

48. 毛包幹細胞リモート制御メカニズムの解明

京都大学医生物学研究所 助教 一條 遼

概要

皮膚に存在する毛包は伸長と退縮を繰り返す非常にユニークな器官である。毛包には毛包幹細胞が存在する。毛包幹細胞のニッチに関する研究は数多く報告されているが、毛包幹細胞から離れた領域から制御を受けるかについては未解明である。皮膚の深層には筋膜という未知の組織が存在する。筋膜の恒常性、存在意義に関しては全くの未解明である。申請者はマウス皮膚組織から外科的処置により筋膜を除去する実験系を確立し、毛包幹細胞の制御に筋膜が重要であることを明らかにした。さらに single cell RNA sequencing (scRNA seq)を実施することで、毛包の成長期、退行期、休止期で筋膜に存在する細胞の遺伝子発現パターンが大きく変化することを同定した。以上の結果は、筋膜の変化が毛包幹細胞制御に関与することを示唆している。幹細胞から遠く離れた領域が幹細胞制御に関与することが明らかとなれば、他臓器でも同様のメカニズムが存在する可能性があり、その波及効果は大きいと考えられる。

背景および目的

皮膚は一般的に表皮、真皮、皮下組織の3層から構成されると説明される。しかし、その下層に筋層[panniculus carnosus (PC)]、筋膜[fascia]と呼ばれるこれまでほとんど着目されていない、眠れる未知の組織が存在する。筋膜は創傷治癒に寄与することは知られているが、恒常性におけるその存在意義は全く分かっていない。筋層は筋細胞などから構成される。一方、筋膜は筋層とは異なり、線維芽細胞、免疫細胞、神経、血管など多種多様な細胞種から構成されている。以上のことについては知られているが、筋層、筋膜の恒常性、皮膚恒常性維持における存在意義については一切分かっておらず、未知の組織である。

毛包は成長期(anagen)、退行期(catagen)、休止期(telogen)を繰り返す。(図1)

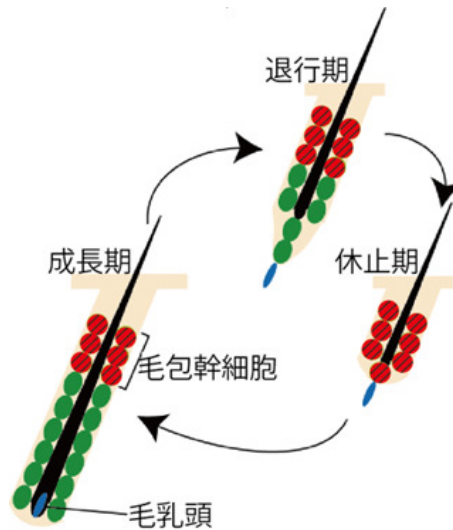


図 1. 毛周期.

成長期では毛包幹細胞の増殖と分化によって毛包が伸長する。退行期には毛包を構成する細胞がアポトーシスし、毛包が縮小していく。休止期には毛包は細胞分裂や細胞死を休止する。毛包幹細胞の維持機構については数多くの報告がある。しかし、毛包から離れた筋膜のような組織が毛包幹細胞に与える影響については解明されていない。申請者はマウスを用いて外科的処置により、筋膜を除去する実験系を独自に確立した。マウス背中の毛を除去し、この実験系を用いて筋膜を除去する実験を行った。その結果、筋膜除去後2週間後には筋膜を除去したマウスの背中で毛の再生が観察されなかった。これらの結果は筋膜が毛包幹細胞を制御し、毛周期に関与していることを示唆している。さらに筋膜除去後4週後に観察すると、筋膜を除去したマウスでも筋膜が再生され、毛周期の成長期が開始されることがわかった。

マウスは若齢期に背中の皮膚で毛周期が同調する。生後4週から6週までが成長期、6週から7週までが退行期、7週から12週までは休止期である。それぞれの時期に皮膚を観察すると、退行期、休止期と比較し、成長期に筋膜が厚くなり、筋膜内の免疫細胞、血管も増加していた。以上より、筋膜の変化と毛周期が連動していることがわかった。これらの予備データから本研究では、皮膚深部にある筋膜が毛包幹細胞をリモート制御するメカニズムを明らかにする。

方法

申請者は毛包の成長期、退行期、休止期における筋膜の変化を包括的に捉えるため、筋膜内の全細胞を含む scRNA-seq を行った。その結果、線維芽細胞、マクロファージ、血管上皮細胞などの細胞集団に分けることができた。全細胞に占める線維芽細胞、マクロファージ、血管上皮細胞の割合が多かったため、これらの細胞に特に注視する。

1. scRNA-seq による各毛周期特異的線維芽細胞の同定

scRNA-seq のデータ上から線維芽細胞だけを抽出し、再度 umap を作成した。その結果、毛包の成長期に特異的な細胞集団を同定した。この細胞集団で相対的に発現量が高い遺伝子について Gene Ontology 解析 (GO 解析) を行うと、コラーゲン生成、血管生成に関するものが多く含まれていた。一方、休止期に特異的な細胞集団で GO 解析を行うと、筋線維芽細胞制御に関するものが含まれていた。本項目では毛包の成長期の筋膜線維芽細胞で高発現する遺伝子 (Cxcl10、Bst2、Plac8 など) について免疫染色を行う。毛包の成長期、退行期、休止期の組織を用いて免疫染色を行い、成長期でのみ出現する線維芽細胞特異的遺伝子の同定を行う。これにより、毛包成長期特異的な f 筋膜の線維芽細胞のマーカーを同定する。

2. 毛包の成長期特異的線維芽細胞が与える毛包幹細胞への影響

1 で同定した遺伝子について flox マウスを作製する。特に転写因子、分泌因子に着目して flox マウスを作製する。CD201-cre-ERT マウスと交配することで筋膜線維芽細胞特異的に目的の遺伝子をノックアウトする。このマウスを用いて背側の毛を除毛した後、毛が再生されるかを皮膚切片のヘマトキシリン・エオジン染色（HE 染色）により、毛包の数を定量することで評価する。また、1 で同定した遺伝子について cre-ERT マウスも作製する。このマウスと Rosa26-tdTomato マウスを交配し、ラベルトレースが可能なマウスを作製する。毛包の成長期に tamoxifen を投与することでラベルし、成長期以降でラベルされた細胞がアポトーシスによりなくなる細胞集団なのか、筋膜に留まり続ける細胞なのかを判別する。この cre-ERT マウスは flox マウスが作製できなかった場合、Rosa26-DTA マウスと交配させることで成長期特異的筋膜線維芽細胞を排除することにも使用する。

3. 毛包の成長期特異的マクロファージの同定

scRNA-seq のデータ上からマクロファージだけを抽出し、再度 umap を作成した。その結果、線維芽細胞と同様に毛包の成長期に特異的なマクロファージの細胞集団を同定した。この細胞集団で発現が上昇する遺伝子について GO 解析を行うと、コラーゲン生成を誘導するもの、免疫システム制御に関するものが多く含まれていた。本項目では毛包の成長期のマクロファージで高発現する遺伝子（Lgals3、Fth1、Ctsd など）について免疫染色を行う。毛包の成長期、退行期、休止期の組織を用いて免疫染色を行い、成長期の筋膜特異的マクロファージ特異的遺伝子の同定を行う。これにより、毛包成長期特異的な筋膜マクロファージのマーカーを同定する。

4. 毛包の成長期特異的マクロファージが与える毛包幹細胞への影響

3 で同定した遺伝子について flox マウスを作製する。LysM-cre-ERT マウスと交配することでマクロファージ (myeloid cell) 特異的に目的の遺伝子をノックアウトする。このマウスの背側の毛を除毛した後、毛が再生されるかを検討する。毛の再生の評価は HE 染色による毛包の数の定量によって行う。さらに 3 で同定した遺伝子について cre-ERT マウスも作製する。このマウスと Rosa26-tdTomato マウスを交配し、ラベルトレースが可能なマウスを作製する。毛包の成長期に tamoxifen を投与することでラベルし、成長期以降でラベルされた細胞がアポトーシスによりなくなる細胞集団なのか、筋膜に留まり続ける細胞なのかを判別する。この cre-ERT マウスは flox マウスが作製できなかった場合、Rosa26-DTA マウスと交配させることで成長期特異的筋膜マクロファージを排除することにも使用する。

結果および考察

1. scRNA-seq による各毛周期特異的線維芽細胞の同定

CD201-cre-ERT/Rosa26-tdTomato マウスを用いた免疫染色と scRNA-seq の結果より、毛包成長期、退行期、休止期特異的な筋膜線維芽細胞を同定することができた。

2. 毛包の成長期特異的線維芽細胞が与える毛包幹細胞への影響

CD201-cre-ERT マウスと毛包成長期特異的筋膜線維芽細胞で高発現する遺伝子の flox マウスを交配させると毛周期の遅延が確認された。

3. 毛包の成長期特異的マクロファージの同定

免疫染色と scRNA-seq の結果より、毛包成長期特異的な筋膜マクロファージを同定することができた。

4. 毛包の成長期特異的マクロファージが与える毛包幹細胞への影響

毛包成長期特異的な筋膜マクロファージで高発現する遺伝子の cre-ERT2 マウスと Rosa26-DTA マウスを交配させ、tamoxifen 誘導的に筋膜マクロファージを ablation できるマウスを作製した。このマウスでは毛周期の遅延が起きることを確認した。

以上より、各毛周期特異的筋膜線維芽細胞、マクロファージを同定することができた。

(完)