

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893289

研究課題名(和文) In vivoイメージングを用いた毛包幹細胞の恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文) Toward understanding regulatory mechanisms of stem cell homeostasis in hair follicles by in vivo imaging

研究代表者

森田 梨津子 (Morita, Ritsuko)

独立行政法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・研究員

研究者番号：20700040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：自己複製能と多分化能を有し、組織の恒常性を支える幹細胞は、生涯に渡って細胞の供給源として機能するために、様々な内因性・外因性のストレスに対して柔軟かつ的確に対応し、自身を維持していると考えられる。本研究では、マウス成体毛包のin vivoイメージングシステムを確立し、連続あるいは間歇的に、毛周期を通して毛包と周囲組織の細胞動態を1細胞レベルの解像力で観察することを可能とした。本技術を用いて、毛包の特定の幹細胞集団を人為的に消失させた時の修復応答を解析することにより、毛包には、幹細胞の枯渇や損傷に対して可逆的に細胞運命を転換し、一定の比率で幹細胞を維持するシステムが存在することが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to maintain stem cells as a lifelong reservoir, the stem cell system needs to be resistant against the external or internal stress robustly. In this study, I have established in vivo live imaging system that allows us to capture the stem cell dynamics during hair regeneration process continuously or intermittently. I removed the certain stem cell populations by laser ablation and traced the repair process by the intermittent live imaging. The day after ablation, cell influx from the adjacent area occurred and the ablated region was filled up within 6 days, recovering marker gene expression. This analysis suggests that stem cell fate can be changed reversibly for keeping the ratio of stem cell populations robustly. These analyses will enable us to understand the physiological behaviour, heterogeneity, hierarchy and plasticity of hair follicle stem cells in the relationship with their microenvironment.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：in vivo imaging

### 1. 研究開始当初の背景

幹細胞は、各組織を構成する様々な細胞の源となる細胞で、自己複製能と多分化能を併せ持つ。成体組織においては、各組織に少数存在する組織幹細胞が生涯にわたって自身を維持するとともに、必要に応じて増殖・分化することにより、組織や臓器の恒常性を維持している。幹細胞が、生涯に渡り細胞の供給源として機能するためには、様々な内因性・外因性ストレスに耐える柔軟でロバストな維持システムが必要であると考えられる。

これまでに同定されたほとんどの組織幹細胞は、組織内の特定の場所に存在するため、その幹細胞周囲の微小環境(幹細胞ニッチ)からのシグナルが、幹細胞の自己複製能や多分化能の制御に関与していると考えられている(*Cell* 132(4):598-611,2008)。最近では、ニッチから幹細胞への一方向性の制御に留まらず、幹細胞が周囲細胞に対してニッチを提供し、双方向にコミュニケーションを取ることで、特殊化した細胞の分布、維持、さらには器官全体としての高次機能の発現に寄与する可能性が報告されている(*Cell* 144:577-89,2011; *Cell* 145: 926-940, 2011; *Cell Stem Cell*, 8(2):177-187, 2011; *Nature* 448:1015-1021, 2007)。加えて、幹細胞とそれを取り巻くニッチは、当初考えられていたよりも柔軟でロバストな幹細胞維持システムを構築している可能性も示唆されている。例えば、幹細胞から前駆細胞、機能細胞が生み出される過程は不可逆的であると考えられてきたが、精巣や腸管において、一度分化方向に向かった細胞から未分化な幹細胞が可逆的に生み出される現象が確認されている(*Science* 328(5974):62-7, 2010; *Nature cell biology* 14:1099-1104, 2012)。

私たちがモデルとする皮膚とその付属器官である毛包は、生涯にわたって再生を繰り返す器官であり、幹細胞研究の良いモデルである(*Trends Genet* 8(2):55-61, 1992)。正常な毛周期における毛包の再生は、幹細胞とそのニッチの存在を示唆し、これまでに、label retaining 法から、毛包の幹細胞ニッチとしてバルジ(bulge)領域が同定されてきた。最近では、幹細胞領域の遺伝子発現解析と細胞系譜追跡により、長期にわたり休眠状態で維持されるバルジ幹細胞に加えて、毛包の再生を直接的に担う細胞を生み出す毛芽領域(hair germ)や、毛包形成に加え表皮損傷時に表皮の再建を担うバルジ上部領域(upper bulge)が明らかになってきた。こうした異なる役割を担う幹細胞は、緊急時には可逆的に互いを補完

することなどを通じて、毛包および表皮の恒常性と再生を支えている可能性が考えられる。しかし、複数種類の幹細胞・前駆細胞間のヒエラルキーやその役割、可塑性の有無は十分に理解されていない。また、傷害やストレスに対して、幹細胞がどのように対処し恒常性を維持しているのかもほとんど不明である。

そこで、毛周期の再生・退行期における各種毛包上皮幹細胞と周囲細胞の移動、分裂頻度、分化の方向、細胞死を定量的に解析する *in vivo* imaging 技術を確立することで、上皮幹細胞の毛再生への寄与とその役割の違い、幹細胞間のヒエラルキーを理解できると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、幹細胞システムの恒常性を支える柔軟でロバストな機構を理解するために、成体毛包幹細胞の挙動を時空間的に解析することを目指し、マウスの毛包をモデルとして (1)*in vivo* における毛包全体のライブセルイメージング技術を細胞レベルの分解能で確立する。さらに (2)特定の細胞系譜と幹細胞ニッチを時空間的に消失させたときの幹細胞の応答から、各幹細胞集団の恒常性、可塑性、そして、それらの細胞外環境の役割を理解することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス毛包の *in vivo* ライブイメージングシステムの確立

毛周期を通して毛包と周囲組織の組織構造と、毛包表皮及び間質細胞の細胞動態を追跡するために、組織の深部までイメージング可能な多光子顕微鏡システム(Olympus)と細胞の核および細胞膜を蛍光標識した遺伝子改変動物(R26-H2B-GFP, R26-Lyn-Venus)を用いて、*in vivo* イメージング系を確立した。動物は吸入麻酔薬を用いて全身麻酔をかけ、自作ステージ上に固定して6~48時間の撮影を行った。撮影中は、マウスの体温、心拍、動脈血酸素飽和度の測定を行い、排泄の有無を確認しながら、適宜輸液を行った。

#### (2) 環境の変化に应答する幹細胞の恒常性維持機構の理解

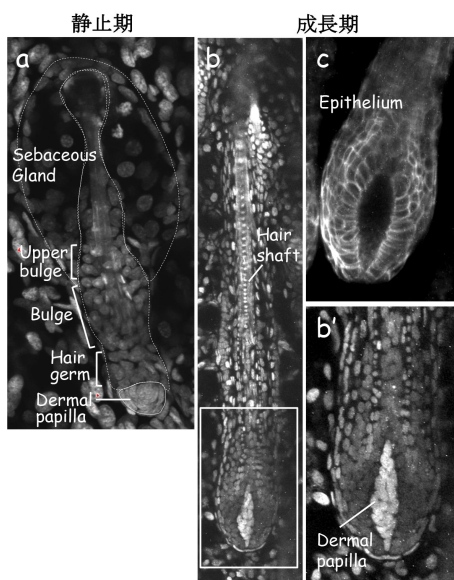
周囲環境や幹細胞領域そのものの損傷に対する幹細胞の修復応答や恒常性を解析するために、upper bulge 領域、bulge 領域、hair germ 領域をレポーターマウスを用いて特異的に標識し、1つの幹細胞集団をレーザーアブレーションによって部分的にあるいは完全に

消失させたときの、周囲細胞の修復応答を経時的に解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) マウス毛包の *in vivo* ライブイメージシステム の確立

成体毛包は生涯を通じて、再生、退縮、休止を繰り返す。こうした毛周期はマウスでは約1ヶ月の期間を要することから、毛再生過程における幹細胞の挙動は、これまで主に組織学的な解析を通して解析されてきた。成体マウス体毛の *in vitro*における器官培養の成功例はなく、生きた個体で毛包幹細胞の動態を直接に観察する手法が長い間求められてきた。最近、成体毛包幹細胞の3次元 *in vivo*動態解析が報告されたものの、1研究室からの報告に留まっております (Nature 487:496-9, 2012; Science 343:1353-6, 2014)、いまだ技術的には未開の領域といえる。そこで本研究では、生きた個体の毛包をイメージングする技術の開発から着手した。成体毛包は表皮下に数百μmにわたって存在するため、毛包全体を可視化するために、組織深部までイメージング可能な多光子顕微鏡と細胞の核および細胞膜を蛍光標識した遺伝子改変動物を用いて検討を行った。自作ステージにて適切にマウスの観察部位を固定することにより、休止期、退行期のみならず、最も毛包が長く伸長した成長期においても、毛包全体と周囲組織を視野に捉え、毛の産生される様子を1細胞レベルの解像力で *in vivo*において観察することができた (Fig. 1)。さらに、麻酔条件を調節することで、こうした細胞



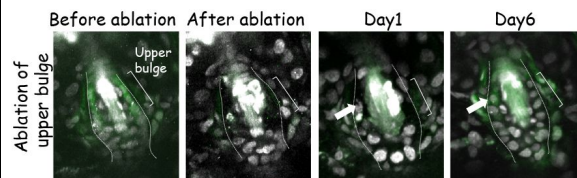
**Fig.1 成体毛包の *in vivo* イメージング**  
(a, b) R26-H2BEGFP マウスの静止期 (a) および成長期毛包 (b)。 (c) K5-Lyn-Venus マウスの毛包上皮組織。

動態を48時間の連続ライブイメージングにより安定的に捉えることを可能とした。また、1ヶ月にわたる毛周期を通じて同一の幹細胞の動態を追跡するために、数日おきに同一毛包を観察する間歇的なイメージング手法を確立した。本技術では、従来の遺伝学的細胞系譜追跡法に加えて、光変換型蛍光タンパク質を発現する遺伝子改変動物を用いることで、同一毛包における特定の幹細胞を経時的かつ間歇的に長期追跡することが可能となっている。

先行の研究報告では、最も長い連続観察時間は16時間程度に留まり、毛包が長く伸長する成長期毛包全体を捉えた報告は存在しない。しかしながら、本研究においてはこの点を大幅に改善し、48時間、連続的に細胞動態を観察することを可能としている。さらに、最も毛包が長く伸長した成長期においても、毛包全体を1細胞レベルの解像力で捉えることを可能とした。本技術の確立により、生体内のより自然な幹細胞動態を明らかにするだけでなく、遺伝子発現を可視化できるレポーターマウスを組み合わせることにより、時空間的に加えられた環境変化に対する細胞の応答や動態の変化を、遺伝子発現の変化や空間情報とともに解析することを可能とすると考えられる。

##### (2) 環境の変化に responding 幹細胞の恒常性維持機構の理解

続いて、幹細胞集団の枯渇や周囲環境の損傷に対して、細胞はどのように備え、恒常性を維持しようとするのかを明らかにするために、特定の幹細胞集団や周囲環境を任意に消失させたときの幹細胞の修復応答を解析した。毛包における代表的な幹細胞領域のひとつであるupper bulge領域を、Gli1-EGFPマウスを用いて可視化し、本領域をレーザーアブレーションによって消失させたところ、1日後から細胞の流入が認められ、6日後には損傷領域が完全に修復し、Gli1EGFPの発現の回復も認められた (Fig. 2)。さらに広範囲にupper bulge領域と隣接するbulge領域の一部を消失させると、数日経過後も損傷した幹細胞領域は修復せず、



**Fig.2 レーザーアブレーションによる幹細胞領域の除去と修復応答。** Gli1-EGFP/R26-H2BmCherry マウスのGli1陽性Upper bulge領域を、レーザーアブレーションにより除去し、修復応答を観察した。

しかしながら、そのまま成長期に入り毛包は伸長しうることが明らかになった。さらに、毛周期が回ったあとには、元通りの比率で各種幹細胞領域が修復することが確認された。このことから、毛包には、幹細胞の枯渇や損傷に対して、可逆的に細胞運命を転換し、一定の比率で幹細胞を維持するシステムの存在が強く示唆された。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

Ritsuko Morita, Toward understanding regulatory mechanisms of stem cell homeostasis in hair follicles by in vivo imaging, CDB Retreat, Unitopia Sasayama, 兵庫, 篠山, 2014年9月29日, ポスター発表  
森田 梨津子, In vivoイメージングを用いた毛包幹細胞の恒常性維持機構の解析, 第2回皮膚の会, ホテル古湧園, 愛媛, 松山, 2014年3月15日, 口頭発表

Ritsuko Morita, Analysis of Tooth Germ Epithelium Morphogenesis by using a Novel Four-dimensional Cell Tracking System, 第51回日本生物物理学会年会シンポジウム, 国立京都国際会館, 京都, 京都, 2013年10月29日, 口頭発表(招待講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

森田 梨津子(MORITA RITSUKO)

独立行政法人理化学研究所

・多細胞システム形成研究センター・研究員

研究者番号:20700040

##### (2) 研究分担者 なし

##### (3) 連携研究者 なし