

マウス外毛根鞘細胞の前駆細胞となる
nestin 陽性細胞の出現時期
に関する研究

2022年度

東京農工大学大学院農学府共同獣医学専攻

馬場悠太

目次

緒論.....	1
図.....	4
第1章 外毛根鞘を構成する EGFP 陽性細胞の発現時期の解析.....	9
1. 序論.....	10
2. 材料および方法.....	12
3. 結果.....	16
4. 考察.....	18
5. 小括.....	21
6. 図表.....	22
第2章 毛杭に認められた EGFP 陽性細胞の細胞学的特徴の解析.....	29
1. 序論.....	30
2. 材料および方法.....	32
3. 結果.....	33
4. 考察.....	34
5. 小括.....	37
6. 図.....	38
第3章 成体マウスの毛包外毛根鞘における EGFP 陽性細胞の解析.....	40
1. 序論.....	41
2. 材料および方法.....	42
3. 結果.....	45
4. 考察.....	46

5. 小括.....	48
6. 図.....	49
総括.....	54
謝辞.....	58
引用文献.....	59

略語一覽

Atoh1: Atonal bHLH transcription factor 1

bHLH: basic helix-loop-helix

CAT: Chloramphenicol acetyl transferase

E~: Embryonic day~

EGFP: Enhanced green fluorescent protein

ERT2: estrogen receptor T2

Fgf20: Fibroblast growth factor 20

i.p.; intraperitoneal administration

NT-3: neurotrophin-3

OHT: 4-hydroxy-tamoxifen

P~: Postnatal day~

PBS: Phosphate Buffered Saline

SKPs: Skin-derived precursors

SOX: SRY-related-HMG-box

S100A6: S100 calcium-binding protein A6

TrkC: tyrosine kinase C

VIM: Vimentin

Wnt: Wingless + Int

緒論

毛包は、その複雑な構造と自己再生能力から、小さな臓器と呼ばれている [Schneider MR et al., 2009]。毛包上皮は表皮と連続しており、その構造は何層もの角化細胞が同心円状に配列する複雑なものである。毛包の構造は、大まかに最外側から外毛根鞘、内毛根鞘、毛幹に分類され、それぞれの層内において特異的なケラチン分子種を発現している [Schneider MR et al., 2009]。また毛包周囲は中胚葉由来の結合組織鞘に囲まれており、これにより真皮との連続性を保っている [Messenger AG et al., 1991] (図 1-1, A)。さらに毛幹は、中心から毛髄質と毛皮質に、内毛根鞘は内側から毛小皮、Huxley 層、Henle 層に細分化される。また、外毛根鞘と結合組織鞘の間には基底膜が存在する (図 1-1, B)

毛包には毛周期が存在し、一生を通じて退行と再生を繰り返す [Schneider MR et al., 2009] (図 1-2)。毛周期は基本的に退行期 (catagen)、休止期 (telogen)、成長期 (anagen) の 3 つステージに分類される [Chase HB, 1954]。成長期毛包は細胞分裂を繰り返すことで毛包の先端が下行し、皮下脂肪織まで到達する。退行期に移行すると毛包の構成細胞がアポトーシスを起こすことで収縮し、毛包の先端は真皮内部の位置まで移動する。その後休止期に移行すると、毛包は細胞分裂能を失い、先端が毛包膨大部の位置で静止する (図 1-1, B)。そして毛根は棍毛 (club hair) という棍棒状の構造となることが知られている [Müller-Röver S et al., 2001]。さらに、近年これらの毛周期と独立して、棍毛繊維が毛包と離解してから実際に毛包から棍毛が抜け落ちるまでを exogen、休止期毛包から棍毛が抜けている状態を kenogen と分類し、毛周期におけるこれらの時期の新たな役割について研究が進められている [Milner Y et al., 2002, Higgins CA et al., 2009, Rebora A and Guarrera M, 2002]。マウスの場合、胎生期から出生後数日間続く毛包発生期を経て、出生後約 17 日目に毛周期が開始する。また、犬や猫では隣接する毛包が異なる毛周期の段階にあり、モザイクパターンを示すのに対し [William Miller et al., 2012]、マウスでは生後 2 回目までの毛周期において全身の被毛が同調することが知られている。さらにマウスは、抜毛後の毛周期が同期

化されることが知られており，週齢ごとの毛包ステージが判明しているため，毛周期の研究に使用される頻度が高い [Müller-Röver S et al., 2001]。

毛包膨大部は立毛筋の付着部位となる外毛根鞘であり，バルジ領域とも呼ばれている (図 1-1, C)。このバルジ領域は毛包の幹細胞ニッチとして知られており，上皮系幹細胞が存在している [Cotsarelis G, 2006]。この上皮系幹細胞は *cytokeratin 15 (K15)* を発現し，毛包上皮や表皮の全層を構成する角化細胞に分化することが知られている [Morris RJ et al., 2004]。また，バルジ領域には，*nestin* を発現している幹細胞集団も存在する [Kanoh M et al., 2008]。*Nestin* は，クラスIV中間フィラメントタンパク質で神経幹細胞のマーカーとして知られる [Suzuki S et al., 2010]。これまでの研究で，マウスの毛包バルジ領域に存在する *nestin* 陽性細胞が多能性幹細胞としての特徴を持ち，*in vitro* で神経細胞，グリア細胞，平滑筋細胞，メラノサイト，角化細胞など複数の細胞系譜に分化したことが報告されている [Liu F et al., 2011, Amoh et al., 2004, 2005, 2007, 2012]。

過去に我々の研究室では，*nestin* プロモーター活性下で *Cre-loxP* 組換えが生じると，*nestin* 陽性細胞およびその娘細胞が恒久的に *enhanced green fluorescent protein (EGFP)* を発現するトランスジェニックマウス (*Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウス) を作出した (図 1-3)。そして同マウスにおいて，成長期毛包を構成する外毛根鞘細胞が抗 *EGFP* 抗体により染色されたことから，これらの細胞が角化細胞であるにも関わらず *nestin* 陽性細胞に由来することを発見した [Onishi S et al., 2019]。このことから，外毛根鞘細胞の前駆細胞において，上皮-神経幹細胞間の可塑性が認められる可能性が示唆された。上皮-神経幹細胞間の可塑性に関しては，腫瘍組織の構成や再生医療において重要な役割を担っていることが知られている。近年ヒトの美容医療などにおいて需要が高まっている、毛髪の再生や育毛分野においてもその機構を解明することで技術の発展が望まれている。神経堤マーカーである *nestin* は、これまでに発生過程の水晶体上皮細胞 [Yang J et al., 2000] やセルトリ細胞の基底部分 [Fröjdman K et al., 1997] での発現が報告されており、上皮-神経幹細胞間の可塑性を探索する上で重要

なマーカーと考えられている。しかしながら、外毛根鞘細胞の発生や分化において、その前駆細胞が *nestin* を発現する時期や、同細胞の役割に関しては未だ不明な点が多い。

そこで本研究では第 1 章において、*Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスを用いて、新生仔マウス毛包の外毛根鞘に EGFP 陽性細胞が存在するか検討したとともに、同マウスの胎生期では毛包発生期のどの時期に毛包上皮に EGFP 陽性細胞が出現するかを解析した。さらに第 2 章では、毛包発生期に認められた EGFP 陽性細胞の詳細な細胞系譜を解析した。第 3 章では、成体マウスにおいて外毛根鞘の前駆細胞となる EGFP 陽性細胞が存在するかを *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスを用いて検討した。

図

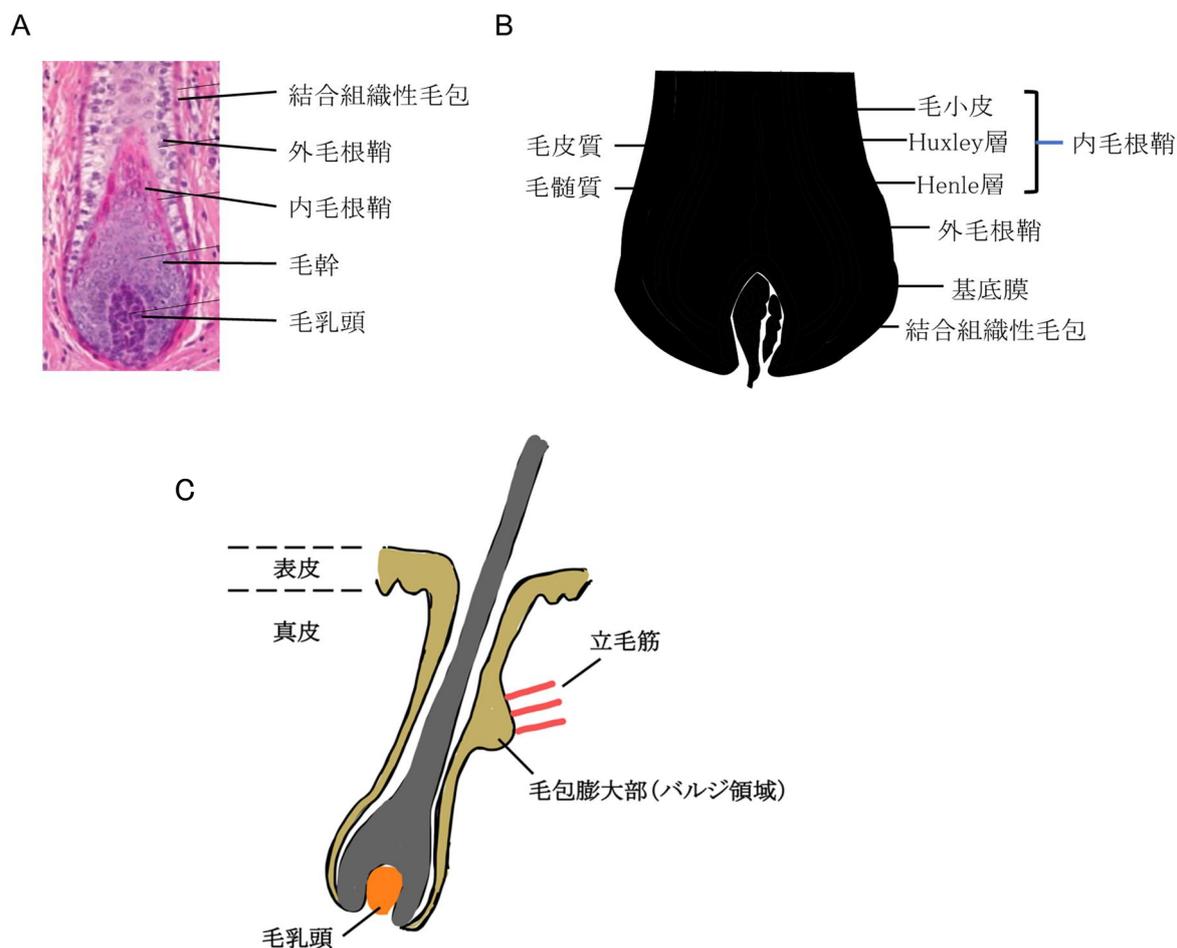


図 1-1 毛包の構造

毛包は大きく、外毛根鞘、内毛根鞘、毛幹に分類される。また、毛包は結合組織鞘に囲まれ、周囲真皮との連続性を保っている。さらに毛包最下層には毛乳頭が存在する (A) [清水宏, 2018, p21 より引用し一部改変]。毛幹は、中心から毛髄質と毛皮質に、内毛根鞘は内側から毛小皮、Huxley 層、Henle 層に細分化される。また、外毛根鞘と結合組織鞘の間には基底膜が存在する (B)。さらに毛包には立毛筋の付着部である毛包膨大部 (バルジ領域) が存在し、幹細胞ニッチとして知られている (C) [Cotsarelis G, 2006]。

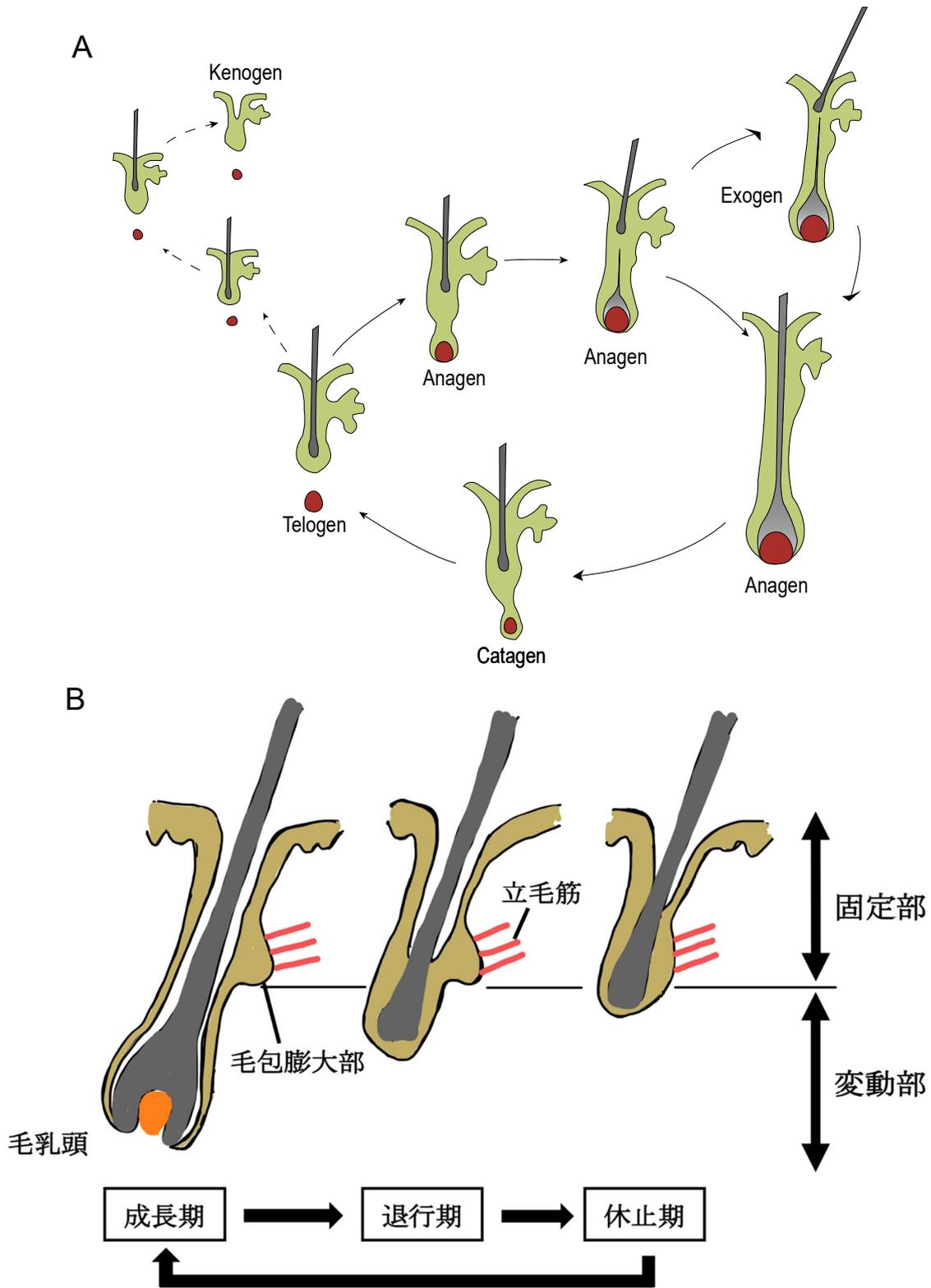


図 1-2 毛周期

毛包には毛周期が存在し、一生を通じて退行と再生を繰り返す。毛周期は基本的に退行期 (catagen)、休止期 (telogen)、成長期 (anagen) に分類される。さらに、これら

の毛周期と独立して，毛幹が毛包と離解してから実際に毛包から毛幹が抜け落ちるまでを **exogen**，休止期毛包から毛幹が抜けている状態を **kenogen** と呼ぶ (A) [Schneider MR et al., 2009]。成長期毛包は細胞分裂を繰り返し下行するが，退行期に移行すると毛包収縮が開始し，細胞分裂は停止する。さらにその後休止期に移行すると，毛包は細胞分裂能を失い毛包膨大部まで上行する (B)。

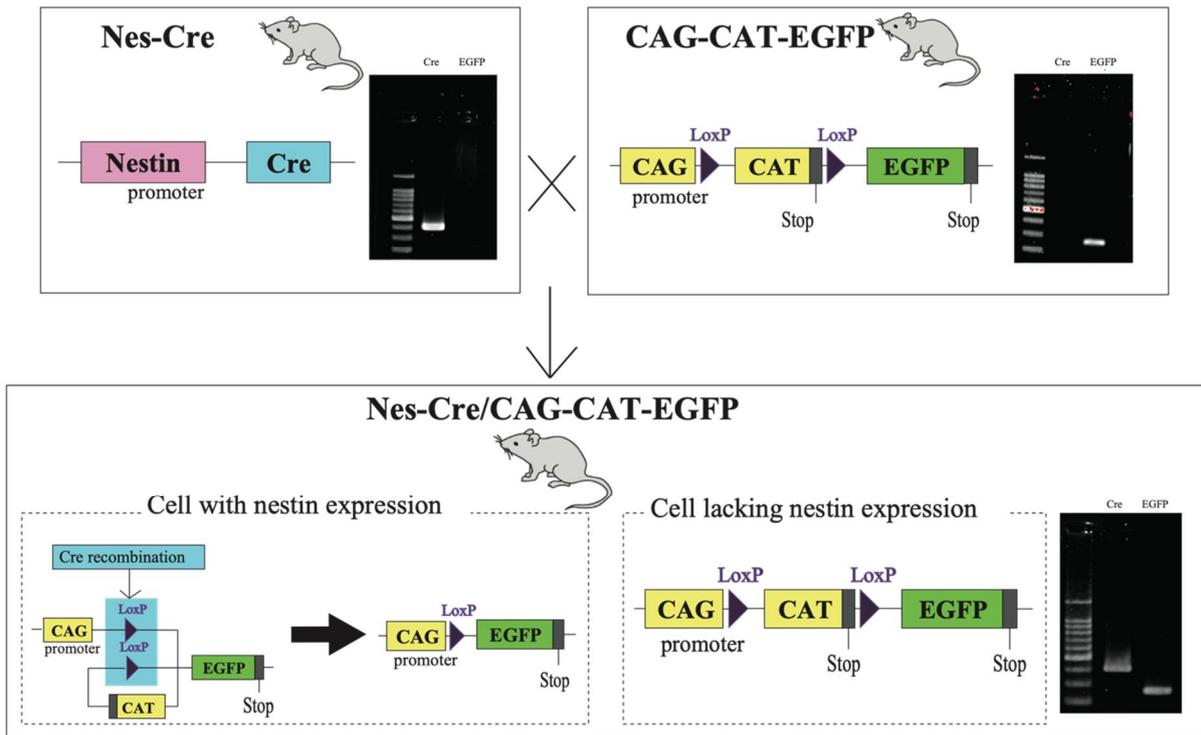


図 1-3 *Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスの作出

Nestin プロモーターの活性下で Cre リコンビナーゼを発現する *Nes-Cre* マウスと、Cytomegarovirus エンハンサー、chicken β -actin プロモーター部分配列および rabbit β -globin スプライス受容部位により構成された CAG プロモーターの下流に、2 つの loxP 配列に挟まれた Chloramphenicol acetyl transferase (CAT) 遺伝子および enhanced green fluorescent protein (EGFP) 遺伝子がタンデムに挿入された *CAG-CAT-EGFP* マウスを交配して、*Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスを作出した。このマウスでは、*nestin* を発現する細胞において同プロモーターが活性化されると、Cre-loxP 部位特異的組換えにより loxP 配列に挟まれた CAT 遺伝子が挿入遺伝子から除去される。その結果、CAG プロモーターの支配下で EGFP が発現するため、*nestin* 陽性細胞とその娘細胞が恒久的に EGFP を発現する。これに対し、*nestin* を発現しない細胞では Cre リコンビナーゼが発現しないため、Cre-loxP 部位特異的組換えがおこらずに EGFP が発現しない。各マウスの模式図の右には、PCR 法で増幅された Cre 遺伝子断片と EGFP 遺伝子断片のアガロースゲル電気泳動所見を示す。

第 1 章

外毛根鞘を構成する nestin 陽性細胞の発現時期の解析

1. 序論

毛包は多数の角化細胞が同心円状に配列した複雑な構造をしており、毛幹を囲むように内毛根鞘、外毛根鞘が存在する [Schneider MR et al., 2009]。毛包最外層の外毛根鞘は表皮と連続しており、その由来は外胚葉である。外胚葉は発生の段階で表皮外胚葉、神経外胚葉に分化することが知られており、毛包は表皮外胚葉由来である [Pispa J and Thesleff I, 2003]。毛包の発生は、胎生期において表皮外胚葉由来の毛包原基となるプラコードと、間葉系由来である真皮との複雑なシグナル伝達が行われることで進行する。まず、E12.5 (Embryonic day 12.5) までに真皮上層部で Wnt (*Wingless + Int*) シグナル活動が行われ、それが表皮に作用して E14.5 頃にプラコードを形成する [Zhang Y et al., 2009]。その後、プラコードからのシグナルで真皮上部の線維芽細胞が局所に集合し、真皮乳頭を形成するようになり、真皮乳頭とプラコードの間で上皮-間葉クロストークが行われる [Chen D et al., 2012]。これによって、毛包の細胞増殖と真皮方向への伸長が促進し、毛芽、後期毛芽、毛杭、毛球性毛杭へと成長する [Millar SE, 2002, Schneider MR et al., 2009] (図 2-1)。

一方で、神経外胚葉は発生の過程で神経管や神経堤に分化することが知られている [Hall BK, 2008, Simões-Costa M and Bronner ME, 2015]。神経胚頭部の神経堤細胞は神経細胞やグリア細胞、軟骨および、骨、結合組織へと、また体幹の神経堤細胞は交感神経細胞、副腎髄質細胞、感覚細胞およびグリア細胞、色素細胞へと分化することが報告されている [Knecht AK and Bronner-Fraser M, 2002]。

Nestin はIV型中間系フィラメントに分類される細胞骨格蛋白で、胚発生の段階では神経堤細胞に一過性に発現することが知られている [Lendahl U et al., 1990]。また nestin は、神経堤細胞の分化に伴い消失することから、神経堤幹細胞または前駆細胞の代表的なマーカーとして知られている [Frederiksen K and McKay RD, 1988, Suzuki S et al., 2010]。一方で、過去の報告では、成体幹細胞や膀胱内皮細胞、視神経細胞の

一部が nestin を発現することが知られている [Treutelaar MK et al., 2003, Yang J et al., 2000]。皮膚においては, nestin 陽性細胞が外毛根鞘のバルジ領域に存在することが報告されている [Li L et al., 2003]。このバルジ領域は立毛筋が付着する毛包膨大部のことを指し, 幹細胞ニッチとして知られている [Ohyama M, 2007]。バルジ領域に分布し, cytokeratin 15 (K15) を発現する上皮系幹細胞は, *in vivo* において毛包の全層および表皮を構成する角化細胞へと分化することが知られている [Morris RJ et al., 2004]。一方で過去の報告において, マウスの毛包バルジ領域に存在する nestin 陽性幹細胞は, *in vitro* において, 神経細胞, グリア細胞, 平滑筋細胞, メラノサイトの他に, 上皮系細胞である角化細胞へと分化することが知られている [Amoh Y et al., 2004, 2005, 2007, 2012]。これらのことから毛包バルジ領域における nestin 陽性細胞は, *in vitro* において多分化能を持つことが示唆されたが, *in vivo* における同細胞の分化運命は不明であった。そこで過去に我々の研究室では, *in vivo* における nestin 陽性細胞の分化能を検討するために, nestin プロモーター活性化で Cre-loxP 組換えが生じると, nestin 陽性細胞およびその娘細胞が恒久的に EGFP を発現するトランスジェニックマウス (*Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウス) を作出し, 同マウス皮膚における EGFP の発現を解析した。その結果, 生後 7 週齢以降に成長期毛包の外毛根鞘を構成する細胞が EGFP を発現したことから, これらの細胞が角化細胞であるにも関わらず nestin 陽性細胞に由来することを発見した [Onishi S et al., 2019]。この事実は, 外毛根鞘細胞の前駆細胞において上皮-神経幹細胞間の可塑性が認められる可能性を示唆するものと考えられるが, EGFP 陽性細胞が外毛根鞘細胞の発生段階におけるどの時期に毛包上皮に出現するのかは不明であった。

そこで本章では, *Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスの毛包上皮に EGFP 陽性細胞が出現する時期について解析した。

2. 材料と方法

1. *Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウス

本研究では、過去に当研究室で作出した *Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスを用いた。本マウスは、以下に示す 2 系統のトランスジェニックマウスを交配して作出した。

Nestin プロモーターの下流に *Cre* リコンビナーゼ遺伝子が挿入された C57Bl/6-*Tg (Nes-Cre) 1Kag* マウス (*Nes-Cre* マウス) は、京都大学ウイルス学研究所 影山龍一郎教授より譲渡された [Isaka *et al.*, 1999]。また Cytomegarovirus エンハンサー、chicken β -actin プロモーター部分配列および rabbit β -globin スプライス受容部位により構成された CAG プロモーターの下流に、2 つの loxP 配列に挟まれた Chloramphenicol acetyl transferase (CAT) 遺伝子および EGFP 遺伝子がタンデムに挿入された B6;D2-*Tg (CAG-CAT-EGFP)39Miya* マウス (*CAG-CAT-EGFP* マウス) は、大阪大学大学院医学系研究科 宮崎純一教授より譲渡された [Kawamoto *et al.*, 2000]。いずれのマウスも、熊本大学生命資源研究支援センターに寄託された保存胚を元に、同センターにおいて個体化されたマウスを入手して本研究に用いた。

挿入遺伝子の確認は、次の方法により行った。*Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウス同士を交配して産まれた胎仔および新生仔マウスの尾先端を切断し、DNA 抽出キット (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を用いてゲノム DNA の抽出を行った。抽出したゲノム DNA を鋳型とし、表 1 に示すプライマーを用いて PCR を行い、*Cre* リコンビナーゼ遺伝子断片ならびに EGFP 遺伝子断片の増幅を確認した。*Cre* リコンビナーゼ遺伝子断片および EGFP 遺伝子断片の両方が増幅された胎仔および新生仔マウスを、*Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスとして後述の実験に用いた。本研究で実施した動物実験および遺伝子組換えマウスを用いた実験については、いずれも本学動物実験小委員会および本学特定生物安全管理小委員会の承認をそれぞれ得た上で実施した (動物実験小委員会承認番号:#25-70, 特定生物安全管理小委員会承認番号:#29-23, #29-76)。

2. 成長期毛包および休止期毛包の採取

Müller-Röverらの既報告 [Müller-Röver et al., 2001] に従い、以下の方法により *Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスにおける毛周期の同期化を試みた。全身の被毛が休止期毛となる生後 7 週齢目の *Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスの背部に、蜜蝋・ロジン酸グリセル・パラフィン混合物 (All Purpose Honey; GiGi, Los Angeles, CA, USA) を塗布したクラフト粘着テープを貼付し、15 分後にクラフト粘着テープを剥がすことにより抜毛を行った。抜毛後 10 日目のマウス背部皮膚を採取し、抜毛部位における全ての被毛が成長期毛であることを組織学的に確認した。また抜毛を施していない生後 7 週目のマウスに対しても、同様の方法により全ての被毛が休止期毛であることを確認した。皮膚サンプルは、10% 中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋し、免疫蛍光染色に供した。

3. 胎生期マウスおよび新生仔マウス皮膚の採材

Müller-Röverらの既報告 [Müller-Röver et al., 2001] に従い、*Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスより胎生期および新生仔皮膚を以下の通り採材した。マウスを交配後、母マウスに臍栓を認めた日の午前中を E0.5 とし、毛芽、毛杭および毛球性毛杭の形成が認められる E15.5, E16.5 および E18.5 の各時期 (図 2-1) に母マウスの子宮から胎生期マウスを摘出し、体幹皮膚を採材した。また、出生後 0 日目 (Postnatal day 0; P0) の新生仔マウスから体幹皮膚を採材した。

4. 免疫蛍光抗体法

Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP マウス皮膚の背部より皮膚を採取し、10% 中性緩衝ホルマリン液に浸漬して組織固定を行った。固定後のマウスの皮膚を常法に基づきパラフィン包埋し、マイクロームを用いて薄切した。薄切した切片に脱パラフィン処理を施した後、pH6.0 に調整した 10 mM クエン酸バッファーに切片を浸漬し、オートクレーブを用いて 95°C 下で 20 分間の抗原賦活化を行った。続いて pH7.4 に調節したリン酸緩衝液 (Phosphate buffered saline: PBS) で切片を洗浄後、ブロッキングバッファー (5% ヤギ血

清, 0.2% Tween20 加 PBS) と室温下で 2 時間反応させてブロッキングを行った。PBS で切片を洗浄後, 上述したブロッキングバッファー中に希釈した一次抗体と 4°C 下で 12 時間反応させた。一次抗体には, マウス抗 EGFP モノクローナル抗体 (#6AT36; Abcam, Cambridge, UK: 200 倍希釈), またはウサギ抗 EGFP ポリクローナル抗体 (Medical & Biological Laboratories. Nagoya, Japan: 200 倍希釈) を用いた。一次反応後の切片を PBS にて洗浄し, 続いて二次抗体と室温下で 30 分間反応させた。二次抗体には Alexa Flour 488 ヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA, USA: 400 倍希釈) または Alexa Flour 488 ヤギ抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (Invitrogen Corp.: 400 倍希釈) を, 核染色蛍光色素として Hoechst 33258 (Invitrogen Corp.: 400 倍希釈) を用いた。二次反応後の切片を PBS で洗浄した後, 蛍光染色用の退色防止剤入り封入剤 (Fluoro-KEEPER Antifade Reagent, Non-Hardening Type; ncalai tesque, Kyoto, Japan) を用いて封入した。染色後の組織切片については, 蛍光顕微鏡 (BX43F; Olympus, Tokyo, Japan) または共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710NLO 2 フォトン; Carl Zeiss, Jena, Germany) を用いて観察した。画像については, イメージングソフトウェア (CellSens Standard; Olympus または ZEN; Carl Zeiss) を用いてコンピューターに取り込んだ後に画像解析を行った。

5. 二重免疫蛍光抗体法

Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP マウス皮膚の背部より採取した皮膚を, 上述の方法により包埋～薄切～前処理を施した後に二重免疫蛍光抗体法を実施した。一次抗体には, マウス抗 EGFP モノクローナル抗体 (#6AT316; Abcam: 200 倍希釈) またはウサギ抗 EGFP ポリクローナル抗体 (Medical & Biological Laboratories. Nagoya, Japan: 200 倍希釈), マウス抗 cytokeratin 14 (K14) モノクローナル抗体 (#LL002; Abcam: 200 倍希釈), ウサギ抗 cytokeratin 5 (K5) モノクローナル抗体 (Abcam: 200 倍希釈), マウス抗 Trichohyalin モノクローナル抗体 (Abcam: 200 倍希釈), ウサギ抗 Laminin モノクローナル抗体 (Abcam: 200 倍希釈) を使用した。二次抗体には Alexa Flour 488 ヤギ抗ウサギ IgG ポリ

クローナル抗体 (Invitrogen Corp.: 400 倍希釈) および Alexa Flour 546 ヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (Invitrogen Corp.: 400 倍希釈) の組み合わせか、または Alexa Flour 488 ヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (Invitrogen Corp.: 400 倍希釈), Alexa Flour 546 ヤギ抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (Invitrogen Corp.: 400 倍希釈) の組み合わせを用いた。核染色蛍光色素には Hoechst 33258 (Invitrogen Corp.: 400 倍希釈) を使用した。

6. 統計解析

全体像が適切に切り出されている毛杭と毛球性毛杭をそれぞれ 6 本選出し、イメージングソフトウェア (ZEN; Carl Zeiss) を用いて毛包上皮細胞および EGFP 陽性細胞をカウントした。その後、毛杭と毛球性毛杭の上皮細胞における EGFP 陽性細胞の頻度を比較した。統計解析には、Graph Pad Prism6 software (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA) を用いて、Student's t-test を行った。 p 値が 0.05 未満の場合、統計的に有意であると判断した。

3. 結果

1. 成体マウスおよび新生仔マウスの外毛根鞘における EGFP 陽性細胞の解析

まず本研究では、生後 7 週齢の *Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスより皮膚を採材し、第 2 休止期毛包における EGFP 陽性細胞の分布を観察した。その結果、休止期毛を取り囲む外毛根鞘および毛包下部の二次毛芽に、抗 EGFP 抗体により染色された細胞が認められた (図 2-2, A)。また休止期毛包では、毛包漏斗部の角質層と脂腺上皮細胞にも一部 EGFP 陽性細胞が認められた。さらに、7 週齢の *Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスの背部被毛を抜毛し、10 日後に観察した成長期毛包では、既報告 [Onishi S et al., 2019] と同様に毛包峽部から毛包下部までの上皮最外層、ならびに毛母の一部に EGFP 陽性細胞が認められた (図 2-2, B)。

続いて本研究では、新生仔マウス毛包の上皮内に EGFP 陽性細胞が認められるかを検討した。その結果、P0 マウスでは成体マウスと同様に、毛包峽部上部～毛包下部の上皮最外層に EGFP 陽性細胞が認められた。さらに、毛球部に分布する毛母細胞の一部および毛乳頭にも、抗 EGFP 抗体により染色される卵円形～紡錘形の細胞が認められた (図 2-2, C, 矢頭)。前述の染色性は、マウス抗 EGFP モノクローナル抗体およびウサギ抗 EGFP ポリクローナル抗体のいずれを用いても同様であった (図 2-2, C, D)。

さらに、外毛根鞘細胞のマーカーである K14 に対して抗 K14 抗体を用いて、抗 EGFP 抗体との二重免疫蛍光抗体法を実施したところ、抜毛後の成長期毛包 (図 2-3, A)、休止期毛包 (図 2-3, B) および新生仔毛包 (図 2-4) に分布する EGFP 陽性細胞の多くが、抗 K14 抗体により染色された。また酸性の K14 とペアで角化細胞の細胞骨格を形成する塩基性の K5 は、K14 と同様に外毛根鞘細胞のマーカーとなるため、抗 K5 抗体および抗 EGFP 抗体を用いた二重免疫蛍光法を実施したところ、EGFP 陽性細胞の多くが抗 K5 抗体により染色された (図 2-4)。一方で、内毛根鞘細胞のマーカーである trichohyalin に対して、抗 trichohyalin 抗体と抗 EGFP 抗体を用いて実施した二重免疫

蛍光法では, *trichohyalin* 陽性細胞の大部分は EGFP 陽性細胞に接して内側に認められ, 二重陽性細胞はほとんど認められなかった (図 2-4)。

以上の結果より, 外毛根鞘細胞の前駆細胞における *nestin* の発現は胎生期にすでに生じている可能性が示唆された。

2. 外毛根鞘における EGFP 陽性細胞の発現時期の検討

続いて, 外毛根鞘細胞の前駆細胞となる EGFP 陽性細胞が, 胎生期の毛包上皮内に出現する時期を検討した。胎生期の毛包形成は, プラコードの形成に始まり, 毛芽, 後期毛芽, 毛杭, 毛球性毛杭と進行することが知られている [Schneider MR et al., 2009] (図 2-1)。本研究では, 抗 EGFP 抗体および表皮基底膜を染色する抗 Laminin 抗体を用いて二重免疫蛍光抗体法を実施した。その結果, *Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスの毛芽および後期毛芽では上皮内に EGFP 陽性細胞が認められなかったのに対し, 同構造を囲む真皮には EGFP 陽性細胞が認められた (図 2-5, A-B)。一方で, 同マウス系統の毛杭では上皮内に EGFP 陽性細胞の小集団が認められた (図 2-5, C-D; 矢頭)。毛杭上皮内の EGFP 陽性細胞は周囲の角化細胞と接着しており, それらの細胞と同様の形態を伴っていた。さらに毛球性毛包では, ほとんどの毛包上皮細胞が EGFP を発現していたとともに毛乳頭にも EGFP 陽性細胞が認められた (図 2-5, E)。毛球性毛杭の上皮細胞層における EGFP 陽性細胞の頻度($95.1 \pm 4.5\%$, $n=6$)は, 毛杭における EGFP 陽性細胞の頻度($8.5 \pm 2.3\%$, $n=6$; Student's t-test, $p < 0.0001$) (図 2-6)と比較し, 有意に高値を示した。

以上の結果より, *Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスでは遅くとも胎生期毛杭には毛包上皮内に EGFP 陽性細胞が出現することが示された。

4. 考察

本章における解析の結果, *Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスでは, 胎生期毛杭より毛包上皮内に EGFP 陽性細胞が出現することが示された。このことから同マウスでは, 遅くとも毛杭の形成期には上皮内に *nestin* 陽性細胞が出現し, 同細胞が外毛根鞘細胞の前駆細胞となる可能性が示唆された。

神経堤細胞は胎生初期に表皮外胚葉と神経板との境界から遊走するが, その発生段階で一過性に *nestin* を発現することが知られている [Frederiksen K and McKay RD, 1988]。本研究で認められた毛杭上皮における EGFP 陽性細胞の出現は, 胎生初期における神経堤細胞の発生機序に類似していると考えられた。これらを証明するためには, 神経堤細胞の発生過程において発現する神経堤幹細胞マーカーが, EGFP 陽性細胞で発現するか検討することが必要であることが示唆された。さらに, 発生過程の水晶体上皮細胞 [Yang J et al., 2000] やセルトリ細胞の基底部分 [Fröjdman K et al., 1997] では, *cytokeratin* とともに *nestin* の発現が認められ, それらの細胞の分化に重要であることが示唆されている。このことから発生過程での毛包上皮における *nestin* の発現も, 毛包の分化に重要である可能性が考えられた。

また, 毛芽および後期毛芽の周囲にある真皮中に, EGFP 陽性となる卵円形～紡錘形の細胞が認められた。毛包の発生過程では, プラコードから周囲真皮へ *Fibroblast growth factor 20 (Fgf20)* などの上皮性シグナルが放出され, 毛包下層真皮の間葉系前駆細胞に供給され, それらは毛乳頭細胞として毛包周囲へ集積する [Huh SH et al., 2013]。また, 上述したように, 毛乳頭細胞 [Toma JG et al., 2001] や血管周皮細胞 [Alliot F et al., 1999] が *nestin* を発現することが報告されている。これらのことから, 本研究で認められた毛芽および後期毛芽周囲の EGFP 陽性細胞は, やがて新生仔毛包でみられた毛乳頭細胞や, 毛包周囲の毛細血管を構成する血管周皮細胞へと分化する可能性が考えられた。さらに, 興味深いことに, 毛芽および後期毛芽で毛包周囲に認められていた EGFP 陽性細胞は, 毛杭周囲には

わずかに認められるのみであった。この現象の詳細な理由は不明であるが、毛芽の周囲に認められた EGFP 陽性細胞は周囲の角化細胞と隣接していたことから、それらが毛包形成の過程で上皮細胞へ分化し、毛杭上皮へ侵入した可能性や、毛杭真皮に移動した可能性が推察された。本研究の結果から、今後、毛包発生期の上皮および真皮における個々の細胞系譜や毛杭の毛乳頭細胞を解析することで、複雑な毛包形成について新たな知見を付随する可能性が示された。

また、本研究で解析した新生仔マウス毛包では、毛球部の毛母細胞の一部が EGFP を発現していた。既報告 [Onishi S et al., 2019] において、*Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスの毛母に認められた EGFP 陽性細胞がメラノサイトである可能性が示唆されている。また、メラノサイトの前駆細胞であるメラノブラストは、神経堤から分離し、毛包バルジ領域でメラノサイト幹細胞となった後で毛球部へ移動することが知られている [Mayer TC, 1973, Slominski A et al., 1994]。これらの既報告より、本研究で新生仔マウス毛包の毛球部に認められた EGFP 陽性細胞は、既報告と同様にメラノサイトであった可能性が考えられた。

さらに *Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスの成体マウスでは、休止期毛包の毛包漏斗部において角質層に EGFP 陽性細胞が認められた。一方で同マウスの成長期毛包や休止期毛包の毛包漏斗部および毛包間表皮では、角化細胞は抗 EGFP 抗体により染色されていない。さらに毛包の存在しない肉球の上皮には、EGFP 陽性細胞が存在しないことが過去に証明されている [Onishi S et al., 2019]。これらのことから、休止期毛包の毛包漏斗部において角質層に認められた EGFP 陽性細胞は、外毛根鞘細胞に由来する角質細胞であった可能性が示唆された。加えて、休止期毛包では脂腺上皮細胞の一部にも EGFP 陽性細胞が認められた。ヒトでは、頭髮の毛包に付属する脂腺上皮細胞の一部に *nestin* の発現が認められることが報告されている [Wang Y et al., 2005]。また、マウスでは K15 陽性上皮系幹細胞が *in vivo* で脂腺上皮細胞へ分化することが証明されているものの [Morris RJ et al., 2004]、それらの上皮系幹細胞が同時に *nestin* を発現するかについてはこれまで明らかにされていない。したがって脂腺上皮細胞の詳細な細胞系譜は不明であるが、本研究の成果からは同細胞の前駆細胞が *nestin* を発現した可能性が示唆された。

また、*Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスの新生仔毛包では外毛根鞘にのみ EGFP 陽性細胞が認められたのに対し、毛球性毛杭では毛包上皮の多くが EGFP 陽性細胞であった。毛包発生期において、外毛根鞘は内毛根鞘や毛幹の形成が進行するにつれ明瞭化される。毛球性毛杭の段階では、内毛根鞘は毛球上部からわずかに表皮方向へ形成されているのみで、毛幹は形成されていない [Paus R et al., 1999]。以上の結果を総合すると、毛球性毛杭を構成する上皮細胞の多くは外毛根鞘細胞へと分化するのに対し、EGFP を発現していない一部の細胞が内毛根鞘や毛幹、毛包間表皮を構成する角化細胞へと分化する可能性が示唆された。

以上の結果より、マウス胎生期の遅くとも毛杭形成期には毛包上皮内に *nestin* 発現細胞が出現し、これらの細胞が外毛根鞘細胞へと分化する可能性が示唆された。しかしながらこれらの細胞が示す詳細な細胞系譜は不明であるため、引き続き検討する必要があると考えられた。

5. 小括

第1章では, *Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスを用いて EGFP 陽性細胞の発現分布を解析することで、毛包上皮における *nestin* 発現細胞が出現する時期を検討した。その結果、胎生期の毛包発生期の毛杭の時期に初めて毛包上皮に EGFP 陽性細胞が認められることを発見した。これらのことから、同マウスでは遅くとも毛杭の形成期には、上皮内に *nestin* 発現細胞が出現する可能性が示唆された。

6. 図表

表1 PCRに用いたプライマー

プライマー名	塩基配列
eGFP forward	GCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
eGFP reverse	GCGGATCTTGAAGTTCACCTTGATGCC
CRE forward	GCATTACCGGTCGATGCAACGAGTGATGAG
CRE reverse	GAGTGAACGAACCTGGTCGAAATCAGTGCG

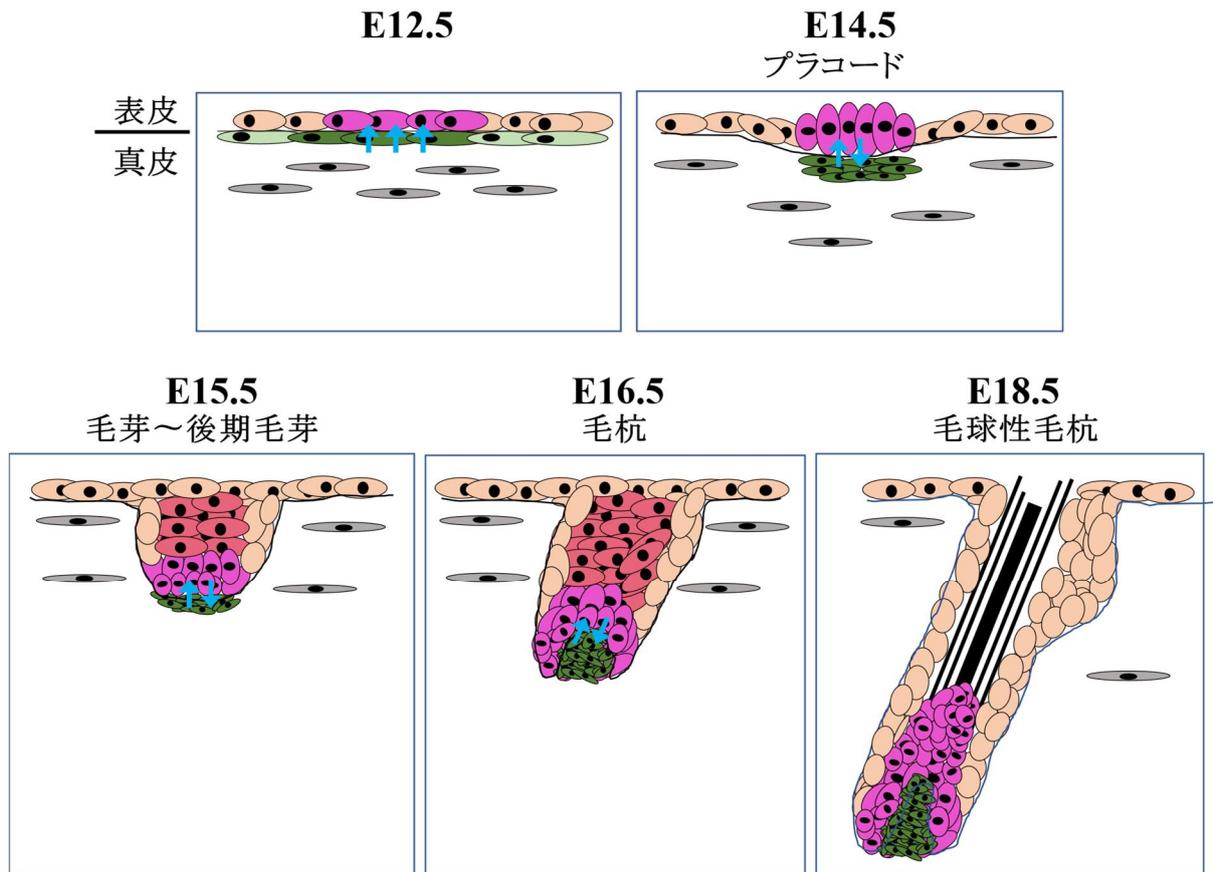
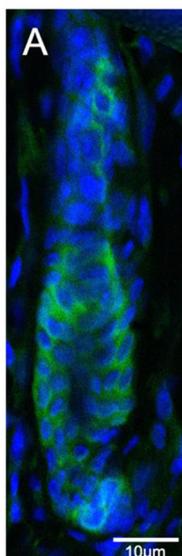


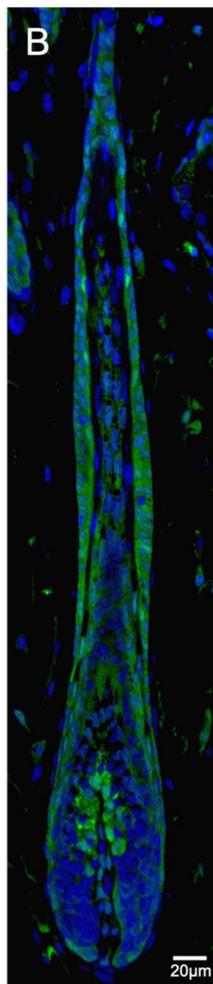
図 2-1 毛包発生期における毛包形態の形成

毛包の発生は、胎生期において表皮外胚葉由来の毛包原基となるプラコードと、間葉系由来である真皮との複雑な相互シグナル伝達が行われることで進行する。まず、E12.5までに真皮上層部で Wnt シグナル活動が行われ、それが表皮に作用して E14.5 頃にプラコードを形成する。その後、プラコードからのシグナルで真皮上部の線維芽細胞が局所に集合し、真皮乳頭を形成するようになり、真皮乳頭とプラコードの間で上皮-間葉クロストークが行われる。これによって、毛包の細胞増殖と真皮方向への伸長が促進し、毛芽、毛杭、毛球性毛杭へと成長する [Schneider MR et al., 2009]。

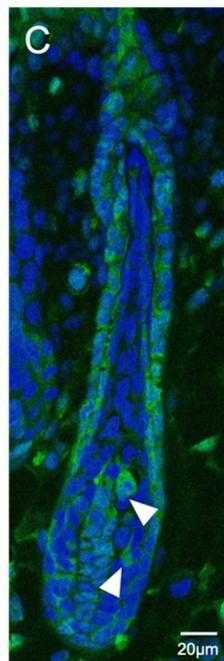
休止期毛包



成長期毛包



新生仔毛包



新生仔毛包

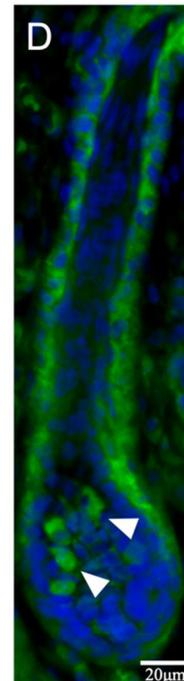


図 2-2 *Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスの成長期毛包, 休止期毛包および新生仔マウス (P0) 毛包における EGFP 陽性細胞の分布

休止期毛包 (A) では毛包上皮および毛包下部の二次毛芽においても抗 EGFP 抗体により明瞭に染色された細胞が認められる。成長期毛包 (B) では, 毛包峽部から毛包下部までの上皮最外層, ならびに毛母の一部に EGFP 陽性細胞が認められる。新生仔マウス毛包 (C, D) でも, 毛包峽部上部~毛包下部の上皮最外層に EGFP 陽性細胞が認められた。さらに, 毛球部に分布する毛母細胞の一部および毛乳頭にも, 抗 EGFP 抗体により染色される卵円形~紡錘形の細胞が認められた (C, D, 矢頭)。(A-C) マウス抗 EGFP モノクローナル抗体, (D) ウサギ抗 EGFP ポリクローナル抗体を使用。

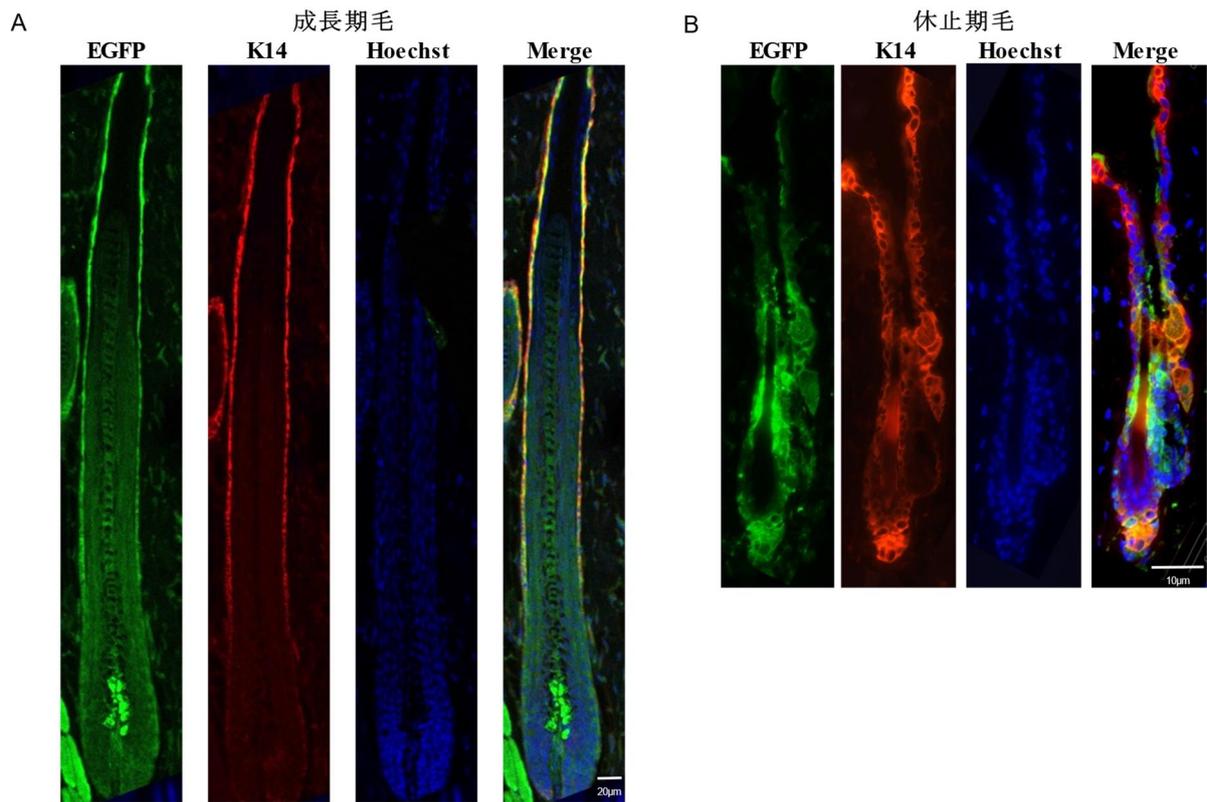


図 2-3 *Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスの成長期毛包および休止期毛包を用いた二重免疫蛍光抗体法所見

成長期毛包 (A), 休止期毛包 (B) について, 抗 EGFP 抗体および抗 K14 抗体を用いた二重免疫蛍光抗体法を実施した。成長期毛包では, 毛包狭部～毛球上部の最外層に配列する EGFP 陽性細胞が, K14 を共発現している。また休止期毛包においても, 毛包上皮および二次毛芽に配列する EGFP 陽性細胞が K14 を共発現している。休止期毛包では, 毛包漏斗部の角質層と脂腺上皮細胞にも一部 EGFP 陽性細胞が認められる。Hoechst: 核染色所見。

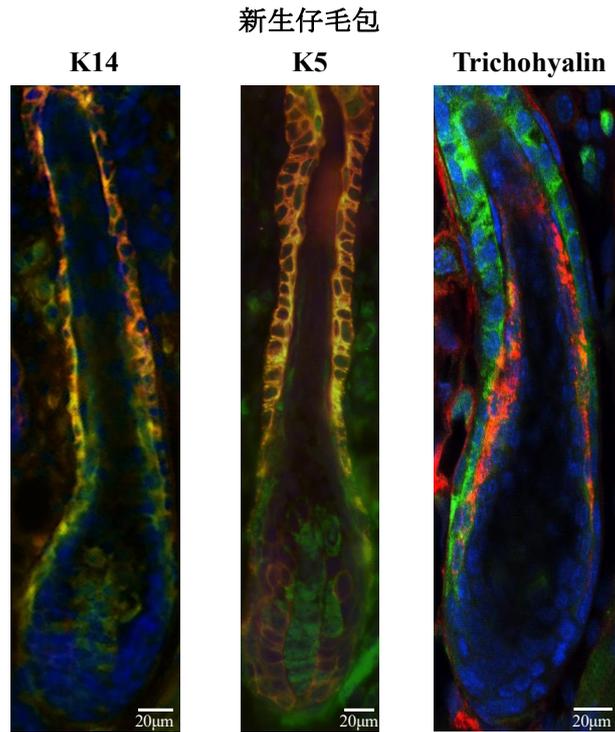


図 2-4 *Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスの新生仔毛包を用いた二重免疫蛍光抗体法所見
 新生仔毛包について, 抗 EGFP 抗体 (緑)および抗 K14 抗体 (赤), 抗 K5 抗体 (赤), 抗
 trichohyalin 抗体 (赤)を用いた二重免疫蛍光抗体法を実施した。毛包狭部～毛球上部の
 最外層に配列する EGFP 陽性細胞が K14 および K5 を共発現している。一方で
 trichohyalin 陽性細胞の大部分は EGFP 陽性細胞に接して内側に認められ, 二重陽性細
 胞はほとんど認められなかった。核染色 (青)。

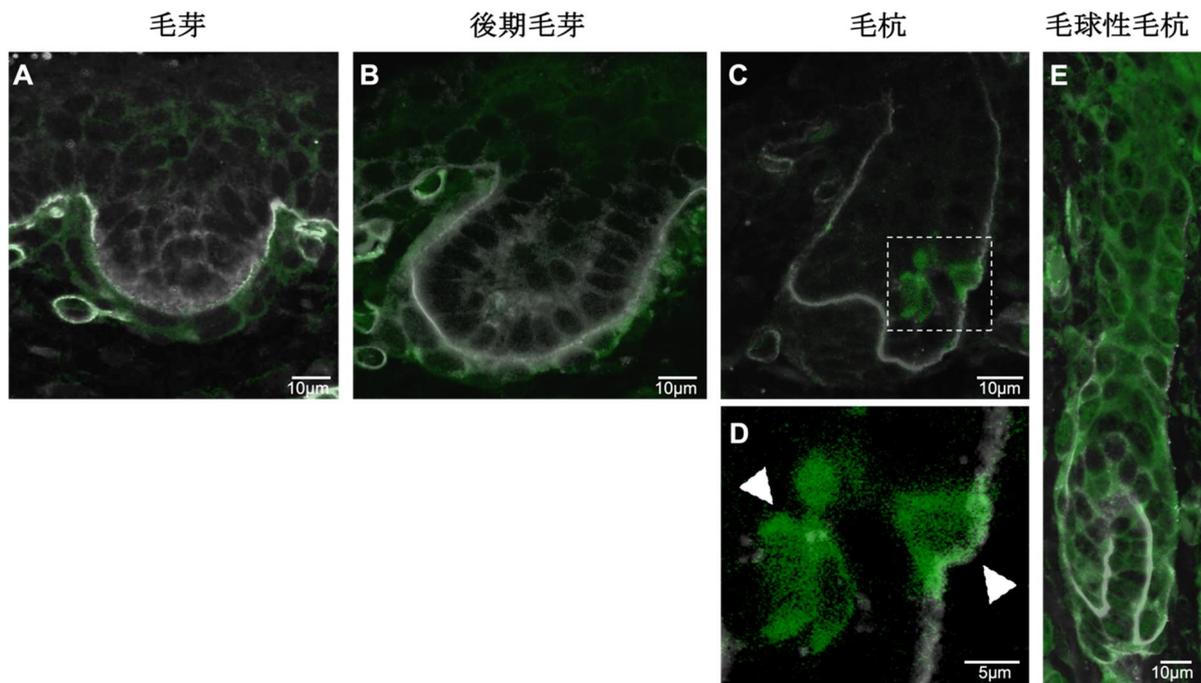


図 2-5 *Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウス胎仔の毛包上皮における EGFP 陽性細胞の分布
 抗 EGFP 抗体 (緑) および抗 laminin 抗体 (白) を用いて二重免疫蛍光抗体法を行った。毛
 芽 (A) および後期毛芽 (B) では上皮内に EGFP 陽性細胞が認められないが、同構造を囲
 む真皮には EGFP 陽性細胞が認められる (A, B)。毛杭では、EGFP 陽性細胞の小集団が
 毛包上皮に認められる (C および D; 矢頭)。毛球性毛杭では、多くの毛包上皮細胞および
 毛乳頭細胞が EGFP を発現している (E)。

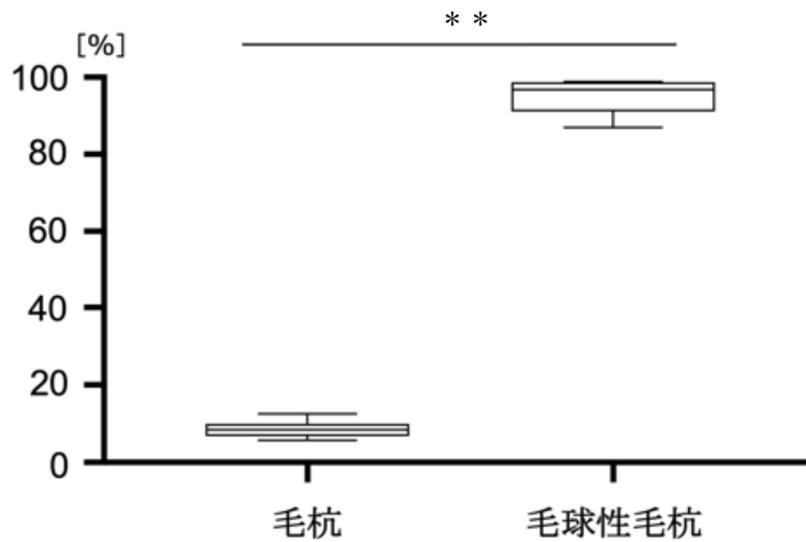


図 2-6 毛杭と毛球性毛の上皮細胞層における EGFP 陽性細胞数の頻度の比較

Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP マウスにおける毛杭上皮の EGFP 陽性細胞数は, 毛球性毛杭上皮の EGFP 陽性細胞数と比較して優位に低値を示す (Student's *t*-test)。**, $P < 0.0001$

第 2 章

毛杭に認められた EGFP 陽性細胞の細胞系譜の解析

1. 序論

第1章では、遅くとも毛杭の時期には毛包上皮に nestin 陽性細胞の出現が認められることを示した。しかしながら、毛杭上皮に認められた EGFP 陽性細胞に関する詳細な細胞系譜は未だ明らかにされていない。

Nestin は神経堤細胞マーカーとして知られているほか、神経系幹細胞マーカーとしても知られている。また、SRY-related-HMG-box (SOX) 2 [Ellis P et al., 2004] や S100 calcium-binding protein A6 (S100A6) [Yamada J and Jinno S, 2014] も神経系幹細胞マーカーとなることが知られている。SOX2 は発生初期の神経管や成体における神経幹細胞で活性化し、神経系の自己再生、増殖、分化などを調節することが報告されている [Mercurio S et al., 2019]。また、表皮に分布するメルケル細胞の前駆細胞も SOX2 を発現することが知られている [Perdigoto CN et al., 2014]。

S100A6 は、EF-ハンド型カルシウム結合タンパク質であり、脳においては細胞の増殖・分化、カルシウムの恒常性維持、神経細胞の変性など、さまざまな役割を果たしていると考えられている [Yamada J and Jinno S, 2014]。また、過去の報告では未熟な星状膠細胞の大部分に S100A6 の発現が認められたが、成熟した星状膠細胞には S100A6 の発現が認められなかったことから、S100A6 が神経幹細胞および前駆細胞に特異的なマーカーであることが示唆されている [Yamada J and Jinno S, 2014]。

また、SOX10 は、神経堤の分化に極めて重要であり、nestin と同様に神経堤細胞のマーカーとなることが報告されているほか [Kelsh RN, 2006, Yang LN et al., 2020]、メラノサイトやメラノブラストでも発現が認められることが知られている [Nonaka D et al., 2008, Aoki Y et al., 2003]。

さらに、nestin は神経堤細胞の分化に伴い消失するものの、SOX10 は未分化な神経堤細胞から、分化した細胞にまで持続的に発現するため、神経堤細胞の分化増殖をモニターできるマーカーとして知られている [Wegner M and Stolt CC, 2005]。

胎生期の毛包上皮には、表皮基底細胞や外毛根鞘細胞と同様に K5 および K14 の発現が認められることが知られている [Moll R et al., 1989]。Vimentin (VIM) は III 型中間径フィラメントタンパクで、代表的な間葉系細胞マーカーであるが、神経系幹細胞にも発現が認められることが知られている [Franke WW et al., 1978, Schnitzer J et al., 1981]。

過去に我々の研究室では、*Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスを用いて、生後 7 週齢以降に成長期毛包の外毛根鞘を構成する細胞が EGFP を発現したことから、これらの細胞が角化細胞であるにも関わらず *nestin* 発現細胞に由来することを発見した [Onishi S et al., 2019]。この事実は、外毛根鞘細胞の前駆細胞において上皮-神経幹細胞間の可塑性が認められる可能性を示唆するものと考えられた。また、第 1 章にて、毛包上皮に初めて EGFP 発現細胞が認められる時期は、胎生期の毛杭の時期であることが示唆された。本章では、この毛杭上皮の EGFP 陽性細胞が出生後の外毛根鞘を形成する前駆細胞であり、この細胞において上皮-神経幹細胞間の可塑性が起こっているのではないかと考え、前述の各種マーカーを発現するかを解析することで、同細胞の詳細な細胞系譜を探索した。

2. 材料と方法

2. 二重免疫蛍光抗体法

Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP マウス胎仔 (E16.5) より採材した皮膚を, 第 1 章で述べた方法により包埋～薄切～前処理を施した後に, 下記に示す二重免疫蛍光抗体法を実施した。

一次抗体には, マウス抗 EGFP モノクローナル抗体 (#6AT316; Abcam: 200 倍希釈), ウサギ抗 Cytokeratin 5 (K5) モノクローナル抗体 (Abcam: 200 倍希釈), ウサギ抗 Cytokeratin 14 (K14) モノクローナル抗体 (#EP1612Y; Abcam: 200 倍希釈), ウサギ抗 VIM モノクローナル抗体 (#EPR3776; Abcam: 200 倍希釈), ウサギ抗 SOX2 モノクローナル抗体 (# SP76; Abcam: 50 倍希釈), ウサギ抗 SOX10 モノクローナル抗体 (# EPR4007-104; Abcam: 50 倍希釈), ウサギ抗 S100A6 モノクローナル抗体 (# EPR13084-69; Abcam: 200 倍希釈) を使用した。二次抗体には Alexa Flour 488 ヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (Invitrogen Corp.: 400 倍希釈) および Alexa Flour 546 ヤギ抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (Invitrogen Corp.: 400 倍希釈) の組み合わせを用いた。核染色蛍光色素には Hoechst 33258 (Invitrogen Corp.: 400 倍希釈) を使用した。二次反応後の切片を pH7.4 に調節した PBS で洗浄した後, 蛍光染色用の退色防止剤入り封入剤 (Fluoro-KEEPER Antifade Reagent, Non-Hardening Type; nacalai tesque, Kyoto, Japan) を用いて封入した。

染色後の組織切片については, 共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710NLO 2 フォトン; Carl Zeiss, Jena, Germany) を用いて観察した。画像については, イメージングソフトウェア (ZEN; Carl Zeiss) を用いてコンピューターに取り込んだ後に画像解析を行った。

3. 結果

1. 胎生期マウスの毛杭に認められた EGFP 陽性細胞の細胞学的特徴の解析

まず *Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスの毛杭に存在する EGFP 陽性細胞が、上皮系細胞マーカーを発現するのか、または間葉系細胞マーカーを発現するのかを解析した。抗 EGFP 抗体および抗 K5 抗体を用いた二重免疫蛍光染色の結果、毛杭上皮の EGFP 陽性細胞は K5 陽性であった (図 3-1, A-D)。一方で毛杭上皮細胞に対する抗 K14 抗体の染色性は軽微であったため、EGFP と K14 とを共発現する二重陽性細胞は毛杭上皮には認められなかった (図 3-1, E)。抗 EGFP 抗体および抗 VIM 抗体を用いた二重免疫蛍光抗体法は、毛乳頭に VIM 陽性の紡錘形細胞集団が認められたが、毛杭上皮には EGFP と VIM とを共発現する二重陽性細胞は認められなかった (図 3-1, F-I)。また、真皮には EGFP 陽性だが、K5 ならびに VIM は陰性である紡錘形細胞集団が認められた (図 3-1, D, I, 矢頭)。

さらに、*Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスの毛杭に存在する EGFP 陽性細胞が、神経幹細胞マーカーである SOX2, S100A6 ならびに神経堤幹細胞マーカーである SOX10 を共発現しているかについて検討した。その結果、抗 EGFP 抗体と抗 SOX2 抗体を用いた二重免疫蛍光抗体法では、毛杭上皮に EGFP 陽性細胞と SOX2 を共発現する二重陽性細胞は認められなかった。しかし、毛包周囲の紡錘形細胞に EGFP 陽性 SOX2 陽性細胞を認めたほか、毛乳頭では SOX2 が顆粒状に染色された (図 3-2, A-D)。さらに抗 EGFP 抗体と抗 SOX10 抗体を用いた二重免疫蛍光抗体法では、毛杭上皮において SOX10 の発現が認められなかった (図 3-2, E-H) が、成長期毛包の毛球部には SOX10 陽性細胞が認められた (図 3-2, I)。また同様に抗 EGFP 抗体と抗 S100A6 抗体を用いた二重免疫蛍光抗体法では、毛杭上皮に EGFP と S100A6 を共発現する二重陽性細胞は認められなかったが、毛乳頭には S100A6 を発現する細胞集団が認められた (図 3-2, J-M)。

4. 考察

本章では、第 1 章で認められた胎生期マウスの毛杭の EGFP 陽性細胞の詳細な細胞学的特徴について解析した。その結果、毛杭の EGFP 陽性細胞では上皮系細胞マーカである K5 の発現が認められたが、間葉系細胞マーカである VIM の発現は認められなかった。また前述の EGFP 陽性細胞では、神経系幹細胞マーカである SOX2 や S100A6, ならびに神経堤幹細胞マーカである SOX10 のいずれも発現は認められなかった。以上の結果より、毛杭に認められた EGFP 陽性細胞は上皮系細胞の特徴を有しており、神経系細胞、神経幹細胞または間葉系細胞には分化転換していないことが示唆された。

本研究で標識を試みた SOX10 は神経堤の形成に極めて重要であり、nestin と同様に神経堤幹細胞のマーカとなることが報告されている [Kelsh RN, 2006, Yang LN et al., 2020]。また過去の報告において、マウスの外毛根鞘細胞の前駆細胞が、神経堤細胞マーカである Wnt1 や plasminogen activator を発現していないことが証明されている [Wong CE et al., 2006]。本研究結果において毛杭上皮の EGFP 陽性細胞に SOX10 の発現が認められなかったことを合わせて考えると、外毛根鞘細胞の前駆細胞は発生の経過で神経堤細胞には分化していないことが示された。また毛杭上皮に認められた EGFP 陽性細胞は、メラノサイトやメラノブラストとも異なる細胞であることが示唆された。

過去の報告では、毛芽上皮に S100A6 陽性細胞は認められなかったが、直下の毛乳頭細胞では S100A6 陽性細胞が認められたことが示されている [Ito M and Kizawa K, 2001]。一方で成体マウスの毛包バルジ領域には、S100A6 陽性細胞が認められることが知られている [Ito M and Kizawa K, 2001]。本研究の結果を総合して考察すると、毛包上皮における S100A6 陽性細胞の出現は毛杭よりも後に認められる現象であることが示唆されたが、その正確な出現時期についてはさらなる解析が必要であると考えられた。いずれにしても成体マウスの毛包バルジ領域に認められる S100A6 陽性細胞は、本研究で解析した外毛根鞘細胞の前駆細胞とは異なる細胞系譜を示すことが示

唆された。

過去の報告では、マウス毛乳頭細胞において SOX2 の発現が認められることが示されている [Driskell RR et al., 2009]。本研究においても、毛乳頭細胞が SOX2 陽性となったが、その染色パターンは複数の毛包で顆粒状を呈した。このことから毛杭の段階では毛乳頭細胞の細胞内顆粒内に SOX2 の発現が認められる事が示唆されたが、今後は電子顕微鏡解析などを用いて胎生期の毛乳頭細胞における SOX2 の発現パターンを解析する必要があると考えられた。

また本研究では、毛杭周囲の真皮に EGFP 陽性であるが、K5 および VIM のいずれも陰性である紡錘形の細胞集団が認められた。またこれらの細胞集団の少なくとも一部は、SOX2 陽性であった。過去の報告では、真皮に多分化能を持つ幹細胞 (Skin-derived precursors: SKPs) が存在することが知られており、それらは nestin 陽性、VIM 陰性、cytokeratin 陰性であることが報告されている [Toma JG et al., 2001]。それらの細胞は真皮に由来し、新生児や成体マウスでも存在することが確認されている。また、*in vitro* で神経細胞、グリア細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞に分化することが証明されている [Toma JG et al., 2001]。また SKPs は SOX2 を発現することも証明されていることを考えると [Fernandes KJ et al., 2004]、本研究結果で真皮に認められた EGFP および SOX2 二重陽性細胞は SKPs であった可能性が考えられた。

過去の報告において、表皮内に分布するメルケル細胞が上皮系細胞と神経系細胞の両方の特徴を併せ持つことが証明されている [Perdigoto CN et al., 2014]。メルケル細胞は、胚発生時には上皮系幹細胞に由来するが [Van Keymeulen A, et al., 2009]、神経発生の初期段階で機能する atonal bHLH transcription factor 1 (Atoh 1) が同細胞の前駆細胞内で発現することが知られている [Perdigoto CN et al., 2014]。また、メルケル細胞は Atoh1 と Cytokeratin 8 (K8) を共発現するが、この二重陽性細胞は E15~16 のマウス表皮基底層に出現することが知られている。さらに、多くの Atoh1 陽性細胞が SOX2 を共発現しており、SOX2 と Atoh1 の相互作用がメルケル細胞の成熟に必要とされている [Perdigoto CN et al., 2014]。本研究で解析した毛杭上皮内の EGFP 陽性細胞は SOX2 を発現していなかったことから、これらの

細胞はメルケル細胞の前駆細胞とは異なることが示唆された。また本研究では表皮内において SOX2 を発現する細胞は認められなかったが、メルケル細胞はマウス背部において触毛周囲にごくわずかに存在する [Moll I et al., 1996] ため、検出が困難であった可能性も考えられた。

毛包発生初期の角化細胞では、神経成長因子である neurotrophin-3 (NT-3) の受容体である tyrosine kinase C (TrkC) の mRNA が高発現しており、毛包の形態形成に関与していることが報告されている [Botchkarev VA et al., 1998]。このことから、毛杭上皮細胞では NT-3 の刺激によって nestin が発現した可能性が示唆されたが、nestin の発現機序については更なる解析が必要であると考えられた。

5. 小括

本章では、第 1 章で認められた胎生期マウス毛杭の EGFP 陽性細胞の詳細な細胞系譜について解析するために、上皮系細胞マーカー、間葉系細胞マーカー、神経系幹細胞マーカーならびに神経堤細胞マーカーを用いて二重免疫蛍光染色を行った。その結果、毛杭に認められた EGFP 陽性細胞では上皮系細胞マーカーである K5 に対する染色性が認められたが、間葉系細胞マーカーや神経系幹細胞マーカー、神経堤細胞マーカーに対する染色性は認められなかった。これらの結果より、毛杭に認められた EGFP 陽性細胞は上皮系前駆細胞の特徴をもつものの、他の細胞系譜には分化転換しないことが示唆された。

6. 図

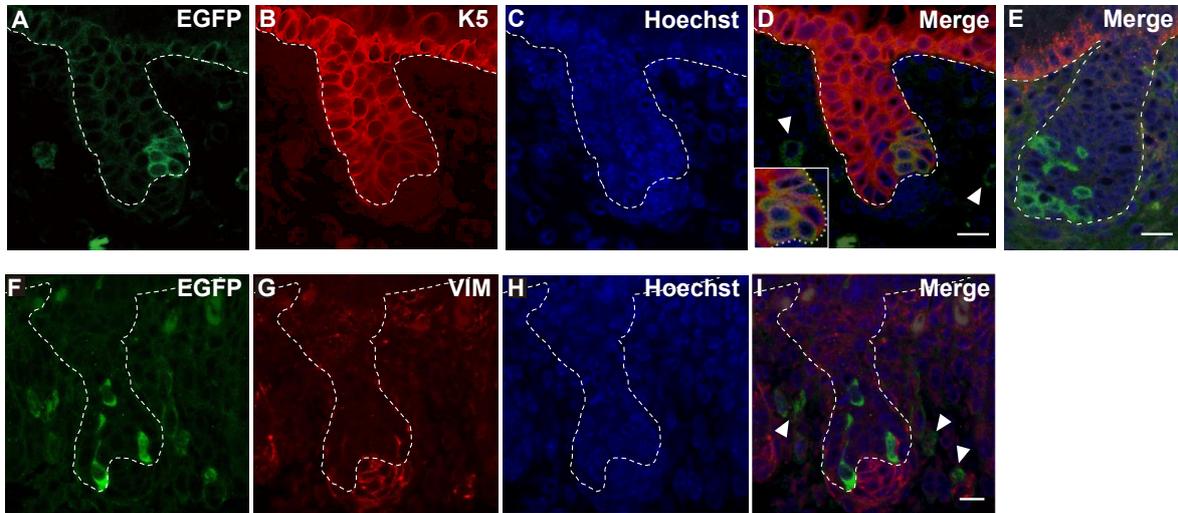


図 3-1 *Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスの毛杭上皮における EGFP 陽性細胞の上皮系および間葉系マーカー発現解析

E16.5 の *Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスから皮膚を採取し、抗 EGFP 抗体 (A, E の緑, F) と抗 K5 抗体 (B), 抗 K14 抗体 (E の赤) もしくは抗 VIM 抗体 (G) を用いて二重免疫蛍光抗体法を行った。核は Hoechst 33258 で共染色した (C, E の青, H)。毛杭の EGFP 陽性細胞は K5 を共発現している (D) が, VIM は共発現していない (I)。また, 真皮には EGFP 陽性の紡錘形細胞集団が認められる (A, F) が, これらの細胞は K5 や VIM を共発現していない (D, I, 矢頭)。K14 陽性細胞は表皮基底層に認められるが, 毛杭上皮には認められない (E)。白点線は基底膜。Bar=10 μ m

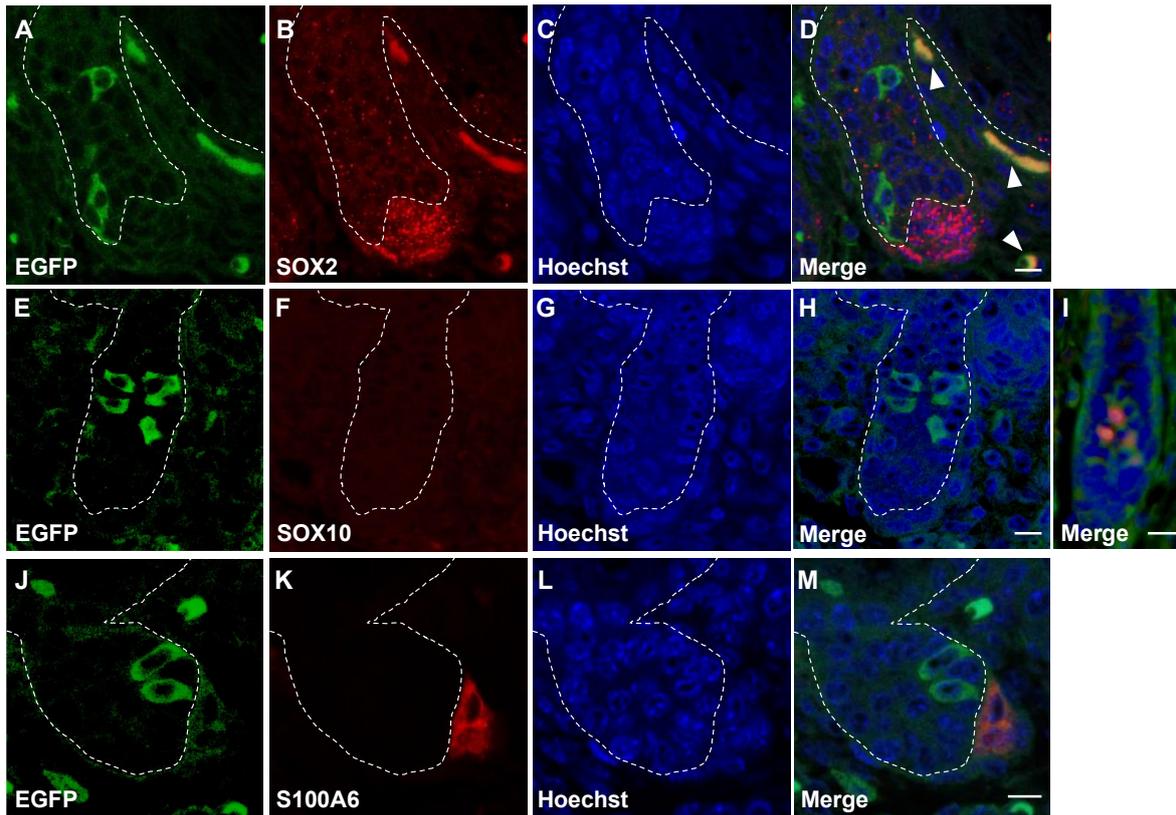


図 3-2 *Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスの毛杭上皮における EGFP 陽性細胞の神経系幹細胞マーカー発現解析

抗 EGFP 抗体 (A, E および J) と抗 SOX2 抗体 (B), 抗 SOX10 抗体 (F) もしくは抗 S100A6 抗体 (K) を用いて二重免疫蛍光抗体法を行った。核は Hoechst 33258 で共染色した (C, G, L)。毛杭上皮に分布する EGFP 陽性細胞は SOX2, SOX10, S100A6 を共発現していない。一方で毛包周囲の紡錘形細胞には EGFP と SOX2 とを共発現する細胞が認められる (D, 矢頭)。毛乳頭では SOX2 が顆粒状に染色されている (B)。成長期毛包の毛母には SOX10 陽性細胞が認められる (I)。さらに、毛乳頭には S100A6 を発現する細胞集団が認められる (K)。白点線は基底膜。Bar=10 μ m(D, H, M), 20 μ m(I)

第3章

成体マウスの外毛根鞘における nestin 発現細胞の解析

1. 序論

毛包の毛包膨大部は、バルジ領域と呼ばれ、幹細胞ニッチとして知られている [Ohyama M, 2007]。過去の報告において、バルジ領域に存在する K15 陽性 CD34 陽性細胞が上皮系成体幹細胞としての特性を有し、外毛根鞘細胞を含む毛包全層および表皮の角化細胞へと分化することが示されている [Morris RJ et al., 2004]。別の報告では、マウス触毛の立毛筋付着部位には nestin 陽性 CD34 陽性幹細胞が分布すること [Li L et al., 2003]、バルジ領域下部に nestin 陽性 K15 陽性細胞が分布することが示されている [Amoh Y et al., 2012]。また、nestin-driven green fluorescent protein (ND-GFP) トランスジェニックマウスを用いた研究では、バルジ領域に分布する GFP 陽性細胞を *in vitro* において各種刺激条件で培養すると、角化細胞を含む様々な系統の細胞へと分化することから、同細胞が多能性幹細胞の特徴を有する可能性が示唆されている [Amoh Y et al., 2009]。さらに、ND-GFP マウスの GFP 陽性細胞は、ヌードマウスに皮下移植すると神経細胞へ分化することが報告されている [Sieber-Blum M et al., 2006]。しかしながら成体マウスにおいて、*in vivo* での nestin 陽性細胞の幹細胞性および細胞系譜は未だ不明である。

本論文の第 1 章および第 2 章では、胎生期の毛杭以前の毛包上皮に nestin 発現細胞が出現し、やがて外毛根鞘細胞へと分化する可能性を示した。本章では、成体マウスの毛包上皮にも外毛根鞘細胞へと分化する nestin 陽性幹細胞/前駆細胞が存在するか解析した。

2. 材料と方法

1. *Nes-CreERT2/CAG-CAG-EGFP*トランスジェニックマウス

C57Bl/6-*Tg(Nes-CreERT2)*マウス (*Nes-CreERT2* マウス) は, 京都大学大学院生命科学科 今吉格教授ならびに影山龍一郎教授より譲渡された [Imayoshi I et al., 2006]。このマウスでは *nestin* プロモーターの活性下で, 変異型エストロゲン受容体 2 (estrogen receptor T2: ERT2) と融合した Cre リコンビナーゼ (CreERT2) が細胞質内に発現する。この CreERT2 はタモキシフェンの代謝産物である 4-hydroxy-tamoxifen (OHT) 依存性に活性化し, CreERT2 と OHT の結合タンパクは核内へと移行する [Feil R et al., 1997]。また, CreERT2 ではエストロゲン受容体部分に点突然変異を複数導入したことにより, 雌マウスでも OHT の存在下でのみ CreERT2 が活性化する [Indra AK et al., 1999]。同マウスは, 理化学研究所バイオリソース研究センターに寄託された保存胚を元に, 同センターにおいて個体化されたマウスを入手して本研究に用いた。

Nes-CreERT2 マウスと *CAG-CAT-EGFP* マウスとを交配して, *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスを作出した。このマウスでは, OHT 投与後に CreERT2 と OHT の結合タンパクが核内へ移動することで, Cre-loxP 組換えが生じ, *nestin* を発現している細胞およびその娘細胞において EGFP が発現する (図 4-1)。このマウスの挿入遺伝子の確認は, 次の方法により行った。*Nes-CreERT2* マウスおよび *CAG-CAT-EGFP* マウス同士を交配して産まれた新生仔マウスの尾先端を切断し, DNA 抽出キット (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を用いてゲノム DNA の抽出を行った。抽出したゲノム DNA を鋳型とし, 第 1 章の表 1 に示すプライマーを用いて PCR を行い, Cre リコンビナーゼ遺伝子断片ならびに EGFP 遺伝子断片の増幅を試みた。Cre リコンビナーゼ遺伝子断片および EGFP 遺伝子断片の両方が増幅された新生仔マウスを, *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスとして後述の実験に用いた。本研究で実施した動物実験および遺伝子組換えマウスを用いた実験については, いずれも本学動物実験小委員

会および本学特定生物安全管理小委員会の承認をそれぞれ得た上で実施した(動物実験小委員会承認番号:#25-70, 特定生物安全管理小委員会承認番号:#29-23, #29-76)。

2. *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスへの OHT の投与および皮膚組織の採取

Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP マウスに Cre-loxP 組換えを生じさせるために、既報 [Matsuda T and Cepko CL, 2007] を参考に、以下の方法により *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスに OHT を投与した。

まず OHT (10 mg; Cayman Chemical; Ann Arbor, MI, USA) を 99.5%エタノールに溶解し、100 mg/ml の OHT 溶解液を作成した。その後、溶解液をコーンオイル (Merck, Darmstadt, Germany) で希釈することにより、10 mg/ml の OHT 投与液を調製した。

次に第一成長期毛包が体表全域に出現する 4 週齢の *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスに、上記の OHT 投与液を 0.1 ml/head (1 mg/head) の用量で、5 日間連続して腹腔内投与した後、第 6 日目に背部から皮膚サンプルを採取した (図 4-2)。また、第二休止期毛包が体表全域に出現する 7 週齢の *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスに、OHT 投与液を同様のスケジュールで投与した後、第 6 日目に成長期毛を促すために背部に蜜蝋・ロジン酸グリセル・パラフィン混合物 (All Purpose Honey; GiGi, Los Angeles, CA, USA) を塗布したクラフト粘着テープを貼付し、15 分後にクラフト粘着テープを剥がすことにより抜毛を行った。抜毛後 7 日目には、背部から皮膚サンプルを採取した (図 4-2)。対照群では、上述と同時期に、コーンオイルのみを 0.1 ml/head の用量で、5 日間連続で腹腔内投与した。皮膚サンプルは、10% 中性緩衝ホルマリンで固定した後、パラフィン包埋し、免疫蛍光染色に供した。

3. 二重免疫蛍光抗体法

Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP マウスの背部より採取した皮膚を、第 1 章で述べた方法により包埋し薄切、前処理を施した後に二重免疫蛍光抗体法を実施した。一次抗体

には、ウサギ抗 EGFP ポリクローナル抗体 (Medical & Biological Laboratories, Nagaya, Japan : 200 倍希釈), マウス抗 K14 モノクローナル抗体 (# LL002; Abcam: 200 倍希釈), マウス抗 K15 モノクローナル抗体 (# LHK15; Abcam: 200 倍希釈) を使用した。二次抗体には Alexa Flour 488 ヤギ抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (Invitrogen Corp.: 400 倍希釈), Alexa Flour 546 ヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体(Invitrogen Corp.: 400 倍希釈)の組み合わせを用いた。核染色蛍光色素には Hoechst 33258 (Invitrogen Corp.: 400 倍希釈) を使用した。二次反応後の切片を PBS で洗浄した後, 蛍光染色用の退色防止剤入り封入剤 (Fluoro-KEEPER Antifade Reagent, Non-Hardening Type; ncalai tesque, Kyoto, Japan) を用いて封入した。染色後の組織切片については, 共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710NLO 2 フォトン; Carl Zeiss, Jena, Germany および Nikon AX; Nikon, Tokyo, Japan) を用いて観察した。画像については, イメージングソフトウェア (ZEN; Carl Zeiss および Nikon AX R; Nikon) を用いてコンピューターに取り込んだ後に画像解析を行った。

4. 統計解析

OHT 投与 *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスにおいて, 全体像が適切に切り出されている第一成長期毛包および抜毛誘発性成長期毛包をそれぞれ 6 本選出し, イメージングソフトウェア (ZEN; Carl Zeiss) を用いて K14 陽性細胞および EGFP 陽性細胞をカウントした。その後, 第一成長期毛包および抜毛誘発性成長期毛包の K14 陽性細胞における EGFP 陽性 K14 陽性細胞の頻度を比較した。統計解析には, Graph Pad Prism6 software (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA) を用いて, Student's t-test を行った。 p 値が 0.05 未満の場合, 統計的に有意であると判断した。

3. 結果

1. 成体マウスの外毛根鞘における EGFP 陽性細胞の解析

OHT を投与した 5 週齢および 7 週齢の *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスを用いて、外毛根鞘角化細胞に分化する *nestin* 陽性幹細胞/前駆細胞が成体マウスの毛包にも存在するか検討した。その結果、第一成長期毛の毛包峽部に分布する K14 陽性細胞の一部が EGFP 陽性となった (図 4-3, A-E)。一方で抗 EGFP 抗体と抗 K15 抗体を用いた二重免疫蛍光抗体法では、毛包峽部において EGFP 陽性細胞は K15 陽性細胞と隣接していたが、EGFP 陽性細胞自体は K15 を発現していなかった (図 4-3, F-I)。また、7 週齢の *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスに OHT を投与した後、背部被毛を抜毛して成長期を誘導したところ、成長期毛包では K14 陽性細胞の大部分が EGFP 陽性となった (図 4-3, J-M)。一方で、毛包間表皮には EGFP を発現する角化細胞は認められなかった (図 4-3, R)。さらに、抗 EGFP 抗体と抗 K15 抗体を用いた二重免疫蛍光抗体法では、第一成長期毛包と同様に毛包峽部の EGFP 陽性細胞が K15 陽性細胞と隣接していたが、EGFP 陽性細胞自体は K15 を発現していなかった (図 4-3, N-Q)。また、OHT の代わりにコーンオイルのみを投与した対照群では、5 週齢および 7 週齢のいずれのマウスでも、外毛根鞘における EGFP 陽性細胞の出現を認めなかった (図 4-3, S)。

さらに、抜毛により誘発された成長期毛包の K14 陽性細胞における、EGFP 陽性 K14 陽性細胞の頻度は $92.1\% \pm 4.6\%$ ($n = 6$) であり、第一成長期毛で観察された同値 ($6.5\% \pm 1.8\%$, $n = 6$) より有意に高値であった (Student's *t*-test, $p < 0.0001$; 図 4-4)。

4. 考察

本章では *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスを用いて、成体マウスの毛包にも *nestin* を発現する外毛根鞘細胞の前駆細胞が存在するかを検討した。本研究の結果より、第一成長期毛包では、毛包峽部に分布する外毛根鞘細胞の一部が EGFP 陽性細胞であった。さらに、7 週齢の *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスに OHT を投与した後に背部被毛を抜毛したところ、成長期毛の外毛根鞘細胞の大部分が EGFP 陽性細胞であったのに対し、毛包間上皮の角化細胞には EGFP の発現は認められなかった。以上の結果より、第一成長期毛包の毛包峽部に認められた EGFP 陽性細胞は、外毛根鞘細胞への分化能を有する前駆細胞である可能性が示唆された。

過去の報告では、ヒト頭皮の成長期毛包に *nestin* 陽性 K15 陰性細胞が存在することが報告されている [Amoh Y et al., 2009]。さらに、同研究において ND-GFP トランスジェニックマウスでは、皮脂腺直下にある EGFP 陽性細胞は幹細胞マーカーである CD34 を発現しているものの、K15 は発現していないことが示されている [Amoh Y et al., 2009]。これらの結果は、OHT 投与 *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスの第一成長期毛の毛包峽部に認められた EGFP 陽性細胞が K15 陽性細胞とは異なる細胞集団であったことを支持するものと考えられた。一方で、ND-GFP トランスジェニックマウスの触毛では、成長期毛外根鞘の毛包峽部の下部に EGFP 陽性 K15 陽性の細胞集団が認められたことが過去に報告されている [Amoh Y et al., 2012]。本研究の結果が当該報告と矛盾する理由については、*Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスでは 4 週齢よりも前に成長期毛包に K15 陽性 *nestin* 陽性細胞が認められた可能性が考慮された。

過去の研究において、毛包バルジ領域に存在する K15 陽性細胞が上皮系多能性幹細胞としての特性を有し、*in vivo* で外毛根鞘細胞を含む角化細胞へと分化することが証明されている [Morris RJ et al., 2004]。この過去の報告と本研究で得られた知見とを総合すると、成体マウス毛包で認められた *nestin* 陽性細胞には、K15 陽性多能性幹細胞に由来する細胞

が存在し、さらに nestin 陽性細胞はやがて外毛根鞘細胞へと分化する単能性前駆細胞である可能性が考えられた。一方、毛包に分布する nestin 陽性細胞は *in vitro* では多分化能を示すことが過去に示されており [Amoh Y et al., 2012], 同細胞をヌードマウスに皮下移植すると神経細胞へ分化することが報告されている [Sieber-Blum M et al., 2006]。Morris らの報告と我々の研究結果から、毛包に分布する nestin 陽性細胞は単能性前駆細胞である可能性を示したが、上記の報告で多分化能を示す結果が得られた理由については、細胞培養時や移植時における何らかの刺激が nestin 陽性単能性前駆細胞を脱分化させ、多能性幹細胞へ転換させた可能性が考察された。

5. 小括

第3章では、成体マウスの毛包においても外毛根鞘細胞の前駆細胞となる *nestin* 陽性細胞が存在するか検討した。OHTを投与した4週齢の *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスでは、第一成長期毛の毛包峡部外毛根鞘に EGFP 陽性細胞が認められ、さらに7週齢の同マウスにおける抜毛誘発性成長期毛包では、大部分の外毛根鞘細胞が EGFP 陽性となった。またOHTを投与した *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスの成長期毛包峡部に認められた EGFP 陽性細胞は、K15 陽性細胞とは異なる細胞集団であることも示唆された。この結果と過去の報告 [Morris RJ et al., 2004] を総合すると、成体マウスの毛包峡部に分布する *nestin* 陽性細胞は K15 陽性細胞に由来し、外毛根鞘細胞への分化能を有する単能性前駆細胞であることが示唆された。

6. 図

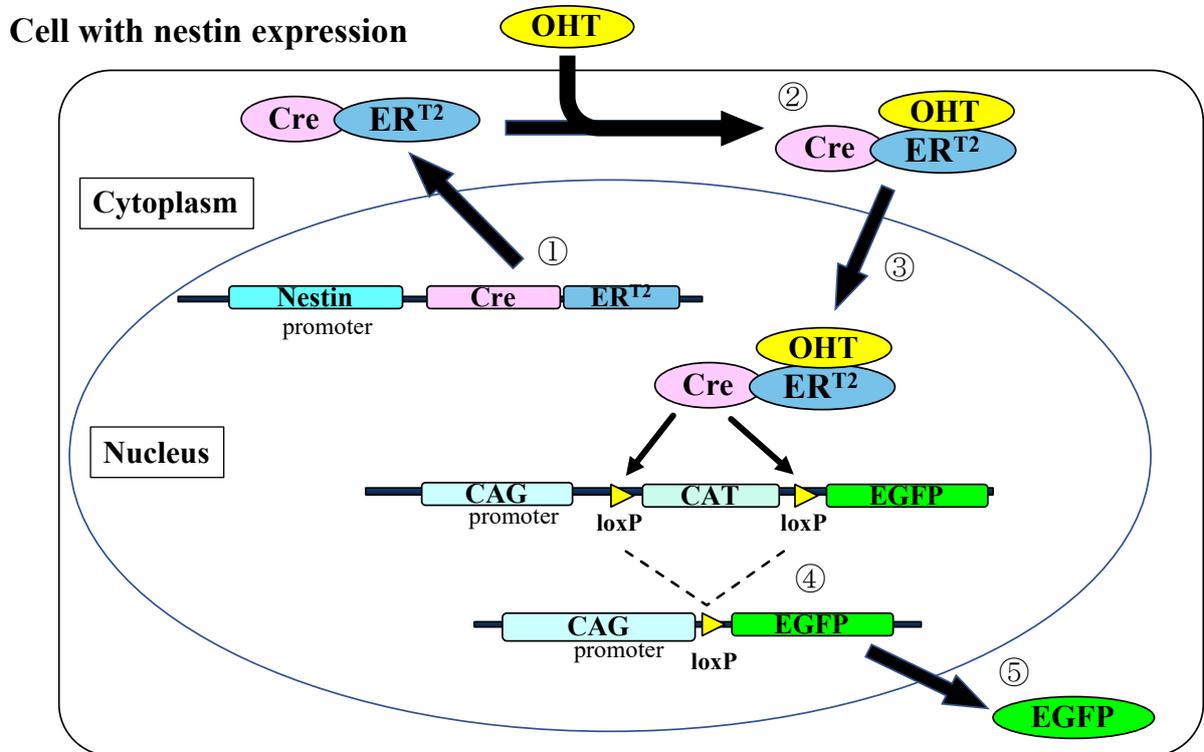


図 4-1 タモキシフェンを投与した *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスにおける Cre-loxP 組換えの模式図

Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP マウスは、nestin プロモーターの下流に CreERT2 が挿入されている (①)。タモキシフェンの代謝産物である OHT は CreERT2 と結合し (②)、細胞質から核内へ移行する (③)。その結果、Cre-loxP 組み換えが生じ (④)、nestin を発現している細胞およびその娘細胞細胞が EGFP 陽性となる (⑤)。

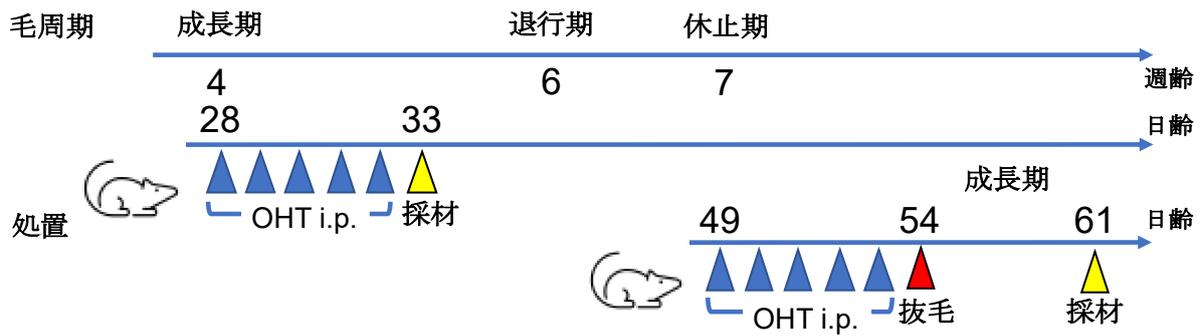


図 4-2 *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスへの OHT 投与

99.5%エタノールおよびコーンオイルで溶解し、10 mg/ml になるように調整した OHT を、最初の成長期毛包が出現する 4 週齢および 2 回目の休止期毛包が出現する 7 週齢の *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスに、0.1 ml/head (1 mg/head) の用量で、5 日間連続して腹腔内投与 (intraperitoneal administration; i.p.) した。4 週齢のマウスでは、5 日間連続投与の翌日に背部から皮膚サンプルを採取した。また、7 週齢のマウスは 5 日間連続投与の翌日に成長期毛を促すため背部被毛を抜毛し、抜毛後 7 日目に背部から皮膚サンプルを採取した。

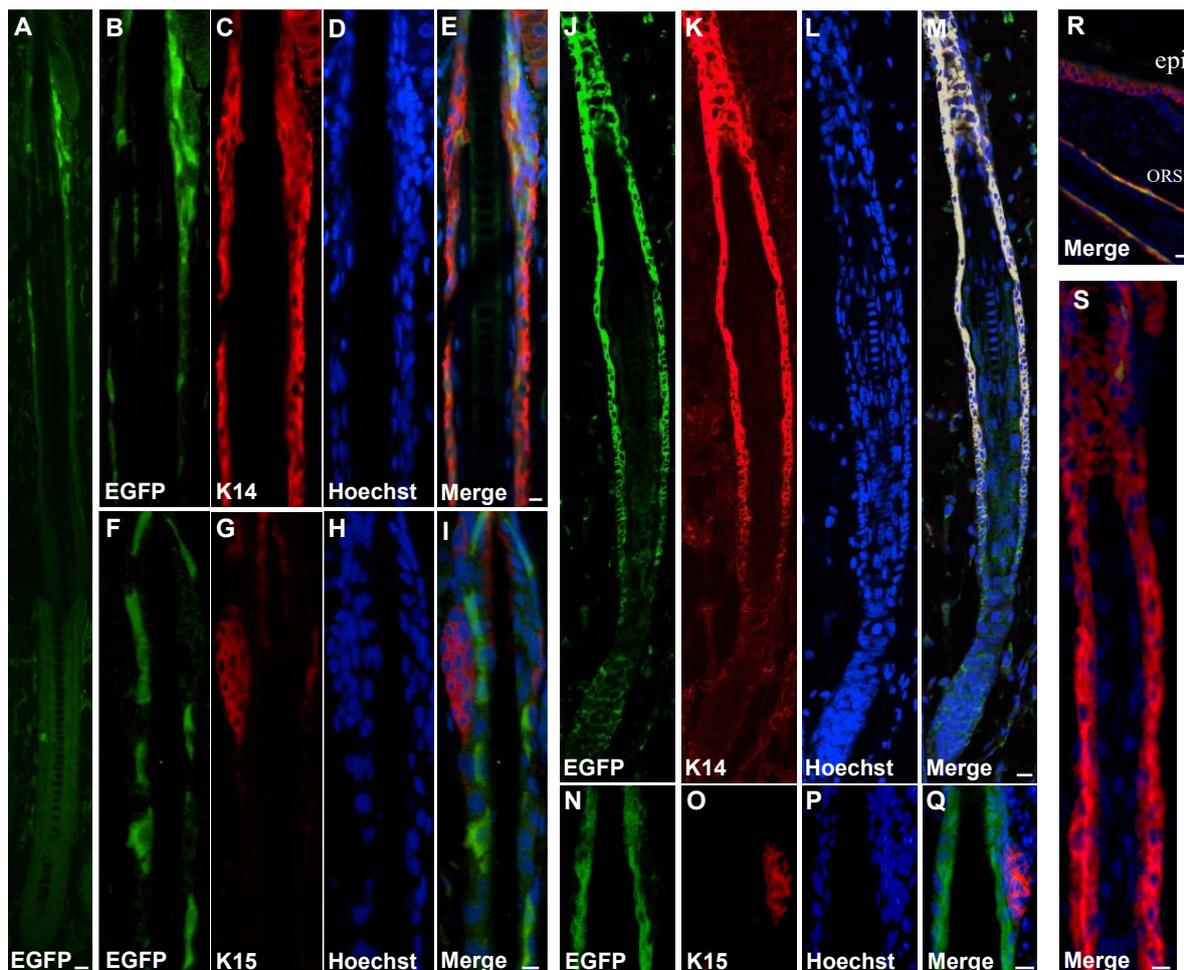


図 4-3 OHT 投与後の *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスの成長期毛外毛根鞘における EGFP 陽性細胞の解析

4 週齢の *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスに OHT を 5 日間連続で投与した。その後、背部皮膚 (第一成長期毛包) を採取し、抗 EGFP 抗体 (A, B, F) と抗 K14 抗体 (C) および抗 K15 抗体 (G) の二重免疫蛍光抗体法を行った。また、7 週齢の *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスに同様に OHT を投与し、その後抜毛により成長期毛を促し、その 7 日後に背部皮膚 (抜毛誘発性成長期毛包) を採取した。その後、抗 EGFP 抗体 (J, N) と抗 K14 抗体 (K) および抗 K15 抗体 (O) の二重免疫蛍光抗体法を行った。核は Hoechst 33258 で共染色した (D, H, L, P)。OHT 投与 *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスの第一成長期毛包では K14 陽性細胞のうち、毛包峡部に少数の EGFP 陽性 K14 陽性細胞を認めた (E)。また、同部位に認められた EGFP 陽性細胞は K15 陰性であった (I)。OHT 投与 *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスの抜毛誘発性成長期毛包では、ほとんどの K14 陽性細

胞が EGFP を共発現していた (M)。一方で, 同マウスの外毛根鞘 (ORS) ではなく, 毛包間表皮 (epi) には EGFP を発現する角化細胞は認められなかった (R)。さらに第一成長期毛包と同様に, 毛包峽部において EGFP 陽性細胞は K15 陽性細胞と隣接するも, それらを共発現する二重陽性細胞は認められなかった (N-Q)。また, OHT の代わりにコーンオイルのみを投与した対照群では, 5 週齢および 7 週齢のいずれのマウスでも, 外毛根鞘における EGFP 陽性細胞の出現を認めなかった (S: 7 週齢)。Bar=20 μ m(A, M, R), 10 μ m(E, I, Q, S)

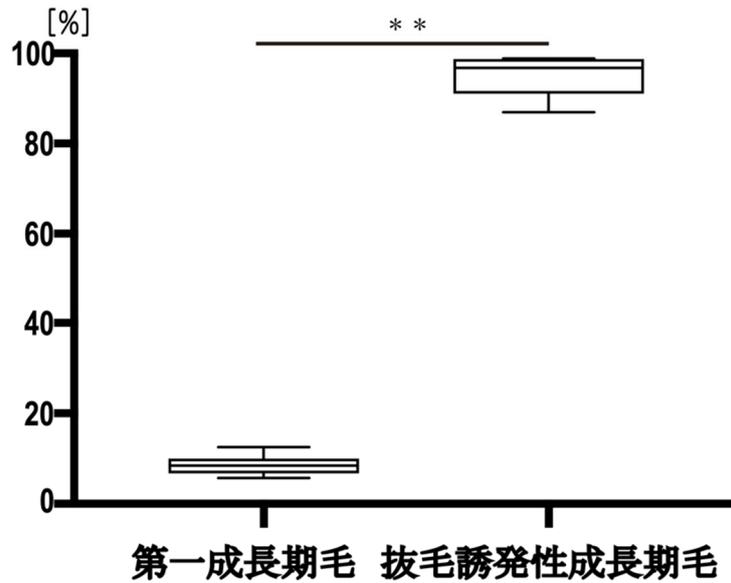


図 4-4 OHT 投与 *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスの第一成長期毛包および抜毛誘発性成長期毛包における K14 陽性細胞中の EGFP 陽性 K14 陽性細胞数の頻度の比較
 OHT 投与 *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスの第一成長期毛包における K14 陽性細胞中の EGFP 陽性 K14 陽性細胞数は同マウスの抜毛誘発性成長期毛包における同値と比較し優位に低値を示した (Student's *t*-test)。**, $P < 0.0001$

総括

毛包は多数の角化細胞が同心円状に配列した複雑な構造をしており、毛幹を囲むように内毛根鞘、外毛根鞘が存在する [Schneider MR et al., 2009]。毛包最外層の外毛根鞘は表皮と連続しており、その由来は外胚葉である。外胚葉は発生の段階で表皮外胚葉、神経外胚葉に分化することが知られており、毛包は表皮外胚葉由来である [Pispa J and Thesleff I, 2003]。一方で、神経外胚葉は発生の過程で神経管や神経堤に分化することが知られている [Hall BK, 2008, Simões-Costa M and Bronner ME, 2015]。

Nestin は、細胞骨格を形成するIV型中間径フィラメントの一種であり、胚発生の段階では神経堤幹細胞など神経外胚葉系の幹細胞で発現が認められることが知られている [Lendahl U et al., 1990]。神経堤幹細胞に発現する nestin は、細胞の分化が進むにつれて消失することから、神経堤幹細胞/前駆細胞の代表的なマーカーとして知られている [Frederiksen K and McKay RD, 1988, Suzuki S et al., 2010]。

過去に我々の研究室では、nestin プロモーター活性化で Cre-loxP 組換えが生じると、nestin 陽性細胞およびその娘細胞が恒久的に EGFP を発現するトランスジェニックマウス (*Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウス) を作出し、そのマウスの成長期毛包を解析したところ、外毛根鞘を構成する細胞が抗 EGFP 抗体により染色されたことから、これらの細胞が角化細胞であるにも関わらず nestin 陽性細胞に由来することを発見した [Onishi S et al., 2019]。このことは、外毛根鞘を構成する細胞が、上皮-神経細胞系幹細胞間の可塑性に由来することを示唆しているが、その詳細な分化時期や細胞系譜に関しては不明であった。

第1章では、*Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスの毛包上皮に EGFP 陽性細胞が出現する時期を検討した。その結果、胎生期の毛包発生期の毛杭の時期に初めて毛包上皮に EGFP 陽性細胞が認められることを発見した。これらのことから、同マウスでは遅くとも毛杭の形成期には、上皮内に nestin 発現細胞が出現する可能性が示唆された。

第2章では、第1章で認められた胎生期マウス毛杭の EGFP 陽性細胞の詳細な細胞系譜について解析した。毛杭の細胞について、上皮系細胞マーカーである K5, K14, 間葉系細胞マーカーである VIM および神経系幹細胞マーカーである SOX2, SOX10,

S100A6 を用いて抗 EGFP 抗体との二重免疫蛍光染色を行った。その結果, 毛杭に認められた EGFP 陽性細胞は上皮系細胞マーカーに陽性であったが, 間葉系および神経系幹細胞マーカーには陰性であった。これらの結果より, 毛杭に認められた EGFP 陽性細胞は上皮系細胞の特徴のみを有することが示唆された。

また第 3 章では, 成体マウスの毛包においても, 外毛根鞘の形成に關与する nestin 陽性前駆細胞が存在するののかについて, OHT 投与 *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスを用いて検討した。その結果, OHT を投与した 4 週齡の *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスでは, 第一成長期毛の毛包峽部外毛根鞘に EGFP 陽性細胞が認められ, さらに 7 週齡の同マウスにおける抜毛誘発性成長期毛包では, 大部分の外毛根鞘細胞が EGFP 陽性となった。一方で, 毛包間上皮の角化細胞には EGFP の発現は認められなかった。また, OHT 投与 *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスの成長期毛包峽部に認められた EGFP 陽性細胞は, K15 陽性細胞とは異なる細胞集団であることも示唆された。

本研究を通して, 毛包外毛根鞘における上皮-神経幹細胞間の可塑性に關して, *Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスおよび *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスを用いて探索した。上記で述べた結果より, 成マウスの外毛根鞘を構成する角化細胞は, 胎生期の毛杭以前の時期に認められた nestin 陽性細胞の娘細胞か, 第一成長期毛包で認められた nestin 陽性細胞の娘細胞である可能性が考察された。これは, 毛包外毛根鞘を形成する上で上皮-神経幹細胞間の可塑性が胎生期だけでなく, 成マウスでも起こっている可能性を示唆した。さらに, 本研究で第一成長期毛の毛包峽部に認められた nestin 陽性細胞は K15 陽性細胞と隣接していたものの, K15 の発現は認められなかった。一方で, 過去の報告では毛包バルジ領域に存在する K15 陽性上皮系幹細胞が外毛根鞘を含む毛包全層へと分化することが報告されている [Morris RJ et al., 2004]。これらのことを総合すると, 成体マウスの成長期毛包峽部に認められた nestin 陽性細胞は, それ以前には K15 を発現し多能性幹細胞としての特性を有しており, その後外毛根鞘へ分化する際に nestin を発現した可能性が考えられた。このことから, 毛包上皮に認められた nestin 陽性細胞は外毛根鞘細胞への分化能を有する単能性前駆細胞であることが示唆された。

近年, 全能性幹細胞や多能性幹細胞を用いて, 完全な毛包を再生する試みがなされている [Mistriotis P et al., 2013]。しかし, より効率的に毛包を再生するためには, 毛包の各細胞層へ特異的に分化する詳細な分子機構および細胞系譜を明らかにする必要があると考えられる。今後は, 毛包上皮細胞へと分化する多能性幹細胞から, より下流への細胞へと分化するために必要な, 分子間相互作用を詳細に解明する研究が期待される。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の中心となって常に熱心にご指導くださいました東京農工大学農学部獣医内科学研究室の西藤公司教授に深謝いたします。また、本研究を細部にわたりご指導くださり、本学位論文審査の主査をお引き受けいただきました東京農工大学農学部獣医内科学研究室の井手香織准教授に感謝いたします。また、本研究に用いた *Nes-Cre* マウスおよび *Nes-CreERT2* マウスをご提供いただいた京都大学大学院生命科学研究科の今吉格教授ならびに影山龍一郎教授、ならびに *CAG-CAT-EGFP* マウスをご提供いただいた、大阪大学大学院医学系研究科の宮崎純一教授に深謝いたします。そして、学位論文審査にあたり、副査をお引き受けいただきました岩手大学農学部小動物内科学教室の山崎真大教授、ならびに、東京農工大学農学部附属動物病院機構小金井動物救急医療センターの福島隆治教授、東京農工大学グローバル研究院の永岡謙太郎教授に深謝いたします。最後に、実験の補助をいただきました東京農工大学獣医内科学研究室の方々に深謝いたします。

引用文献

1. Ahtiainen L, Lefebvre S, Lindfors PH, Renvoisé E, Shirokova V, Vartiainen MK, Thesleff I, Mikkola ML. (2014). Directional cell migration, but not proliferation, drives hair placode morphogenesis. *Dev Cell*. 28(5):588-602.
2. Alliot F, Rutin J, Leenen PJ, Pessac B. (1999). Pericytes and periendothelial cells of brain parenchyma vessels co-express aminopeptidase N, aminopeptidase A, and nestin. *J Neurosci Res*. 58(3):367-78.
3. Amoh Y, Li L, Katsuoka K, and Hoffman, RM. (2007). Chemotherapy targets the hair-follicle vascular network but not the stem cells. *J Invest Dermatol*. 127:11-15.
4. Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Penman S and Hoffman RM. (2005). Multipotent nestin-positive keratin-negative hair follicle bulge stem cells can form neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102:5530-5534.
5. Amoh Y, Li L, Yang M, Moossa R, Katsuoka K, Penman S and Hoffman RM. (2004). Nascent Blood Vessels in the Skin Arise from Nestin-Expressing Hair-Follicle Cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:13291-13995.
6. Amoh Y, Kanoh M, Niiyama S, Kawahara K, Sato Y, Katsuoka K and Hoffman RM. (2009). Human and mouse hair follicles contain both multipotent and monopotent stem cells. *Cell cycle*. 8:176-177.
7. Amoh Y, Mii S, Aki R, Hamada Y, Kawahara K, Hoffman RM and Katsuoka K. (2012). Multipotent Nestin-Expressing Stem Cells Capable of Forming Neurons Are Located in the Upper, Middle and Lower Part of the Vibrissa Hair Follicle. *Cell Cycle*. 11:3513-3517.
8. Anderson DJ. (1997). Cellular and molecular biology of neural crest cell lineage determination. *Trends Genet*. 13(7):276-80.

9. Aoki Y, Saint-Germain N, Gyda M, Magner-Fink E, Lee YH, Credidio C, Saint-Jeannet JP. (2003). Sox10 regulates the development of neural crest-derived melanocytes in *Xenopus*. *Dev Biol.* 259(1):19-33.
10. Biernaskie J, Paris M, Morozova O, Fagan BM, Marra M, Pevny L, Miller FD. (2009). SKPs derive from hair follicle precursors and exhibit properties of adult dermal stem cells. *Cell Stem Cell.* 5(6):610-23.
11. Botchkarev VA, Botchkarev NV, Albers KM, van der Veen C, Lewin GR, Paus R. (1998). Neurotrophin-3 involvement in the regulation of hair follicle morphogenesis. *J Invest Dermatol.* 111(2):279-85.
12. CHASE HB. (1954). Growth of the hair. *Physiol Rev.* 34(1):113-26.
13. Chen D, Jarrell A, Guo C, Lang R, Atit R. (2012). Dermal β -catenin activity in response to epidermal Wnt ligands is required for fibroblast proliferation and hair follicle initiation. *Development.* 139(8):1522-33.
14. Cotsarelis G. Epithelial stem cells: a folliculocentric view. (2006). *J Invest Dermatol.* 126(7):1459-68.
15. Ellis P, Fagan BM, Magness ST, Hutton S, Taranova O, Hayashi S, McMahon A, Rao M, Pevny L. (2004). SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev Neurosci.* 26(2-4):148-65.
16. Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun.* 237(3):752-7.
17. Franke WW, Schmid E, Osborn M, Weber K. (1978). Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 75(10):5034-8.
18. Frederiksen K, McKay RD. (1988). Proliferation and differentiation of rat

- neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci.* 8(4):1144-51.
19. Frödman K, Pelliniemi LJ, Lendahl U, Virtanen I, Eriksson JE. (1997). The intermediate filament protein nestin occurs transiently in differentiating testis of rat and mouse. *Differentiation.* 61(4):243-9.
 20. Greco V, Chen T, Rendl M, Schober M, Pasolli HA, Stokes N, Dela Cruz-Racelis J, Fuchs E. (2009). A two-step mechanism for stem cell activation during hair regeneration. *Cell Stem Cell.* 4(2):155-69.
 21. Hall BK. (2008). The neural crest and neural crest cells: discovery and significance for theories of embryonic organization. *J Biosci.* 33(5):781-93.
 22. Higgins CA, Westgate GE, Jahoda CA. (2009). From telogen to exogen: mechanisms underlying formation and subsequent loss of the hair club fiber. *J Invest Dermatol.* 129(9):2100-8.
 23. Indra AK, Warot X, Brocard J, Bornert JM, Xiao JH, Chambon P, Metzger D. (1999). Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res.* 27(22):4324-7.
 24. Imayoshi I, Ohtsuka T, Metzger D, Chambon P, Kageyama R. (2006). Temporal regulation of Cre recombinase activity in neural stem cells. *Genesis.* 44(5):233-8.
 25. Isaka F, Ishibashi M, Taki W, Hashimoto N, Nakanishi S, Kageyama R. (1999). Ectopic expression of the bHLH gene *Math1* disturbs neural development. *Eur J Neurosci.* 11(7):2582-8.
 26. Ito M, Kizawa K. (2001). Expression of calcium-binding S100 proteins A4 and A6 in regions of the epithelial sac associated with the onset of hair follicle regeneration. *J Invest Dermatol.* 116(6):956-63.
 27. Kanoh M, Amoh Y, Sato Y, Katsuoka K. Expression of the hair stem cell-specific marker nestin in epidermal and follicular tumors. (2008). *Eur J Dermatol.* 18(5):518-

- 23.
28. Kelsh RN. (2006). Sorting out Sox10 functions in neural crest development. *Bioessays*. 28(8):788-98.
29. Knecht AK, Bronner-Fraser M. Induction of the neural crest: a multigene process. (2002), *Nat Rev Genet*. 3(6):453-61.
30. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 60(4):585-95.
31. Li L, Mignone J, Yang M, Matic M, Penman S, Enikolopov G, Hoffman RM. Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. (2003). *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(17):9958-61.
32. Liu F, Uchugonova A, Kimura H, Zhang C, Zhao M, Zhang L, Koenig K, Duong J, Aki R, Saito N, Mii S, Amoh Y, Katsuoka K, Hoffman RM. (2011). The bulge area is the major hair follicle source of nestin-expressing pluripotent stem cells which can repair the spinal cord compared to the dermal papilla. *Cell Cycle*. 10(5):830-9.
33. Liu Y, Lyle S, Yang Z, Cotsarelis G (2003) Keratin 15 promoter targets putative epithelial stem cells in the hair follicle bulge. *J Invest Dermatol*. 121(5):963–968.
34. Matsuda T, Cepko CL. (2007). Controlled expression of transgenes introduced by in vivo electroporation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104(3):1027-32.
35. Maricich SM, Wellnitz SA, Nelson AM, Lesniak DR, Gerling GJ, Lumpkin EA, Zoghbi HY. (2009). Merkel cells are essential for light-touch responses. *Science*. 324(5934):1580-2.
36. Mayer TC. (1973). The migratory pathway of neural crest cells into the skin of mouse embryos. *Dev Biol*. 34(1):39-46.
37. Messenger AG, Elliott K, Temple A, Randall VA. (1991). Expression of basement membrane proteins and interstitial collagens in dermal papillae of human hair follicles. *J Invest Dermatol*. 96(1):93-7.

38. Mercurio S, Serra L, Nicolis SK. (2019). More than just Stem Cells: Functional Roles of the Transcription Factor Sox2 in Differentiated Glia and Neurons. *Int J Mol Sci.* 20(18):4540.
39. Millar SE. Molecular mechanisms regulating hair follicle development. (2002). *J Invest Dermatol.* 118(2):216-25
40. Milner Y, Sudnik J, Filippi M, Kizoulis M, Kashgarian M, Stenn K. (2002). Exogen, shedding phase of the hair growth cycle: characterization of a mouse model. *J Invest Dermatol.* 119(3):639-44.
41. Morris RJ, Liu Y, Marles L, Yang Z, Trempus C, Li S, Lin JS, Sawicki JA, Cotsarelis G (2004). Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol.* 22(4):411–417.
42. Moll I, Paus R, Moll R. (1996). Merkel cells in mouse skin: intermediate filament pattern, localization, and hair cycle-dependent density. *J Invest Dermatol.* 106(2):281-6.
43. Moll R, Dhouailly D, Sun TT. (1989). Expression of keratin 5 as a distinctive feature of epithelial and biphasic mesotheliomas. An immunohistochemical study using monoclonal antibody AE14. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.*58(2):129-45.
44. Morris RJ, Liu Y, Marles L, Yang Z, Trempus C, Li S, Lin JS, Sawicki JA, Cotsarelis G. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. (2004) *Nat Biotechnol.* 22(4):411-7.
45. Müller-Röver S, Handjiski B, van der Veen C, Eichmüller S, Foitzik K, McKay IA, Stenn KS, Paus R. (2001). A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J Invest Dermatol.* 117(1):3-15.
46. Nonaka D, Chiriboga L, Rubin BP. (2008). Sox10: a pan-schwannian and melanocytic marker. *Am J Surg Pathol.* 32(9):1291-8.

47. Onishi S, Baba Y, Yokoi F, Ide K, Ohyama M, Nishifuji K. (2019). Progenitor cells expressing nestin, a neural crest stem cell marker, differentiate into outer root sheath keratinocytes. *Vet Dermatol.* 30(5):365-e107.
48. Ohyama M. (2007). Hair follicle bulge: a fascinating reservoir of epithelial stem cells. *J Dermatol Sci.* 46(2):81-9.
49. Paus R, Müller-Röver S, Van Der Veen C, Maurer M, Eichmüller S, Ling G, Hofmann U, Foitzik K, Mecklenburg L, Handjiski B. (1999). A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis. *J Invest Dermatol.* 113(4):523-32.
50. Perdigoto CN, Bardot ES, Valdes VJ, Santoriello FJ, Ezhkova E. (2014). Embryonic maturation of epidermal Merkel cells is controlled by a redundant transcription factor network. *Development.* 141(24):4690-6.
51. Pispá J, Thesleff I. Mechanisms of ectodermal organogenesis. (2003). *Dev Biol.* 262(2):195-205.
52. Rebora A, Guarrera M. (2002). Kenogen. A new phase of the hair cycle? *Dermatology.* 205(2):108-10.
53. Rios AC, Serralbo O, Salgado D, Marcelle C. (2011). Neural crest regulates myogenesis through the transient activation of NOTCH. *Nature.* 473(7348):532-5.
54. Saxena N, Mok KW, Rendl M. (2019). An updated classification of hair follicle morphogenesis. *Exp Dermatol.* 28(4):332-344.
55. Schneider MR, Schmidt-Ullrich R, Paus R. (2009). The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Curr Biol.* 19(3):R132-42.
56. Sieber-Blum M, Schnell L, Grim M, Hu YF, Schneider R, Schwab ME (2006) Characterization of epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) grafts in the lesioned spinal cord. *Mol Cell Neurosci.* 32(1-2):67–81.
57. Simões-Costa M, Bronner ME. (2015). Establishing neural crest identity: a gene

- regulatory recipe. *Development*. 142(2):242-57.
58. Slominski A, Paus R, Plonka P, Chakraborty A, Maurer M, Pruski D, Lukiewicz S. (1994). Melanogenesis during the anagen-catagen-telogen transformation of the murine hair cycle. *J Invest Dermatol*. 102(6):862-9.
59. Suzuki S, Namiki J, Shibata S, Mastuzaki Y, Okano H. (2010). The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature. *J Histochem Cytochem*. 58(8):721-30.
60. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabé-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD. (2001). Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*. 3(9):778-84.
61. Treutelaar MK, Skidmore JM, Dias-Leme CL, Hara M, Zhang L, Simeone D, Martin DM, Burant CF. (2003). Nestin-lineage cells contribute to the microvasculature but not endocrine cells of the islet. *Diabetes*. 52(10):2503-12.
62. Van Keymeulen A, Mascré G, Youseff KK, Harel I, Michaux C, De Geest N, Szpalski C, Achouri Y, Bloch W, Hassan BA, Blanpain C. (2009). Epidermal progenitors give rise to Merkel cells during embryonic development and adult homeostasis. *J Cell Biol*. 187(1):91-100.
63. Wang Y, Zhang Y, Zeng Y, Zheng Y, Fu G, Cui Z, Yang T. (2006). Patterns of nestin expression in human skin. *Cell Biol Int*. 30(2):144-8.
64. Wegner M, Stolt CC. (2005). From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends Neurosci*. 28(11):583-8.
65. William Miller, Craig Griffin, Karen Campbell. (2012). *Muller&Kirk's Small Animal Dermatology*, 7th ed., ELSEVIER
66. Yamada J, Jinno S. (2014). S100A6 (calcyclin) is a novel marker of neural stem cells and astrocyte precursors in the subgranular zone of the adult mouse hippocampus. *Hippocampus*. 24(1):89-101.

67. Yang J, Bian W, Gao X, Chen L, Jing N. (2000). Nestin expression during mouse eye and lens development. *Mech Dev.* 94(1-2):287-91.
68. Yang LN, Huang WK, Li XL, Bai YZ, Zhang SC. (2020). Sox10 Is a Specific Biomarker for Neural Crest Stem Cells in Immunohistochemical Staining in Wistar Rats. *Dis Markers.* 2020:8893703.