

立体培養系における ヒト皮膚表皮の形成に空気暴露が 必須であるメカニズムの研究

名古屋大学大学院 創薬科学研究科
基盤創薬学専攻 創薬生物科学講座 細胞生化学分野

手島 裕文

目次

略語.....	2
要旨.....	3
序論.....	6
研究材料、研究方法.....	9
結果.....	14
考察.....	20
実験データ.....	28
参考文献.....	55
業績リスト.....	58
謝辞.....	59

略語

ACF	Acriflavine
ALDOA	Aldolase, fructose-bisphosphate A
BSA	Bovine serum albumin
CA9	Carbonic anhydrase 9
ChIP	Chromatin-immunoprecipitation
DEG	Differentially expressed gene
DMOG	Dimethyloxaloylglycine
ENO2	Enolase 2
FLG	Filaggrin
GO 解析	Gene ontology 解析
HIF	Hypoxia inducible factor
HK2	Hexokinase 2
IP-MS	Immunoprecipitation-mass spectrometry
IVL	Involucrin
K1/10	Keratin 1/10
KDM3A	Lysine demethylase 3A
LDHA	Lactose dehydrogenase A
LOR	Loricrin
NDUFA4L2	NDUFA4 mitochondrial complex associated like 2
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1
PHD	Prolyl hydroxylase domain-containing protein
p300	Histone acetyltransferase p300
shRNA	Short hairpin RNA
SLC2A3	Solute carrier family 2 member 3
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A

要旨

ヒト皮膚表皮は、外部からの異物侵入や体内の水分蒸散を防ぐバリアとして機能する細胞層である。基底部の幹細胞が分化増殖し、最外部にバリア機能を担う角質層を生じることにより表皮が形成される。この一連の表皮形成過程は、ヒト表皮三次元培養という細胞培養系によって再現可能である。通常、細胞培養が液体培地中で行われるのに対し、ヒト表皮三次元培養では細胞をフィルター上に播種したのち、細胞を気相環境に暴露する「空気暴露」という操作が必須である。現在、培養系の確立から数十年が経過し、皮膚科学研究や薬理研究においてヒト表皮三次元培養は一般的な手法として広く浸透している。加えて表皮形成能改善のため、支持体の形状や材質の改良、培地組成の改善や生体材料を用いた方法など、様々な変法が提案されてきた。しかし、いずれについても空気暴露という特異な刺激が正常な表皮多層構造の形成に必須であり、その理由はこれまで明らかでなかった。そこで本研究では、空気暴露という特異な刺激がどのように表皮形成を促進するのかという点について着目し、そのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

空気暴露に起因する表皮形成メカニズムを明らかにするため、空気暴露環境下で培養する群と、液体培地中で培養することにより空気暴露を行わない群を比較する対照実験を行った。最初に、空気暴露の有無が表皮形成にどのような影響を与えるのかへマトキシリン・エオシン染色を用いて形態学的に評価した。結果として、空気暴露群では成熟した表皮構造が形成されたが、空気暴露を行わない液相培養群では異常な表皮形成が確認された。しかし培養期間を延長し長期で培養した場合、液相培養群における表皮形成異常が緩和したかのような形態が示された。そこで、より詳細な表皮構造を解析するために電子顕微鏡解析を行った。その結果、マクロな解析では明らかにならなかった明確な形態異常が示された。つまり、液相培養群で形成されている表皮層は全く成熟しておらず、表皮形成が破綻していることが改めて明らかとなった。

次に形態学的解析に加えて、表皮分化特異的なタンパク質の発現量をウェスタンブロットティングにより解析した。表皮には分化段階に応じて発現量が変動するタンパク質が多数存在する。それらの発現量を解析することにより、表皮の分化状態を評価した。その結果、表皮形成において非常に重要なタンパク質の多くが液相培養群において発現低下した。形態学的な解析に相関し、液相培養群では表皮分化プロセスが適切に進行していないことが示された。

これまでの解析から、空気暴露の有無により生じた表現型を明らかにしたが、空気暴露が誘導する細胞内変動を明らかにするため、発現遺伝子を網羅的に解析する RNA-sequencing を行った。形態学的解析において空気暴露の影響が培養開始 2 日目の時点で観察されたことから、空気暴露後 2 日目を対象に解析を行った。その結果、空気暴露の有無により発現が変動した遺伝子を 78 個同定した。これら変動遺伝子がどのような生

命現象に関与するのかが明らかにするため、Gene ontology (GO) 解析および Pathway 解析を行った。その結果、空気暴露群では表皮形成に関与する多くの遺伝子が発現したことが明らかとなった。一方で、液相培養群で発現した 48 遺伝子を解析したところ、HIF (Hypoxia-inducible factor: 低酸素誘導因子) pathway の関与が明らかとなった。

HIF は低酸素応答を担う転写因子であり、低酸素環境適応のために解糖系酵素を中心に様々な遺伝子の発現を制御する。RNA-sequencing の結果から、液相培養群で HIF が活性化している可能性が示されたため、解糖系酵素の発現量をウェスタンブロッティングで解析し、HIF の活性化状態を推定した。その結果、液相培養群では解糖系酵素の発現量が顕著に上昇した。本解析に加え、HIF の転写活性を直接測定するためレポーターアッセイを行った。HIF が結合する DNA 配列の直下にレポーター遺伝子を融合した外来遺伝子を表皮細胞に導入し、レポータータンパク質の発現量を測定することにより、転写因子の活性を測定した。その結果、液相培養群で HIF の活性が上昇した。

これまでの結果から、液相培養群における HIF の活性化が示唆されたため、HIF のタンパク質量をウェスタンブロッティングにより解析した。その結果、液相培養群では HIF タンパク質の発現量が減少し、空気暴露群では増加した。本結果を受け、核内に局在する HIF を正確に評価できていない可能性を検討するため、細胞を細胞質と核に分離し HIF タンパク質の発現量を定量した。しかし HIF は核内においても液相培養群で減少していた。

液相培養群で HIF は減少したが、これまでの結果から液相培養群は低酸素環境であり HIF が活性化していると仮定した。そこで、液相培養の表現型が HIF 阻害剤や RNA 干渉による HIF 抑制で回復するか解析した。まずは HIF 阻害剤である Acriflavine を液相培養群に作用させ、HIF 標的遺伝子および表皮分化マーカータンパク質をウェスタンブロッティングにより解析した。その結果、Acriflavine 処理により液相培養群における解糖系酵素は低下したものの、表現型の回復は見られなかった。また、HIF に対する short hairpin RNA (shRNA) を導入し、恒常的に HIF が抑制される細胞を用いて液相培養した場合も結果は同様であり、表皮形成の回復は確認されなかった。

HIF 自体の抑制では液相培養群の表現型が回復しなかったため、低酸素の解消により液相培養群の表現型が回復するか検討した。液相培養系に酸素を供給するため、培養器を振とう器で振とうさせることにより培地を攪拌し、酸素環境の改善を試みた。最初に、振とう培養が細胞の酸素環境を改善するか確認するため、低酸素検出プローブである Pimonidazole を細胞に添加した。その結果、液相培養群で確認された強いシグナルが振とう培養によって減少し、空気暴露群と同程度に改善した。すなわち、液相培養による低酸素が振とうにより解除され、空気暴露群と同等の酸素環境に改善した。次に振とう培養が表皮形成に与える影響を形態学的に解析した。その結果、液相培養における表皮分化異常が振とう培養により大きく回復した。本解析に加えて、表皮分化マーカータン

パク質の発現を解析した。その結果、振とう培養によって液相培養群で確認された分化マーカータンパク質の低下が大きく改善した。ここで興味深いことに、振とう培養下では HIF および解糖系酵素が空気暴露群と同様の動態を示した。すなわち、振とう培養群では液相培養群と比較して HIF タンパク質の存在量が増加する一方で、HIF の転写活性は減少した。以上の結果から、酸素環境が表皮分化に大きく影響を与えること、空気暴露は細胞に酸素を供給することにより表皮形成を促進することが明らかとなった。また、空気暴露群および振とう培養群では HIF タンパク質の増加と転写活性の低下が生じることが明らかとなった。

空気暴露環境下で進行する正常な表皮形成には、HIF タンパク質は増加するが転写活性は低下するという特異な動態が伴う。そのため、増加した HIF が表皮分化に対して寄与する可能性が考えられた。本仮説を検証するため、阻害剤および RNA 干渉を用いて空気暴露群の HIF を阻害した。その結果、HIF 阻害剤と RNA 干渉による HIF 抑制のどちらにおいても表皮分化は低下し、HIF が表皮分化に対し正に作用することが示された。本結果に加え、空気暴露群で増加した HIF は低酸素応答を促進する活性には関与しないことから、HIF が通常とは異なる活性で表皮分化に寄与する可能性が示唆された。

本研究では、ヒト表皮三次元培養の特異な培養環境に着目し、なぜ空気暴露という特異な刺激がヒト表皮の形成に必要なのかという問いを追求した。空気暴露を行わない条件下で確認された表皮形成の異常は、酸素環境の改善を目的とした振とう培養により改善した。このことから、空気暴露が細胞に酸素を供給することにより表皮形成の促進に寄与する可能性を示した。また表皮形成が促進する空気暴露群および振とう培養群においては、HIF 発現量が増加し、従来の HIF の転写活性が低下する現象が確認された。このことから、HIF が通常とは異なる活性で表皮分化に関与している可能性が示唆された。

序論

ヒトの体表を覆う皮膚は、大きさにすると約 1.6 m²、重さは約 3 kg であり人体で最大の臓器である。表皮、真皮、皮下組織の 3 つの層から構成され、痛覚などを感知する感覚器としての機能や、発汗による体温調節など様々な機能を持つ。なかでも、外部からの異物侵入や体内の水分蒸散を防ぐバリア機能は体内の恒常性を維持するために特に重要であり、その機能の大部分を表皮が担う¹⁾。

扁平重層上皮である表皮は約 0.2 mm 厚の細胞層であり、基底層、有棘層、顆粒層、角質層の 4 層に分類できる。各層はそれぞれ異なる細胞から構成され、異なる機能を有する。

基底層は表皮最深部に位置する単層であり、基底細胞により構成される。基底細胞は表皮細胞内で唯一の幹細胞であり、自己増殖により幹細胞性を維持するとともに、上層に分化した細胞を供給する役割を持つ。

基底層の上部に位置する有棘層は基底層から分化状態が進行した細胞層であり、5～10 層の有棘細胞から構成される。細胞同士が棘で接着しているような形態が観察されたことから有棘層と命名された。円柱状の形態を示す基底細胞に対し、有棘層下部の細胞は多角形を示し、上層に向かうにつれて扁平な形態へと変化する。

顆粒層は有棘細胞よりも分化が進行した細胞層である。2～3 層の顆粒細胞から構成され、さらに扁平な形態を示す。顆粒細胞はタンパク質性の顆粒であるケラトヒアリン顆粒や脂質を内包する層板顆粒といった顆粒を細胞内に内包している。これら顆粒はのちのち表皮細胞の最終分化において重要なコンポーネントとなる。また顆粒層の中層部分では、細胞間接着構造であるタイトジャンクションが高度に発達している。このタイトジャンクションは表皮内の液性環境を隔てる一種のバリアとして機能し、水分をはじめとした物質の移動を制御している。

表皮の最も外側に位置する角質層は、あらゆるストレスから体内を守るバリア機能を発揮する。角質層を構成する角質細胞はこれまでの細胞と大きく異なり、核や顆粒類をはじめとした細胞小器官を失った死細胞である。細胞内は高度に凝集したケラチン繊維で満たされているため扁平な形態を示す。このケラチンの凝集には、ケラトヒアリン顆粒の構成タンパク質 Profilaggrin が関係している。Profilaggrin が分解されモノマー化した Filaggrin monomer がケラチン繊維同士を凝集させる。また角質細胞では、細胞膜の代わりにタンパク質の巨大複合分子が細胞を覆っている。この巨大分子は Cornified envelope と呼ばれ、Loricrin (LOR) や Involucrin (IVL)、Small proline rich protein (SPRR) といった構造タンパク質群が Transglutaminase という酵素によって架橋されることにより形成される^{2,3)}。角質細胞同士は特異的なデスモソームであるコルネオデスモソームによって連結され、細胞の間隙は脂質で満たされている。この角質間脂質は、顆粒層後期に層板顆粒から細胞外へ放出される。以上のように、脂質とタ

ンパク質の複合体から成る強固な表皮バリアを獲得するためには様々なプロセス必要であり、これらが正確に遂行されることが必須である⁴。

基底細胞が角質細胞に分化する一連の過程を角化と言い、今日ではこの角化を細胞培養で再現することができる^{5,6}。表皮三次元培養法が確立される以前では、一般的な細胞培養と同様に表皮細胞をディッシュ上で二次元的に培養することが主流であった。しかし、1975年に線維芽細胞との共培養により表皮細胞の重層化に成功したことが発端となり、三次元的な表皮培養法の構築が加速した⁷。培地組成や足場環境の検討など様々な試みが行われ、1990年には血清など生体由来のマテリアルに頼らない三次元表皮モデルが提唱された⁸。現在では様々な研究機関や企業にヒト表皮三次元モデルが浸透し、皮膚科学研究や薬理研究において多用されている⁹。

このモデルが広く浸透している一方で、表皮分化の再現には空気暴露と呼ばれる特殊な刺激が必須である。細胞を培地中に沈めて行う培養と異なり、表皮三次元培養では細胞を空気に暴露しながら培養を行う。培養条件を実際の生体環境に近づける目的で1983年に空気暴露環境下での培養が実施され、表皮分化を促進する効果があることが報告された¹⁰。本報告以来、これまでに様々な表皮三次元培養の変法が提案されてきた^{11,12}。しかし、いずれの方法であっても空気暴露刺激が必須であることに加え、最初の報告から40年が経過した現在においても空気暴露刺激がどのように表皮分化を促進するのか明確な答えは得られていない。2006年のKoriaらの報告から、空気暴露の有無が糖代謝に影響を与えること、空気暴露を行わない条件下ではグリコーゲン合成を促進するProtein phosphatase 2 catalytic subunit alphaやProtein phosphatase 2 regulatory subunit betaが発現上昇することが分かっている¹³。また、創傷治癒特異的に発現するIntegrin 5 alphaの発現が空気暴露を行わない条件下において増加したことから、負傷状態で形成される表皮に一部表現型が類似していることが示唆されている¹³。

このように、空気暴露によって生じる細胞内変動の知見はあるが断片的な現象の報告にとどまっており、メカニズムに関しては未解決な部分が多い。そのため本研究では、立体培養系におけるヒト皮膚表皮の形成に空気暴露が必須であるメカニズムの解明を目的とした。そのために空気暴露を行う群と行わない群との対照実験を実施した。その結果、空気暴露が細胞に酸素を供給することにより表皮分化の促進に寄与する可能性を明らかにした。また、空気暴露の有無がHIFの発現と活性に大きく影響し、従来のHIFの転写制御モデルでは説明できない現象を引き起こすことを明らかにした。以上の研究成果から、これまでに明確な答えが得られていなかった表皮三次元培養における空気暴露刺激の意義の一端を明らかにすることができた。これにより空気暴露操作についてその意義を論理的に主張でき、より良い表皮培養条件の提案が可

能である。また、皮膚再建に使用される自家培養表皮シートの新規培養法の提案といった再生医療に対する貢献も期待できる。

研究材料、研究方法

試薬、オリゴヌクレオチド、抗体

使用した抗体、培地などの試薬類の情報は Table. 1 にまとめた。その他の試薬についてはナカライテスク、富士フィルム和光純薬製のものを使用した。

Table. 1 試薬、オリゴヌクレオチド、抗体情報のまとめ（参考文献¹⁴より引用）

		Cat #	Lot	Supplier	Dilution
1 st Ab	HIF-1 α	610958	9183651	BD	1/1000 (WB)
	HIF-1 α	NB100-134	AF	NOVUS	0.5 ng/ μ l (IHC)
	HIF-2 α	NB100-132	T-4		1/1000 (WB)
	LDHA	3582	10	CST	1/1000 (WB)
	HK2	2867	5		1/1000 (WB)
	β -actin	3700	17		1/10000 (WB)
	IgG isotype control	3900S	48		0.5 ng/ μ l (IHC)
	Loricrin	905104	B321752	Biolegend	1/2000 (WB)
	TG3	-	-	Homemade ¹⁵	500 ng/ml (WB)
	ENO2	sc-21738	D1219	SCBT	1/1000 (WB)
	Filaggrin	sc-66192	B2120		1/1000 (WB)
	Involucrin	sc-21748	J0319		1/1000 (WB)
	K1	sc-65999	B1219		1/2000 (WB)
	K10	sc-53252	J1119		1/2000 (WB)
	Lamin B1	sc-377000	F0617		1/1000 (WB)
	RFP (mCherry)	6g6-20	51020014AB	Chromotek	1/1000 (WB)
	Anti-pimonidazole	HP1-100Kit	8.23.19	Hypoxypore	1/1000 (WB)
2 nd Ab	POD Rabbit	111-035-144	151080	Jackson	1/2000 (WB)
	POD Mouse	115-035-146	151651		1/2000 (WB)
	Starbright700 Rabbit	12004161	64247470	Bio-Rad	1/5000 (WB)
	Starbright700 Mouse	12004158	64395958		1/5000 (WB)
		Cat #		Supplier	
Medium	CnT-Prime Epithelial Proliferation Medium		CnT-PR		CELLnTEC
	CnT-Prime Epithelial 3D Airlift Medium		CnT-PR-3D		

		Cat #	Lot	Supplier	CAS
Reagent	DMOG	D5480	8Y88O-SN	TCI	89464-63-1
	ACF	A8251	SHBM0542	Sigma-Aldrich	8063-24-9
	Hypoxypore	HP1-100Kit	111720	Hypoxypore	-

		Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
Primer	ENO2 (NM 001975.3)	TGCACAGGCCAGATCAAGAC	ACAGCACACTGGGATTACGG
	LDHA (NM 005566.4)	CGACGTGCATTCCCGATTC	CATGCCAACAGCACCAACC
	HK2 (NM 000189.5)	TCGGTTTCCCAACTCTGCG	GAGAGGCGCATGTGGTAGAG
	TBP (NM 003194.5)	TCAAACCCAGAATTGTTCTCCTTAT	CCTGAATCCCTTTAGAATAGGGTAGA

細胞

新生児由来のヒト表皮初代培養細胞を、TOYOBO (CA10205n)、KURABO (KK-4009)、CELLnTEC (HPEKp) のいずれから購入した。また、不死化ヒト表皮細胞 Ker-CT は ATCC より購入した。

ヒト表皮三次元培養

EpiLife (MEPI500CA, Gibco) に Human Keratinocyte Growth Supplement (S0015, Gibco) を加えた培地で表皮細胞を培養した。三次元培養中は CELLnTEC 社の培地で維持するため、二重容器に細胞を播種する直前までに培地を CnT-Prime (CnT-PR, CELLnTEC) に交換し、細胞を馴化させた。継代数 5 回以内のヒト表皮初代培養細胞または Ker-CT から 5×10^5 cells/ml の細胞懸濁液を調製し、Cell Culture Inserts (140620, Thermo Scientific) に 400 μ l 滴下した。3 日間培養したのち、培地を全量 CnT-Prime Epithelial 3D Airlift Medium (CnT-PR-3D, CELLnTEC) に置換し 15-16 時間培養した。その後、二重容器内の培地を除いて空気暴露を行い、最大 7 週間培養を行った。

ヘマトキシリン・エオシン染色

二重容器のメンブレン部分を切り出し、SCEM-L1 (C-EM002, Section-lab) に包埋後、ヘキサン・ドライアイスでブロックを凍結した。庫内温度 -25°C 、試料温度 -30°C に設定したクライオスタットを使用し、粘着フィルムである Cryofilm type 2C(9) (C-FP091, Section-lab) を張り付けた凍結包埋ブロックから 5 μm 厚の切片を作成した。切片を室温中で解凍したのち、100%エタノールに 60 秒浸漬させ、4%パラホルムアルデヒドで 10 分間固定した。固定した切片を水に浮かべて 5 分間水洗後、切片上にヘマトキシリン (C-SH002, Section-lab) を滴下し 10 分染色、5 分間水洗した。エオシン (C-SE001, Section-lab) で 20 秒染色したのち、水洗、100%エタノールに浸漬、水洗をそれぞれ 20

秒行った。封入材である SCMM-R2 (C-MM03、Section-lab) を切片に滴下し数分放置した後、カバーガラスに切片を張り付け、紫外線照射装置で封入した。染色像は倒立型顕微鏡 (BZ-9000、KEYENCE) で観察、撮影した。

電子顕微鏡解析

1 次固定は 2.5% グルタルアルデヒド、2 次固定は 1% 四酸化オスミウムを使用した。サンプルを脱水後、Epon812 に包埋し、約 80 nm 厚で切片化した。酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色し、透過型電子顕微鏡 (JEM-1400 Plus、JEOL) で観察、撮影した。

ウェスタンブロッティング

4 等分したメンブレンを 10 mM Tris-HCl (pH8.0)、1 mM EDTA、5 mM 2-メルカプトエタノール、0.1% Triton X-100、プロテアーゼ阻害剤ミックスを含む細胞溶解液に入れ、15% 出力の超音波処理を 20 回行った。最終濃度 150 mM の NaCl を加えた後、13500 rpm、4°C で 10 分間遠心し、上清画分を可溶性画分、沈殿を不溶性画分とした。可溶性画分は Bradford 法でタンパク質濃度を定量し、終濃度 1 倍の Laemmli サンプルバッファを加えた後 95°C の熱処理を 3 分間行った。不溶性画分には 2 倍濃度の Laemmli サンプルバッファを加え、15% 出力の超音波処理を 20 回行った後、95°C で 3 分間熱処理することにより可能な限りタンパク質を可溶化した。全細胞抽出液は、不溶性画分の可溶化方法と同様の方法で調製した。

調製したサンプルを 7.5~15% のポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、ゲルを転写用緩衝液に 15 分間浸透させた。その後メタノールで活性化させた PVDF 膜を使用し、ゲルからメンブレンへの転写を 90 分、100 mA 定電流で行った。転写後のメンブレンを 5% スキムミルク/TBST で 60 分間ブロッキング後、TBST で洗浄し、5% BSA/TBST に 1 次抗体を加えた溶液で一晩振とうさせた。1 次抗体液を洗浄後、5% スキムミルク/TBST に 2 次抗体を加えた溶液でメンブレンを 90 分間室温で振とうし、洗浄後 SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (34580、Thermo Scientific) を用いて発色させた。シグナルは FUSION (Vilber Lourmat) を用いて観察、撮影した。撮影した写真から ImageJ を用いてバンドの定量値を算出し、統計解析を行った。

RNA 抽出

二重容器より切り出した膜に Sepasol-RNA I Super G (09379-55、ナカライテスク) を 500 μ l 加え、ボルテックスミキサーで細胞をホモジナイズした。クロロホルムを 200 μ l 加え転倒混和したのちに、12000 \times g で 20 分遠心した。2 層に分かれた溶液の上層を回収し、等量のイソプロパノールを加え、室温で 10 分間 RNA を沈殿させた。12000 \times g で 20 分間遠心した後 1 ml の 75% エタノールで沈殿を洗浄し、減圧乾燥させた。得られた沈殿は RNase free water に溶解した。

定量 PCR

ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (FSQ-301、TOYOBO) を使用し Total RNA 200 ng から cDNA を調製した。終濃度 0.2 μ M のプライマーと THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (QPS-201、TOYOBO) に希釈した cDNA を加え、LightCycler 96 System (Roche) を使用してシグナルを検出した。一回の実験に使用する全サンプルの cDNA を混合した溶液を用いて検量線を作成し、検量線法によって相対定量値を算出した。

RNA-sequencing

FavorPrep Tissue Total RNA Mini Kit (FATRK 001、FAVORGEN) を使用し DNase 処理した Total RNA を 4 μ g 以上調製した。ライブラリー調製からデータ解析を Filgen に委託した。シーケンス解析には NovaSeq6000 を使用し、各サンプル 2000 万リード以上取得した。マッピングには TopHat2 を使用した。Differentially expressed gene (DEG) 解析については TMM 正規化を行った後 DEGseq を使用し、 $|\log_2(\text{Fold change})| > 1$ 且つ $q\text{-value} < 0.005$ であった遺伝子を変動が顕著な遺伝子と判定した (Table S1)。DEG 解析から得られたデータを Gene Ontology 解析する際は David を使用した。Pathway 解析は Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) データベースに基づき、KOBAS を用いて解析した。

免疫染色

5 μ m 厚の切片を作成し、4%パラホルムアルデヒドで 10 分間固定した。3%過酸化水素/メタノールを 15 分間処理し、内在性のペルオキシダーゼを不活化した。1.5%の正常ヤギ血清を含む PBST でブロッキングを 30 分行った後、1%BSA、0.3%TritonX-100 を含む PBS で抗体を希釈し、4°Cで一晩抗体を反応させた。ブロッキングと同様の溶液で 200 倍希釈した 2 次抗体を 37°Cで 90 分間反応させた。A 溶液と B 溶液を PBS に 1/50 量加えた溶液を 30 分間静置し、切片に滴下後 30 分反応させた。洗浄後、30 μ l の DAB を 1 ml の希釈液で希釈した溶液を切片に滴下し、適切な染色像が得られるまで反応させた。PBS で切片を洗浄することにより染色反応を停止させ、SCMM-R2 で封入した。本染色では、VECTASTAIN Elite ABC Rabbit IgG Kit および ImmPACT DAB (PK-6101、SK-4105、Vector Laboratories) を使用した。

RNA 干渉による遺伝子抑制

shRNA を発現する Plasmid は pSIH1-H1-Puro (SI500A-1、System Biosciences) を使用した。HIF-1 α に対する shRNA は NM_001530.4 に基づいて設計し、632-652 bp に位置する配列 GATAATGTGAACAAATACATG を使用した。Negative control 配列として CAACAAGATGAAGAGCACCAA を使用した。

0.1%ゼラチンをコートした 3.5 cm ディッシュに HEK293T を播種した翌日、

Lipofectamine LTX Reagent with PLUS Reagent (15338030、Thermo Fisher Scientific) を使用し、レンチウイルスベクター、Lentiviral High Titer Packaging Mix (6194、TaKaRa) を細胞に導入した。8 時間後に Epilife に培地交換し、2 晩培養後培地を回収した。新たな培地を加えて 1 晩培養後、再度培地を回収した。回収した培地を孔径 0.45 μm のフィルターでろ過し、限外ろ過によって濃縮した。qPCR Lentivirus Titer Kit (LV900、abm) を用いてウイルスの力価を測定後、Negative control と HIF-1 α shRNA の力価を合わせ、終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Polybrene (sc-134220、Santa Cruz) を使用して Ker-CT に感染させた。感染後の細胞を終濃度 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Puromycin で薬剤選択した後、三次元培養を行った。

レポーターアッセイ

本実験では pGreenFire 2.0 HIF-1 reporter plasmid (TR426PA-P、System Biosciences) を使用した。Negative control として pGreenFire 2.0 HIF-1 reporter plasmid から Hypoxia response elements を除いたベクターを使用した。Ker-CT への遺伝子導入は RNA 干渉による遺伝子抑制と同様の方法で実施した。

レポーター遺伝子を導入した Ker-CT を三次元培養後、ウェスタンブロッティングと同様の方法で細胞抽出液を調製し、各サンプルの抽出液のタンパク質濃度をそろえた。マイクロプレートにルシフェラーゼ発光基質であるピッカジーン (PGL100、東洋ビーネット) と細胞抽出液を添加後、EnSpire マルチモードプレートリーダー (PerkinElmer) でシグナルを測定した。

酸素供給を目的とした振とう培養

ヒト表皮三次元培養における液相培養の酸素環境改善のため、シーソータイプのシェーカー (NA-M101、日伸理科) を用いて振とうしながら培養を行った。空気暴露を開始する Day 0 から 12 RPM 程度の強度で振とうを開始し、目的の期間培養を行った。

結果

空気暴露を行わないと表皮の形態異常が生じる

最初に、空気暴露の有無が表皮の形態にどのような影響を与えるのかについて解析を行った。空気暴露を行う日を Day 0 として培養を継続した（以下、Day としての定義は全て同様とする）（Fig. 1A）。設定したタイムコースに従って培養を行い、定期的なサンプリングを行いながら Day 21 まで培養を行った。空気暴露を行わない群については Day 0 での空気暴露を行わず、培養容器内が培地で満たされた状態で空気暴露群と同様に培養を行った。回収したサンプルをヘマトキシリン・エオシン（HE）染色し形態を確認したところ、空気暴露群では経時的に表皮分化が進行し、最終的に Day 21 では成熟した表皮層が観察された（Fig. 1B）。具体的に各層の特徴を述べると、エオシン色素で強く染まり、最外部に位置する扁平な細胞層が角質層、その直下に位置し細胞内にヘマトキシリンで染まった顆粒を内包する細胞層が顆粒層、最下部で細胞が整列した層が基底層、顆粒層と基底層の間が有棘層である。一方で空気暴露を行わなかった群については、空気暴露群と比較して全体的に薄い細胞層が形成された（Fig. 1B）。また空気暴露群と異なり、角質層と思われる部位に核が残存していた。正常な角化では脱核が生じるため、異常な表皮分化が生じていることが示された。次に、さらに培養期間を延長した場合、両群はどのような形態を示すのか HE 染色により検証した（Fig. 1C）。その結果、空気暴露群の Day 35、49 では Day 21 よりも大幅に角質細胞が堆積していたが、各層がはっきりと確認でき、成熟した表皮層が観察された。一方で空気暴露を行わない液相培養群では、角質層に残存していた核が減少し、表皮分化が回復したような形態が確認された（Fig. S1）。本結果を受け、液相培養群において形成された表皮層の詳細な構造を明らかにするため、電子顕微鏡解析を行った（Fig. 1C）。その結果、HE 染色では正常に分化しているかに思われた液相培養群の角質層はまったく成熟していないことが明らかとなった。正常に分化した角質層は、細胞内がケラチンで満たされるため高電子密度の電子顕微鏡像となるが、液相培養の角質層は電子密度が非常に低く、Cornified envelope も低形成であった。ケラトヒアリン顆粒についても数が少なく、小さかった。また、角質間脂質を確認することができなかった。以上のことから、空気暴露を行わない環境下においては表皮の形態異常が生じることが明らかとなった。

液相培養環境では表皮分化マーカータンパク質が低下し表皮分化が破綻する

次に、表皮分化マーカータンパク質の発現量をウェスタンブロッティングにより解析することにより、表皮分化の程度を解析した。表皮には、分化段階に応じて発現量が変化するタンパク質が存在する。分化を評価するタンパク質として Transglutaminase 3 (TG3)、Loricrin (LOR)、Involucrin (IVL)、Filaggrin (FLG)、Keratin 1/10 (K1/10) を選択した。まず、培養期間の異なる細胞から可溶性の細胞抽出液を調製し、ウェスタン

ブロッティングを行った。その結果、IVL を除くすべてのタンパク質が空気暴露群では上昇するのに対し、液相培養群では上昇度が小さいことが示された (Fig. 2A, B)。K1/10 については発現を示すシグナルを確認することができなかった。分化マーカータンパク質群は分化に応じて高度に不溶化する。そのため、2 倍濃度の Laemmli バッファーを使用して可能な限りタンパク質を可溶化し、その抽出液を用いて再度ウェスタンブロッティングを行った。その結果、可溶性画分を用いた評価と同様に IVL を除く分化マーカータンパク質が空気暴露群では増加し、液相培養群では低下した (Fig. 2A, C)。また、可溶性画分の抽出液では検出することができなかった K1/10 を検出することができ、その他の分化マーカータンパク質と同様の挙動を示した。以上の結果から、空気暴露を行わないと表皮分化において重要な役割を果たす構造タンパク質の発現量が低下することが明らかとなった。

液相培養群では低酸素誘導因子が制御するシグナルが活性化している

これまでの解析では空気暴露の有無により生じる表現型の違いを明らかにしてきたが、より詳細な細胞内の遺伝子発現変動を明らかにするためにトランスクリプトーム解析を行った。形態学的な解析から、空気暴露の影響が表皮形成の早い段階から現れることが示されたため、形態的な変化が見られ始めた Day 2 を対象に RNA を用いて解析を行った。その結果、気相培養群と液相培養群の 2 群間において変動が 2 倍以上あった遺伝子が計 78 個同定された (Fig. 3A)。空気暴露群において発現が高い 30 個の遺伝子の Gene ontology 解析を行ったところ、検出された遺伝子の多くが表皮分化に関与することが明らかとなった (Fig. 3B)。次に、液相培養群において発現が高い 48 個の遺伝子の Pathway 解析を行ったところ、低酸素誘導因子 (HIF) が制御をするシグナル経路が陽性であることが明らかとなった (Fig. 3C)。本結果をさらに検証するため、HIF が制御する代表的な遺伝子 Enolase 2 (ENO2)、Hexokinase 2 (HK2)、Lactate dehydrogenase A (LDHA) の発現量を定量 PCR によって確認した (Fig. 3D)。その結果、これら遺伝子の発現量が液相培養群において経時的に増加することが明らかとなった。本解析に加え同遺伝子のタンパク質発現量を経時的に解析したところ、定量 PCR の結果と相関し、液相培養群における当該タンパク質の発現が経時的に増加することが明らかとなった (Fig. 3E, F)。

空気暴露群では HIF の活性と発現量が逆相関する

液相培養群において HIF 制御遺伝子の発現が増加したことから、HIF の活性が高いことが示唆された。そのため、空気暴露の有無による HIF 活性の変化をレポーターアッセイにより検証した (Fig. 4A)。本解析では、HIF の活性を測定する外来遺伝子を導入したヒト表皮細胞株 Ker-CT を用いた。その結果、空気暴露群における HIF 活性の低下と液相培養群における HIF 活性の上昇を確認し、トランスクリプトーム解析の結果から得られた HIF 制御遺伝子の発現変動と相関する結果が認められた。空気暴露の有無が

HIF の活性に影響を与えたため、次に HIF タンパク質発現量を検証した。HIF は α と β サブユニットのヘテロダイマーから構成される。恒常的に発現している β サブユニットに対し、 α サブユニットは低酸素依存的に安定化するため、HIF の転写活性は α サブユニットの発現量で推定できる。転写活性を有する HIF の α サブユニットには HIF-1 α と HIF-2 α の 2 種存在するため、これら 2 つのサブユニットのタンパク質発現量を解析した。まず外来遺伝子を導入した Ker-CT を対象に解析を行った結果、予想に反して HIF-1 α のタンパク質量がレポーターアッセイなどの結果と逆相関した (Fig. 4B,C)。つまり HIF 活性が高い液相培養群では HIF-1 α タンパク質量が低下し、活性が低い空気暴露群では HIF-1 α タンパク質が安定化していた。HIF-2 α については空気暴露の有無に応じた明確な変動は認められなかった。これらの結果は、ヒト表皮初代培養細胞の抽出液を用いたウエスタンブロッティングおよび免疫染色でも同様であった (Fig. 4D-F)。本結果を踏まえ、核内に存在する HIF-1 α を十分に解析できていない可能性を検証するため、細胞質と核を分画し HIF-1 α の発現量を確認した (Fig. 4G,H)。その結果、これまでのウエスタンブロッティングと同様に、空気暴露群では HIF-1 α が安定化し、液相培養群においては HIF-1 α が低下していた。

液相培養における HIF の阻害は表皮分化を改善しない

HIF の活性と発現量が逆相関する結果が得られたが、これまでの解析から液相培養では HIF が低酸素応答の従来の活性を発揮していると仮定した。そこで、HIF の阻害により液相培養の表皮分化が改善するか検証した。まずはヒト表皮初代培養細胞を用いた培養において、HIF ヘテロダイマー形成阻害薬である Acriflavine (ACF) を作用させ、表皮分化マーカーの発現量が改善するか解析した。その結果 ACF 処理によって、表皮分化マーカータンパク質の発現量が減少した (Fig. 5A,C)。続いて HIF-1 α に対する shRNA を発現する Ker-CT を作製し、液相培養を実施することにより表皮分化マーカーの発現がどのように変化するかを解析した。その結果、HIF-1 α の発現抑制によって表皮分化マーカーが低下した。(Fig. 5B,D)。以上の結果から、HIF の活性を阻害するだけでは液相培養条件での表皮分化を回復できないことが明らかとなった。

振とう培養は液相培養に酸素を供給することにより表皮分化を改善する

HIF の阻害だけでは液相培養における表皮分化を改善できないことが分かったため、次は液相培養における低酸素の解除により分化が改善する可能性を検証した。そのために、振とう器を用いて培養容器を緩やかに攪拌し、液相培養における酸素環境が改善できないか試みた (Fig. 6A)。振とうは Day 0 から開始した。はじめに、振とうが細胞の酸素環境を改善するか確認するため、低酸素検出プローブである Pimonidazole を使用して細胞の酸素環境を評価した。その結果、液相培養で確認された強いシグナルは振とうを行った場合では確認できず、空気暴露群と同程度であった (Fig. 6B,C)。このことから

ら、液相培養における低酸素状態が振とうによって解除され、空気暴露群と同程度の酸素環境に改善することが分かった。続いて、振とう培養によって改善した酸素環境が表皮分化に与える影響を形態学的に解析した。その結果、液相培養条件において確認される表皮分化異常は振とう培養によって大幅に改善し、細胞層の厚さに関しては空気暴露群と同程度に回復した (Fig. 6D, E, S2)。HE 染色による形態解析に加えて表皮分化マーカータンパク質について解析を行ったところ、液相培養において減少した TG3、LOR、FLG、K1/10 が振とう培養によって増加することが明らかとなった (Fig. 6F, G)。ここで大変興味深いことに、振とう培養は HIF-1 α および低酸素マーカータンパク質の動態に関しても空気暴露群を模倣した。すなわち、液相培養で減少していた HIF-1 α は振とうによって増加し、HIF 制御遺伝子の減少も生じた。これらの解析から、正常な表皮分化には酸素が非常に重要であること、空気暴露の生理学的な意義は細胞に対する酸素供給であることが明らかとなった。

気相培養における HIF の抑制は表皮分化を阻害する

表皮の正常な分化では HIF-1 α タンパク質の増加と HIF 活性の低下が生じることから、空気暴露環境下では HIF が従来の低酸素応答とは異なるメカニズムで表皮分化に寄与する可能性が考えられた。この可能性を検証するため、阻害剤または shRNA による HIF-1 α の活性または発現の抑制が空気暴露群に与える影響を確認した (Fig. 7A, B)。その結果、ACF による HIF の阻害では HIF 制御遺伝子の発現低下はほとんど見られなかった。一方で、shRNA による HIF-1 α 発現抑制では、HIF 制御遺伝子の発現がわずかに低下した。また、表皮分化マーカータンパク質の発現の発現量は、ACF による阻害と HIF-1 α 発現抑制の両者において減少した。このことから、HIF が表皮分化に対して正の働きを持つことが示唆され、これは従来の低酸素応答とは異なる可能性が示唆された。

気相培養条件下における HIF-1 α の新規相互作用因子および結合 DNA 領域の同定 (融合研究)

これまでの解析から、気相培養条件下では HIF-1 α が安定化しているのにもかかわらず (Fig. 4B-F)、HIF の転写活性は低い (Fig. 3E, F, 4A) という矛盾した結果が得られている。HIF-1/2 α を欠損させたマウスでは表皮に異常が現れることに加え¹⁶⁻¹⁸、気相培養における HIF の阻害では表皮分化の低下が認められた (Fig. 7)。また、気相培養下で発現した HIF-1 α は核内に局在する (Fig. 4G, H)。本結果から表皮形成において HIF は必須であり、転写因子として機能していることが推測される。本研究結果に加え、近年 HIF-1 α の相互作用因子が変化することにより標的 DNA 配列が変化し、従来とは異なる遺伝子発現を制御することが報告された¹⁹⁻²²。本研究結果と先行研究の報告を踏まえると、気相培養条件下では HIF-1 α が HIF β ではない新しい因子と結合し、通常と異なる DNA 配列に結合後、遺伝子の発現を制御する可能性が考えられた。この可能性を検証するた

め、気相培養条件下において特異的に存在する相互作用因子の探索および結合 DNA 領域の同定に取り組むことにした。相互作用因子の同定については、Immunoprecipitation-mass spectrometry (IP-MS) および、近位ビオチン標識法 (BioID 法) を実施した。本実験は、名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所・分子構造センターの三城恵美特任講師にご協力いただいた。また、結合 DNA 配列の同定については Chromatin-immunoprecipitation (ChIP) を実施した。本解析の実施にあたり、名古屋大学・生命農学研究科の一柳健司教授の元を訪問し、実験手技等を直接ご教授いただいた。

相互作用因子の同定を行う上で、サンプル回収日は HIF-1 α の存在量が比較的多い Day 5 を選択した。実験条件は気相・液相培養に加え、HIF α タンパク質の安定化を促進する薬剤 (DMOG) を液相培養に添加した条件を選択した。DMOG 添加により従来の HIF シグナル経路が強力に活性化することから、低酸素応答を示すコントロールとした。まず、IP-MS を行う上で免疫沈降に使用可能な HIF-1 α 抗体を検討した。その結果、高い HIF-1 α 結合能を示し、実験コストが安価である Ab2 を選択した (Fig. S3A)。選定した抗体を用い、核抽出液を試料として免疫沈降を実施した。その結果、HIF-1 α を免疫沈降によって回収できたため (Fig. S3B)、本サンプルを質量分析に供した。得られた質量分析データを Data independent acquisition 法を用いて解析したところ、どのサンプル条件においても 3500 個程度のタンパク質を同定した (Fig. S3C)。また、HIF-1 β や Histone acetyltransferase p300 (p300)、Lysine demethylase 3A (KDM3A) のような HIF 活性を増加させるような因子の同定量を調べたところ、液相培養および液相培養+DMOG において多く検出されていた (Fig. S3D)。獲得したデータを解析ソフトウェアである Perseus²³を用いて解析し、試験的に階層的クラスタリングを行うことにより、気相培養群において多く検出される因子が存在するか検証した。Perseus 上で各サンプルの欠損値を含むタンパク質は除いたデータを正規化し、階層的クラスタリングを行った。その結果、空気暴露群で高い同定数を示し、液相培養群で低い値を示すタンパク質クラスターが確認できた (Fig. S3E)。

次に BioID 法の実施のため、外来遺伝子の導入方法を検討した。できるだけ生体内の HIF-1 α の発現を乱さないために、レンチウイルスを用いた強制発現ではなく、ノックイン技術を用いることにした。ビオチン化酵素には様々な種類があるが、本解析では活性が強い TurboID を使用することにした。HIF-1 α の N 末端側に薬剤耐性マーカー遺伝子および TurboID がノックインされるようなコンストラクトを設計した (Fig. S4A)。TurboID 自体も 35 kDa 程度の大きさがあるため、HIF-1 α との間には十分なリンカーを加えた。当研究室ではトランスジェニック体をメダカで作製する際、Cas9 nickase を用いたシングルニッキングによる遺伝子導入を行っている²⁴⁻²⁶。そのため本手法を採用した (Fig. S4A)。Cas9 nickase を用いたノックインではダブルニッキング法²⁷を用いることが一般的なため、本手法も同時に実施した。薬剤選択後、シングルニッキングを用い

た方法では、ディッシュ内にコロニーが1~2個確認できた一方で、ダブルニッキング法では最大で10個強のコロニーが確認できた。それぞれの手法で得られたノックイン細胞集団を回収し、遺伝子型をPCRによって判定したところ、すべての実験条件においてノックインを確認することができた (Fig. S4B)。また細胞抽出液を調製し、HIF-1 α とTurboIDが接続されているかウエスタンブロッティングで確認した結果、210および140 kDaのマーカ付近に目的のTurboID融合HIF-1 α のバンド (図中黒および灰色矢印) が検出された (Fig. S4C)。

ChIPを行うサンプルの回収日はIP-MS等と同様にDay 5とした。500~100 bp程度の断片化クロマチンを取得するため、細胞の核画分に作用させるソニケーションの時間を検討した。その結果、ソニケーション処理を30回以上しないと適切なサイズにならないことがわかった (Fig. S5A)。多すぎるソニケーションは標的タンパク質を分解してしまい、抗原性が失われてしまう²⁸。そのため、ソニケーションのサイクル数がHIF-1 α の安定性に与える影響を解析した。その結果、HIF-1 α はソニケーション処理に弱く、10サイクルでかなりのタンパク質が分解してしまうことがわかった (Fig. S5B)。このことからDNAの断片化ではソニケーションではなく、DNA断片化酵素であるMNaseを用いることにした。三次元培養サンプルから抽出したサンプルにユニット数の異なるMNaseを作用させ条件検討を行った。その結果、1つの培養容器に対して10 gelunits程度が良いことがわかった (Fig. S5C)。しかし、MNaseを用いたサンプル調製方法では核からクロマチンを回収する過程でソニケーションを行わないため、HIF-1 α の抽出効率が落ちてしまった (Fig. S5D)。これはポッター型ホモジナイザーを使用し、核画分をホモジナイズすることにより改善した (Fig. S5E)。ここまでの最適なクロマチン回収プロトコルが整ったため、回収したサンプルを定量PCRに供することにより、クロマチンが正しく回収できているか確認した。方法としては、HIF1が結合するDNA配列を標的としたプライマーを設計し、低酸素応答が活性化している液相培養やDMOG処理サンプルで高い値が得られるか検証した。その結果、ヒト表皮三次元培養サンプルを用いた場合、再現性良くデータを得ることができなかった。一方でHEK293Tを用いた場合は、DMOG処理サンプルにおいてHIF1結合領域が濃縮されていることがわかった (Fig. S5F)。

考察

本研究では、ヒト表皮三次元培養が空気暴露という特異な培養環境を必須とする点に着目し、空気暴露がどのように表皮分化を促進するのかという本質的な問いを深めた。

はじめに、ヒト表皮三次元培養において空気暴露を行わないとどのような形態変化が現れるのか検証を行った。成熟した表皮の形成には2週間以上の時間を要するが、培養開始後早い段階において空気暴露の有無による形態的差異を確認することができた。Day 21のHE染色像に着目し比較すると、液相培養条件下で形成された表皮は空気暴露群に対して明らかに薄くなる特徴が見られる (Fig. 1B)。表皮を構成する基底層、有棘層、顆粒層、角質層の4層の中で増殖能をもつ細胞層は基底層のみである²⁹。そのため、液相培養群の表皮が菲薄化している原因として基底細胞の増殖能低下が考えられる。

液相培養下の表皮では菲薄化に加え、脱核が正常に進行せず角質層に核が残留していた (Fig. 1B)。正常な皮膚表皮では、顆粒細胞が角質細胞に分化する際、核を含むあらゆる細胞小器官が消失し死細胞となる。この過程は6時間程度の短時間で完了するとされる³⁰。しかし、炎症性疾患など正常時よりも細胞増殖が盛んになっている場合、脱核を含む分化過程が正常に終了する前に細胞が表層へ押し上げられてしまい、脱核不全を生じる。この症状を不全角化という³¹。Day 21の液相培養において、角質層に核が残留していた点にのみ着目すると不全角化が生じていることが考えられる。しかし、液相培養では炎症性疾患で確認される有棘層の肥厚や顆粒層の消失などは確認できないことに加え、表皮層全体が薄くなっていた (Fig. 1B)。このことから、液相培養条件では細胞増殖に加え、表皮分化についても遅滞していることが考えられた。実際に、長期の液相培養を行ったところ Day 35、49のHE染色では、Day 21で観察された角質層内の核が減少し、改善傾向が見られた (Fig. 1C, S1)。確認された回復傾向の表現型が正常な角質層の構造を呈するか確認するため電子顕微鏡解析を行ったところ、一つの結論が得られた。正常な角質層では Filaggrin monomer によって凝集されたケラチンが角質細胞内を満たし、Cornified envelope というタンパク質の巨大分子が膜の代わりに細胞を覆っている⁴。また細胞間は脂質で満たされバリア機能を高めている⁹。こうした構造が液相培養条件ではまったく確認することができなかった (Fig. 1C)。このことから、液相培養条件では表皮分化が破綻しており、バリア機能を発揮できる細胞層を形成できないことが明らかとなった。しかし長期培養することにより角質細胞内の脱核はある程度進行することが示された。角化における脱核には Caspase 14 や DNase 1L2 などの関与が見出されているが、その全容は未だ解明されていない³²⁻³⁶。近年の報告から、ケラトヒアリン顆粒が物理的に核を圧迫することにより脱核が促進されることが明らかとなった³⁷。液相培養条件ではケラトヒアリン顆粒が小さく数も少なかったため、ケラトヒアリン顆粒による核への物理的な刺激が低下し、脱核が遅れた可能性が考えられる。

形態学的な解析に加え、表皮分化マーカータンパク質の発現を解析することにより生化学的にも空気暴露の影響を明らかにすることができた。分化マーカータンパク質として TG3、LOR、IVL、FLG、K1/10 を選択した。多くの分化マーカータンパク質は分化段階に応じて細胞内で不溶化する。そのため可溶性の細胞抽出液に加え、全細胞抽出液も使用して評価を行った。その結果マーカータンパク質は IVL を除き、液相培養群で発現低下した (Fig. 2)。

TG3 は様々なタンパク質を架橋することにより Cornified envelope を合成するタンパク質であり、LOR や IVL はその構成タンパク質である^{2,3}。液相培養群において TG3 が低下したため、Cornified envelope の形成が抑制されたことが考えられる (Fig. 1C)。一方で TG3 のアイソザイムである Transglutaminase 1 (TG1) は液相培養群の方が高い発現量を示した (Fig. S6)。TG1 のノックアウトマウスは、重篤なバリア機能不全により出生後致死となることから TG3 よりも主要な架橋酵素だと考えられている^{9,38}。液相培養条件で TG1 が高発現しているのにもかかわらず Cornified envelope が低形成であったことから、Transglutaminase が活性を発揮できない細胞内環境であったことが考えられる。またこういった細胞内環境に対して補償機構が働き、液相培養群における TG1 発現量が増加した可能性が考えられる。

K1/10 は有棘層以降に発現する構造タンパク質であり、最終的に角質細胞内で FLG monomer によって凝集される。液相培養群の電子顕微鏡像では、角質細胞内の電子密度が気相培養群に比べ大幅に低下していたが、K1/10 の発現低下が原因だと考えられる。また、顆粒細胞内において K1/10 はケラトヒアリン顆粒の骨格のような役割をすることにより、顆粒の形成を助けることが知られている³⁷。ケラトヒアリン顆粒はこの骨格の中で液滴のような状態で存在する。このことから、K1/10 の発現低下がケラトヒアリン顆粒の低形成にも影響していると推測される。

FLG はケラトヒアリン顆粒を構成する主要なタンパク質の一つであり、表皮において多機能を有する。Filaggrin monomer が 10~12 個連結した Profilaggrin は、細胞内に発現したのち顆粒を形成する。分化段階に応じて Filaggrin monomer に分解された後、最終的にアミノ酸にまで分解され天然保湿因子となる³⁹。本解析では Filaggrin monomer に着目して解析し、液相培養群における発現低下を確認した。本結果は、液相培養群の角質細胞内に未成熟な構造が形成された原因の一つだと考えられる。Profilaggrin が Filaggrin monomer に分解される過程では、まず細胞内 pH が低下した後に様々なプロテアーゼが働くと考えられている^{37,40}。Day 49 液相培養群の電子顕微鏡像では、細胞内が角質層と同様の形態を示しているのにもかかわらずケラトヒアリン顆粒を内包している細胞が確認出来る (Fig. 1C)。このことから細胞内 pH が適切に低下しなかったことからケラトヒアリン顆粒の分解および Profilaggrin の分解に異常をきたし、ケラチンの凝集が適切に行われなかったことが推測できる。

空気暴露の有無により生じる発現遺伝子の差異を RNA-sequencing により網羅的に同定し、計 78 個の遺伝子に変動があることを明らかにした (Fig. 3A)。予想よりも少ない遺伝子数であったが、表皮分化初期である Day 2 を対象としたトランスクリプトーム解析を行ったためだと考えられる。気相培養群において高い発現を示した 30 個の遺伝子には分化マーカーである K1/10 や LOR、SPRR2E が含まれていた。また、GO 解析からも気相培養群で発現する遺伝子群は表皮分化に関連することが明らかとなった (Fig. 3B)。このことから Day 2 という早い段階であっても表皮分化に関連する遺伝子群が気相培養群で増加し、液相培養群では減少していることが示された。液相培養群では検出された遺伝子群が HIF1 シグナル経路に関係することが Pathway 解析から示された (Fig. 3C)。HIF は低酸素応答を制御する転写因子であり、 α と β サブユニットからなるヘテロダイマーである⁴¹。細胞が低酸素環境に陥った際、環境に適応するため HIF は代謝の変動や活性酸素種の発生抑制・細胞内 pH の調整・血管新生などを制御する。 β サブユニットは恒常的に細胞内に発現している一方、 α サブユニットの分解系が低酸素で機能低下するため、低酸素環境下では α サブユニットが増加し HIF が転写因子として活性化する (Fig. S7)。 α サブユニットには 3 つのアイソフォームがあり、1 α および 2 α が転写活性を持つ。それぞれの α サブユニットから構成された HIF を HIF1 または HIF2 という。低酸素環境に陥りやすいガンや貧血の分野において HIF はこれまで研究が行われてきたが、構造内に血管を持たず、比較的低酸素状態である表皮とも関連がある⁴²。液相培養群において発現が高い遺伝子として検出された 48 個の遺伝子のなかに HIF 自体は認められなかったが、HIF が制御する遺伝子として CA9、SLC2A3、LDHA、ENO2、NDUFA4L2、VEGFA、HK2、ALDOA を確認することが出来た。これら遺伝子の中で ENO2、HK2、LDHA は mRNA およびタンパク質の発現が液相培養において増加していた (Fig. 3D-F)。Koria らによって行われた先行研究においても HIF が制御する遺伝子が液相培養群において発現が高いことが示されている¹³。以上のことから、空気暴露の有無によって HIF シグナル経路が変動することが明らかとなった。HIF レポーターアッセイにより細胞内における HIF 転写活性を解析した結果、液相培養群において常に高い値を示した (Fig. 4A)。一方で、通常のディッシュを用いたセミコンフルエント状態での培養では HIF の活性は低く、三次元培養に移行後 HIF レポーターの値が上昇した。細胞培養において、細胞のコンフルエント状態が HIF の活性に影響を与えることが知られている⁴³。このことから、ヒト表皮三次元培養においても細胞のコンフルエント状態が HIF の活性と大きく関連していることが示唆された。

次の解析で行ったことは、HIF α サブユニット量の検出である。様々な解析から液相培養系における HIF 活性化が示唆されたが、HIF レポーターアッセイは HIF1 と HIF2 を区別できないことに加え、HIF1 と HIF2 の制御遺伝子は類似している。そのため、HIF-1 α および 2 α を対象にタンパク質量を解析した。まず HIF-2 α に関しては、結果に

ばらつきが大きく、空気暴露依存的な変動を確認できなかった (Fig. 4B-E)。HIF-1 α と 2 α の分解経路は共通しているため⁴⁴、HIF-1 α と発現パターンが異なるという矛盾が生じていた。しかし、HIF-2 α を検出する抗体を変更して再解析したところ HIF-1 α と同様のパターンを示した (データ未掲載)。一方で、HIF-1 α に関しては予想に反する結果が得られた。すなわち、気相培養群において HIF-1 α が増加し、液相培養群において減少した (Fig. 4B-F)。これは HIF 発現量の解析手法を変えた場合においても同様であった。核に局在する HIF-1 α をうまく解析できていない可能性を考えたが、細胞分画したサンプルを用いた解析でも同様の結果を示した (Fig. 4G, H)。HIF-1 α /2 α の mRNA 発現量では空気暴露依存的な変動を確認できなかった (Fig. S8)。そのためタンパク質レベルでの制御が機能していると考えられる。HIF の分解系は Prolyl Hydroxylase Domain-Containing Protein (PHD) という水酸化酵素により制御されている^{41,44} (Fig. S7)。本酵素活性が酸素濃度に影響を受けることにより、酸素濃度依存的な HIF α の分解が実現している。液相培養系における HIF-1 α の減少に PHD が関与しているか検証するため阻害剤を作用させたところ、HIF-1 α が増加した (Fig. S9)。細胞内で主要な PHD である PHD2 を shRNA によって発現抑制した場合においても結果は同様であった (Fig. S10)。PHD2 が経時的に増加することに加え (Fig. S11)、PHD2 の次に活性が高いとされる PHD3 も増加している (Fig. S12)。これらのことから、液相培養系では HIF α の分解が積極的に生じた結果、液相培養群において HIF-1 α が減少することが考えられた。液相培養群の HIF 活性が高いことを踏まえ、HIF-1 α タンパク質量が少ないことを考察すると、少ない HIF-1 α が確実に HIF 活性化に貢献することにより活性が高くなっていることが推測される。HIF にはその活性を促進する様々な翻訳後修飾や相互作用因子が存在する⁴⁵。例えば、Mitogen-activated protein kinase は HIF-1 α のリン酸化を触媒し、核内移行を促進する⁴⁶。また、KDM3A との相互作用は HIF 結合領域周辺のクロマチンリモデリングを促進し、HIF 転写活性を増加させる^{47,48}。実際に本研究においても HIF と相互作用し、クロマチンリモデリングを制御する p300 が液相培養系において増加することを確認している (Fig. S13)。

液相培養系における HIF α タンパク質低下について考察したが、気相培養系における HIF α タンパク質の安定化についても考察したい。PHD2/3 が気相培養条件では低下していることに加え (Fig. S11, 12)、PHD の阻害が気相培養においても HIF-1 α を増加させたことを踏まえると (Fig. S14)、気相培養における HIF-1 α の増加にも PHD が関与することが推測できる。つまり、PHD が通常酸素下で機能していたとしても PHD の働きを阻害するような因子が高発現していたら HIF α の安定化は可能である。例えば Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L は、HIF1 α の脱ユビキチン化を促進することにより HIF-1 α の安定性を高める⁴⁹。このような HIF 安定化作用がある因子である NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1 (NQO1) の顕著な変動を確認した (Fig. S15)。NQO1 はフリーラジカルの除

去や解毒に関連する酵素であり、キノンの還元を触媒する⁵⁰。一方でNQO1は酵素以外の機能が近年多数報告されており、HIFを標的としたPHDの水酸化を競合的に阻害することが示された⁵¹。このNQO1が気相培養において増加し、液相培養において減少したことから、HIF α が安定化した一因だと考えられる。NQO1が気相培養群において増加したメカニズムとしては活性酸素種の発生が考えられる。NQO1は活性酸素種などの酸化ストレスによって活性化する転写因子によって発現制御を受けることが明らかである。実際に気相培養群と液相培養群における活性酸素種を測定したところ、液相培養群に対して気相培養群では活性酸素種が多く発生していることが示された(データ未掲載)。

HIFの転写活性が高い液相培養群では、表皮分化が低下したことから、HIFの活性化が表皮分化に対して悪影響を及ぼすことが考えられた。そのため、HIFの転写活性を阻害することにより液相培養群における表皮分化を改善できる可能性が示唆された。本仮説の検証のため、液相培養群においてHIFを阻害したが、表皮分化は促進されなかった(Fig. 5)。しかし、これまでの結果から液相培養群が低酸素環境であることが強く示唆されたことから、空気暴露依存的な表皮分化とHIFを一度切り離して思考し、液相培養群における酸素環境を改善することに試みた。今回用いた培養方法と類似する肺上皮細胞の培養において、振とう培養を導入すると酸素環境および分化が改善することが報告されている⁵²。そこで本手法を参考に、液相培養条件で振とうしながら培養した。結果として、酸素環境が改善したのみならず、表皮の形態や分化マーカーの発現も回復した(Fig. 6, S2)。このことから、空気暴露は細胞へ酸素供給により表皮分化を促進することが明らかとなった。この時、振とう培養群では液相培養群に比べHIF-1 α は増加し、HIF制御遺伝子は低下した。すなわち、気相培養群と同様の挙動を示した。表皮特異的にHIF-1 α とHIF-2 α をノックアウトしたマウスではFilaggrinおよび表皮バリア機能が低下する¹⁶。HIF-1 α 単体の表皮特異的なノックアウトマウスも同様に表皮に異常を示す^{17,18}。加えて、気相培養群におけるHIFの転写活性は低い、HIF-1 α タンパク質は核内に集積していた(Fig. 4A, G, H)。これらのことから、HIFが表皮分化に対して正の作用を持っていること、この正の作用は従来の活性とは異なる可能性が考えられた。実際に、空気暴露群におけるHIF阻害剤および遺伝子抑制では表皮分化が低下した(Fig. 7)。この仮説には2つの可能性が考えられる。一つ目は、HIF α/β の結合はそのままだが、このヘテロダイマーに補因子が結合することによりDNA結合嗜好性が変化する可能性がある。現にHIFはp300/CBPによるクロマチン構造の緩和作用を強く受けるといわれており⁵³、本因子の結合によって低酸素応答が活性化する。矛盾を解消する一つの可能性として、こういった補因子がHIFのDNA結合嗜好性に影響を与えていることが考えられる。つまり気相培養群ではp300/CBPが低発現している、あるいは結合できないため、HIF-1 α が発現しているが活性が低いという可能性である。実際にp300の発現は液相培

養で高く、気相培養で低い (Fig. S13)。しかし、HIF レポーターアッセイではクロマチン構造をある程度無視することが可能なため、気相培養において活性が低いことを説明できない。そのため、p300 のような HIF の活性に影響を与える因子ではなく、HIF のターゲット配列が変えるような補因子が関与する可能性が考えられる。2 つ目の仮説は、HIF α サブユニットが HIF β サブユニットとは全く異なる因子と結合し、転写因子として機能する可能性である。HIF β サブユニットは、HIF α サブユニット以外にも Aryl hydrocarbon receptor や Single-minded family BHLH transcription factor などとダイマーを形成することが分かっている^{54,55}。これら複合体は HIF とは異なる DNA 配列を認識する。また近年、HIF α サブユニットが HIF β ではなく Basic helix-loop-helix ARNT like 1 や Oligodendrocyte transcription factor とダイマーを形成することが報告された¹⁹⁻²²。すなわち、HIF α サブユニットも HIF β と同様に、ダイマーを形成する相手が変わることにより認識する DNA 配列が変化する。このことから空気暴露群においても、新たな因子が HIF-1 α とヘテロダイマーを形成することによりターゲットが変化した可能性が考えられる。HIF は 2 つのサブユニットで挟むようにして標的 DNA を認識することが構造学的に明らかになっている⁵⁶。空気暴露群では従来の HIF 認識配列を認識していない点に加え (Fig. 4A)、HIF の DNA 認識機構を考慮すると、1 つ目の仮説ではなく 2 つ目の仮説の可能性が高いと考えられる。

どのような場合であっても、これら仮説の実証には大きく分けて 2 つの解析の実施が必要だと考えられる。1 つ目は、HIF 相互作用因子の探索である。相互作用因子の探索については、Immunoprecipitation-mass spectrometry (IP-MS) によって明らかにできると考えた。本解析については、HIF-1 α 抗体を用いて免疫沈降したサンプルを試験的に質量分析に供するところまで進んでいる。本結果では、HIF-1 β や p300、KDM3A など HIF1 活性を増加させるような因子が液相培養および液相培養+DMOG (PHD 阻害剤) において多く検出された (Fig. S3D)。このことから、サンプルの回収・調製に問題がないことが考えられるため、本手法を用いて次の解析を行いたい。また試験的に階層的クラスタリングを行ったところ、気相培養において多く検出され、液相・液相培養+DMOG では少なく検出されるタンパク質クラスターがあることがわかった (Fig. S3E)。このことから、クラスター解析を利用することにより、大量の候補タンパク質群から目的のものを絞り込むことができる見通しを立てることができた。特異的に HIF-1 α と相互作用する因子が IP-MS により明らかになる可能性があるが、本解析手法は一般的にタンパク質の非特異的な結合を原因とする偽陽性が多い実験である。そのため、近位ビオチン標識法 (BioID 法) を用いた網羅的解析を同時に行うことにより、両実験において検出される信頼性の高い因子を特定することにした。本解析で採用した TurboID はプロトタイプである BioID を改変した酵素であり、自身から約 10 nm に存在する近傍のタンパク質をビオチン化する⁵⁷。HIF-1 α 自身はある程度の大きさがあるタンパク質だが、最終的

な相互作用因子複合体は更に巨大になることが予想される。そのため HIF-1 α に直接 TurboID を融合すると、相互作用因子を十分にビオチン化できない可能性が考えられた。長いリンカーの使用はビオチン標識するタンパク質を増加させることが知られている⁵⁸。またリンカーの使用により、HIF-1 α の N 末端側に存在する核移行シグナルや DNA 認識ドメインに TurboID が影響することを抑えられると考えた。以上の理由から、BioID と HIF-1 α のリンカーは通常よりも長くした。設計したコンストラクトをノックイン技術に導入した理由は、HIF-1 α の発現量を内在性の動態に近づけたかったためである。HIF の活性化や阻害は表皮分化の低下を示す (Fig. 5, 7, S9, 14)。そのためノックインという手法を採用した。しかし、ノックインを含め遺伝子を導入する際に問題となるのはオフターゲット効果である。このオフターゲット効果を最小限にするために今回は Cas9 nickase を用いた遺伝子導入を採用した⁵⁹。あまり研究例がないシングルニッキングによる遺伝子導入を実施したが、ダブルニッキング法²⁷と比べ導入効率は 2~5 倍程度低いことが今回の結果から推測された。しかし、シングルニッキングによる外来遺伝子を導入ではオフターゲット効果を極限まで最小にすることができる。そのため、オフターゲットが致命的になるような実験では、原理的に考えて最大限の効果を発揮すると考えられる。いずれのノックイン方法においても遺伝子を導入できたため、細胞のセクションおよび表現型の解析が次の課題である。

気相培養条件下における HIF-1 α 結合領域の同定には、ChIP が有効であると考えた。様々な条件を最適化し定量 PCR を実施したが、ヒト表皮三次元培養サンプルから回収したクロマチンでは安定した結果が得られなかった。結論としては、初発の細胞数が十分でなかった可能性が考えられる。10 cm ディッシュで培養した HEK293T を用いて行った実験では、HIF が活性化しているサンプルにおいて HIF1 結合 DNA 領域が濃縮されていた (Fig. S5F)。一般的に転写因子を対象とした ChIP には 10⁶⁻⁷ 個の細胞が使用されるが、ヒト表皮三次元培養では十分な細胞数を確保できなかった可能性が考えられる。そのため免疫沈降の効率に影響が生じ、十分なクロマチン DNA を精製できなかったことが考えられる。初発の細胞の量を大幅に増やすことに加え、免疫沈降時に用いる抗体やビーズの量を増やすことにより改善することが見込まれる。

本研究では、空気暴露が誘導する表皮分化メカニズムに着目し、大きく分けて 2 点明らかにした。1 つ目は、空気暴露依存的な表皮分化に HIF が関与することを明らかにした点である。空気暴露依存的な表皮分化における特異な HIF の動態変動が関与するが、これまでの結果を踏まえると、HIF が従来とは異なる DNA 配列を認識することにより表皮分化を促進していることが推定される (Fig. S16)。HIF は貧血やガンの増殖等に深く関与する転写因子である。例えば、貧血の治療には PHD 阻害薬が使用されているほか、低酸素環境下におけるガンの増殖には HIF を介した血管新生促進が重要な役割を果たす⁶⁰。また、低酸素環境に馴化したガンは放射線をはじめとした治療抵抗性を示す

⁶¹。表皮における特異な HIF 制御メカニズムを明らかにできれば、表皮分化機構の解明だけでなく酸素や PHD に依存しない新たな HIF 制御ターゲットを提供することができると考える。

2 つ目は、表皮分化には酸素が必須であり、空気暴露の生理学的な意義は細胞に対する酸素供給であることを明らかにした点である。Hanada らが行った実験では、液相培養の途中から気相培養に切り替えた場合、液相培養よりも分化が亢進することが示されている⁶²。つまり、液相培養下において分化が途中まで進行した段階であっても、空気暴露を介した酸素供給を開始することにより分化が回復することを示している。本研究からも、酸素が表皮分化に重要であることを示している。またこれまでは、ヒト表皮三次元培養では正常な表皮形成になぜ空気暴露が必須なのか不明であったが、本研究により空気暴露が細胞に対しどのように作用しているのかを論理的に主張することができると考える。その上、酸素が表皮分化を促進するという知見は再生医療において貢献できると考えられる。皮膚再建に使用する自家培養表皮は作製に 3 週間以上の時間を要しており、この点が患者の死亡率を高めていた⁶³。振とう培養など、酸素を細胞に供給するシステムを組み込むことができれば、患者により早く届く表皮シート作製が実現できる可能性があると考えられる。

実験データ

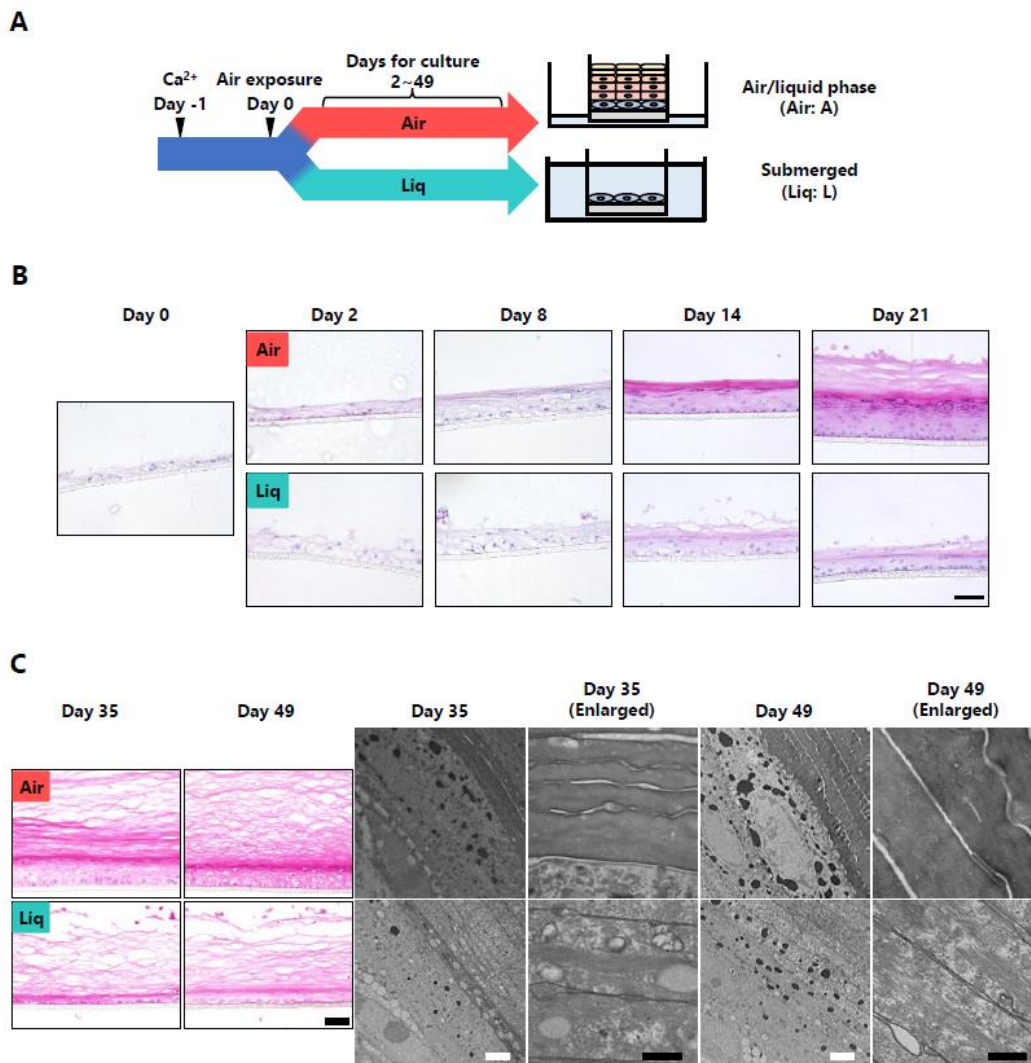


Fig. 1. 空気暴露の有無が表皮分化に与える影響の形態学的解析

- (A) 空気暴露を行う日を Day 0 としたタイムコースに従いヒト表皮三次元培養を行った。空気暴露前日に表皮分化用培地に交換し、15~16 時間後空気暴露を行った。液相培養群では Day 0 以降も細胞を培地に沈めた状態で培養を行った。Day -1 サンプルは分化用培地交換前に回収、Day 0 サンプルは空気暴露前に回収を行った。Air/A: 空気暴露群、Liq/L: 液相培養群
- (B) Day 0~21 にかけて経時的に空気暴露群・液相培養群のサンプルを回収し、HE 染色による形態学的解析を行った。Scale bar = 50 μ m
- (C) Day 35/49 まで培養を延長し、HE 染色による形態学的解析および電子顕微鏡解析を行った。HE 染色 Scale bar=50 μ m、電子顕微鏡解析 Scale bar =2 μ m (white bar)/0.5 μ m (black bar)

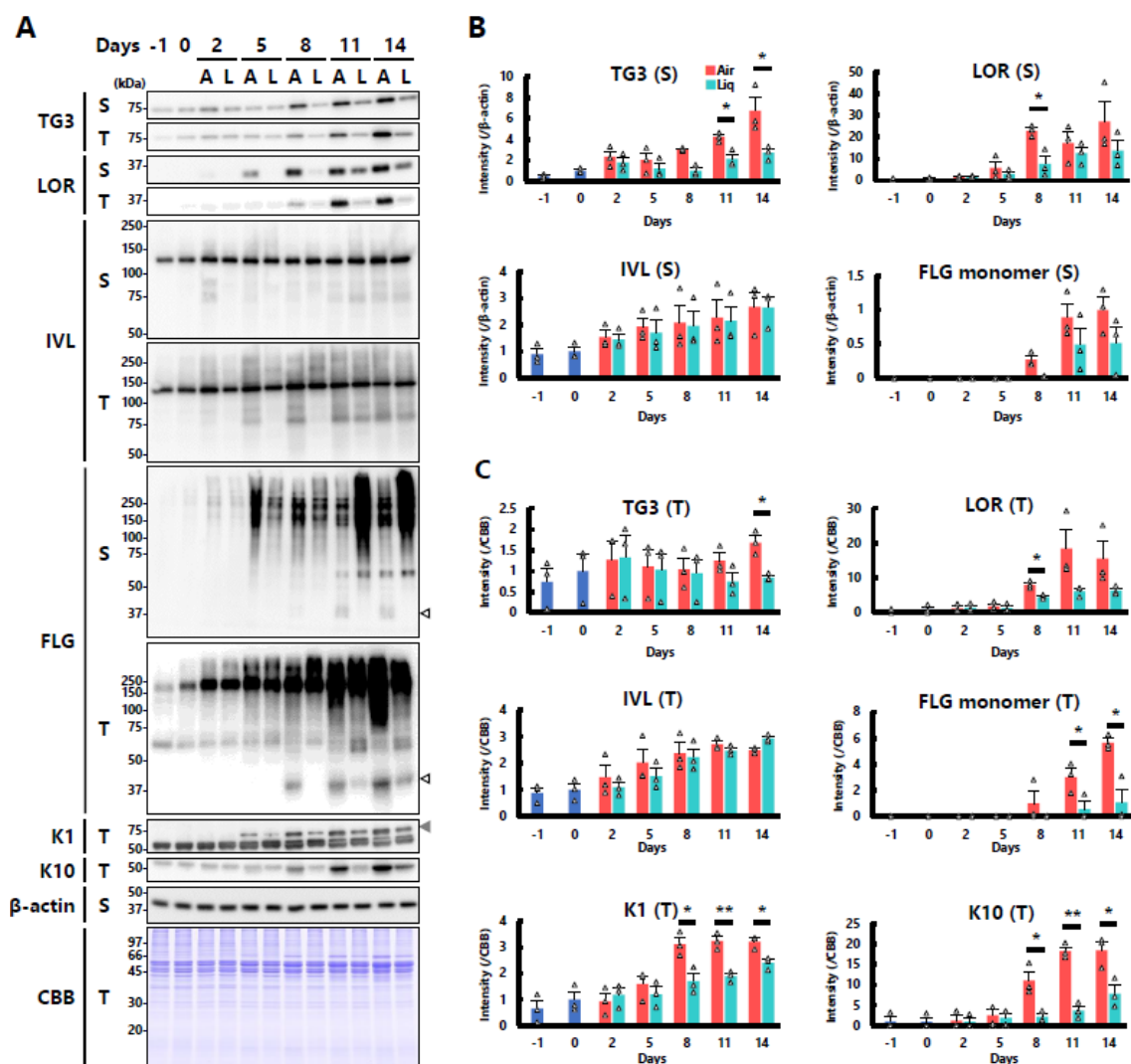


Fig. 2. 空気暴露の有無が表皮分化マーカータンパク質の発現量に与える影響の解析

- (A) ヒト表皮初代培養細胞を用いた三次元培養サンプルから可溶性の細胞抽出液および全細胞抽出液を経時的に調製し、各種表皮分化マーカータンパク質についてウエスタンブロッティングを行った。β-actin を可溶性細胞抽出液の内在性コントロールとした。CBB は全細胞抽出液のローディングコントロールである。S: 可溶性細胞抽出液を用いたウエスタンブロッティング、T: 全細胞抽出液を用いたウエスタンブロッティング、◁: Filaggrin monomer bands、◀: K1 bands
- (B) β-actin を内在性コントロールとして各種表皮分化マーカータンパク質のウエスタンブロッティングのシグナル強度をグラフ化した。Student's t-test により統計解析を行った。*P<0.05、**P<0.01
- (C) CBB 染色像をローディングコントロールとして各種表皮分化マーカータンパク質のウエスタンブロッティングのシグナル強度をグラフ化した。Student's t-test により統計解析を行った。*P<0.05、**P<0.01

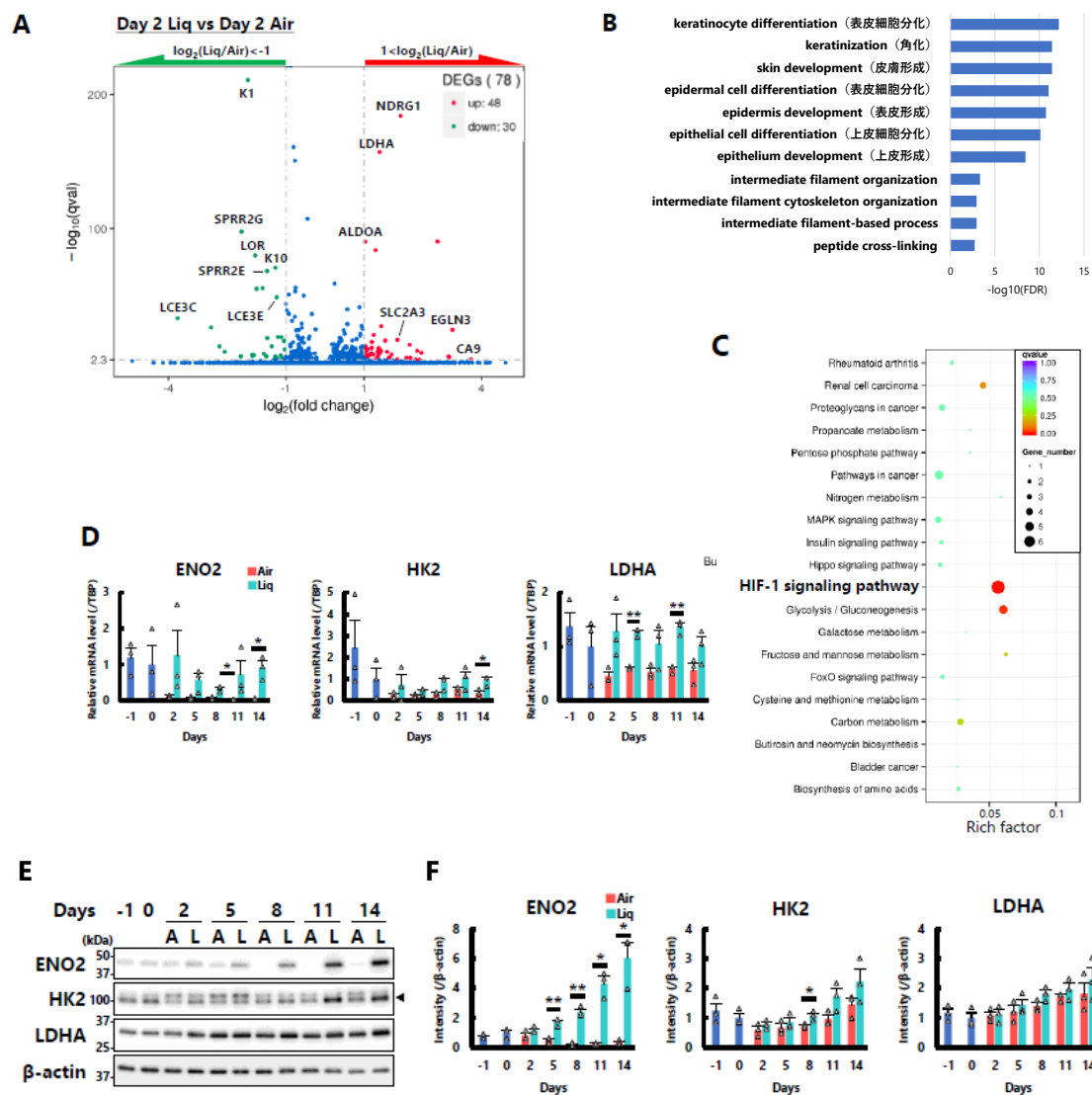


Fig. 3. 空気暴露群・液相培養群の RNA-sequencing および HIF 標的遺伝子の解析

- (A) Day 2 を対象とした空気暴露群・液相培養群の RNA-sequencing を実施し、Differentially expressed gene (DEG) 解析を行った。Q-value<0.005、 $|\log_2(\text{Fold change})| \geq 1$ である遺伝子を変動遺伝子とした。両群間において計 78 個の変動遺伝子があり、空気暴露群で発現が高い遺伝子が 30 個、液相培養群で発現が高い遺伝子が 48 個検出された。
- (B) DEG 解析において空気暴露群で発現が高い 30 個の変動遺伝子について Gene Ontology 解析を行った。
- (C) DEG 解析において液相培養群で発現が高い 48 個の変動遺伝子について Pathway 解析を行った。Rich factor は各パスウェイに登録されている遺伝子数の内どれくらいの割合の変動遺伝子が検出されたかを示す値。
- (D) HIF が発現制御する遺伝子の経時的な発現量を定量 PCR で解析した。TBP を内在性コントロールとした。Student's t-test により統計解析を行った。*P<0.05、**P<0.01、A: 気相培養群、L: 液相培養群
- (E) HIF が発現制御する遺伝子の経時的なタンパク質発現量をウェスタンブロッティングで解析した。◀: HK2 bands
- (F) (E)で解析したバンド強度をグラフ化した。β-actin を内在性コントロールとした。Student's t-test により統計解析を行った。*P<0.05、**P<0.01

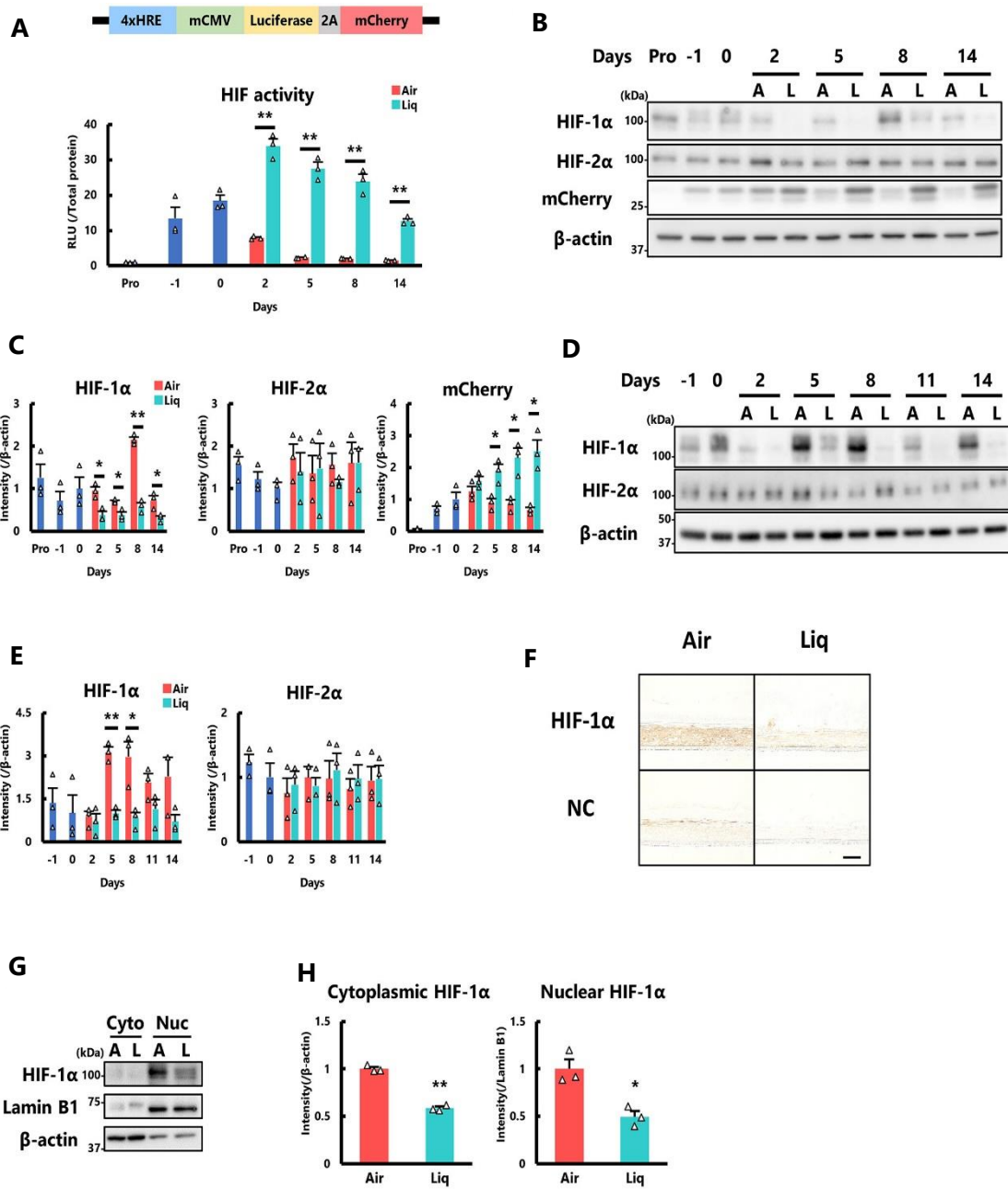


Fig. 4. HIF 転写活性および HIF α タンパク質の細胞内存在量の解析

- (A) レンチウイルスを用いて HIF レポーター遺伝子を導入した Ker-CT を用いて経時的な HIF 活性を測定した。実験に使用したタンパク質量を基準にレポーター遺伝子であるルシフェラーゼから得られたシグナル強度を算出した。Pro は通常の細胞培養ディッシュを使用しセミコンフルエント状態まで培養後、回収したサンプル。4×HRE: HIF 結合配列の 4 回タンデムリピート、mCMV: minimal Cytomegalovirus promoter
- (B) HIF レポーター遺伝子を導入した Ker-CT から調製した細胞抽出液を使用し、HIF-1/2 α の細胞内存在量をウェスタンブロッティングにより解析した。A: 気相培養群、L: 液相培養群
- (C) (B) で解析したバンド強度をグラフ化した。 β -actin を内在性コントロールとした。Student's t-test により統計解析を行った。*P<0.05、**P<0.01
- (D) ヒト表皮初代培養細胞から調製した細胞抽出液を使用し、HIF-1/2 α の細胞内存在量をウェスタンブロッティングにより解析した。A: 気相培養群、L: 液相培養群
- (E) (D) で解析したバンド強度をグラフ化した。 β -actin を内在性コントロールとした。Student's t-test により統計解析を行った。*P<0.05、**P<0.01
- (F) ヒト表皮初代培養細胞を用いたヒト表皮三次元培養 Day 8 切片を使用し、HIF-1 α の免疫染色を行った。Negative control として IgG アイソタイプコントロール抗体を用いた染色を行った。Scale bar = 50 μ m
- (G) ヒト表皮初代培養細胞を用いたヒト表皮三次元培養 Day 8 サンプルを細胞質画分 (Cyto) と核画分 (Nuc) に分画し、HIF-1 α 存在量をウェスタンブロッティングにより解析した。Lamin B1 は核画分、 β -actin 細胞質画分のローディングコントロールとした。A: 気相培養群、L: 液相培養群
- (H) (F) で解析したバンド強度をグラフ化した。Lamin B1 および β -actin をローディングコントロールとした。Student's t-test により統計解析を行った。*P<0.05、**P<0.01、A: 気相培養群、L: 液相培養群

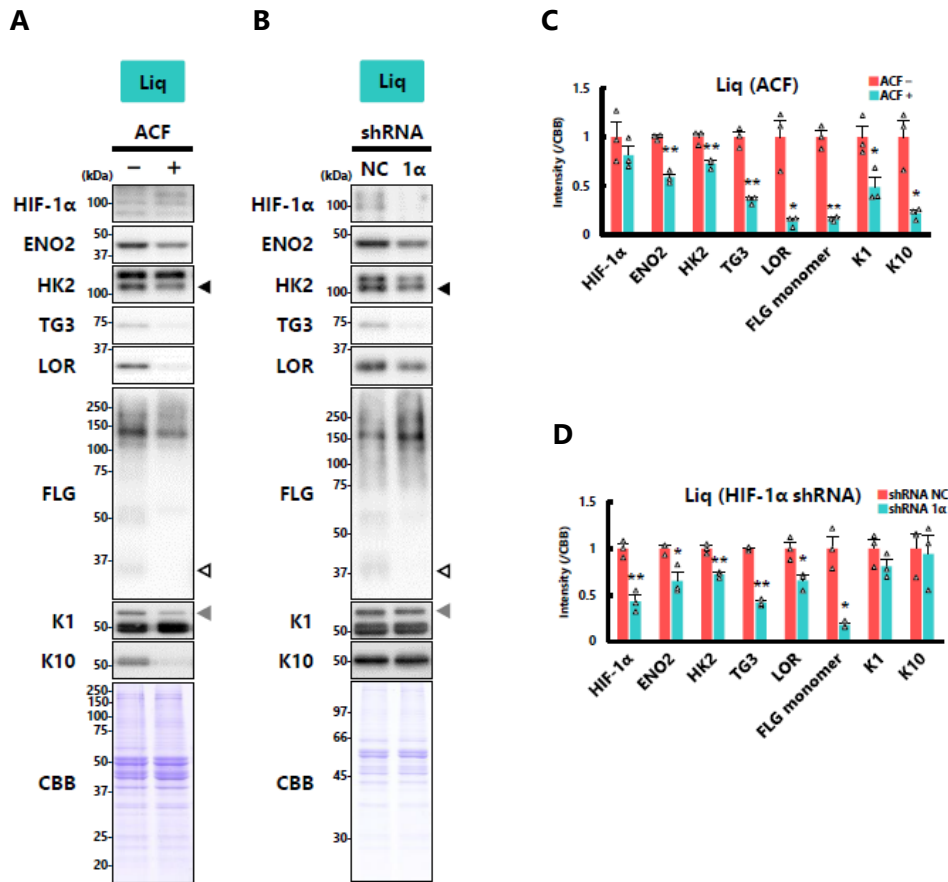


Fig. 5. 液相培養群において HIF の阻害が表皮分化に及ぼす影響の解析

- (A) ヒト表皮初代培養細胞を用いたヒト表皮三次元培養の液相培養において、薬剤による HIF の阻害が表皮分化に与える影響を解析した。Day 0~8 まで終濃度 0.2 μ M の Acriflavine (ACF) を加えて培養し、サンプリングを行った。全細胞抽出液を調製し、ウエスタンブロッティングにより HIF-1 α および HIF 制御遺伝子、表皮分化マーカータンパク質を解析した。◀: HK2 bands、◀◀: Filaggrin monomer bands、◀◀◀: K1 bands
- (B) HIF-1 α に対する shRNA および Negative control shRNA を発現する外来遺伝子を導入した Ker-CT を用いたヒト表皮三次元培養の液相培養を行った。Day 8 まで培養後、全細胞抽出液を調製し、ウエスタンブロッティングにより HIF-1 α および HIF 制御遺伝子、表皮分化マーカータンパク質を解析した。◀: HK2 bands、◀◀: Filaggrin monomer bands、◀◀◀: K1 bands
- (C) (A) で解析したバンド強度をグラフ化した。CBB 染色像をローディングコントロールとして用いた。Student's t-test により統計解析を行った。*P<0.05、**P<0.01
- (D) (B) で解析したバンド強度をグラフ化した。CBB 染色像をローディングコントロールとして用いた。Student's t-test により統計解析を行った。*P<0.05、**P<0.01

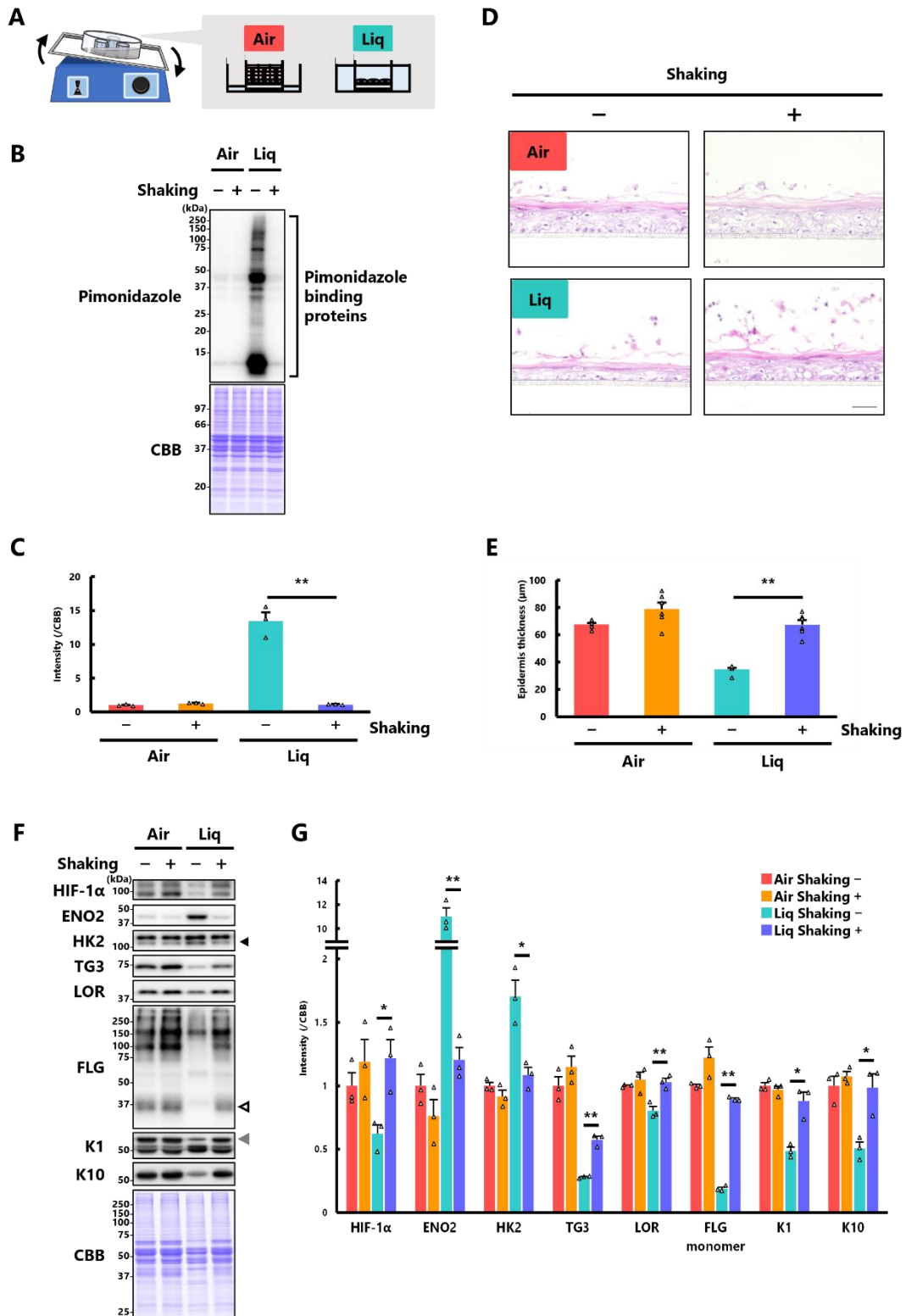


Fig. 6. 振とう培養が表皮分化に与える影響の解析

- (A) シーソータイプシェーカーを用いて振とうさせながら三次元培養を行った。Day 0 より振とうしはじめ、Day 8 または 14 まで培養を行った。
- (B) Pimonidazole を用いて振とう培養が細胞の酸素環境に影響を与えるか検証した。空気暴露 2 時間前に終濃度 50 μ M の Pimonidazole 含有分化用培地に交換し、2 時間後に空気暴露を行った。液相培養群は細胞を培地に沈めたまま培養を行った。Day 2 まで培養を行った後、全細胞抽出液を調製し、ウエスタンブロッティングにより pimonidazole にラベルされたタンパク質を pimonidazole 抗体で検出した。
- (C) (B) で解析したバンド強度をグラフ化した。CBB 染色像をローディングコントロールとして用いた。Student's t-test により統計解析を行った。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$
- (D) ヒト表皮初代培養細胞を用いた三次元培養を行い、Day 0~14 まで振とう培養を行った。HE 染色による形態学的な解析を行った。Scale bar=50 μ m
- (E) ImageJ を用いて HE 染色像から表皮の厚さを計測しグラフ化した。Student's t-test により統計解析を行った。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$
- (F) ヒト表皮初代培養細胞を用いた三次元培養を行い、Day 0~8 まで振とう培養を行った。全細胞抽出液を調製し、ウエスタンブロッティングにより HIF-1 α および HIF 制御遺伝子、表皮分化マーカータンパク質を解析した。◀: HK2 bands、◁: Filaggrin monomer bands、◄: K1 bands
- (G) (F) で解析したバンド強度をグラフ化した。CBB 染色像をローディングコントロールとして用いた。Student's t-test により統計解析を行った。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$

A

B

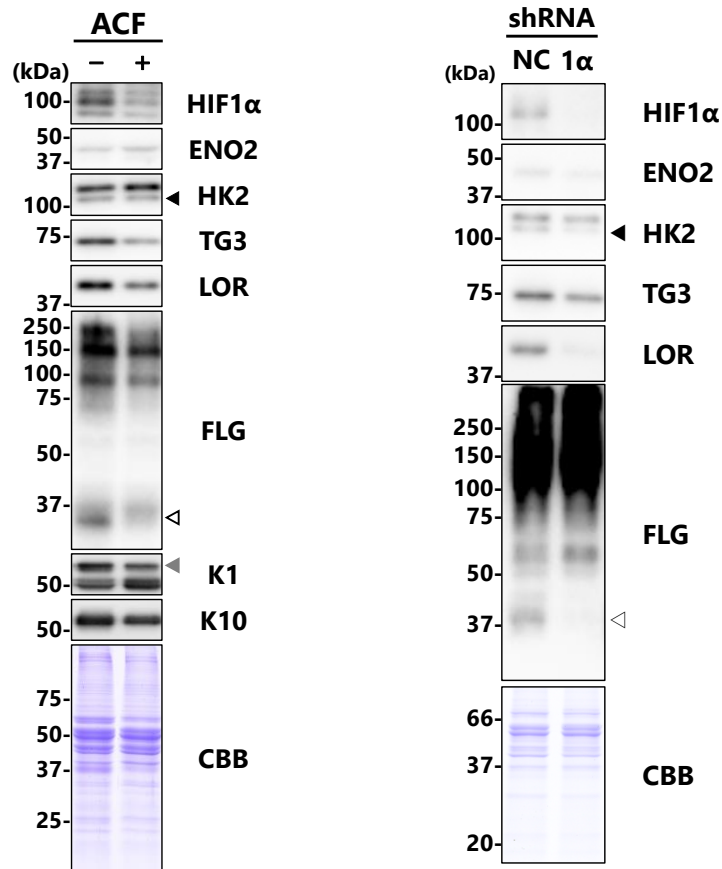
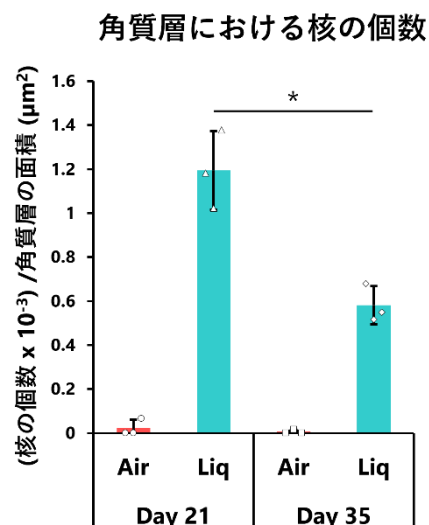


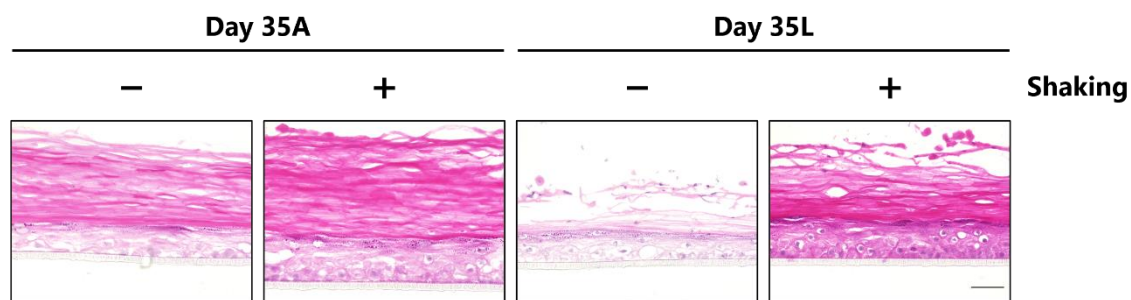
Fig. 7. 気相培養群において HIF の阻害が表皮分化に及ぼす影響の解析

- (A) ヒト表皮初代培養細胞を用いた気相培養において、薬剤による HIF の阻害が表皮分化に与える影響を解析した。Day 0~8 まで終濃度 0.2 μ M の Acriflavine (ACF) を加えて培養し、サンプリングを行った。全細胞抽出液を調製し、ウエスタンブロットティングにより HIF-1 α および HIF 制御遺伝子、表皮分化マーカータンパク質を解析した。◀: HK2 bands、◁: Filaggrin monomer bands、◀: K1 bands
- (B) HIF-1 α に対する shRNA および Negative control shRNA を発現する外来遺伝子を導入した Ker-CT を用いたヒト表皮三次元培養の気相培養を行った。Day 8 まで培養後、全細胞抽出液を調製し、ウエスタンブロットティングにより HIF-1 α および HIF 制御遺伝子、表皮分化マーカータンパク質を解析した。◀: HK2 bands、◁: Filaggrin monomer bands



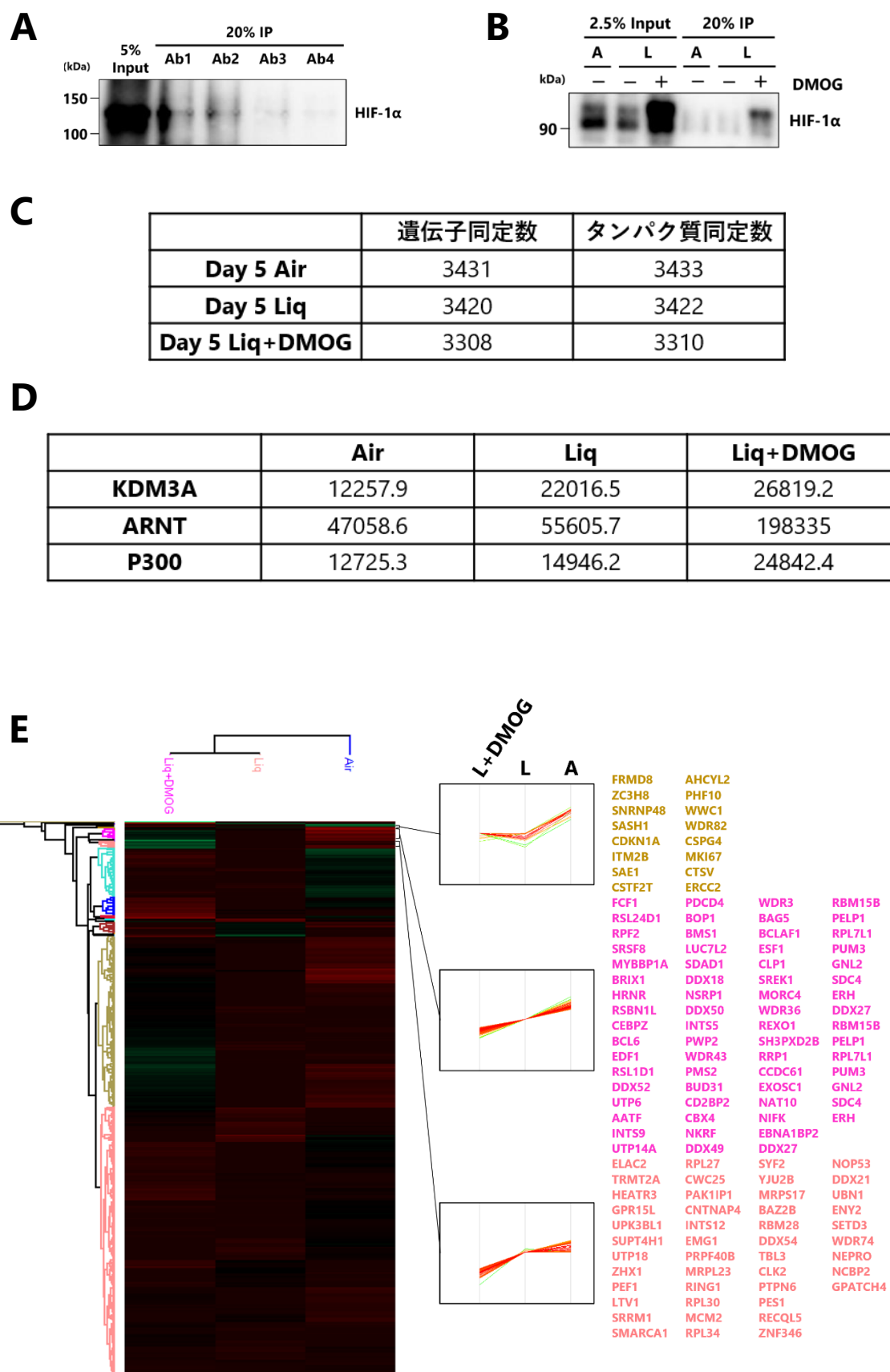
Supplementary Fig. S1. 角質層に存在する核の個数の変化

ヒト表皮初代培養細胞を用いた三次元培養の Day 21A/L または Day 35A/L サンプルを対象に、角質層に存在する核の個数をカウントした。HE 染色切片を用いて解析した。角質層の面積は Image J を使用して計測した。*P<0.05



Supplementary Fig. S2. HE 染色を用いた Day 35 振とう培養サンプルの解析

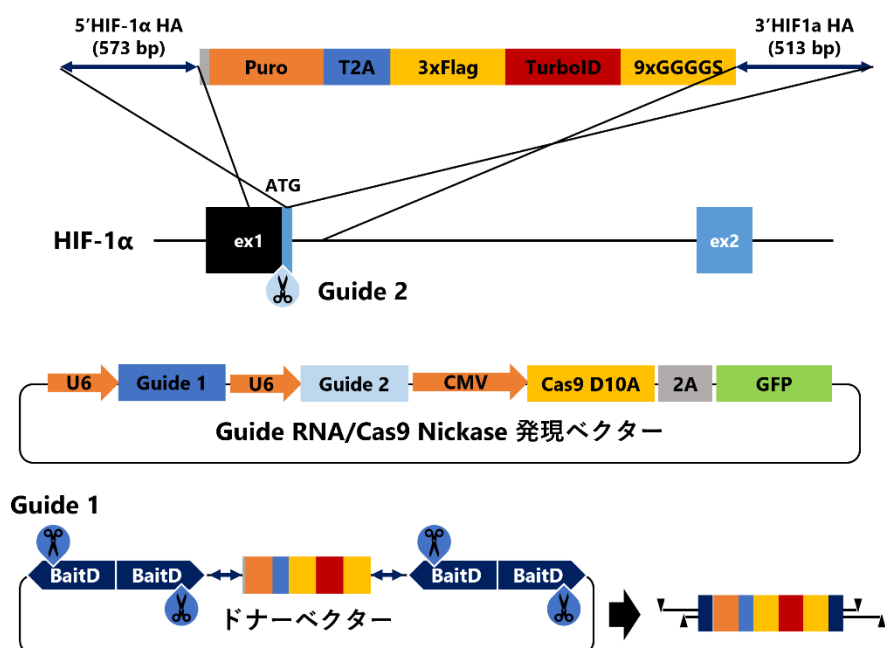
ヒト表皮初代培養細胞を用いた三次元培養を振とうしながら行った。Day 0 から振とうしはじめ、Day 35 まで培養を行った。包埋したサンプルから切片を作成し、HE 染色を行った。Scale bar = 50 μm



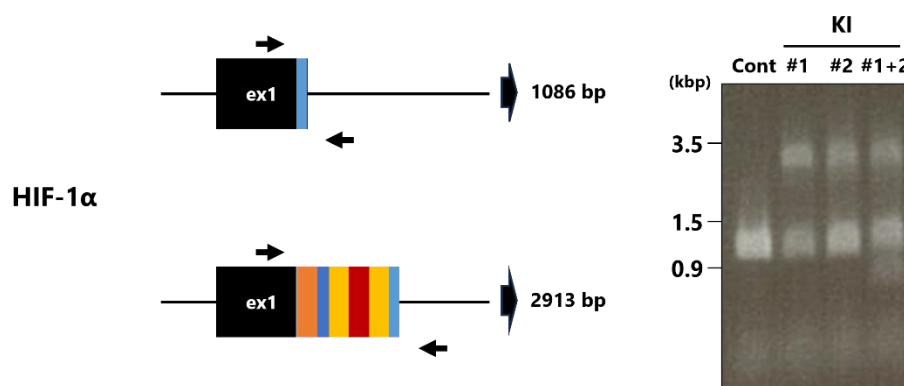
Supplementary Fig. S3. IP-MS による HIF-1 α 相互作用因子探索のための検討

- (A) IP に使用する抗体の検討を行った。HEK293T から細胞抽出液を調製し IP を行った。IP に使用した細胞抽出液の内 5% を Input とし解析に用いた。また、IP サンプルの内 20% をウェスタンブロットに供した。Ab2 を以降の解析に使用した。Ab1: D1S7W Rabbit mAb (CST)、Ab2: NB100-134 Rabbit polyAb (NOVUS)、Ab3: NB100-105 Mouse mAb (NOVUS)、Ab4: sc-53546 Mouse mAb (SCBT)
- (B) IP-MS に供するサンプルを用いて HIF-1 α のウェスタンブロッティングを行った。0.1% のホルマリンで固定した三次元培養サンプルを細胞質画分と核画分に分離し、核抽出液を免疫沈降に使用した。0.5% NP-40 と 0.25% TritonX-100 を含む細胞質可溶化液で固定後の細胞を処理した後、残渣を核画分とし、0.1% SDS を含む溶液で可溶化した。この核抽出液中の 2.5% を Input サンプルとして使用した。抗体を結合した磁気ビーズと核抽出液は一晩反応させた。IP 後のビーズのうち 20% を IP サンプルとして分取し、終濃度 2 倍の Laemmli バッファの添加および熱変性処理後、ウェスタンブロッティングに供した。
- (C) Day 5 Air/Liq/Liq+DMOG サンプルについて HIF-1 α 抗体を用いた IP-MS を行った際の遺伝子およびタンパク同定数を示した。IP 後のビーズに対し直接トリプシン処理をし、タンパク質の断片化を行った。サンプルの還元化、アルキル化処理をした後、サンプル pH を酸性に調整し、GL-Tip SDB カラムによるペプチドの濃縮を行った。精製したペプチドを質量分析に供した後、得られたデータを Data independent acquisition 法で解析した。
- (D) IP-MS から取得したタンパク質データに対し階層的クラスタリングをおこなった。データは Perseus で解析した²³。欠損値を含むタンパク質は除いたデータを正規化し、階層的クラスタリングを行った。遺伝子の発現パターンを 20 個のクラスターに分け、Air において高い発現を示すクラスターを示した。それぞれのクラスターに含まれる遺伝子名を記載した。

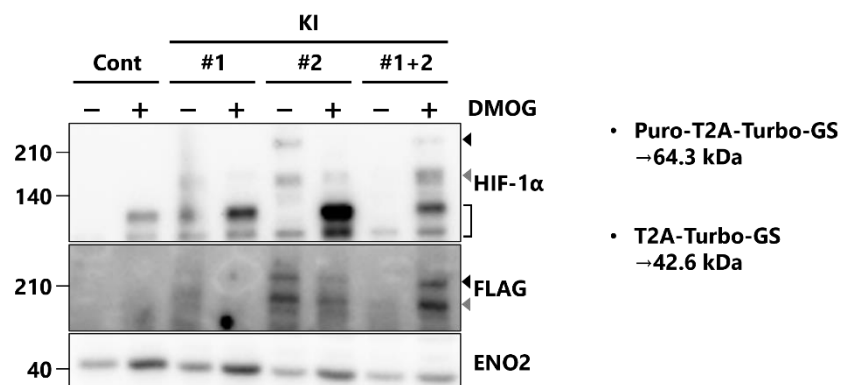
A



B

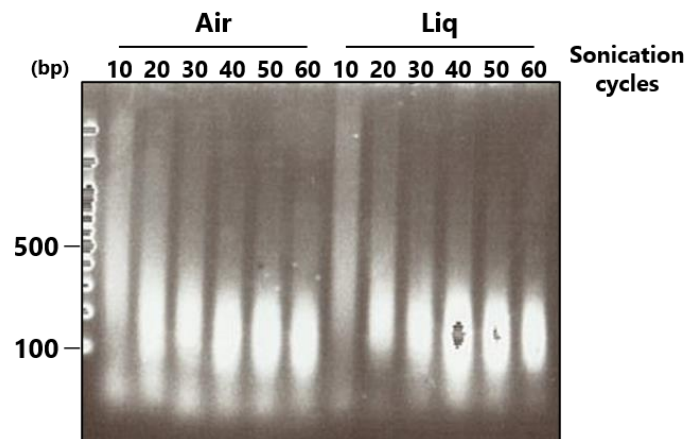
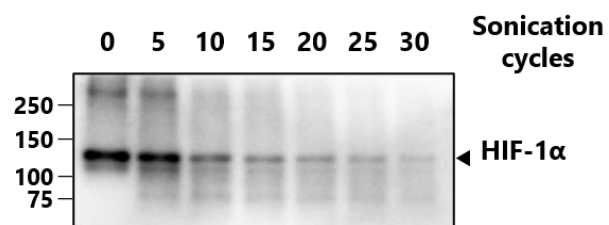
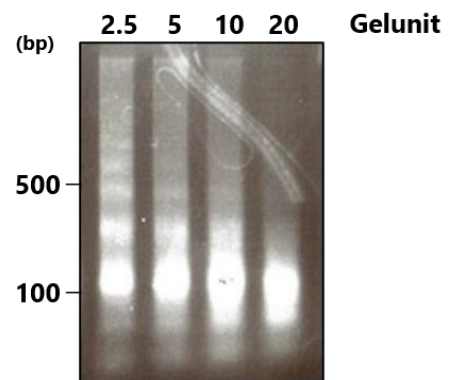
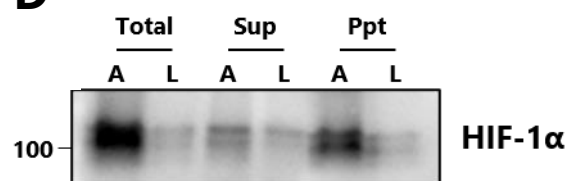
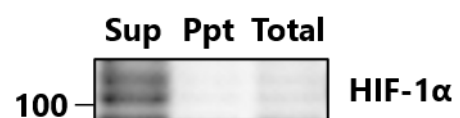
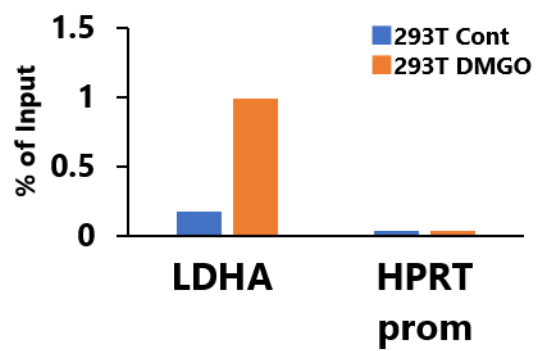


C



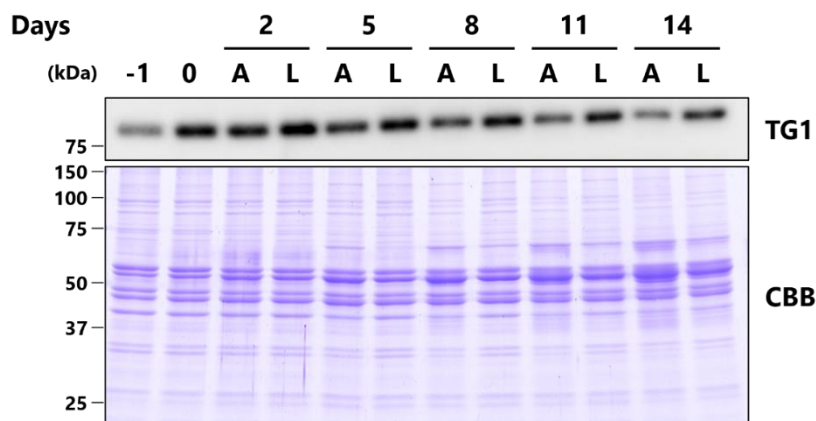
Supplementary Fig. S4. 近位ビオチン標識法を用いた HIF-1 α 相互作用因子同定に用いる細胞の樹立

- (A) 導入する外来遺伝子の概略図および使用したベクターを示す。HIF-1 α 開始コドンの直下に外来遺伝子が挿入されるように 500 bp 程度のホモロジーアームを選択した。薬剤選択マーカーを TurboID (ビオチン化酵素) 2A ペプチドで接続し、翻訳時に切断されるようにした。TurboID は 3 \times FLAG タグでラベルし、HIF-1 α との接続部にはグリシン/セリンリンカーを挿入した。Guide RNA/Cas9 nickase 発現ベクターは 2 種類の Guide RNA を発現する。Guide 1 には BaitD 配列に対する Guide RNA 配列を挿入し、Guide 2 には HIF-1 α に対する Guide RNA 配列を挿入した。ドナーベクターでは、BaitD の逆位反復配列がドナー配列を挟んでいる。BaitD が切断されることにより、細胞内でリニアなドナー配列が生まれる。BaitD: ゲノムに外来遺伝子を効率よく導入することができる配列であり、in silico screening によって選択された。Puro: Puromycin 耐性遺伝子、U6: U6 プロモーター、CMV: サイトメガロウイルスプロモーター、Cas9 D10A: Cas9 nickase、GFP: 緑色蛍光タンパク質
- (B) 外来遺伝子導入後の細胞からゲノム DNA を抽出し、PCR により遺伝子型を判定した。外来遺伝子が挿入されていない場合は 1086 bp、挿入されている場合は 2913 bp の産物を生じる。シングルニッキング法: #1/2、ダブルニッキング法: #1+2。#1 ターゲットサイト: CGGGGACCGATTACCATGG、#2 ターゲットサイト: GAGCGAGCCTGGGGGCCGC
- (C) 外来遺伝子導入後の細胞に PHD 阻害剤 (DMOG) を添加し、発現する HIF-1 α について調べた。DMOG を添加した細胞から細胞抽出液を調製し、ウェスタンブロッティングを行った。解析には 6 μ g のタンパク質を用いた。T2A で切断されなかった場合は 64.3 kDa、された場合は 42.6 kDa のタンパク質が HIF-1 α に付加される。◀: Puro-T2A-TurboID-GS-HIF-1 α bands、◀: T2A-TurboID-GS-HIF-1 α bands、]: HIF-1 α bands

A**B****C****D****E****F**

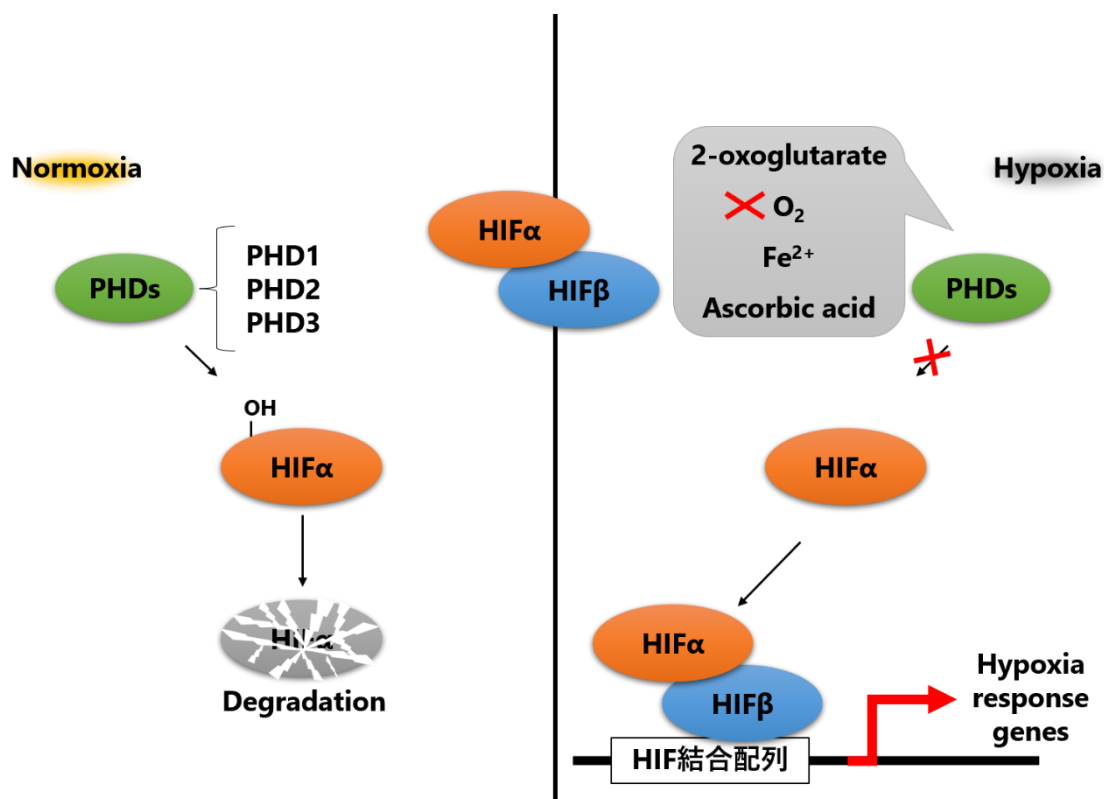
Supplementary Fig. S5. ChIP による HIF-1 α 結合 DNA 配列同定のための検討

- (A) ChIP に適した DNA 断片得られるソニケーションサイクルの検討を行った。Ker-CT を用いた三次元培養サンプルを使用した。1%ホルマリンで 10 分間固定した細胞から核を抽出した。核画分に対して 30 秒 On/30 秒 Off のソニケーションを 10~60 サイクル繰り返した。ソニケーションは、サンプルを冷却しながら行い、High power で行った。機器は Bioruptor を使用した。クロマチンはフェノール/クロロホルム処理およびエタノール沈殿で精製した。精製したクロマチンを 2%のアガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。
- (B) PHD 阻害剤である DMOG を処理した HEK293T サンプルに対し、0~30 サイクルのソニケーションを処理した。処理後のサンプルを lammliie バッファーで変性させ、HIF-1 α のウエスタンブロッティングを行った。
- (C) ChIP に適した DNA 断片得られる MNase 濃度の検討を行った。Ker-CT を用いた三次元培養サンプルを使用した。1%ホルマリンで 10 分間固定した細胞から核を抽出した。核画分に MNase を添加後、37°C で 20 分間反応させ、終濃度 10 mM EDTA および 20 mM EGTA を含むバッファーで反応を停止させた。クロマチンはフェノール/クロロホルム処理およびエタノール沈殿で精製した。精製したクロマチンを 2%のアガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。
- (D) MNase で断片化したクロマチンサンプルをウエスタンブロッティングに供し、HIF-1 α を検出した。Ker-CT を用いた三次元培養サンプルを使用した。MNase の反応停止時に SDS を含むバッファーを添加することにより核を破碎した。分画前のサンプルを Total、核画分を Sup、核破碎後の残渣を Ppt とした。
- (E) MNase で断片化したクロマチンサンプルをウエスタンブロッティングに供し、HIF-1 α を検出した。Ker-CT を用いた三次元培養サンプル（気相培養条件）を使用した。MNase の反応停止時に SDS を含むバッファーを添加した。強力に破碎するためにポッター型ホモジナイザーで核画分を破碎した。分画前のサンプルを Total、核画分を Sup、核画分破碎後の残渣を Ppt とした。
- (F) PHD 阻害剤である DMOG を処理した HEK293T を用いて ChIP-qPCR を行った。細胞を 10 分間 1%ホルマリンで固定後、分画し核画分を得た。核画分に MNase を加え、20 分間 37°C で反応させた。SDS、EDTA、EGTA を含む溶液で MNase の反応を停止後、ホモジナイザーで核を破碎した。フェノール/クロロホルム処理およびエタノール沈殿によって抽出液からクロマチンを精製した。クロマチン 1 ng を使用し qPCR を行い、標的配列が Input に対しどの程度濃縮されたか算出した。LDHA Promoter 領域が標的であるプライマーと HPRT Promoter 領域が標的であるプライマーを使用した。LDHA Forward: TTGGAGGGCAGCACCTTACTTAGA、LDHA Reverse: GCCTTAAGTGAACAGCTATGCTGAC、HPRT Prom Forward: TGTTTGGGCTATTACTAGTTG、HPRT Prom Reverse: ATAAAATGACTTAAGCCCAGAG



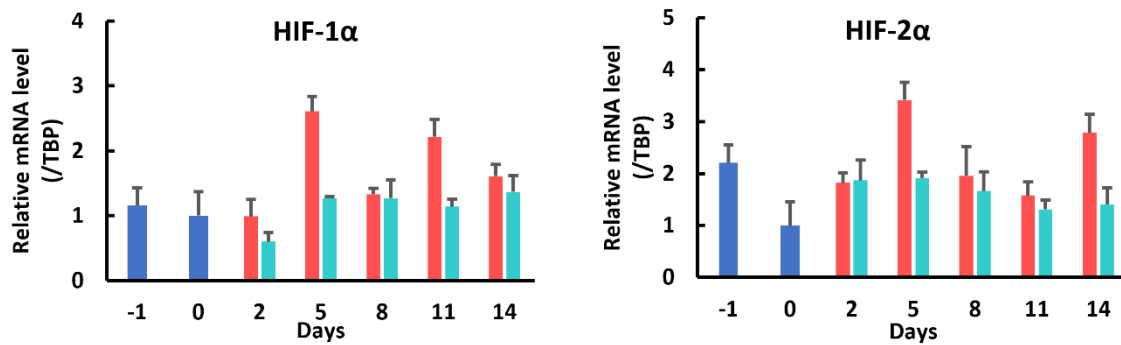
Supplementary Fig. S6. TG1 タンパク質発現量の経時的解析

ヒト表皮初代培養細胞を用いた三次元培養サンプルから全細胞抽出液を調製し、TG1のウエスタンブロッティングを行った。CBBはローディングコントロールとして用いた。A: 気相培養群、L: 液相培養群。



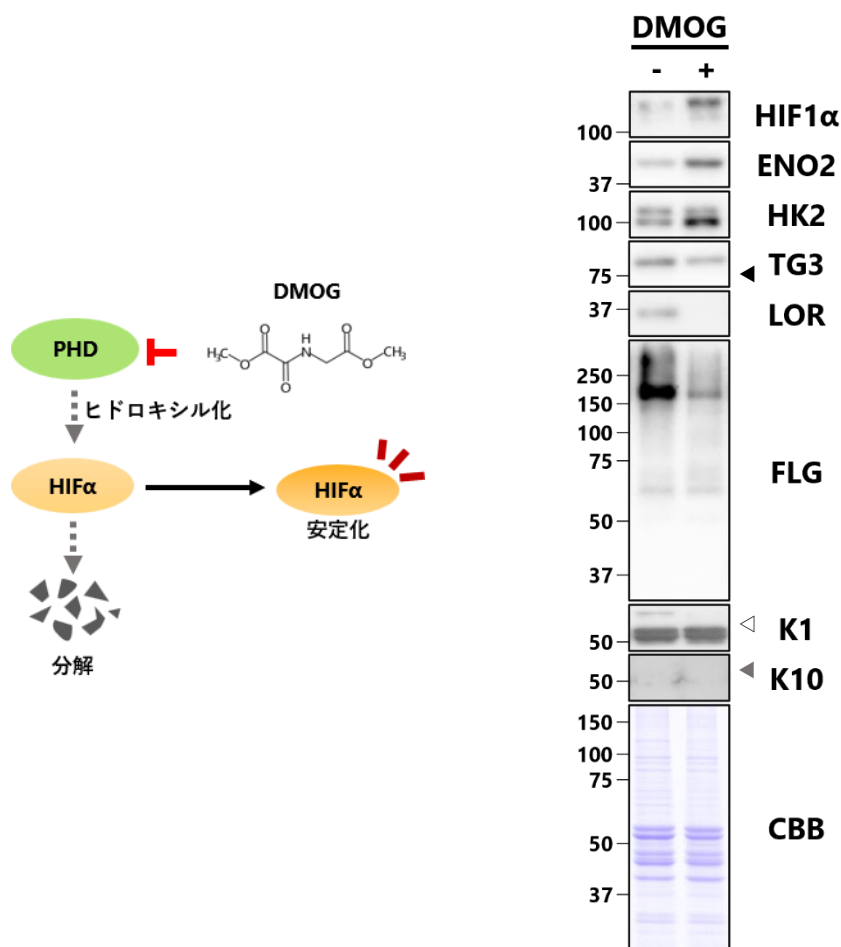
Supplementary Fig. S7. PHD による HIF 分解経路の概略図

PHD による HIF 分解経路の概略図を示した。通常酸素下では HIFα が PHD によって水酸化された後ユビキチンプロテアソーム系によって分解される。しかし、低酸素下では PHD の酵素活性が低下し、HIFα が安定化することにより HIF が活性化する。



Supplementary Fig. S8. HIF-1α および 2α の遺伝子発現量の解析

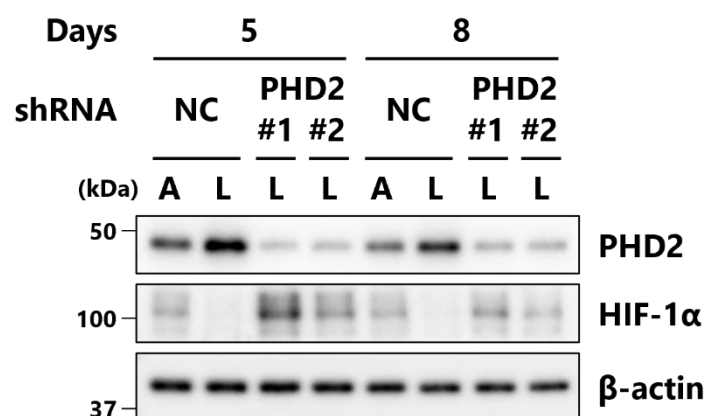
ヒト表皮初代培養細胞を用いた三次元培養サンプルから mRNA を抽出し、qPCR を行った。HIF-1α および 2α の発現量を調べた。TBP を内在性コントロールとした。HIF-1α Forward: CTGCAACATGGAAGGTATTGCAC、HIF-1α Reverse: ATCAGCACCAAGCAGGTCATAG、HIF-2α Forward: CAGCCTCCATCTGCCATCAG、HIF-2α Reverse: GCCATGCCTGACACCTTGTG



Supplementary Fig. S9. 液相培養において PHD 阻害剤が表皮分化に及ぼす影響の解析

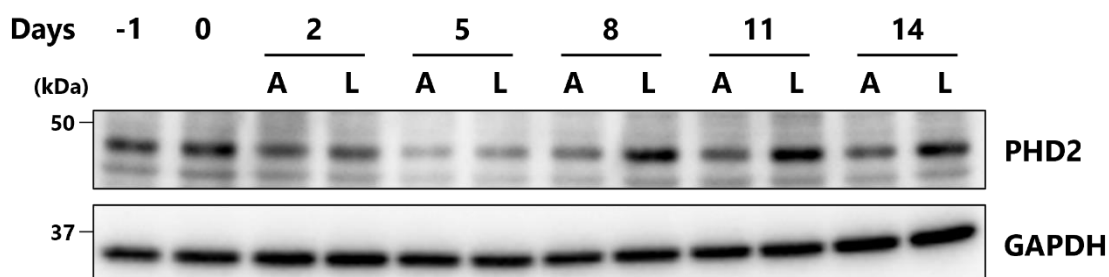
ヒト表皮初代培養細胞を用いた液相培養において、薬剤による PHD の阻害が表皮分化に与える影響を解析した。Day 0~8 まで終濃度 1 mM の Dimethyloxaloylglycine

(DMOG) を加えて培養し、サンプリングを行った。全細胞抽出液を調製し、ウエスタンブロッティングにより HIF-1α および HIF 制御遺伝子、表皮分化マーカータンパク質を解析した。◀: HK2 bands、◁: Filaggrin monomer bands、◄: K1 bands



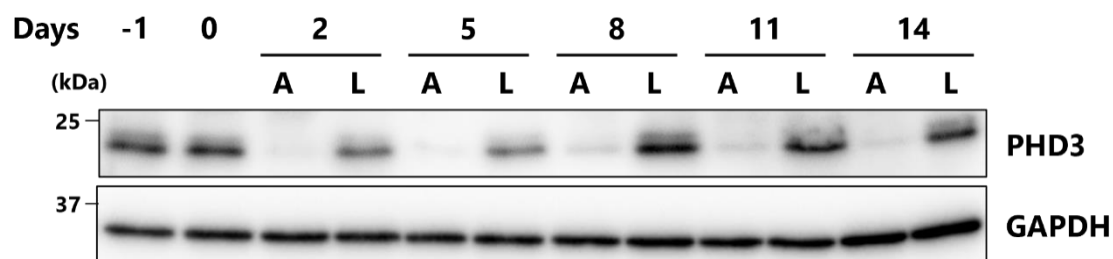
Supplementary Fig. S10. 液相培養における HIF-1α 分解経路の確認

PHD2 に対する shRNA (#1 または #2) および Negative control shRNA を発現する外来遺伝子を導入した Ker-CT を用いてヒト表皮三次元培養を行った。Day 5/8 まで培養後、可溶性の細胞抽出液を調製し、ウエスタンブロッティングにより PHD2、HIF-1α を解析した。β-actin をローディングコントロールとして用いた。A: 気相培養群、L: 液相培養群



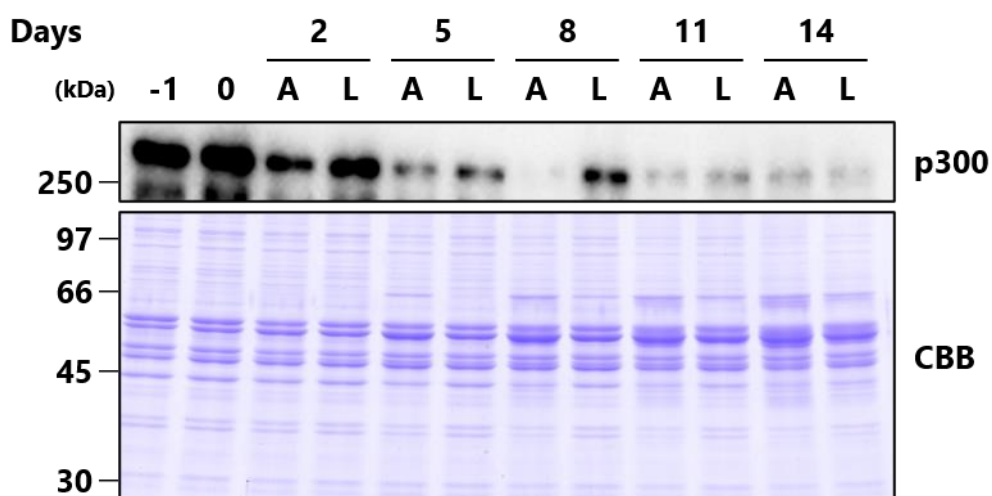
Supplementary Fig. S11. PHD2 タンパク質発現量の経時的解析

ヒト表皮初代培養細胞を用いた三次元培養サンプルから可溶性細胞抽出液を調製し、PHD2 のウエスタンブロッティングを行った。ローディングコントロールとして GAPDH を用いた。



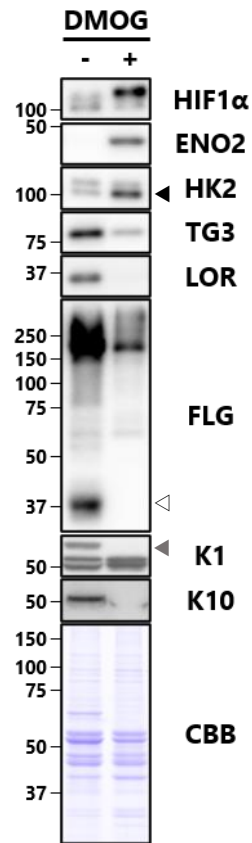
Supplementary Fig. S12. PHD3 タンパク質発現量の経時的解析

ヒト表皮初代培養細胞を用いた三次元培養サンプルから可溶性細胞抽出液を調製し、PHD3 のウエスタンブロッティングを行った。ローディングコントロールとして GAPDH を用いた。A: 気相培養群、L: 液相培養群

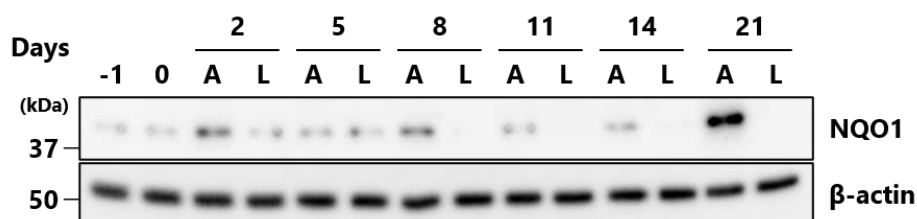


Supplementary Fig. S13. p300 タンパク質発現量の経時的解析

ヒト表皮初代培養細胞を用いた三次元培養サンプルから全細胞抽出液を調製し、p300 のウエスタンブロッティングを行った。CBB をローディングコントロールとして用いた。A: 気相培養群、L: 液相培養群

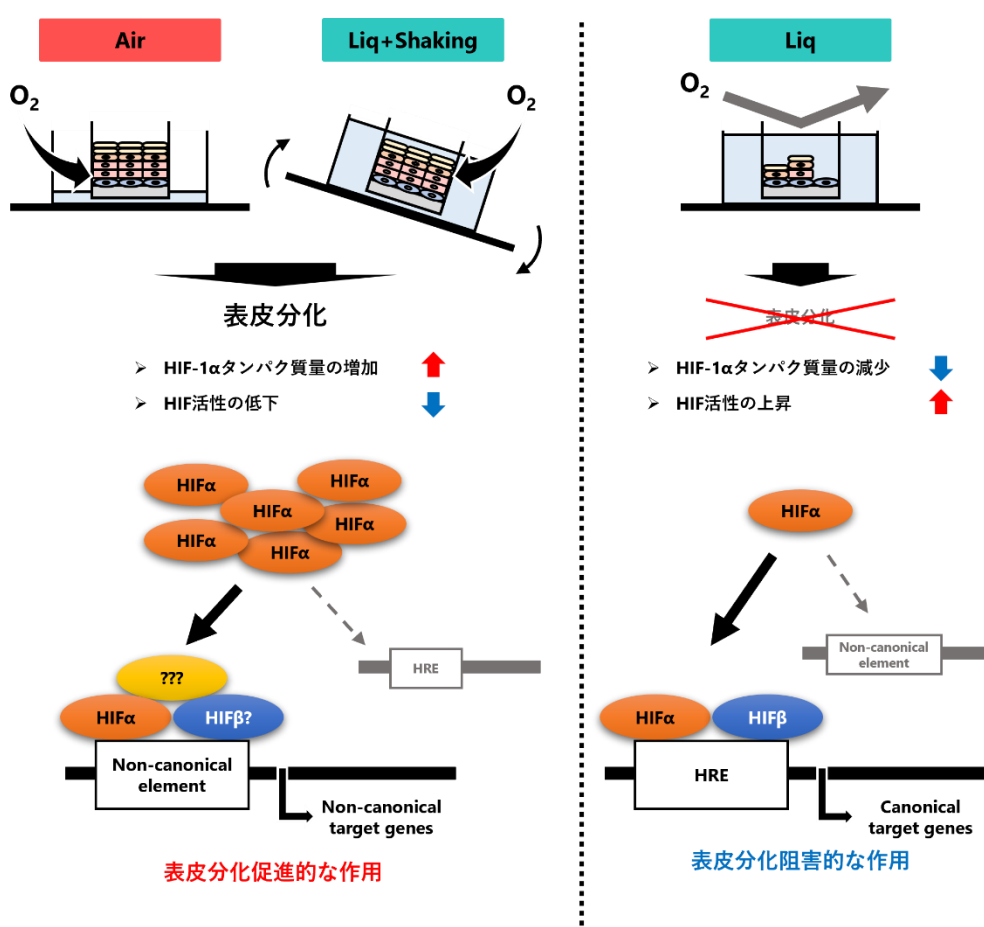


Supplementary Fig. S14. 気相培養において PHD 阻害剤が表皮分化に及ぼす影響の解析
 ヒト表皮初代培養細胞を用いた気相培養において、薬剤による PHD の阻害が表皮分化に与える影響を解析した。Day 0~8 まで終濃度 1 mM の Dimethyloxaloylglycine (DMOG) を加えて培養し、サンプリングを行った。全細胞抽出液を調製し、ウエスタンブロッティングにより HIF-1 α および HIF 制御遺伝子、表皮分化マーカータンパク質を解析した。◀: HK2 bands、◁: Filaggrin monomer bands、◄: K1 bands



Supplementary Fig. S15. NQO1 タンパク質発現量の経時的解析

ヒト表皮初代培養細胞を用いた三次元培養サンプルから可溶性細胞抽出液を調製し、NQO1 のウエスタンブロッティングを行った。A: 気相培養群、L: 液相培養群



Supplementary Fig. S16. HIF が関与する空気暴露依存的な表皮分化メカニズム

HIF が関与する空気暴露依存的な表皮分化メカニズムの概略図を示した。液相培養下では細胞が低酸素になり表皮分化が低下する。この時 HIF-1 α タンパク質は低下するが、HIF は活性化している。気相培養下では空気暴露が細胞に酸素を供給し分化を促進する。この時、HIF-1 α タンパク質安定化と HIF 活性の低下が生じる。新たな因子との相互作用などを介して HIF-1 α が従来の HRE 配列とは異なる DNA 配列に結合し、表皮分化に働く遺伝子を転写促進する可能性がある。

Supplementary Table 1. Differentially expressed gene 解析によって Day 2 Air/Liq 間の発現量に差異が確認された遺伝子のリスト

Genes upregulated in the air-liquid interphase culture (Air)

Gene ID	Gene	Log ₂ FC (Air/Liq)	q-value
ENSG00000244057	LCE3C	-3.7689	6.24E-34
ENSG00000145824	CXCL14	-2.913	4.47E-27
ENSG00000224308	LINC01527	-2.6956	7.27E-13
ENSG00000108417	KRT37	-2.5631	6.87E-09
ENSG00000135925	WNT10A	-2.15	1.66E-05
ENSG00000159516	SPRR2G	-2.1325	1.29E-98
ENSG00000167768	KRT1	-1.9698	1.37E-211
ENSG00000173221	GLRX	-1.8636	1.44E-06
ENSG00000011028	MRC2	-1.8536	7.74E-06
ENSG00000187134	AKR1C1	-1.8134	2.30E-06
ENSG00000203782	LOR	-1.783	9.42E-81
ENSG00000044574	HSPA5	-1.7459	7.67E-56
ENSG00000137440	FGFBP1	-1.595	2.61E-56
ENSG00000170477	KRT4	-1.5642	1.77E-07
ENSG00000170465	KRT6C	-1.4995	1.54E-05
ENSG00000203785	SPRR2E	-1.4819	4.45E-69
ENSG00000109846	CRYAB	-1.4773	3.92E-19
ENSG00000143546	S100A8	-1.3591	5.76E-13
ENSG00000073737	DHRS9	-1.3067	4.20E-03
ENSG00000203783	PRR9	-1.2697	2.46E-05
ENSG00000186395	KRT10	-1.2684	1.42E-71
ENSG00000185966	LCE3E	-1.2351	1.66E-49
ENSG00000276600	RAB7B	-1.2336	1.98E-03
ENSG00000187223	LCE2D	-1.2199	9.42E-04
ENSG00000204389	HSPA1A	-1.2048	5.42E-20
ENSG00000179593	ALOX15B	-1.1322	4.46E-06
ENSG00000103257	SLC7A5	-1.1162	6.13E-20
ENSG00000187173	LCE2A	-1.0955	4.67E-04
ENSG00000125691	RPL23	-1.0491	4.45E-17
ENSG00000197948	FCHSD1	-1.0293	1.16E-10

Genes upregulated in submerged culture (Liq)

Gene ID	Gene	Log ₂ FC (Air/Liq)	q-value
ENSG00000107159	CA9	3.7341	2.38E-03
ENSG00000129521	EGLN3	3.26	3.46E-25
ENSG00000166473	PKD1L2	3.1791	4.74E-05
ENSG00000217801	LOC100288175	3.1543	2.69E-05
ENSG00000105141	CASP14	2.8769	3.88E-91
ENSG00000118523	CTGF	2.4633	3.82E-08
ENSG00000134013	LOXL2	2.4213	4.48E-03
ENSG00000122884	P4HA1	2.3581	1.11E-09
ENSG00000111674	ENO2	2.322	2.94E-03
ENSG00000176826	FKBP9P1	2.1845	1.90E-04
ENSG00000185633	NDUFA4L2	2.165	3.59E-14
ENSG00000247095	MIR210HG	2.081	2.40E-04
ENSG00000104419	NDRG1	1.9335	7.80E-185
ENSG00000059804	SLC2A3	1.8531	8.21E-18
ENSG00000186517	ARHGAP30	1.8492	2.83E-03
ENSG00000066735	KIF26A	1.7067	6.20E-07
ENSG00000222009	BTBD19	1.6386	1.23E-04
ENSG00000160886	LY6K	1.6216	8.28E-04
ENSG00000119630	PGF	1.5902	7.26E-09
ENSG00000197930	ERO1A	1.5429	2.58E-17
ENSG00000087074	PPP1R15A	1.4385	6.05E-28
ENSG00000276900	RP11-467L13.7	1.4276	1.31E-09
ENSG00000167772	ANGPTL4	1.4065	2.70E-08
ENSG00000134333	LDHA	1.3965	6.06E-158
ENSG00000237330	RNF223	1.3826	1.58E-07
ENSG00000167968	DNASE1L2	1.3769	1.41E-11
ENSG00000188290	HES4	1.356	2.00E-08
ENSG00000074590	NUAK1	1.3484	3.05E-05
ENSG00000176171	BNIP3	1.3476	3.75E-09
ENSG00000170345	FOS	1.2994	4.28E-03
ENSG00000099875	MKNK2	1.2932	9.58E-85
ENSG00000198743	SLC5A3	1.2842	3.69E-03
ENSG00000130821	SLC6A8	1.2452	2.13E-21
ENSG00000147872	PLIN2	1.2269	7.09E-07

ENSG00000162545	CAMK2N1	1.1992	3.32E-16
ENSG00000112715	VEGFA	1.1927	9.69E-12
ENSG00000146242	TPBG	1.1855	6.93E-08
ENSG00000109046	WSB1	1.1448	1.17E-06
ENSG00000151651	ADAM8	1.0994	8.70E-07
ENSG00000115548	KDM3A	1.0921	1.21E-03
ENSG00000182261	NLRP10	1.0908	8.20E-11
ENSG00000099860	GADD45B	1.0898	2.01E-05
ENSG00000159399	HK2	1.0581	9.45E-06
ENSG00000154764	WNT7A	1.0356	1.31E-09
ENSG00000147689	FAM83A	1.0265	4.69E-13
ENSG00000149925	ALDOA	1.0239	6.53E-91
ENSG00000112245	PTP4A1	1.0096	2.14E-12
ENSG00000204839	MROH6	1.0041	1.13E-07

参考文献

1. 清水宏. あたらしい皮膚科学. (2005).
2. Hitomi, K. Transglutaminases in skin epidermis. *Eur. J. Dermatol.* **15**, 313–9 (2005).
3. Eckert, R. L. *et al.* Transglutaminase regulation of cell function. *Physiol. Rev.* **94**, 383–417 (2014).
4. Candi, E., Schmidt, R. & Melino, G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 328–40 (2005).
5. Poumay, Y. *et al.* A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. *Arch. Dermatol. Res.* **296**, 203–11 (2004).
6. Poumay, Y. & Coquette, A. Modelling the human epidermis in vitro: tools for basic and applied research. *Arch. Dermatol. Res.* **298**, 361–9 (2007).
7. Rheinwald, J. G. & Green, H. Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. *Cell* **6**, 317–30 (1975).
8. Rosdy, M. & Clauss, L. C. Terminal epidermal differentiation of human keratinocytes grown in chemically defined medium on inert filter substrates at the air-liquid interface. *J. Invest. Dermatol.* **95**, 409–14 (1990).
9. Tanabe, Y. *et al.* Studies on differentiation-dependent expression and activity of distinct transglutaminases by specific substrate peptides using three-dimensional reconstituted epidermis. *FEBS J.* **286**, 2536–2548 (2019).
10. Pruniéras, M., Régnier, M. & Woodley, D. Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J. Invest. Dermatol.* **81**, 28s–33s (1983).
11. Segal, N. *et al.* The basement membrane microenvironment directs the normalization and survival of bioengineered human skin equivalents. *Matrix Biol.* **27**, 163–70 (2008).
12. Kumamoto, J. *et al.* Mathematical-model-guided development of full-thickness epidermal equivalent. *Sci. Rep.* **8**, 17999 (2018).
13. Koria, P. & Andreadis, S. T. Epidermal morphogenesis: the transcriptional program of human keratinocytes during stratification. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 1834–41 (2006).
14. Teshima, H. *et al.* Involvement of hypoxia-inducible factor activity in inevitable air-exposure treatment upon differentiation in a three-dimensional keratinocyte culture. *FEBS J.* **290**, 2049–2063 (2023).
15. Hitomi, K. *et al.* Analysis of epidermal-type transglutaminase (transglutaminase 3) in human stratified epithelia and cultured keratinocytes using monoclonal antibodies. *J. Dermatol. Sci.* **32**, 95–103 (2003).
16. Wong, W. J., Richardson, T., Seykora, J. T., Cotsarelis, G. & Simon, M. C. Hypoxia-inducible factors regulate filaggrin expression and epidermal barrier function. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 454–461 (2015).
17. Rezvani, H. R. *et al.* Loss of epidermal hypoxia-inducible factor-1 α accelerates epidermal aging and affects re-epithelialization in human and mouse. *J. Cell Sci.* **124**, 4172–83 (2011).
18. Mahfouf, W. *et al.* Loss of Epidermal HIF-1 α Blocks UVB-Induced Tumorigenesis by Affecting DNA Repair Capacity and Oxidative Stress. *J. Invest. Dermatol.* **139**, 2016–2028.e7 (2019).
19. Peek, C. B. *et al.* Circadian Clock Interaction with HIF1 α Mediates Oxygenic Metabolism and Anaerobic Glycolysis in Skeletal Muscle. *Cell Metab.* **25**, 86–92 (2017).
20. O’Connell, E. J., Martinez, C.-A., Liang, Y. G., Cistulli, P. A. & Cook, K. M. Out of breath, out of time: interactions between HIF and circadian rhythms. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **319**, C533–C540 (2020).
21. Vaughan, M. E. *et al.* Cryptochromes Suppress HIF1 α in Muscles. *iScience* **23**, 101338 (2020).

22. Allan, K. C. *et al.* Non-canonical Targets of HIF1 α Impair Oligodendrocyte Progenitor Cell Function. *Cell Stem Cell* **28**, 257–272.e11 (2021).
23. Tyanova, S. *et al.* The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods* **13**, 731–40 (2016).
24. Murakami, Y., Ansai, S., Yonemura, A. & Kinoshita, M. An efficient system for homology-dependent targeted gene integration in medaka (*Oryzias latipes*). *Zool. Lett.* **3**, 10 (2017).
25. Murakami, Y., Futamata, R., Horibe, T., Ueda, K. & Kinoshita, M. CRISPR/Cas9 nickase-mediated efficient and seamless knock-in of lethal genes in the medaka fish *Oryzias latipes*. *Dev. Growth Differ.* **62**, 554–567 (2020).
26. Murakami, Y. & Kobayashi, T. An effective double gene knock-in strategy using small-molecule L755507 in the medaka fish (*Oryzias latipes*). *Genesis* **60**, e23465 (2022).
27. Sander, J. D. & Joung, J. K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotechnol.* **32**, 347–55 (2014).
28. Pchelintsev, N. A., Adams, P. D. & Nelson, D. M. Critical Parameters for Efficient Sonication and Improved Chromatin Immunoprecipitation of High Molecular Weight Proteins. *PLoS One* **11**, e0148023 (2016).
29. Blanpain, C. & Fuchs, E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 207–17 (2009).
30. Matoltsy, A. G. Structure and Function of the Mammalian Epidermis. in *Biology of the Integument* 255–271 (Springer Berlin Heidelberg, 1986). doi:10.1007/978-3-662-00989-5_14.
31. Brady, S. P. Parakeratosis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **50**, 77–84 (2004).
32. Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E. & Declercq, W. Cell death by cornification. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 3471–3480 (2013).
33. Fischer, H., Buchberger, M., Napirei, M., Tschachler, E. & Eckhart, L. Inactivation of DNase1L2 and DNase2 in keratinocytes suppresses DNA degradation during epidermal cornification and results in constitutive parakeratosis. *Sci. Rep.* **7**, 6433 (2017).
34. Yamamoto-Tanaka, M. *et al.* Mesotrypsin and caspase-14 participate in prosaposin processing: potential relevance to epidermal permeability barrier formation. *J. Biol. Chem.* **289**, 20026–38 (2014).
35. Yamamoto-Tanaka, M. *et al.* Multiple pathways are involved in DNA degradation during keratinocyte terminal differentiation. *Cell Death Dis.* **5**, e1181 (2014).
36. Fischer, H. *et al.* DNase1L2 degrades nuclear DNA during corneocyte formation. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 24–30 (2007).
37. Quiroz, F. G. *et al.* Liquid-liquid phase separation drives skin barrier formation. *Science* **367**, eaax9554 (2020).
38. Matsuki, M. *et al.* Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 1044–9 (1998).
39. Brown, S. J. & McLean, W. H. I. One remarkable molecule: filaggrin. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 751–62 (2012).
40. Matsui, T. *et al.* A unique mode of keratinocyte death requires intracellular acidification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **118**, e2020722118 (2021).
41. Lee, P., Chandel, N. S. & Simon, M. C. Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 268–283 (2020).
42. Boutin, A. T. *et al.* Epidermal sensing of oxygen is essential for systemic hypoxic response. *Cell* **133**, 223–34 (2008).
43. Sheta, E. A., Trout, H., Gildea, J. J., Harding, M. A. & Theodorescu, D. Cell density mediated pericellular hypoxia leads to induction of HIF-1 α via nitric oxide and

- Ras/MAP kinase mediated signaling pathways. *Oncogene* **20**, 7624–34 (2001).
44. Berra, E., Ginouvès, A. & Pouyssegur, J. The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling. *EMBO Rep.* **7**, 41–5 (2006).
 45. Semenza, G. L. A compendium of proteins that interact with HIF-1 α . *Exp. Cell Res.* **356**, 128–135 (2017).
 46. Mylonis, I., Chachami, G., Paraskeva, E. & Simos, G. Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by MAPK. *J. Biol. Chem.* **283**, 27620–27627 (2008).
 47. Mimura, I. *et al.* Dynamic change of chromatin conformation in response to hypoxia enhances the expression of GLUT3 (SLC2A3) by cooperative interaction of hypoxia-inducible factor 1 and KDM3A. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 3018–32 (2012).
 48. Qian, X. *et al.* KDM3A Senses Oxygen Availability to Regulate PGC-1 α -Mediated Mitochondrial Biogenesis. *Mol. Cell* **76**, 885-895.e7 (2019).
 49. Goto, Y. *et al.* UCHL1 provides diagnostic and antimetastatic strategies due to its deubiquitinating effect on HIF-1 α . *Nat. Commun.* **6**, 6153 (2015).
 50. Ross, D. & Siegel, D. The diverse functionality of NQO1 and its roles in redox control. *Redox Biol.* **41**, 101950 (2021).
 51. Oh, E.-T. *et al.* NQO1 inhibits proteasome-mediated degradation of HIF-1 α . *Nat. Commun.* **7**, 13593 (2016).
 52. Ito, Y., Ahmad, A., Kewley, E. & Mason, R. J. Hypoxia-inducible factor regulates expression of surfactant protein in alveolar type II cells in vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **45**, 938–45 (2011).
 53. Lisy, K. & Peet, D. J. Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Cell Death Differ.* **15**, 642–9 (2008).
 54. Vorriink, S. U. & Domann, F. E. Regulatory crosstalk and interference between the xenobiotic and hypoxia sensing pathways at the AhR-ARNT-HIF1 α signaling node. *Chem. Biol. Interact.* **218**, 82–8 (2014).
 55. Woods, S., Farrall, A., Procko, C. & Whitelaw, M. L. The bHLH/Per-Arnt-Sim transcription factor SIM2 regulates muscle transcript myomesin2 via a novel, non-canonical E-box sequence. *Nucleic Acids Res.* **36**, 3716–27 (2008).
 56. Wu, D., Potluri, N., Lu, J., Kim, Y. & Rastinejad, F. Structural integration in hypoxia-inducible factors. *Nature* **524**, 303–8 (2015).
 57. Cho, K. F. *et al.* Proximity labeling in mammalian cells with TurboID and split-TurboID. *Nat. Protoc.* **15**, 3971–3999 (2020).
 58. Kim, D. I. *et al.* An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. *Mol. Biol. Cell* **27**, 1188–96 (2016).
 59. Haft, D. H., Selengut, J., Mongodin, E. F. & Nelson, K. E. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput. Biol.* **1**, e60 (2005).
 60. Brown, J. M. & Wilson, W. R. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 437–47 (2004).
 61. Harada, H. How can we overcome tumor hypoxia in radiation therapy? *J. Radiat. Res.* **52**, 545–56 (2011).
 62. Hanada, T., Itahara, Y., Katoh, M., Inoie, M. & Hata, K.-I. Keratinization induced by air exposure in the reconstructed human epidermal model: an in vitro model of a cultured epithelial autograft. *J. Biosci. Bioeng.* **118**, 323–6 (2014).
 63. Wood, F. M., Kolybaba, M. L. & Allen, P. The use of cultured epithelial autograft in the treatment of major burn injuries: a critical review of the literature. *Burns* **32**, 395–401 (2006).

業績リスト

(1) 学術雑誌等（紀要・論文集等も含む）に発表した論文、著書

1. Teshima H, Endo M, Furuyama Y, Takama H, Akiyama M, Tsuji T, Tatsukawa H, Hitomi K, Involvement of hypoxia-inducible factor activity in inevitable air-exposure treatment upon differentiation in a three-dimensional keratinocyte culture, FEBS J., FEBS Press, Volume290, Issue8, Pages 2049-2063, 2023, <https://doi.org/10.1111/febs.16707> 査読あり
2. Kuribayashi M, Kawaguchi Y, Teshima H, Yamaguchi H, Tatsukawa H, Hitomi K, Investigation of mouse amniotic fluid for stimulating ability of keratinocyte differentiation depending on the fetal stage, Arch Biochem Biophys., Volume 711, 109003, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.109003> 査読あり
3. Tanabe Y, Yamane M, Kato M, Teshima H, Kuribayashi M, Tatsukawa H, Takama H, Akiyama M, Hitomi K, Studies on differentiation-dependent expression and activity of distinct transglutaminases by specific substrate peptides using three-dimensional reconstituted epidermis, FEBS J., FEBS Press, Volume286, Issue13, Pages 2536-2548, 2019, <https://doi.org/10.1111/febs.14832> 査読あり

(2) 学術雑誌等又は商業誌における解説、総説

1. Teshima H, Kato M, Tatsukawa H, Hitomi K, Analysis of the Expression of Transglutaminases in the Reconstructed Human Epidermis Using Three-Dimensional Cell Culture, Anal Biochem., Volume 603, 113606, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113606> 査読あり
2. 手島裕文、加藤まなみ、辰川英樹、人見清隆、第 14 章 皮膚表皮形成を司るタンパク質架橋化酵素・トランスグルタミナーゼ、食品・バイオにおける最新の酵素利用・シーエムシー出版、2019 査読なし

謝辞

本研究の遂行に際して、ご指導ご鞭撻のほどを受け賜りました人見清隆教授、辰川英樹助教、辻徳治助教に深く御礼申し上げます。また名古屋大学医学研究科 秋山真志教授、高間寛之助教には電子顕微鏡解析において多大なご協力をいただきました。名古屋大学 生命農学研究科 一柳健司教授には ChIP 関連の解析において丁寧なご指導を賜りました。京都大学生命科学研究科 原田浩教授、小林稔助教には実験結果について様々相談にのっていただきました。名城大学生物資源学科 児島孝明准教授にはトランスクリプトーム解析について丁寧にご指導していただきました。名古屋大学創薬科学研究科 小坂田文隆准教授、久留米大学皮膚細胞生物学研究所 Kwesi Teye 助教には遺伝子導入実験において多大なご協力をいただきました。質量分析を用いた相互作用因子の探索は名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所・分子構造センターの三城恵美特任講師のご協力によって実施することができました。たくさんの先生に支えていただいただき、ご協力を賜ることにより本研究を遂行することができました。この場を借りて厚くお礼申し上げます。

諸先輩・後輩方から多大なご支援をいただきました。この場を借りて御礼申し上げます。最後にいつも応援してくれる家族・友人にお礼申し上げます。