

学位論文題名

Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells

(毛包幹細胞は色素幹細胞のニッチ細胞として機能する)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

幹細胞は、特異的な微小環境(ニッチ)によって維持されていると考えられているが、機能的に重要な細胞(ニッチ細胞)の実体、およびニッチ細胞が幹細胞を制御する仕組みについては、*Drosophila* の生殖幹細胞などの一部の幹細胞を除く多くの幹細胞システムにおいて依然不明である。

毛包幹細胞は、角化細胞の多能性幹細胞であり、毛包の恒常部の下端領域に相当するバルジ領域に存在する。毛周期と同調して毛母に角化細胞を供給し、創傷時などには表皮や脂腺にも角化細胞を供給する。

色素幹細胞もまた、毛包のバルジ領域に存在する。我々は、色素幹細胞をはじめて同定し、毛に色素を供給する色素細胞の供給源となること、その維持に必須の遺伝子が欠損したり、あるいは加齢に伴って、色素幹細胞が維持できなくなると白毛化を発症することを明らかにした。色素幹細胞の子孫細胞は、いったんニッチを離れても、空のニッチに再び入ると未熟な状態で維持され、以後、再び色素幹細胞として機能できることから、ニッチが幹細胞の運命を優勢に決定していることが明らかになったが、その分子基盤は不明である。これまでに色素幹細胞側で必須となるマスター制御因子として *MITF* 転写因子を同定したが、細胞外から色素幹細胞の運命を制御するメカニズムについては明らかではない。

幸い、色素幹細胞システムは、組織内での幹細胞およびニッチの可視化が可能であるなど、他のシステムにはない多くのユニークな利点を持つ。本研究においては、これらの利点を生かしたアプローチを行い、ニッチ細胞が細胞外からいかにして幹細胞を維持しているのかを検討した。

【方法と結果】

ヘミデスモソームを構成する膜貫通型蛋白である 17 型コラーゲン欠損マウスでは白毛化と脱毛を呈することがわかっているが、その原因については明らかにされていない。17 型コラーゲン欠損マウスを解析し、17 型コラーゲンの毛包における役割について検討した。

17 型コラーゲン欠損マウスは、毛が生えかわるごとに次第に白毛化をきたし、これに引き続いて脱毛を示すことが判明した。色素幹細胞を維持することが出来ないために、白毛化が進行した可能性を調べるため、17 型コラーゲン欠損マウスの毛包における色素幹細胞を調べた。色素幹細胞は、*Dct-lacZ* トランスジェニックマウスを用いると、毛包バルジ領域において *Dct-lacZ* 陽性の未分化なメラノブラストとして同定出来る。17 型コラーゲン欠損マウスに *Dct-lacZ* トランスジェンを導入し解析したところ、白毛化に先立って色素幹細胞が消失することが明らかになった。

次に、免疫組織学的解析によって、バルジ領域の色素幹細胞は、毛包幹細胞のマーカーとして知られるケラチン 15 を発現する細胞と直接に接して存在することが判明した。また 17 型コラーゲンが、毛包幹細胞のマーカーを発現する細胞において特異的に発現しており、

毛周期を通じてその発現が維持されていることが判明した。さらに、毛包幹細胞は 17 型コラーゲンを発現するが、色素幹細胞においては発現を認めなかった。以上のことから色素幹細胞の消失の原因は、毛包幹細胞の異常によるものと考えた。

脱毛の原因として、毛包幹細胞の維持不全の可能性を考え、17 型コラーゲン欠損マウスの毛包における毛包幹細胞のマーカーの発現を調べたところ、脱毛に先立って毛包幹細胞が消失することが明らかになった。さらに *in vitro* の新生仔角化細胞の培養実験において、17 型コラーゲン欠損角化細胞の自己複製能が低下していることが明らかになった。

毛包の色素幹細胞とニッチにおいて TGF- β シグナルが活性化されており、このシグナルが色素幹細胞の維持に必要なことや、色素細胞特異的に TGF- β 受容体をコードする TGF β RII 遺伝子を欠損する conditional ノックアウトマウスで毛が生え変わる度に白毛化が進行すること、これらの毛包においては色素幹細胞の枯渇が先行することが明らかになっている。そこで、我々は 17 型コラーゲン欠損マウスにおける色素幹細胞の消失の原因が、周囲の毛包幹細胞からの TGF- β シグナルの異常にある可能性を考え、免疫組織学的解析を行った。その結果、17 型コラーゲン欠損マウスでは、毛包のバルジ領域において TGF- β およびその下流の標的遺伝子群の発現が抑制されており、毛包幹細胞からの TGF- β シグナルが色素幹細胞の維持において重要な因子であることが明らかになった。

最後に、17 型コラーゲン欠損マウスにおいてヒトの 17 型コラーゲンをニッチ細胞 (毛包幹細胞) 側で発現するマウスを作製し解析したところ、色素幹細胞および毛包幹細胞ともに消失せず、白毛化と脱毛がいずれともレスキューされることが判明した。このことから、17 型コラーゲンを発現する毛包幹細胞が 17 型コラーゲンを発現しない色素幹細胞のニッチ細胞として機能することが明らかになった。

【考察】

今回我々は、ヘミデスモソームを構成する膜貫通型蛋白である 17 型コラーゲンが毛包幹細胞で強く発現しており、毛包幹細胞の維持に重要な役割を果たしていることを明らかにした。17 型コラーゲンの欠損マウスでは、白毛化と脱毛をきたした。ヒトの 17 型コラーゲン欠損によって発症する遺伝性疾患である接合部型表皮水疱症の患者においても、毛包の萎縮や消失を伴う脱毛をきたすことがわかっている。このマウスモデルは、接合部型表皮水疱症の患者さんの脱毛の原因解明や治療の助けにもなりうると考えられた。

過去に我々は、ニッチが色素幹細胞の運命を優勢に決定していることを明らかにしたが、その分子基盤は不明であった。今回我々は、色素幹細胞のニッチ細胞をはじめて同定し、驚くことに毛包幹細胞が色素幹細胞という異なる種類の幹細胞のニッチ細胞として機能していることをはじめて明らかにした。さらに、ニッチ由来の TGF- β シグナルが色素幹細胞の維持において重要な因子の一つであることも明らかになった。このような例が見つかったのは、*Drosophila* の生殖幹細胞などの一部の幹細胞のみであり、今後、同様に他の組織においても、組織幹細胞が別の組織幹細胞に対してニッチ機能を果たす例が明らかになる可能性がある。

【結論】

膜貫通性のコラーゲンが毛包幹細胞の維持に必須であること、毛包幹細胞の維持を介して色素幹細胞の維持にも重要であり、加齢とともにみられる白毛化や脱毛を抑制していることがはじめて明らかになった。このような組織幹細胞システムを制御する仕組みの解明は、今後再生医療へと応用していく上でも、加齢に伴う多くの難治性疾患を理解する上でも極めて重要であり、今後著しく発展する分野であると考えている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 瀬 谷 司

副 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 清 水 宏

学 位 論 文 題 名

Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells

(毛包幹細胞は色素幹細胞のニッチ細胞として機能する)

幹細胞は、特異的な微小環境(ニッチ)によって維持されていると考えられている。毛包幹細胞は、角化細胞の多能性幹細胞であり、毛包の恒常部の下端領域に相当するバルジ領域に存在し、毛周期と同調して毛母に角化細胞を供給する。色素幹細胞も毛包のバルジ領域に存在し、毛に色素を供給する色素細胞の供給源となること、その維持に必須の遺伝子が欠損すると白毛化を発症することがわかっている。また、ニッチが幹細胞の運命を優勢に決定していることがわかっているが、その分子基盤は不明で、細胞外から色素幹細胞の運命を制御するメカニズムについては明らかになっていない。

17型コラーゲンはヘミデスモソームを構成する膜貫通型蛋白であり、ヒトで17型コラーゲンの欠損により発症する接合部型表皮水疱症では若年性の脱毛をきたすことから、17型コラーゲンは毛包のホメオスタシスに重要な役割を果たしていると考えられる。本研究では17型コラーゲンの毛包における役割について色素幹細胞と毛包幹細胞に着目して解析した。

まず17型コラーゲン欠損マウスでは、毛が生えかわるごとに次第に白毛化をきたし、これに引き続いて脱毛をきたすことが判明した。色素幹細胞の維持不全により白毛化が進行した可能性を考え、17型コラーゲン欠損マウスの色素幹細胞の変化を調べたところ、白毛化に先立って色素幹細胞が消失することが明らかになった。

次に、免疫組織学的解析によって、色素幹細胞は毛包幹細胞と直接に接して存在することが判明した。また17型コラーゲンが、毛包幹細胞において特異的に発現しており、毛周期を通じてその発現が維持されていることが判明した。さらに、毛包幹細胞は17型コラーゲンを発現するが、色素幹細胞においては発現を認めなかった。以上のことから色素幹細胞の消失の原因は、毛包幹細胞の異常によるものと考えた。

そこで次に、17型コラーゲン欠損マウスの毛包幹細胞を調べたところ、脱毛に先立って毛包幹細胞が消失することが明らかになった。さらに新生仔角化細胞の培養実験において、17型コラーゲン欠損角化細胞の自己複製能が低下していることが明らかになった。

毛包の色素幹細胞とニッチにおいてTGF- β シグナルが活性化されており、このシグナルが色素幹細胞の維持に必要なことがわかっている。そこで、17型コラーゲン欠損マウスにおける色素幹細胞の消失の原因が、周囲の毛包幹細胞からのTGF- β シグナルの異常にある可能性を考え、免疫組織学的解析を行った。その結果、17型コラーゲン欠損マウスでは、毛包のバルジ領域においてTGF- β およびその下流のシグナルが抑制されており、毛包幹細胞からのTGF- β シグナルが色素幹細胞の維持において重要な因子であることが明ら

かになった。

最後に、17型コラーゲン欠損マウスにおいてヒトの17型コラーゲンをニッチ細胞側で発現するマウスを作製し解析したところ、色素幹細胞および毛包幹細胞ともに消失せず、白毛化と脱毛がいずれともレスキューされることが判明した。このことから、17型コラーゲンを発現する毛包幹細胞が17型コラーゲンを発現しない色素幹細胞のニッチ細胞として機能することが明らかになった。

小池教授から、毛包幹細胞と色素幹細胞の発生由来や、白髪を黒くする臨床応用のアイデア、17型コラーゲン以外でニッチに関わっているタンパクは何かあるのかについて質問があった。次いで清水教授から、この研究は今後どのように臨床に応用できそうかとの質問があった。最後に瀬谷教授から、毛の幹細胞が毛根部ではなくバルジ領域にあるのは生物学的に何か意味があるのかどうか、鳥の毛の色素などはどのように作られているのかについて質問があった。いずれの質問に対しても申請者は、これまでの研究論文等を引用しおおむね適切に回答した。

この論文は、17型コラーゲンの毛包のホメオスタシスにおける役割を明らかにし、色素幹細胞のニッチ細胞を同定し、色素幹細胞を制御するメカニズムを明らかにした点で高く評価され、今後脱毛や白毛化の治療法の開発や、再生医療への応用に繋がっていくものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。