

論 文 要 旨

Maintenance of sweat glands by stem cells located in the acral epithelium

(手掌および足底の上皮における幹細胞による汗腺の組織維持)

関西医科大学皮膚科学講座
(紹介：岡 本 祐 之 教授)

関西医科大学実験病理学講座
(指導：上 野 博 夫 教授)

大 江 秀 一

【研究目的】

角化細胞の幹細胞 (keratinocyte stem cell : KSC) は有毛部では毛隆起部 (バルジ領域) に存在し、毛包、毛、脂腺、毛包間表皮などへ分化し、組織を維持している。しかし、手掌や足底などの無毛部には毛組織が存在しないため、無毛部における KSC の局在については不明であった。

そこで、我々は無毛部に局在し、角化細胞の維持および修復に関与する KSC について検討した。

【研究方法】

多色細胞系譜追跡法によるクローンの検討を行った。多色細胞系譜追跡法では、ある細胞集団における長期幹細胞のクローンを同定し、異なった幹細胞に由来するクローンを区別することが可能である。Rosa26^{rbw/+}マウスは Cre リコンビネースによる DNA の組み換えが起こると、緑色 (GFP) を発現していた細胞が、青色 (mCerulean)、オレンジ色 (mOrange)、赤色 (mCherry) の各色にランダムに変化する。

また、H2BGFP/Rosa26-rtTA (Tet On) マウスにドキシサイクリンを投与している間は全ての細胞の核が緑色 (GFP) となるが、投与を終了すると細胞分裂が行われる度に GFP の発現が減少することを利用した、標識維持細胞 (label-retaining cell) の同定を行った。

無毛部の皮膚として、マウスの足底の皮膚を採取し、凍結切片およびパラホルムアルデヒド固定パラフィン包埋切片を作成した。

【結果】

まず、無毛部皮膚における細胞の増殖能について Ki67 を用いて検討したところ、分裂細胞は表皮の基底層にみられたものの、汗組織にはみられなかった。さらに、H2BGFP/Rosa26-rtTA マウスでの検討により、標識維持細胞は汗管に存在していた。このことより、細胞分裂の遅い細胞は汗管に存在し、幹細胞であることが示唆された。

次に、全身の全ての細胞がタモキシフェンの投与により Cre リコンビネースを発現させることのできる Rosa26^{CreERT2/+}マウスと Rosa26^{rbw/+}マウスを掛け合わせ、全ての細胞をタモキシフェン投与によりランダムな 3 色に標識した。その結果、初期には種々の色が混在していた組織が、約 4 週間後には各汗腺から汗管、表皮に至るまでがそれぞれ単色となった。このことより、汗腺に存在する幹細胞が汗管や表皮へ細胞を供給していることが示された。

次に、有毛部の KSC マーカーである Lgr5、Lgr6、Bmi1 のそれぞれの遺伝子に Cre リコンビネースの遺伝子をノックインしたマウスを Rosa26^{rbw/+}マウスと掛け合わせ、それぞれのマーカー遺伝子の発現している細胞の標識を行った。Lgr5 を用いた細胞系譜の追跡では、標識細胞は汗腺のみで単色となった。次に、Lgr6 および Bmi1 を用いた細胞系譜の追跡では、ともに各汗腺から表皮に至るまでがそれぞれ単色となり、汗腺に存在する細胞から細胞が供給されていると考えら

れたが、**Bmi1** を用いた場合の方が表皮まで標識されるのに時間を要した。これらは共焦点レーザー顕微鏡を用いた三次元での解析でも同様の結果であった。

また、これらのマーカー遺伝子の発現を *in situ hybridization* にて検討したところ、**Lgr5** と **Bmi1** は汗腺にのみ発現し、**Lgr6** は汗腺、汗管、表皮に発現していた。

さらに、放射線照射後の細胞の修復について、**Bmi1** を用いた細胞系譜の追跡を行ったところ、照射マウスでは非照射マウスに比べて **Bmi1** 発現細胞の増殖が有意に早かった。

【考察】

今回、我々は無毛部の皮膚の維持および修復を担当する細胞を同定した。**Lgr5** 発現細胞は汗腺に存在し、汗腺のみに細胞を供給する前駆細胞と考えられた。**Lgr6** 発現細胞は比較的細胞周期が速い短期幹細胞として汗腺に存在し、汗腺、汗管、表皮へ細胞を供給していた。**Bmi1** 発現細胞も同様に汗腺、汗管、表皮へ細胞を供給していたが、**Lgr6** 発現細胞に比べて増殖は遅く、長期幹細胞であると考えられた。また、**Bmi1** 陽性細胞は細胞障害時には速やかに細胞周期に移行しており、リザーバーとしての役割があるものと考えられた。