初期から毛が分化・産生されるまでの毛包全体の細胞動態を、1細胞解像度で長期間連続的にライブイメージングする。この取得画像中で同一毛包内の毛包構成細胞を網羅的に追跡し時間を遡ることで、器官を構成する多数の細胞の細胞動態(配置、分裂、位置関係など)と細胞系譜が紐づけされた四次元的な細胞系譜情報を得る。これは、従来の固定組織を用いた経時解析では取得不可能な動的な細胞系譜データで、このデータの解析により、毛包構成細胞全体の発生源とその発生系譜を明らかにできると考えた。

一方、ライブイメージングでは時空間的な細胞の位置情報を知ることができても、細胞状態の変化はわからない。そこで、発生毛包全体の時系列1細胞トランスクリプトームデータを同時に取得して各細胞系譜の遺伝子発現の変化を解析し、ライブイメージングから得た細胞動態と系譜の情報

に統合することで、毛包幹細胞の起源と誘導過程をこれまでにない解像度で明らかにすることを考えた。

この戦略に従って、まずマウスの頬および背中の毛包の発生を生体外(*ex vivo*)で再現する器官培養法を新たに確立し、1細胞レベルの解像度で毛包発生過程を捉えた動画を取得した<sup>6,7)</sup>。本動画のなかで毛包発生が始まる毛包プラコードへと時間を遡って細胞の追跡を進めた。その結果、二次元の上皮シートから成る毛包プラコードでは、異なる系譜の細胞群が同心円リング状に配置されており、将来幹細胞になる細胞は、毛包プラコード辺縁に位置するSOX9陽性の基底細胞のリングから生まれることが明らかになった(図2A)。発生が進むと、毛包プラコード上の同心円リング領域が間充織側へ陥入し、かつ各領域が長軸方向に伸長することで、各リング領域が三次元的な筒状の領域(幹細胞領域を含む)に発展することもわかった。更に、毛包幹細胞の予定細胞は、この過程での毛包形成にはほとんど寄与しなかった。

Ouspenskaia らによる先行研究では、毛包幹細

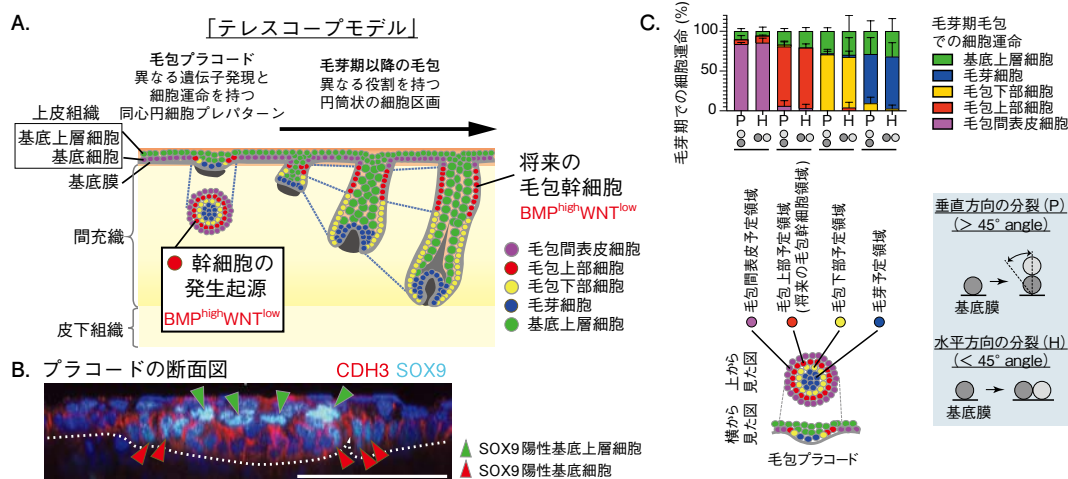


図 2 毛包幹細胞の発元起源の解明

- A. データ駆動型オミクス解析から明らかになった毛包幹細胞の発元起源と毛包発生の新モデル「テレスコープモデル」  
 B. 毛包プラコードの SOX9 発現細胞の局在  
 C. 毛包プラコード基底細胞の分裂方向とその後の毛芽期毛包での細胞運命の関係

胞はプラコード基底細胞の垂直および非対称の細胞分裂によって生まれる SOX9 陽性/ $WNT^{low}$  の基底上層細胞に由来すると報告された。一方、筆者らの研究で同定された毛包幹細胞予定細胞は、同じ SOX9 陽性細胞であっても、先行研究とは異なる基底細胞に由来していた。なぜこのような矛盾が生まれたのか？ この問題を解決するために、筆者らはまず、体毛と頬ひげのプラコードで SOX9 発現細胞の分布を確認した。すると、基底上層細胞で強い SOX9 の発現が認められる一方で、プラコード辺縁の基底層においても弱いながら SOX9 の発現が認められ、プラコードには 2 種類の SOX9 陽性細胞が存在することが明らかになった (図 2B)。更に *Sox9* のレポーターマウスを用いて新たに動画を取得し、SOX9 陽性細胞の系譜追跡を行ったところ、SOX9 陽性のプラコード基底上層細胞からは幹細胞領域への寄与はなく、SOX9 陽性基底細胞から将来の幹細胞が生まれることが確認された。更に、プラコードの各領域ごとに、基底膜に対して垂直方向と水平方向に分裂する基底細胞をピックアップし、発生が進んだ毛芽期毛包での細胞運命を解析したところ、毛包幹細胞を含む毛包細胞の運命は、分裂方向ではなく、むしろプラコード内での細胞の位置に大きく依存することが示唆された (図 2C)。これらの結

果から、プラコードには 2 種類の SOX9 陽性細胞群が存在し、それらが異なる細胞運命をとるために、幹細胞の起源や誘導機構に関する食い違いが生じたと考えられた。

続いて、細胞の分化状態の時空間的な発展を毛包上皮全体にわたって明らかにするために、毛包発生過程を通じた経時的な 1 細胞トランスクリプトーム解析を実施した。経時的に取得した各発生ステージの細胞から、高感度 1 細胞完全長トータル RNA シーケンス法「RamDA-seq」<sup>8)</sup>を用いて 1 細胞トランスクリプトームデータを取得した。個々の細胞の組織内での擬似的な時空間配置と細胞系譜を細胞の遺伝子発現パターンに基づいて構築した結果、毛包プラコードにおいて、ライブイメージングで得られた細胞系譜パターンと一致した同心円リング状の遺伝子発現パターンが存在することが判明した。更に、疑似時空間にプロットされた毛包細胞系譜の遺伝子発現変動を解析した結果、発生ステージの進行と共に、同心円の各リングに特徴的な複数の遺伝子が、同心円パターンから筒状毛包の各領域への発展と対応するように、その発現領域を変化させることが明らかになった。そして、毛包幹細胞が生まれるプラコード辺縁のリング領域は、成体幹細胞と同様に BMP 活性が高く WNT 活性が低い状態であり、この領域が毛

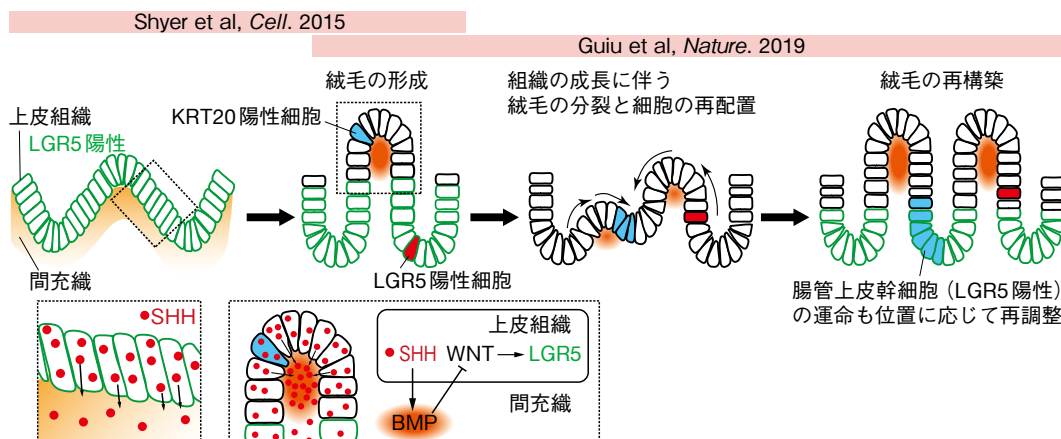


図 3 腸管上皮幹細胞の発生起源に関する最新知見

包発生を通じて維持，拡大することで，毛包幹細胞が誘導される場が生じている可能性が示された。

#### IV. 毛包の領域形成と幹細胞誘導を支える「テレスコープモデル」

前述のとおり，ライブイメージングと1細胞トランスクリプトーム解析という異なる2つの手法を用いて毛包発生を解析した結果，毛包プラコード上に同心円リング状の細胞系譜パターンと遺伝子発現パターンが，それぞれ存在することを見出した<sup>7)</sup>。この異なる遺伝子発現と細胞運命を持つ上皮細胞系列の同心円リングパターンは，その後，間充織側へと突出するように陥入し，各領域が長軸方向に伸長することで，毛包の筒状の領域パターンを形成することも明らかになった(図2A)。そして，毛包幹細胞の起源は毛包プラコードの辺縁の基底細胞のリングに由来し，毛包の形態形成過程でこのBMP活性が高くWNT活性が低いリングが拡大・伸長するなかで，幹細胞が誘導されることが示唆された。筆者らは，この毛包の発生様式を伸縮式の望遠鏡になぞらえて「テレスコープモデル」と名づけた。二次元の同心円パターンから三次元的な筒状の領域が形成される様は，ショウジョウバエの胚発生における肢原基形成機構にも似ていることから，哺乳類以外の生物種の器官発生にも共通する普遍的な形態形成システムであることが期待される<sup>9,10)</sup>。すなわち，二

次元のプレパターンを三次元的に変形・拡大するという方法によって，単純な細胞シートから多様な上皮細胞の系譜から成る三次元の筒状区画(そのうちの 하나가幹細胞)が形成される時空間発展のしくみが説明できると考えられる。

#### V. 形態形成と幹細胞誘導の多階層的理解

器官が正常に機能するためには，器官の形成過程において，幹細胞を含む多様な機能細胞が適切に分化・配置される必要がある。どのようにして，個々の細胞のふるまいや細胞運命を時期・場所ごとに適切に制御しながら，複雑な器官構造と秩序が構築されるのか。最近，発生過程において細胞と周囲環境の相互作用を通じて，初期幹細胞の誘導やふるまいが制御されている可能性が報告されている。

一般的に，組織幹細胞は，器官や組織の特定の部位や構造に安定的に局在していることが多い。毛包幹細胞はバルジと呼ばれる皮膚の下毛包隆起部に維持され，小腸上皮幹細胞は各絨毛の基底部(将来の陰窩)に局在化する。こうした器官の組織構造，細胞配置，そして幹細胞としてのアイデンティティは，胎生期の器官形成過程で誘導されたものが成体に引き継がれる。最近，幹細胞の局在化と形態形成に密接な関係があることが，マウスやニワトリの腸の発生において報告された(図3)<sup>2,3)</sup>。

腸の発生初期には、幹細胞マーカーである LGR5 を発現する前駆細胞が上皮全体に均一に分布している。Shyer らは、腸の内胚葉の座屈によって絨毛が形成されると、折り畳まれた上皮の彎曲した先端部において、腸内胚葉全体に様に発現していたソニックヘッジホッグ (Shh) シグナルが局所的に増大し、隣接する間充織においてシグナルセンターである絨毛クラスターが誘導されることを示した。更に、このシグナルセンターから分泌された BMP が先端上皮にフィードバックされて WNT 活性化に拮抗することで、WNT に支えられた LGR5 陽性細胞群の増殖が抑制され、結果的に LGR5 陽性幹細胞が各絨毛の基部に限定された。このように、組織の二次元から三次元への機械的な変形によって、一様であった形態形成場から局所的なシグナルセンターが生まれ、細胞の局所的な誘導・分化が引き起こされることが示された<sup>3)</sup>。

また、Guiu らは、3D イメージングと定量的な系譜解析を用いて、胎仔期の絨毛が組織の成長に伴いモデリングされて分裂すること、そしてその組織再構築によって、非増殖性で LGR5 陰性 KRT20 陽性の絨毛上皮細胞も、増殖性の間隙領域に移動して成体の幹細胞に貢献し得ることを明らかにした。更に生物物理学的モデリングにより、生物学実験から得られた結果は、成体の腸管のように腸基底部から絨毛への一方向の細胞移行を基盤とするモデルでは説明できず、絨毛の新生・分裂に伴い、絨毛と絨毛間領域で細胞位置の再配置(絨毛間領域が絨毛領域になるなど)が起こるモデル (cell-repositioning model) により最も説明できることが判明した。このことから、場所やマーカーの発現にかかわらず、胎生期の腸管細胞は総じて可塑性が高く、どの細胞も成体腸管幹細胞の同等の前駆体であることも示し、位置依存的にその後の細胞運命が決定し得ることが明らかになった<sup>2)</sup>。

このように、腸の形態形成過程における組織の屈曲や絨毛の分裂という組織のトポロジーの変化は、局所的な微小環境を改造する生物物理学的なメカニズムを提供し、形態形成と細胞運命の調和を可能にする。これが他の器官や組織の発生過程

にも当てはまるかどうかは十分に理解されていないが、組織のトポロジーや細胞への機械刺激が細胞の増殖、生存、細胞運命などに寄与することが明らかにされてきていることを鑑みると、器官に固有の形態形成プロセスが幹細胞の誘導に影響を与えることは十分に想定される。今後、発生過程における幹細胞とそのニッチの誘導機構の理解を進めるにあたって、遺伝子発現パターン、個々の細胞のふるまい、そして組織の形態変化という多階層な現象に目を向けて、それら階層間をつなぐメカニズムを明らかにしていく必要があるだろう。

## おわりに

筆者らが提唱した「テレスコープモデル」は、毛包固有の組織形態の変化と、幹細胞の誘導を支えるシグナルゾーンと細胞系譜の時空間発展現象とをつなぐモデルになり得ると考えている。このモデルを基盤に研究を進めることで、幹細胞を生み出し維持する幹細胞ニッチの誘導メカニズムの解明も進むと期待される。更に、テレスコープモデルは、毛包と同様にプラコードから発生する様々な外胚葉性器官(乳腺、汗腺など)の発生に共通する形態形成モデルである可能性がある。これらの器官の間にある共通点と相違点を探るなかで、器官の多様性を支えるしくみが明らかになることが期待される。

## ●文 献

- 1) Furutachi S, Miya H, Watanabe T et al : *Nat Neurosci.* **18** : 657-665, 2015
- 2) Guiu J, Hannezo E, Yui S et al : *Nature.* **570** : 107-111, 2019
- 3) Shyer AE, Huycke TR, Lee C et al : *Cell.* **161** : 569-580, 2015
- 4) Ouspenskaia T, Matos I, Mertz AF et al : *Cell.* **164** : 156-169, 2016
- 5) Fujiwara H, Tsutsui K, Morita R : *Dev Growth Differ.* **60** : 531-541, 2018
- 6) Morita R, Kihira M, Nakatsu Y et al : *PLoS One.* **11** : e0161336, 2016
- 7) Morita R, Sanzen N, Sasaki H et al : *Nature.* **594** : 547-552, 2021
- 8) Hayashi T, Ozaki H, Sasagawa Y et al : *Nat Commun.* **9** : 619, 2018
- 9) Lecuit T, Cohen SM : *Nature.* **388** : 139-145, 1997
- 10) Ruiz-Losada M, Blom-Dahl D, Córdoba S, Estella C : *J Dev Biol.* **6** : 17, 2018