

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14866

研究課題名(和文)毛包形成に關与する未知の分化決定メカニズムと關連遺伝子の時系列的探索

研究課題名(英文)Time series analysis of unknown differentiation mechanisms and related genes for hair follicle generation

研究代表者

西藤 公司(Nishifuji, Koji)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20365422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では毛包バルジ領域に存在するケラチン15上皮幹細胞の中に、ネスチン陽性神経幹細胞の娘細胞が存在するかを解析したとともに、上皮-神経幹細胞の分化運命を解析するための遺伝子改変プラスミドを作製した。その結果、マウス成長期毛包および休止期毛包のバルジ領域では、ネスチン陽性細胞またはその娘細胞の特性を示し、かつケラチン15を発現する細胞を蛍光抗体法により特定することはできなかった。一方で本研究では、ケラチン15とネスチンの共発現下でCre-loxP組換えが生じた結果、タモキシフェン存在下でFlp-ERT部位特異的を誘導するFlpERT2を発現させるための遺伝子改変プラスミドの作製に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated whether nestin-expressing neural stem cells and their descendants can be mixed in keratin 15-expressing hair follicle bulge stem cells. We also aimed to generate plasmid constructs to investigate the fate of epithelial-neural stem cells. In murine anagen and hair follicle bulge, keratin 15-expressing cells with features of nestin-expressing cells or their descendants could not be detected by immunofluorescence analysis. Meanwhile, we could successfully generate plusmid constructs that could express FlpERT2, which induces Flp-FRT site specific recombination under the presence of tamoxifen, by Cre-loxP recombination in keratin 15 and nestin co-expressing cells.

研究分野：獣医学

キーワード：毛包

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の毛包バルジ領域には、複数の幹細胞または前駆細胞が存在することが知られている。同領域に存在するケラチン (KRT)15+上皮系幹細胞をヌードマウスの皮膚に移植すると、同細胞が毛包や脂腺を再構成することが報告されている。一方で同領域には多分化能をもつネスチン (NES)+神経幹細胞も存在するが、同細胞の皮膚における分化運命は十分に解明されていない。

研究代表者は Cre-loxP 部位特異的組換え技術により、NES+細胞およびその娘細胞が GFP を発現するトランスジェニックマウス (Nes-Cre/CAG-CAT^{lox}-EGFP) を作出した。このマウスを用いて皮膚における神経幹細胞の分化運命を解析したところ、毛包を構成する外毛根鞘細胞が、上皮系細胞であるにも関わらず神経幹細胞または娘細胞の特徴である GFP 陽性細胞である事実を発見した。

以上の背景を元に、研究代表者は毛包バルジ領域に神経-上皮系幹細胞の両方の特徴を有する細胞 (NES+KRT15+二重陽性幹細胞) が存在し、この細胞が外毛根鞘細胞へと特異的に分化するのではないかという仮説を立案し、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

(1) Nes-Cre/CAG-CAT^{lox}-EGFP マウスの成長期毛包ならびに休止期毛包のバルジ領域に、GFP+K15+二重陽性細胞が存在するかを解析した。

(2) NES+K15+二重陽性細胞の分化運命を解析するためのツールとして、K15 プロモーターの下流に CreERT2 を挿入した遺伝子コンストラクト、ならびに NES プロモーターの下流に蛍光色素である DeRed^{lox} ならびに FlpERT2 をタンデムに挿入した遺伝子コンストラクトを作製した。

3. 研究の方法

(1) Nes-Cre/CAG-CAT^{lox}-EGFP トランスジェニックマウス

過去に当研究室で作出した Nes-Cre/CAG-CAT^{lox}-EGFP トランスジェニックマウスを試験に用いた。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)IKag 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。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 配列に挟まれたカタラーゼ (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 B6;D2-TG (CAG-CAT-EGFP) 39Miy マウス (CAG-CAT^{lox}-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。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。新生仔マウスの尾先端を切断し、DNA 抽出キットを用いてゲノム DNA の抽出を行い、これを鋳型とした PCR により、Cre リコンビナーゼ遺伝子断片ならびに GFP 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-Cre/CAG-CAT^{lox}-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生物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。

(2) 成長期毛包と休止期毛包の採取

既報告に従い、以下の方法により Nes-Cre/CAG-CAT^{lox}-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^{lox}-EGFP マウスの背部に、蜜蝋・ロジン酸グリセル・パラフィン混合物を塗布したガムテープを貼付し、15 分後にガム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。

(3) 蛍光抗体法

Nes-Cre/CAG-CAT^{lox}-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、マイクロト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。

続いて切片をリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄後、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、内因性イムノグロブリンのブロッキングを行うために、上述したブロッキング

バッファー中に希釈した Goat F(ab) Anti-Mouse IgG H&L (Abcam, Cambridge, UK: 1000 倍希釈) を室温で 1 時間反応させた。さらに切片を PBS にて洗浄後、上述したブロッキングバッファー中に希釈したマウス抗 GFP モノクローナル抗体 (Clone 6AT36; Abcam: 200 倍希釈) と 4°C 下で 12 時間反応させて一時反応を行った。

一次反応後の切片を PBS にて洗浄し、続いて Alexa Fluor 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)、ならびに核染色用に Hoechst 33258 (Invitrogen Corp.: 400 倍希釈) と室温下で 30 分間反応させた。さらに切片を PBS で洗浄した後、マウス抗サイトケラチン 15 (K15) モノクローナル抗体 (Clone LHK15; Abcam) と Zenon Alexa Fluor 555 mouse IgG2a labelling kit (Invitrogen Corp.) とを結合させたラベリング抗体 (200 倍希釈) を用いて反応させた。

切片を PBS で洗浄した後、封入して後述の画像解析に用いた。

(4) 画像解析

蛍光染色後の組織切片を、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。またイメージングソフトウェア (ZEN; Carl Zeiss) を用いて画像データを取り込んだ後に、次の方法により画像解析を行った。

成長期毛包と休止期毛包については、同一のスライド切片上に存在し、かつ表皮から毛球までが確認できる毛包を 1 切片につき 3 毛包ずつ、計 2 切片分を選択した。

成長期毛包のバルジ領域ならびに下部、また休止期毛包のバルジ領域に分布する上皮細胞をそれぞれ計 17 細胞ずつ選択し、細胞膜から対側の細胞膜までの距離を X 軸上に、抗 GFP 抗体、抗 K15 抗体ならびに Hoechst 33258 による蛍光強度をそれぞれ Y 軸上にプロットして折れ線グラフを作成した後に、それぞれの蛍光強度を測定した。

さらに前述の折れ線グラフにおけるグラフ曲線下の面積を積分することで 1 細胞あたりの蛍光強度を算出したとともに、成長期毛包と休止期毛包については抗 GFP 抗体/抗 K15 抗体による蛍光強度比を求めて比較解析を行った。

(5) 統計解析

統計解析には、Graph Pad Prism6 software (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA) を用いて、Mann-Whitney test を行った。

(6) 組換えコンストラクトの作製

K15-CreERT2 遺伝子断片は次の方法により作製した。pCAG-CreERT2 プラスミド (Dr.

Connie Cepko より譲渡) の配列中に存在する CreERT2 遺伝子の前後に、MfeI および SmaI 制限酵素による切断部位を付加した遺伝子断片を PCR 法により増幅した。K15-EGFP プラスミド (Dr. George Cotsarelis より譲渡) の配列中に存在する EGFP 遺伝子を MfeI および SmaI 制限酵素により切断し、同じ制限酵素の組み合わせで切断した PCR 産物を挿入した後、コンピテントセルに形質転換して K15-CreERT2 プラスミドを精製した。精製したプラスミドを培養細胞に導入して遺伝子産物の発現を確認した後 (後述)、CspCI および AflIII を用いて K15-CreERT2 遺伝子断片を切断し、アガロースゲルに電気泳動して遺伝子断片を抽出した。

pNestin-DsRed^{fllox}-FlpERT2 遺伝子断片は次の方法により作製した。まず pCAG-FlpERT2 (Dr. Connie Cepko より譲渡) の配列中に存在する FlpERT2 遺伝子の前後に、SalI および AflIII 制限酵素による切断部位を付加した遺伝子断片を PCR 法により増幅した。pMSCV-DsRed^{fllox}-EGFP プラスミド (Dr. Hans Clevers より譲渡) の配列中に存在する EGFP 遺伝子を、XhoI および AgeI 制限酵素で切断した後、SalI および AflIII 制限酵素で切断した PCR 産物を挿入して pMSCV-DsRed^{fllox}-FlpERT2 プラスミドを作製した。続いて同プラスミド配列中に存在する DsRed^{fllox}-FlpERT2 の前後に、AgeI および NotI 制限酵素による切断部位を付加した遺伝子断片を PCR 法により増幅し、pNestin-EGFP プラスミド (Dr. Wei Cui より譲渡) 中に存在する EGFP 遺伝子を同じ組み合わせの制限酵素で切断した後 PCR 産物を挿入して pNestin-DsRed^{fllox}-FlpERT2 プラスミドを作製した。精製したプラスミドを培養細胞に導入して遺伝子産物の発現を確認した後 (後述)、KpnI および AflIII を用いて pNestin-DsRed^{fllox}-FlpERT2 遺伝子断片を切断し、アガロースゲルに電気泳動して遺伝子断片を抽出した。

(7) 培養細胞における組換え遺伝子の発現および Cre/loxP または Flp/FRT 組換えの確認

角化細胞内における K15-CreERT2 遺伝子の発現およびタモキシフェン存在下における Cre-loxP 組換え能の有無については、以下の方法により確認した。pMSCV-DsRed^{fllox}-EGFP プラスミドを単独、または K15-CreERT2 プラスミドと混合し、A549 ヒト角化細胞株に形質導入した。導入後の細胞株に 0.3 μM の 4-hydroxytamoxifen を添加し、72 時間後に蛍光顕微鏡を用いて DsRed または EGFP による発色の有無を観察した。

神経幹細胞における pNestin-DsRed^{fllox}-FlpERT2 遺伝子の発現ならびに Cre リコンビナーゼ存在下における組換えの有無については、以下の方法により確認した。pNestin-DsRed^{fllox}-FlpERT2 プラスミドを単独で、また

は pBS185-CMV-Cre プラスミド (Dr. Brian Sauer より譲渡) と混合し, Neuro2a マウス神経幹細胞株に形質導入した。そして形質導入から 72 時間後における DsRed の発色の有無を蛍光顕微鏡により観察した。pBS185-CMV-Cre プラスミドによる Cre-loxP 組換えを確認するための陽性対照として, pNestin-DsRed^{fllox}-EGFP プラスミドと pBS185-CMV-Cre プラスミドを混合したものを同細胞に添加し, 同様の方法で観察を行った。

4. 研究成果

(1) Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP マウスの成長期毛包ならびに休止期毛包における GFP の発現解析

過去の研究において, Nes-Cre/CAG-CAT^{fllox}-EGFP マウスの成長期毛包では, 外毛根鞘細胞が抗 GFP 抗体により染色されることが示されている。本研究では休止期毛包の角化細胞も, 同様に抗 GFP 抗体により染色されるかを蛍光抗体法により検討した。

その結果成長期毛包では, 外毛根鞘領域となる毛包狭部~毛球上部の最外層を構成する上皮細胞が抗 GFP 抗体により染色されたのに対し (図 1-a, -c, -d), 休止期毛包の上皮細胞では抗 GFP 抗体により明瞭に染色された細胞は認められなかった (図 1-e, -f, -g)。毛漏斗部では角質細胞の一部が抗 GFP 抗体により弱く染色されたものの, 角化細胞では同様の染色は認められなかった(b)。新生毛包の原基となる二次毛芽においても同様に, 抗 GFP 抗体により明瞭に染色された細胞は認められなかった。

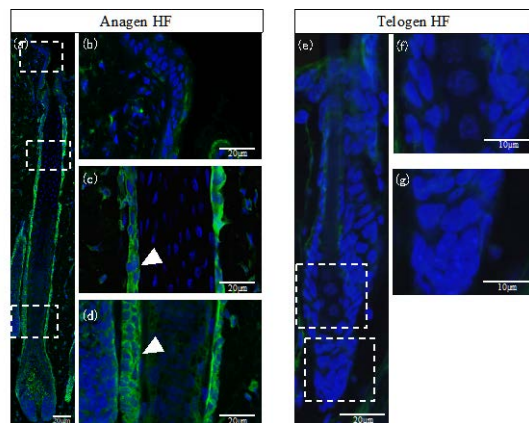


図 1 Nes-Cre/CAG-CAT-EGFP マウスの成長期毛包ならびに休止期毛包における GFP 陽性細胞の分布 (a~d)成長期毛包, (e~g)休止期毛包。

成長期毛包の外毛根鞘細胞における抗 GFP 抗体の染色性が GFP 特異的であることを再確認するため, Cre-loxP 組換えが生じない CAG-CAT^{fllox}-EGFP マウスならびに野生型マウスより皮膚を採取して, 前述の抗 GFP 抗体を用いた蛍光抗体法を実施した。しかしながらこれらのマウスでは, 成長期毛包の上皮細胞

が抗 GFP 抗体により染色されなかったことから (未掲載), 同抗体による染色性は GFP 特異的であることが確認された。

(2) 成長期毛包および休止期毛包のバルジ細胞における GFP の発現解析

続いて本研究では, K15 を毛包バルジ幹細胞マーカーとして蛍光抗体法を用い, 成長期毛包と休止期毛包のバルジ細胞における GFP の発現を比較解析した。

その結果, 成長期毛包のバルジ細胞では, 周囲の GFP 陽性細胞と比較して抗 GFP 抗体による細胞質の染色性が弱かった (図 2)。また休止期毛包のバルジ細胞でも, 成長期毛包のバルジ細胞と同様に抗 GFP 抗体による細胞質の染色性が弱かった (図 2)。

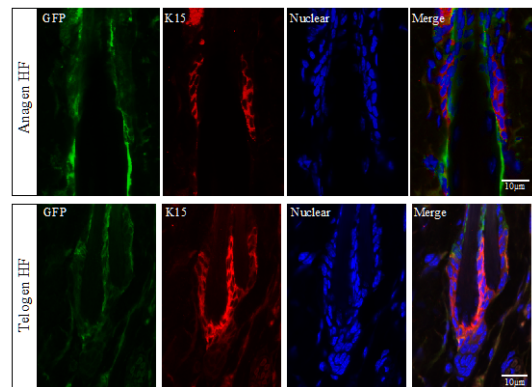


図 2 成長期毛包ならびに休止期毛包のバルジ領域における GFP ならびに K15 陽性細胞の分布

図 3 では成長期毛包のバルジ領域および毛包下部, ならびに休止期毛包のバルジ領域における, 抗 GFP 抗体ならびに抗 K15 抗体の代表的な細胞内分布を示した。成長期毛包ならびに休止期毛包のバルジ細胞では, 細胞質における抗 GFP 抗体による蛍光強度が, 抗 K15 抗体の蛍光強度よりも低値を示した (図 3-a, -b, -c, -g, -h, -i)。一方で成長期毛包の下部に分布する上皮細胞では, 細胞質における抗 GFP の蛍光強度が, 抗 K15 抗体による蛍光強度よりも高値を示した (図 3-d, -e, -f)。

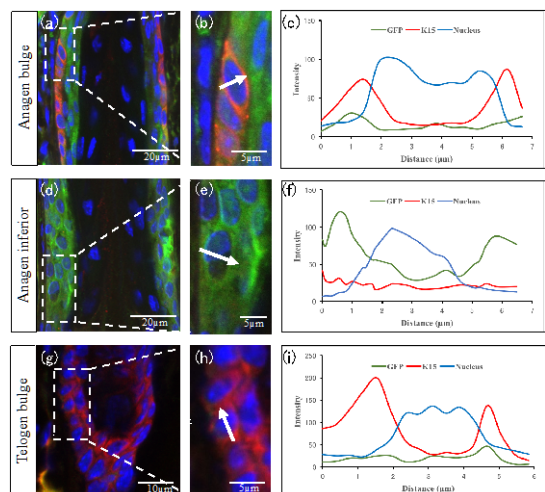


図3 成長期毛包のバルジ領域および毛包下部、ならびに休止期毛包のバルジ領域における GFP ならびに K15 の細胞内分布

さらに本研究では、成長期毛包のバルジ領域ならびに毛包下部の間で、上皮細胞の細胞質における抗 GFP 抗体の蛍光強度を定量的に比較解析した。その結果、バルジ細胞における抗 GFP 抗体の蛍光強度の中央値 [範囲] は 23.00 [11.94 - 44.12] であり、毛包下部の上皮細胞における同値 (73.44 [66.33 - 92.31]) よりも優位に低値を示した (図 4a; Mann-Whitney test, $P < 0.0001$)。

続いて成長期毛包と休止期毛包のバルジ細胞における、抗 GFP 抗体の蛍光強度を定量化して比較解析するため、各部位の細胞における GFP/K15 蛍光強度比を算出し、部位間で比較解析を行った。その結果、成長期毛包のバルジ細胞における蛍光強度比の中央値 [範囲] は 0.30 [0.19 - 0.68] であったのに対し、休止期毛包の外毛根鞘細胞における同値は 0.23 [0.08 - 0.42] であり、両者の間に有意差は認められなかった (図 4b; Mann-Whitney test, $P=0.0785$)。

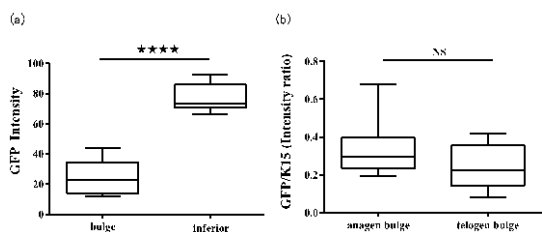


図4 成長期毛包のバルジ領域および毛包下部の細胞内における GFP の蛍光強度, ならびに成長期毛包と休止期毛包のバルジ領域における GFP/K15 蛍光強度比の比較 (Mann-Whitney test). **, $P < 0.0001$; NS, Not significant**

以上の結果より、成長期毛包および休止期毛包のバルジ領域では K15+NES+二重陽性細胞の存在を確認することはできなかった。今後は成体毛包および胎生期における K15+細胞および NES+細胞間の分化方向性についてさらに解析を行う必要があると考えられた。

(3) K15+細胞および NES+細胞の分化運命を解析するための組換え遺伝子の発現解析

pMSCV-DsRed^{flox}-EGFP プラスミドを単独で導入した A549 ヒト角化細胞株に 4-hydroxytamoxifen を添加したところ、一部の細胞で細胞質内に DsRed の発色が認められた(図 5a)。一方で pMSCV-DsRed^{flox}-EGFP プラスミドと K15-CreERT2 プラスミドを混合して導入した後に 4-hydroxytamoxifen を添加した細胞株では、一部の細胞で細胞質内に EGFP の発現が認められた(図 5b)。この結果より、K15-CreERT2 遺伝子は、タモキシフェン存在下において角化細胞内で Cre-loxP 組換えを誘導する可能性が示唆された。

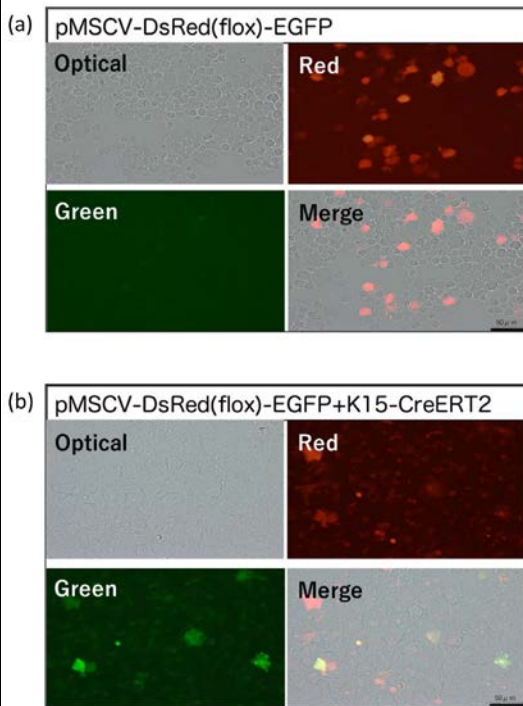


図5 A549 ヒト角化細胞培養株における DsRed および EGFP の発現

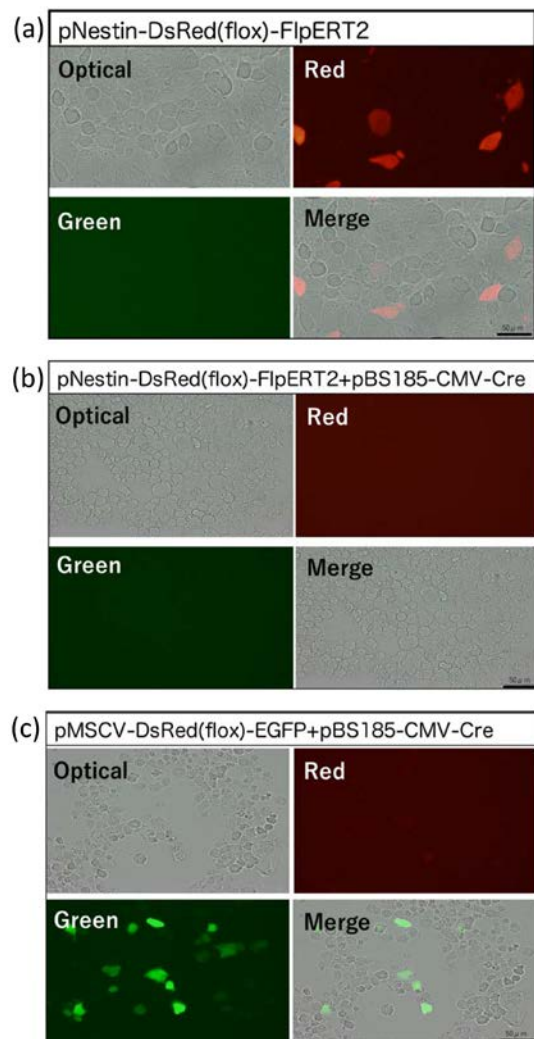


図6 Neuro2a マウス神経幹細胞株における DsRed および EGFP の発現

pNestin-DsRed^{fllox}-FlpERT2 プラスミドを単独で形質導入した Neuro2a マウス神経幹細胞株では、一部の細胞で細胞質内に DsRed の発現が確認された(図 6a)。しかしながら同プラスミドを pBS185-CMV-Cre プラスミドを混合して形質導入した細胞では、DsRed の発現は認められなかった(図 6b)。

pNestin- DsRed^{fllox}-EGFP プラスミドと pBS185-CMV- Cre プラスミドを混合して形質導入した細胞では、一部の細胞で細胞質内に EGFP の発現が確認された(図 6c)。以上の結果より、pNestin-DsRed^{fllox}-FlpERT2 遺伝子は Cre リコンビナーゼの存在下で DsRed 遺伝子を欠失する可能性が示唆された。

以上の結果より、本研究で作製した K15-CreERT2 遺伝子断片および pNestin-DsRed^{fllox}-FlpERT2 遺伝子断片は、胎生期および成体毛包における NES+細胞および K15+細胞の分化運命を解析するためのトランスジェニックマウスを作製するツールとして有用となる可能性が期待された。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

- ① Onishi S, Yokoi F, Ide K, Ohyama M, Nishifuji K. Progenitor cells expressing nestin, a neural crest stem cell marker differentiate into outer root sheath keratinocytes. 8th World Congress of Veterinary Dermatology. 2016, Bordeaux, France.

[その他]

ホームページ等

<http://kenkyu-web.tuat.ac.jp/Profiles/15/0001474/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西藤 公司 (NISHIFUJI Koji)
東京農工大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：20365422

(2) 研究分担者

井手 香織 (IDE Kaori)
東京農工大学・大学院農学研究院・講師
研究者番号：40550281

角田 茂 (KAKUTA Shigeru)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：80345032