

学 位 論 文 要 旨

氏 名 馬場 悠太

題 目 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

(Studies on the timing of the appearance of nestin-positive cells as progenitor cells of mouse outer root sheath cells)

毛包は多数のケラチノサイト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。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。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。

Nestin は、細胞骨格を形成するVI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の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。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。

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。このことは、外毛根鞘細胞の前駆細胞において、上皮-神経細胞系幹細胞間の可塑性が認められる可能性を示唆しているが、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。そこで本研究では、マウス外毛根鞘細胞の前駆細胞となる nestin 陽性細胞に関して、外毛根鞘上皮への発現時期とその詳細な細胞系譜の解明を目的とした。

第1章では成体 *Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスの外毛根鞘を構成する EGFP 陽性細胞に関して、どの時期に初めて毛包上皮に EGFP 陽性細胞が発現するかについて検討した。まず *Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスから、第2休止期毛および新生仔の皮膚を採取し、抗 EGFP 抗体を用いて免疫蛍光抗体法を実施した。その結果、休止期毛および新生仔マウスの外毛根鞘がすでに EGFP 陽性細胞で構成されていることから、毛包上皮に EGFP が発現する時期は胎生期であることが示唆された。次に、胎生期マウスの毛包上皮に関しても免疫蛍光抗体法により解析を行った。その結果、毛芽および後期毛芽では、真皮に EGFP 陽性細胞が認められるのみであったが、毛杭の時期に、初めて毛包上皮に EGFP 陽性細胞が認められた。これらの結果より、新生児や成体マウスの毛包外毛根鞘で認められた EGFP 陽性細胞の初期の発現時期は、胎生期の毛杭の時

期であることが証明され、毛杭上皮において nestin を発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学的特徴について解析した。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 vimentin 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もつ可能性が示唆された。

また、第3章では、成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。タモキシフェン投与後に nestin を発現している細胞およびその娘細胞が EGFP を発現する *Nes-CreERT2/CAG-CAT-EGFP* マウスを用いて、抗 EGFP 抗体および抗 K14 抗体もしくは抗 K15 抗体による二重免疫蛍光抗体法を実施した。その結果、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 陽性であった。また同細胞は K15 を発現していなかった。さらに、7週齢の同マウスに OHT を投与後、背部被毛を抜毛したところ、誘導された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。以上より、成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ことが示唆された。

本研究より、*Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウスの外毛根鞘を構成する角化細胞は、胎生期の毛杭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ことが示唆された。また、過去の報告から、毛包バルジ領域に存在する上皮系幹細胞が外毛根鞘を含む毛包全層の細胞へと分化することや、同じく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性を持ち、*in vitro* で角化細胞へ分化することが知られている。このことと、本研究の第3章での結果をあわせると、第一成長期毛包の毛包峽部に認められた 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可能性が示唆された。

本研究の成果は、マウス毛包における nestin 陽性細胞の分化運命の一部を解明しただけでなく、未だ詳細に解明されていない毛包の発生や再生について、新たな知見をもたらした。

(備考) 1 学位論文題目が日本語の場合は英訳を、英語の場合は和訳を () 内に記入すること。(英語の表記は、論文目録と同じ。)

2 日本語の場合は、2,000字程度とする。

3 英語の場合は、1,200語程度とする。

4 図表は、この要旨には記載しないこと。

5 枚数は1枚を超えても差し支えありません。