

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660237

研究課題名(和文) 上皮性皮膚腫瘍における未知の分化転換機構の解明と関連遺伝子群の網羅的探索

研究課題名(英文) Investigation of unknown transdifferentiation mechanisms of cutaneous epithelial tumor and related genes

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では神経提細胞マーカーであるNestin陽性細胞の、皮膚における局在および分化運命について解析したと共に、皮膚腫瘍における同細胞の挙動について解析した。その結果、毛乳頭や皮膚腫瘍周囲の真皮には、Nestinを発現する紡錘形細胞ならびに血管周皮細胞が分布していることを証明した。また外毛根鞘細胞、ならびにケラトア坎トーマを構成する角化細胞が、Nestin陽性細胞の娘細胞により構成されることを証明した。これらの結果は、nestinを発現する紡錘形細胞が角化細胞の増殖に関与している可能性、また毛包上皮や一部の皮膚腫瘍を構成する角化細胞が、神経堤幹細胞の娘細胞である可能性を示唆するものとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated distribution and differentiation potential of nestin-expressing cells in normal skin, cutaneous tumor and wounded skin. The nestin-expressing spindle cells and pericytes are distributed in dermal papilla, as well as dermis surrounding cutaneous epithelial tumor and wounded skin. In addition, we found that keratinocytes in outer root sheath cells, keratoacanthoma and wounded skin are daughter cells of nestin-expressing cells. These findings imply that nestin-expressing spindle cells contribute to keratinocyte proliferation, and some of keratinocytes in hair follicle and cutaneous epithelial tumors consist of daughter cells of the neural crest stem cells.

研究分野：獣医学

キーワード：ネスチン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 毛包における上皮系幹細胞の存在は既知の事実であるが、その他にも神経堤幹細胞マーカーである Nestin を発現した多能性幹細胞が毛包に存在することが過去に報告されている。Nestin プロモーターの下流に GFP 遺伝子を挿入したトランスジェニックマウスを用いた解析では、GFP 陽性細胞が毛包膨大部の外毛根鞘に局在することが示されている。

一方でヒト毛包では、Nestin 陽性細胞が毛包周囲の結合組織や毛乳頭に存在するのに対し、上皮組織からは検出されないことが報告されている。さらにイヌでは、毛包狭部に分布する角化細胞が均一に Nestin を発現していたことが報告されている。ここまでの報告を総合した限りでは、哺乳動物における同細胞の組織学的分布については、十分な統一見解が得られているとはいえない。また毛包に存在する神経堤幹細胞の分化運命についても十分に解明されておらず、より詳細な解析が求められている。

(2) 医学分野では、ヒトの外毛根鞘腫、パピローマウイルス感染に伴うボーエン病やボーエン癌において、腫瘍化した角化細胞が Nestin を発現することが過去に報告されている。これに対しヒト基底細胞癌では、腫瘍化した角化細胞は Nestin を発現しないことが示されている。

一方でヒトやイヌに発症した基底細胞癌や有棘細胞癌において、腫瘍化した上皮細胞が Nestin を発現するとする報告もあり、これまでのところ十分な統一見解が得られているとはいえない。また仮に腫瘍化した上皮細胞が Nestin を発現していたとしても、それらの腫瘍細胞が外毛根鞘細胞に由来するのか、あるいは上皮系細胞である角化細胞が神経堤細胞へと分化転換するのかについても十分に解明されておらず、より詳細な解析が求められている。

## 2. 研究の目的

(1) Nestin 陽性細胞およびその娘細胞が GFP を発現するコンディショナルノックアウト (CKO) マウスを作出し、同マウスの毛包における GFP 陽性細胞の組織内分布について解析した。

(2) CKO マウスの皮膚に化学発癌を惹起させ、発癌過程における GFP 陽性マウスの挙動について解析した。

(3) 健常イヌ皮膚、イヌに自然発症した上皮性皮膚腫瘍、ならびにイヌ皮膚の全層欠損部における Nestin 陽性細胞の組織内分布および表現型について解析した。

## 3. 研究の方法

(1) 既報告において作出された NES-CRE マウ

ス(京都大学 景山龍一郎氏より譲渡)と CAG-CAT-EGFP マウス(大阪大学 宮崎純一氏より譲渡)を交配し、Nestin プロモーター遺伝子の活性化において Cre-loxP 部位特異的組換えにより GFP を発現する CKO マウスを作出した。また同マウスの毛包における GFP 陽性細胞の局在を、免疫組織化学染色及び蛍光抗体法により解析した。

(2) 上述した CKO マウスの皮膚に 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA) および 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を塗布して化学発癌を惹起させ、腫瘍組織中 (n=3) における GFP 陽性細胞の局在を解析した。

(3) 健常イヌ (n=3) の皮膚、イヌ上皮性皮膚腫瘍 (n=28)、ならびにイヌ皮膚全層欠損部 (n=3) における Nestin 陽性細胞の局在を解析するため、抗 Nestin 抗血清を用いた免疫組織化学染色を実施した。さらに同細胞の表現型を確認するため、抗 keratinocyte 抗体 (AE1/AE3)、抗メラノサイト抗体 (PNL1)、抗 Vimentin 抗体、抗 von Willebrand Factor (vWF) 抗体、抗 CD31 抗体、抗 Desmin 抗体ならびに抗  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ SMA) 抗体を用いた二重蛍光染色法を実施した。

## 4. 研究成果

(1) NES-CRE/CAG-CAT-EGFP CKO マウスの皮膚では、成長期毛包の毛乳頭細胞、ならびに結合組織鞘に分布する紡錘形細胞において GFP の発現が認められた。また毛包上皮を構成する角化細胞のうち、成長期毛包の最外層において GFP の発現が認められたが、毛幹を構成する角化細胞ならびに表皮角化細胞では GFP の発現が認められなかった (図 1)。

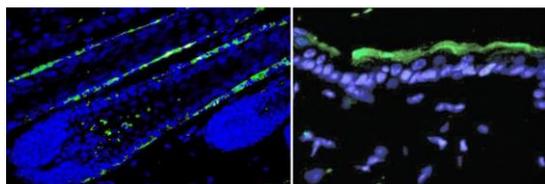


図 1. 成長期毛包(左)および表皮(右)における GFP の発現。毛包の最外層および表皮の角層に緑色の蛍光が認められるが、毛幹ならびに表皮角化生細胞には同様の蛍光が認められない。

続いて毛包最外層に分布する GFP 陽性細胞の組織学的局在について解析するため、抗 GFP 抗体、外毛根鞘細胞マーカーである Keratin 14、内毛根鞘細胞マーカーである Trichohyalin に対する抗体を用いた二重蛍光染色法を実施した。その結果、上述の GFP 陽性細胞は Keratin 14 陽性であったのに対し、Trichohyalin は陰性であった (図 2)。

一方で抗 Nestin 抗血清を用いた免疫蛍光染色では、毛乳頭細胞および結合組織鞘に分

布する紡錘形細胞において Nestin の発現が認められたのに対し、外毛根鞘細胞には Nestin の発現が確認できなかった。

以上の結果から、前述の CK0 マウスでは Nestin 陽性細胞が、成長期毛の毛乳頭および結合組織鞘に分布することが示された。また同細胞の娘細胞が、外毛根鞘に分布することが示された。

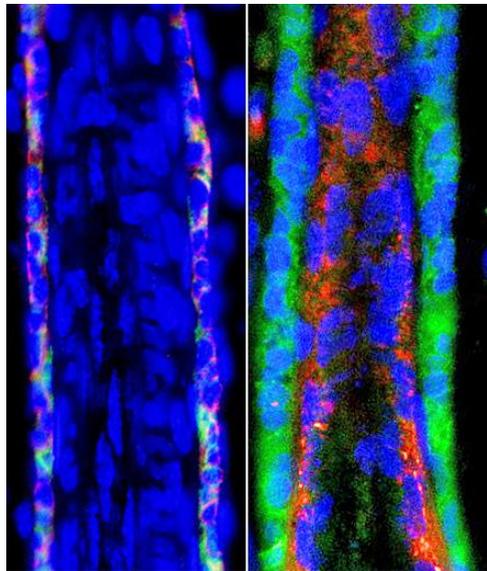


図 2. Nestin, Keratin 14, Trichohyalin に対する二重蛍光染色法所見。(左) Nestin (緑) Keratin 14 (赤)、(右) Nestin (緑) Trichohyalin (赤)。Nestin 陽性細胞は Keratin 14 陽性細胞と共在するのに対し、Trichohyalin 陽性細胞とは共在しない。

(2) 前述した CK0 マウスの皮膚に DMBA および TPA を塗布したところ、ヒトおよびイヌ keratoacanthoma に矛盾のない組織像をマウスの皮膚に再現することができた。

再現した腫瘍組織中における GFP 陽性細胞の局在を、抗 GFP 抗体を用いた免疫組織化学染色により解析した。その結果、腫瘍組織を構成する角化細胞の一部が GFP を発現することを確認した (図 3)。さらに同組織の周囲に存在した比較的小型の腫瘍における GFP 陽性細胞の局在を観察したところ、基底細胞の一部、ならびに有棘細胞および顆粒細胞の多くが GFP 陽性であることを確認した (図 3)。

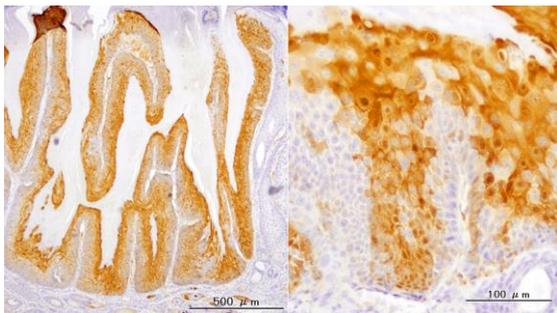


図 3. 化学発癌により CK0 マウスに発現した keratoacanthoma の免疫組織化学染色所見 (抗 Nestin 抗血清)。(左) 腫瘍組織の上皮内に Nestin 陽性細胞が認められる。(右) Nestin 陽性細胞は基底細胞の一部と有棘細胞～顆粒細胞の大部分を構成している。

一方で、抗 Nestin 抗血清を用いた免疫組織化学染色では、上述の腫瘍組織における上皮細胞中における Nestin の発現は確認できなかった。

以上の結果より、前述の CK0 マウスにおける keratoacanthoma の発生過程においては、腫瘍細胞の一部が外毛根鞘細胞に由来する可能性が示唆された。

(3) 健常犬の皮膚では、Nestin 陽性細胞がマウスと同様に毛乳頭および結合組織鞘に分布することが確認された。また外毛根鞘のケラチン陽性細胞や毛球部のメラノサイトは、Nestin を発現していないことが確認された (図 4)。さらに Nestin 陽性細胞は、間葉系細胞マーカーである Vimentin を発現していることが示された。

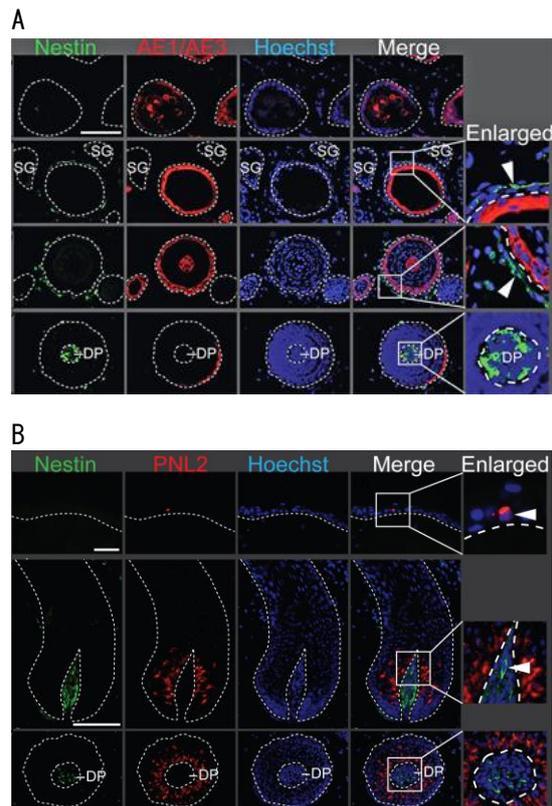


図 4. 健常犬の毛包における Nestin, AE1/AE3 (Keratin : A) および PNL2 (メラノサイト抗原 : B) の組織内分布。Nestin 陽性細胞は結合組織鞘および毛乳頭に認められる。AE1/AE3 陽性細胞ならびに PNL2 陽性細胞は、Nestin を共発現していない。

またイヌに自然発症した有棘細胞癌 (n=15)、毛包上皮腫 (n=18)、毛芽腫 (n=4) ならびに皮内角化上皮腫 (n=3) における、Nestin 陽性細胞の組織学的局在を解析するため免疫組織化学的解析を実施した。その結果、いずれの組織においても Nestin 陽性細胞は、腫瘍周囲の間質中に認められた (図 5)。二重蛍光染色法により、この Nestin 陽性細胞はいずれも Keratin 陰性、メラノサイト抗原陰性、Vimentin 陽性であることが示された。

各組織における Nestin 陽性間質細胞の頻度は、有棘細胞癌で 93.3% (14/15)、毛包上皮腫で 38.9% (7/18)、毛芽腫で 50.0% (2/4)、皮内角化上皮腫で 33.3% (1/3) であった。一方で上述のイヌ腫瘍組織のいずれにおいても、角化細胞中に Nestin の発現は確認されなかった。

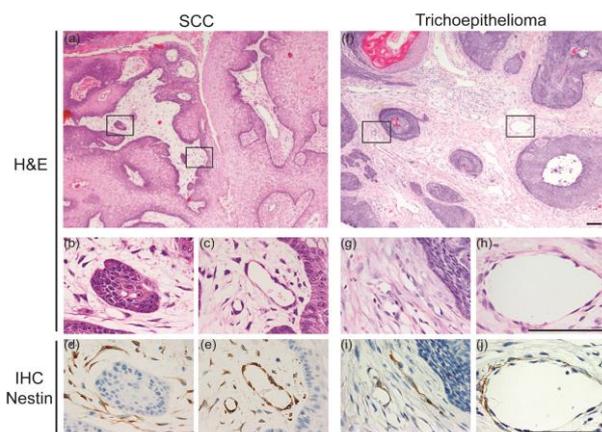


図 5. 有棘細胞癌 (SCC) および毛包上皮腫 (Trichoepithelioma) Nestin 陽性細胞の分布。Nestin を発現する紡錘形細胞が、腫瘍周囲の間質 (d, i) および毛細血管壁 (e, j) に認められる。一方で腫瘍を構成する上皮細胞中には、Nestin の発現は確認されない。

続いてイヌ皮膚腫瘍の結合組織に認められる Nestin 陽性細胞のうち、毛細血管壁を構成する細胞の表現型を二重蛍光染色法により解析した。その結果、同細胞が血管内皮細胞マーカーである vWF や CD31 を発現する細胞よりも周囲に分布し、血管周皮細胞マーカーである Desmin や  $\alpha$ SMA を共発現する事を確認した (図 6)。

さらにイヌに作出した皮膚全層欠損部における、Nestin 陽性細胞の組織学的分布、経時的挙動ならびに表現型について観察した。その結果、受傷後 7 日目において創傷部直下の結合組織に Nestin を発現する紡錘形細胞が旺盛に発現し、18 日目には減少したものの一部の細胞が管腔構造を形成していた (図 7)。さらに同細胞の表現型を観察したところ、Nestin とともに Desmin や  $\alpha$ SMA を共発現する細胞の頻度が経時的に増加した。

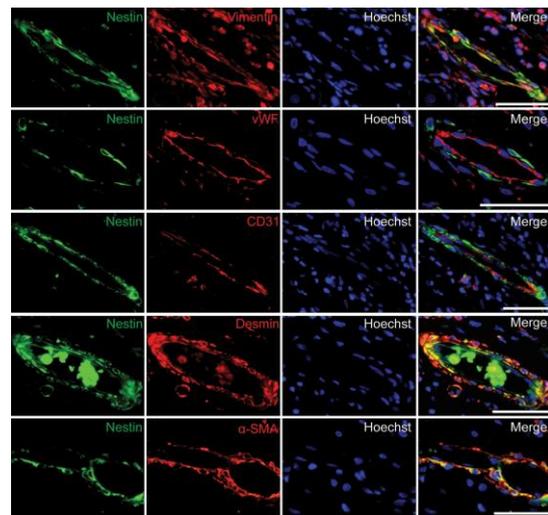


図 6. イヌ有棘細胞癌の結合組織に分布する毛細血管の二重蛍光染色法所見。Nestin 陽性細胞は Vimentin 陽性で、血管内皮細胞マーカーである vWF や CD31 を発現する細胞の周囲に分布し、Desmin や  $\alpha$ SMA を共発現している。

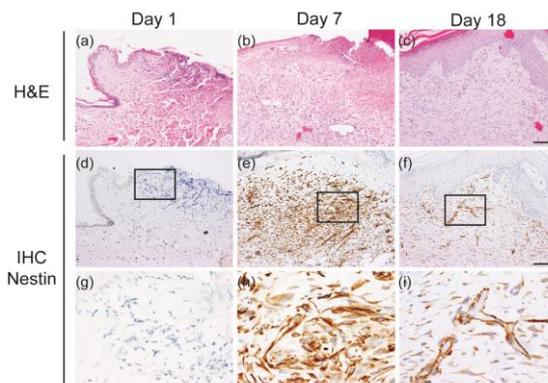


図 7. イヌ皮膚に作出した皮膚全層欠損部における Nestin 陽性細胞の発現。Nestin 陽性細胞は受傷後 7 日目で、創傷部直下の結合組織に旺盛に認められる。受傷後 18 日目には同細胞の頻度が減少しているものの、一部の細胞が管腔構造を形成している。

以上の結果より、イヌ皮膚においては Nestin が毛乳頭細胞や腫瘍間質細胞など、増殖の旺盛な角化細胞に隣接して局在することが確認された。さらにイヌ皮膚腫瘍および皮膚全層欠損部においては、結合組織中に紡錘形細胞が認められるとともに、同細胞の一部が血管周皮細胞へと分化することが示された。この事実は、前述の結合組織中に分布する Nestin 陽性細胞が、直接または血管周皮細胞へと分化することで、角化細胞の増殖を促進する役割を有する可能性を示唆するものと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

- ① Mineshige T, Yasuno K, Sugahara G, Shimokawa N, Kamiie J, Nishifuji K, Shirota K: Trichoblastoma with Abundant Plump Stromal Cells in a Dog. Journal of Veterinary Medical Science. 2014. 76: 735-739. 査読有

〔学会発表〕（計 1 件）

- ① Wang YH, Ide K, Shirota K, Nishifuji K: Distribution of nestin-expressing cells in normal hair follicle and epithelial tumors in dogs. 3rd Asian Meetings of Animal Medicine Specialties. 2013, Bogor, Indonesia.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）

〔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

代田 欣二 (SHIROTA Kinji)  
麻布大学・獣医学部・教授  
研究者番号：70149322

### (3) 連携研究者

大山 学 (OHYAMA Manabu)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号：10255424