

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591669

研究課題名(和文)細胞極性制御因子による皮膚幹細胞の維持機構

研究課題名(英文)Mechanism for the maintenance of skin stem cells by a cell polarity protein

研究代表者

長田 真一(Osada, Shin-Ichi)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：00244484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の上皮細胞の極性を制御する蛋白質aPKC (atypical protein kinase C lamda)の皮膚における役割を調べるために、表皮特異的にaPKC を欠損させた変異マウスを作製した。この変異マウスでは、毛周期が異常になり、進行性の脱毛、および表皮と脂腺の分化異常をきたした。これらの異常は、aPKC の欠損により毛包幹細胞の休眠誘導因子(Fgf18とBmp6)の発現が低下し、毛包幹細胞の休眠状態が破綻するためであることを見出した。以上の結果から、aPKC は毛包幹細胞の休眠状態を制御することにより、皮膚幹細胞の維持に関わっていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To examine the role of aPKC, which regulates the apico-basal epithelial polarity in mammals, in the epidermis, we generated mutant mice harboring epidermal specific deletion of aPKC. The mutant mice exhibited abnormal hair follicle cycling, progressive losses of pelage hairs, and altered differentiation into the epidermis and sebaceous gland. We found that in the mutant mice hair follicle stem cell quiescence was lost, as revealed by the decreased expression level of quiescence-inducing factors (Fgf18 and Bmp6). These results indicate aPKC is implicated in the maintenance of skin stem cells by regulating hair follicle stem cell quiescence.

研究分野：皮膚科学

キーワード：細胞極性 プロテインキナーゼC 毛包幹細胞 休眠 脱毛 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞内の重要なシグナル伝達分子であるプロテインキナーゼC (Protein kinase C, PKC) には、現在 10 種の分子種が存在し、構造と生化学的特徴から conventional PKC (cPKC)、novel PKC (nPKC)、atypical PKC (aPKC) に大きく分類されている。このうち aPKC は、PAR3、PAR6 という蛋白質と複合体 (aPKC-PAR 複合体) を形成して上皮細胞のタイトジャンクションに局在し、頂端基底極性 (apical-basal polarity: A-P 極性) の決定に、重要な役割を果たしている。

(2) 表皮は基底細胞層から角層まで、増殖と分化の統制のとれた極性構造を持つ。表皮細胞の極性を乱したときに、表皮全体の構造にどのような影響を及ぼすかを調べるために、aPKC-PAR 複合体を構成する分子の一つ、aPKC (ラムダ) を表皮特異的に欠損させたマウス (conditional knockout, cKO) を作製した。

(3) cKO マウスでは表皮細胞の A-P 極性が乱されることによって、規則正しい表皮構造が破壊されることを予想していたが、cKO マウスは予想に反し、体毛の脱毛がみられたばかりでなく、表皮や脂腺にも異常が見られた。毛包のバルジ領域には、毛包、表皮、脂腺の形成に関わる幹細胞が存在する。そこで、aPKC と毛包幹細胞の関係に注目した。

2. 研究の目的

哺乳類の上皮細胞の A-P 極性の形成には、進化的に保存された aPKC-PAR 複合体が重要な役割を果たしている。aPKC-PAR 複合体を構成する分子の一つ、aPKC (ラムダ) を表皮特異的に欠損させたマウス (cKO マウス) を作製したところ、変異マウスは脱毛をきたし、表皮も肥厚した。これは、aPKC が表皮の恒常性の維持に密接に関与していることを示唆している。本研究では、細胞極性制御因子 aPKC がどのようにして皮膚幹細胞の維持に関わっているのか、そのメカニズムを解析した。

3. 研究の方法

(1) Cre-loxP システムを用いた表皮特異的 aPKC 欠損マウス (cKO マウス) の作製

皮膚基底細胞に発現する Keratin 5 のプロモーターの下流に Cre リコンビナーゼをつないだ Keratin 5-Cre マウスと、aPKC の制御ドメインをコードする exon 5 の前後に loxP 配列を挿入した flox アレルを持つマウス (aPKC^{floxES/floxES}、コントロールとして使用) を作製し、両者をかけ合わせて cKO を作製した。

(2) cKO マウスの表現型の解析

毛包形成期と毛周期で複数の観察点を取

り、肉眼、及び HE 染色で cKO マウスの脱毛の進行過程を詳細に調べた。

表皮分化マーカー (Keratin10, Loricrin) の発現を蛍光免疫組織染色で調べ、cKO マウスにおける表皮分化の異常の有無を調べた。

脂腺分化マーカー (Adipose differentiation-related protein, ADFP) の発現を蛍光免疫組織染色で調べ、cKO マウスにおける脂腺分化の異常の有無を調べた。

(3) cKO マウスで脱毛をきたすメカニズムの解析

毛包幹細胞マーカーである $\alpha 6$ -integrin, CD34, Keratin 15, Lrig1, Lgr5, Lhx2, P-cadherin, Sox9 の発現を蛍光免疫染色で調べ、cKO マウスにおける毛包幹細胞の動態を解析した。

幹細胞は生体内でゆっくり分裂するため、分裂時に核に取り込まれたラベルを保持する細胞 Label-retaining cell (LRC) として検出される。生後 3 週令マウスの腹腔内に Bromodeoxyuridine (BrdU) を注射し、8 週令に達したところで解析し、cKO マウスでは Label-retaining cell (LRC) が減少しているか検討した。

フローサイトメトリーで毛包幹細胞は CD34、および $\alpha 6$ -integrin 陽性細胞として同定することができる。そこで、フローサイトメトリー法を用いてコントロールマウスと cKO マウスで毛包幹細胞数を定量して比較した。

4. 研究成果

(1) 毛包形成期と毛周期で複数の観察点を取り、肉眼で cKO マウスの脱毛の進行過程を詳細に調べた。その結果、cKO マウスでは、加齢と共に徐々に脱毛が進行し、生後 1 年ほどでほぼ全脱毛になることがわかった (図 1)。また、cKO マウスでは体毛だけでなく、ヒゲも短くなることがわかった。



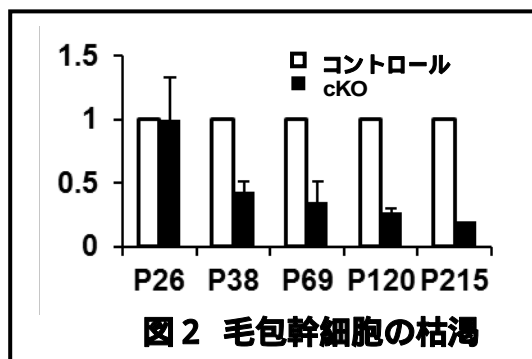
(2) コントロールマウスの毛包は、生後約 3 週で休止期に入り、以後成長期 (4~6 週)、退行期 (6~7 週)、休止期 (7 週~) という周期に入る。ところが、cKO マウスでは、最初の休止期に入るのが約 5 週と遅れ、毛包も

著しい変形を示した。この著しく変形した毛包もその後成長期に入るが、退行期に移行することなく、成長期様の形態を維持し続けた。しかし、生後3か月ころから cKO マウスの毛包は次第に変性していき、1年を経過するころには正常の毛包構造はほとんど確認できなかった。

(3) 成体マウスの表皮は通常2~3層の角化細胞からなるが、cKO マウスの表皮は数層にまで達し、著しく肥厚していた。表皮の分化マーカーで免疫染色を行うと、cKO マウスでは、K10、および loricrin の発現領域が著しく拡大していた。また、脂腺も脂肪滴のマーカーである ADFP で染色すると、cKO マウスでは、染色領域が広がっており、成熟した脂腺が過形成になっていることがわかった。以上より、cKO マウスでは、表皮、および脂腺の分化プログラムが異常をきたしていることが明らかになった。

(4) cKO マウスで毛包形成の異常、分化の異常が起こるのは、毛包幹細胞に異常があるのではないかと考え、種々の毛包幹細胞マーカーの発現を検討した。その結果、コントロールマウスと cKO マウスで発現が変わらないもの($\alpha 6$ -integrin)、cKO マウスでは発現が低下するもの(Sox9, Lhx2)、cKO マウスで発現が拡大するもの(Lrig1)、発現時期や局在が異常になるもの(Keratin 15, Lgr5, P-cadherin)があることがわかった。このことは、aPKC が毛包幹細胞マーカーの発現や局在を制御していることを意味している。

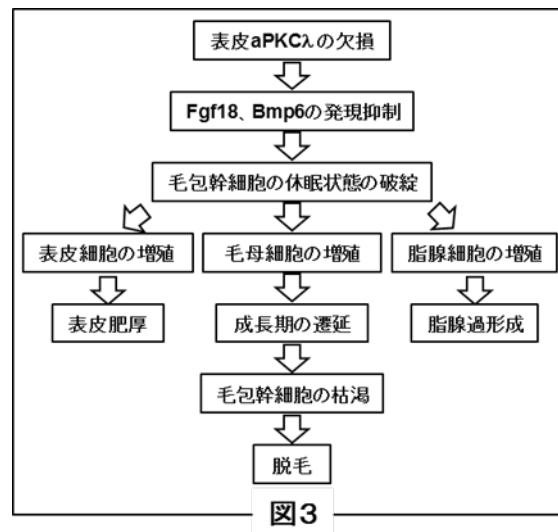
(5) フローサイトメトリーで、CD34、および $\alpha 6$ -ingegrin 陽性となる毛包幹細胞を定量した。その結果、コントロールマウスの幹細胞数を1として比較すると、cKO マウスでは、毛包幹細胞が加齢と共に徐々に枯渇していくことがわかった(図2)。また、label retaining 法でも、cKO マウスでは LRC が著しく減っていることがわかった。



(6) 毛包幹細胞の休眠状態の維持は、バルジ領域の内側に存在する keratin6 陽性細胞から分泌される Fgf18、および BMP6 が重要な役割を果たしている。そこで、cKO マウスで Fgf18、および BMP6 の発現を調べたところ、

両者の発現が mRNA レベルでも蛋白レベルでも著しく低下していることが分かった。このことは、aPKC は、毛包幹細胞の休眠状態の維持に必要なシグナル経路を制御していることを示唆している。

以上の結果から、次のようなメカニズムが考えられた(図3)。cKO マウスでは、aPKC の欠損により、毛包幹細胞は休眠状態を保てなくなり恒常的に活性化状態となる。その結果、表皮細胞、脂腺細胞は活発に分裂、増殖し、表皮肥厚と脂腺肥大をきたす。一方、毛包細胞も活発に増殖し続けるため成長期が遷延化するが、次第に幹細胞プールが枯渇し脱毛となる。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Shin-Ichi Osada, Naoko Minematsu, Fumino Oda, Kazunori Akimoto, Seiji Kawana, and Shigeo Ohno. Atypical protein kinase C isoform, aPKC, is Essential for Maintaining Hair Follicle Stem Cell Quiescence. J Invest Dermatol (印刷中)

[学会発表](計4件)

Shin-Ichi Osada, Naoko Minematsu, Fumino Oda, Kazunori Akimoto, Seiji Kawana, and Shigeo Ohno. An apico-basal cell polarity protein aPKC is essential for the hair follicle cycling and hair follicle stem cell quiescence. The 44th Annual European Society for Dermatological Research Meeting, 2014年9月11日、コペンハーゲン(デンマーク)

長田真一、峰松直子、小田文乃、秋本和憲、川名誠司、眞鍋 求、大野茂男: 細胞極性因子 aPKC は毛包幹細胞の維持に必要である、

第22回毛髪科学研究会、2014年11月29日、
大手町サンケイプラザ（東京）

長田真一、眞鍋 求：The Roles of aPKC in
Maintaining Epidermal Homeostasis.第28
回表皮細胞研究会、2014年12月6日、城山
観光ホテル（鹿児島）

長田真一、峰松直子、小田文乃、秋本和憲、
川名誠司、大野茂男：A cell polarity protein,
aPKC ϵ , is essential for maintaining hair
follicle stem cell quiescence and hair
follicle regeneration. 第39回日本研究皮
膚学会年次学術大会、2014年12月12日、
ホテル阪急エキスポパーク（大阪）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長田 真一（OSADA, Shin-Ichi）
秋田大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：00244484

(3) 連携研究者

大野 茂男（OHNO, Shigeo）
横浜市立大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10142027

秋本 和憲（AKIMOTO, Kazunori）
東京理科大学・薬学部・准教授
研究者番号：70285104