178　表皮基底膜による幹細胞静止期の制御メカニズムの解明	夏賀　健

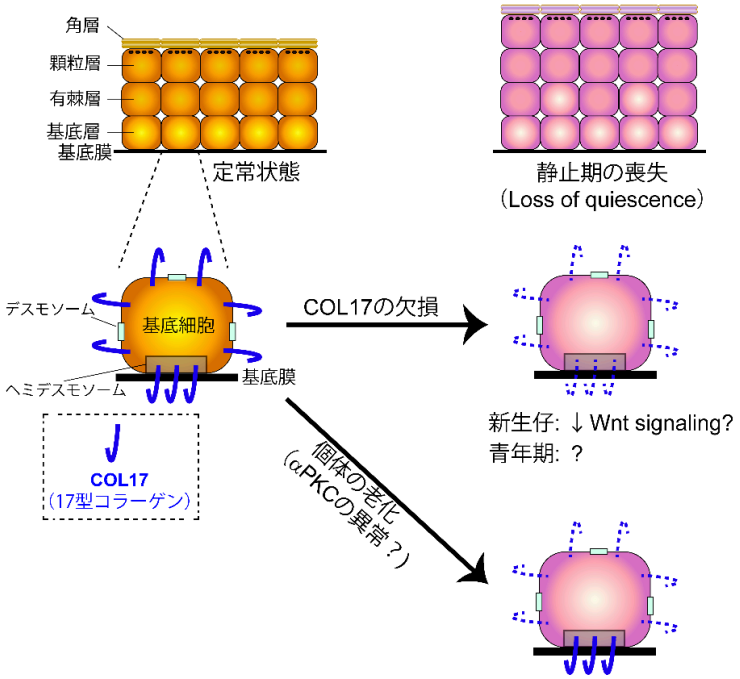
【目的】皮膚は全身を覆う人体最大の臓器であり、外表面に位置していることから老化の表現型を容易に捉えることができる。皮膚の上皮である表皮は、表皮幹細胞の自己複製と分化によって維持されている。表皮幹細胞は、表皮基底膜をニッチにしており、加齢においても表皮基底膜の変化が生じると考えられている。

筆者らは最近、加齢によって a）毛包間表皮は過増殖に至ること、b）17 型コラーゲン（COL17）に代表される表皮基底膜領域蛋白の分布が変化すること、c）COL17 を表皮で強制発現させることによって加齢による過増殖の表現型が解除されることを明らかにした。また、先行研究において皮膚の毛包幹細胞では、タンパク分解酵素 ELANE の活性が上昇することによって、COL17 が加齢にともなって減少するとされる。本研究の目的は、筆者らの研究成果と先行研究をさらにすすめ、早老化モデルである *COL17* ノックアウトマウスの毛包間表皮を詳細に観察し、COL17 をはじめとした表皮基底膜領域蛋白の表皮幹細胞に与える役割を解明することである。また、同時に正常ヒト表皮における表皮基底膜蛋白の分布も観察する。

【方法】*COL17* ノックアウトマウスとその同腹仔の対照群マウス（ノックアウトヘテロマウス）8 週齢の個体を安楽死させ、その掌蹠の表皮を毛包間表皮として解析した。皮膚切片に対してケラチン 14、ケラチン 6、インテグリン β1、ロリクリンを免疫染色した。また、正常ヒト皮膚の COL17、インテグリン β1、インテグリン α6 の分布を免疫染色で解析した。

【結果】*COL17* ノックアウトマウス毛包間表皮では、表皮幹細胞マーカーである K14、ITGB1 陽性の表皮層が対照群と比較して厚くなっていた。また、K6 陽性細胞が *COL17* ノックアウトマウス毛包間表皮で広範囲に分布していた（図 4）。正常ヒト毛包間表皮において、表皮幹細胞マーカーである ITGB1、ITGA6、COL17 は、増殖の強い表皮稜側ではなく、真皮乳頭層と接する表皮に強く分布していた。

毛包間表皮の模式図



178. 表皮基底膜による幹細胞静止期の制御メカニズムの解明

夏賀　健

北海道大学病院 皮膚科

Key words：表皮基底膜，表皮幹細胞，毛包間表皮，コラーゲン

緒　言

皮膚は全身を覆う人体最大の臓器であり、外表面に位置していることから老化の表現型を容易に捉えることができる。皮膚の上皮である表皮は、表皮幹細胞の自己複製と分化によって維持されている。表皮幹細胞は、表皮基底膜をニッチにしており［1］、加齢においても表皮基底膜の変化が生じると考えられている［2］。

筆者らは最近、加齢によって a）毛包間表皮は過増殖に至ること、b）17 型コラーゲン（COL17）に代表される表皮基底膜領域蛋白の分布が変化すること、c）COL17 を表皮で強制発現させることによって加齢による過増殖の表現型が解除されることを明らかにした（図 1）［3］。また、先行研究において皮膚の毛包幹細胞では、タンパク分解酵素 ELANE の活性が上昇することによって、COL17 が加齢にともなって減少するとされる［4］。本研究の目的は、筆者らの研究成果と先行研究をさらにすすめ、早老化モデルである *COL17* ノックアウトマウスの毛包間表皮を詳細に観察し、COL17 をはじめとした表皮基底膜領域蛋白の表皮幹細胞に与える役割を解明することである。また、同時に正常ヒト表皮における表皮基底膜蛋白の分布も観察する。

方　法

1. *COL17* ノックアウトマウス毛包間表皮の組織学的解析

COL17 ノックアウトマウス［5］とその同腹仔の対照群マウス（ノックアウトヘテロマウス）8 週齢の個体を安楽死させ、その掌蹠の表皮を毛包間表皮として観察した。ノックアウトマウス、対照群それぞれ 3 匹以上を解析した。採取された掌蹠の皮膚は、ホルマリン固定パラフィン包埋検体あるいは凍結後に OCT コンパウンドに包埋して、いずれも 5 μm の厚さとなるように切片を作成した。ホルマリン固定パラフィン包埋検体は、citrate buffer（pH6.0）あるいは EDTA buffer（pH9.0）を用いて抗原賦活化してから免疫染色を行った。また、凍結切片は、4%PFA 固定あるいは未固定でその後の免疫染色を行った。免疫染色には、ケラチン 14（K14）、ケラチン 6（K6）、インテグリンβ1（ITGB1）、ロリクリン（LOR）に対する 1 次抗体を用いた。2 次抗体として、Alexa488 あるいは Alexa647 の蛍光色素で標識された抗体を用いた。核染色として DAPI を用いた。染色された切片は、FV-1000（Olympus）で観察した。本研究で行われている動物実験は、北海道大学にて承認を受けている。

2. ヒト毛包間表皮の組織学的解析

正常ヒト皮膚の凍結検体を OCT コンパウンドに包埋し、5 μm の厚さとなるように切片を作成した。切片は未固定で、その後の免疫染色を行った。免疫染色の 1 次抗体として、COL17、インテグリンβ1（ITGB1）、インテグリンα6（ITGA6）に対する抗体を用いた。2 次抗体以降はマウス標本と同様に処理した。ヒト検体を用いた実験は、北海道大学大学院医学研究院の倫理委員会にて承認を受けている。

結果および考察

1. *COL17* ノックアウトマウス毛包間表皮の組織学的解析

COL17 ノックアウトマウスは、1 ヶ月齢を超える頃から白髪・脱毛を呈すようになり、早老化の表現型を呈する（図 2）[3]。*COL17* ノックアウトマウス毛包間表皮では、表皮基底層のマーカーである K14 陽性の表皮層が対照群と比較して分厚くなっていた。同様に表皮幹細胞マーカーである ITGB1 陽性の表皮層も対照群と比較して厚くなっていた。（図 3）。また、K6 陽性細胞が *COL17* ノックアウトマウス毛包間表皮で広範囲に分布していた（図 4）。これらの結果は、COL17 の喪失によって過増殖に至る表皮［3］と合致しており、表皮基底膜領域蛋白の異常によって表皮幹細胞の静止期が維持できない状態にあることが示唆された。

2. ヒト毛包間表皮の組織学的解析

正常ヒト毛包間表皮において、表皮幹細胞マーカーである ITGB1、ITGA6 を観察すると、増殖の強い表皮稜側ではなく、真皮乳頭層と接する表皮に強く分布していた（図 5）。これは、過去の報告と一致する結果であった［6］。COL17 の観察でも、ITGB1、ITGA6 と同様なパターンを示していた（図 5）。これらの結果から、表皮幹細胞は定常状態で比較的静止期で保たれていること、また表皮基底膜領域蛋白がそれを支持していると示唆された。

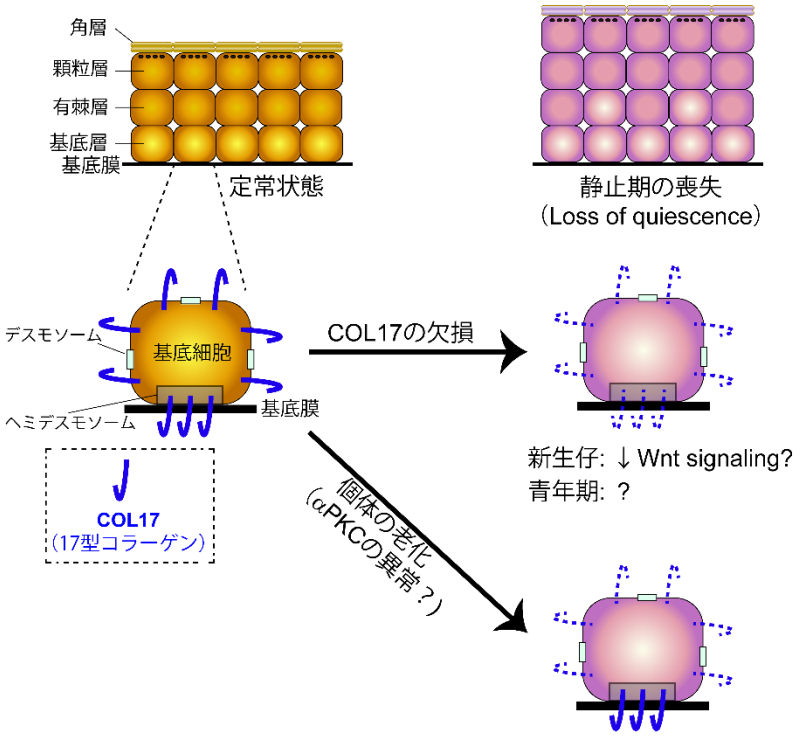


図 1. 毛包間表皮の模式図（文献 3 から改変）
COL17 の欠損によって表皮は過増殖に至り、また個体の老化にともなって COL17 の分布が変化することで表皮は過増殖に至る。



図 2. *COL17* ノックアウトマウスは早老化を呈する（文献 3 から改変）
COL17 の欠損は、成年早期から白髪や脱毛を引き起こす。

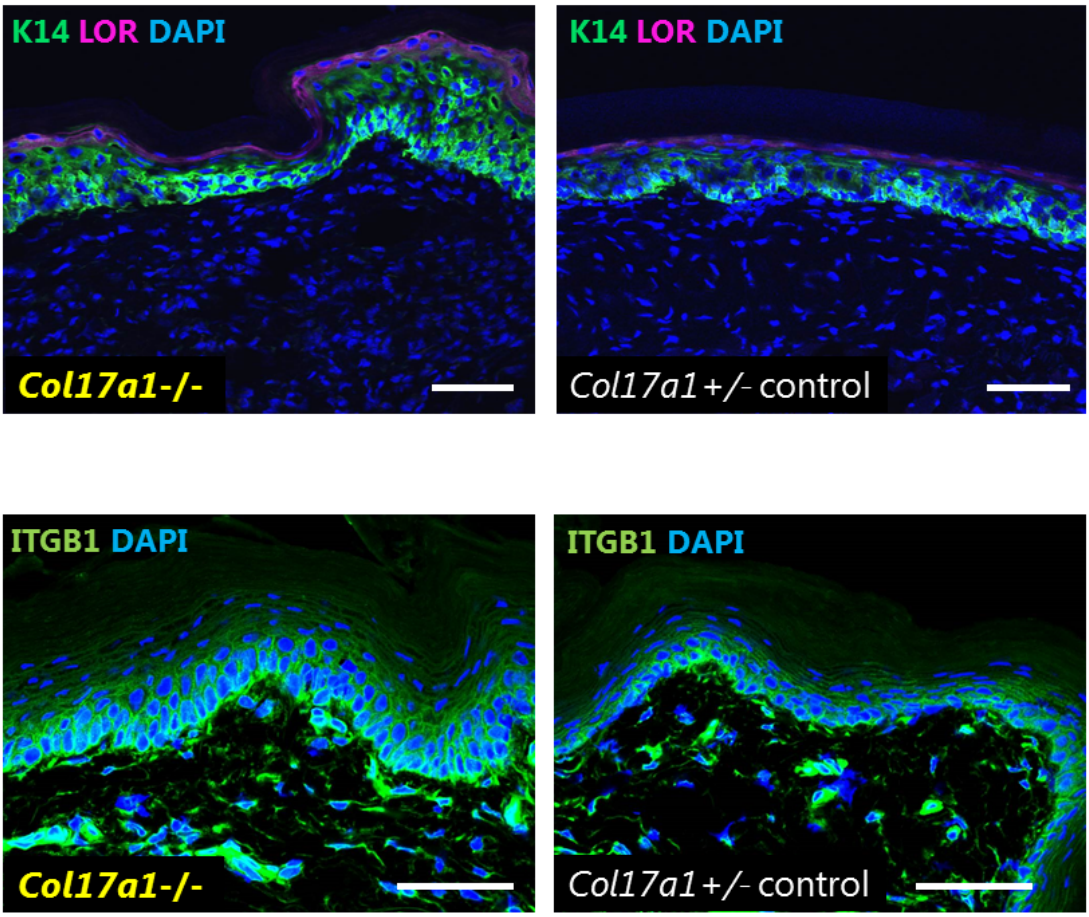


図 3. *COL17* ノックアウトマウスは K14, ITGB1 陽性の表皮層が厚くなる
COL17 ノックアウトマウス（左）、同腹仔対照群マウス（右）。上が K14、下が ITGB1。Scale bar：50 μm。

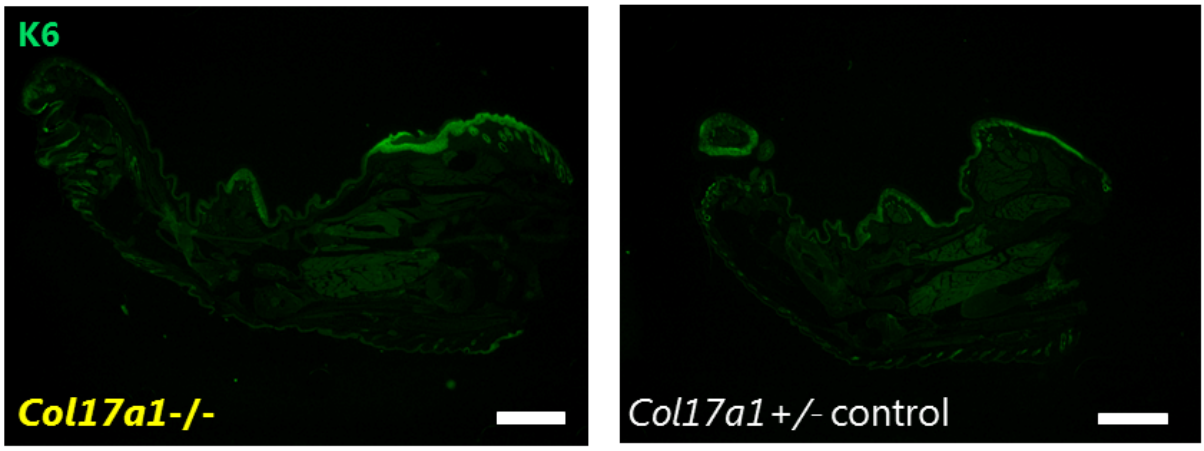


図 4. *COL17* ノックアウトマウスは K6 陽性表皮の分布が広い
COL17 ノックアウトマウス（左）、同腹仔対照群マウス（右）。Scale bar：1.5 mm。

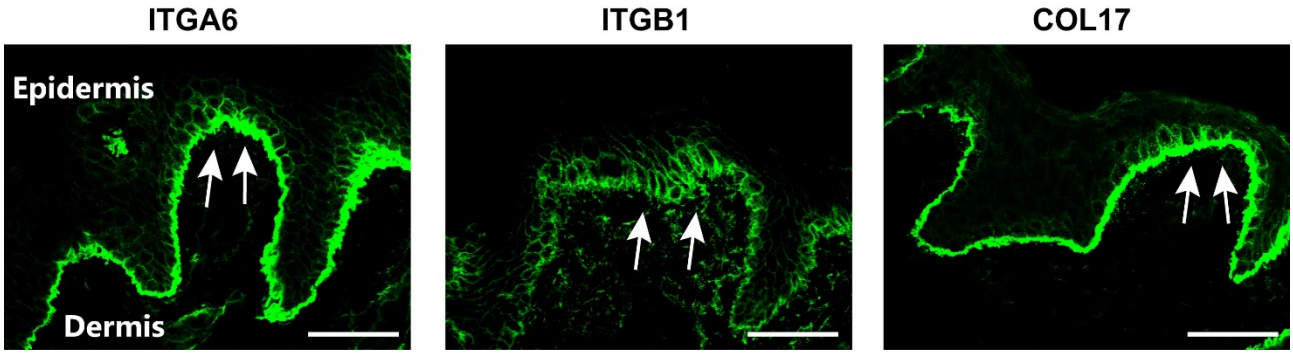


図 5. 正常ヒト表皮における表皮基底膜領域蛋白の分布
ITGA6、ITGB6、COL17 はいずれも矢印で示す真皮乳頭層と接している部分に強く染色される。Scale bar：50 μm。

共同研究者・謝辞

本研究への助成にあたり、上原財団の関係者の皆様と審査員の先生方に深く御礼申し上げます。

文　献

1) Watt FM, Fujiwara H. Cell-extracellular matrix interactions in normal and diseased skin. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 Apr 1;3(4). pii: a005124. PMID: 21441589 DOI: 10.1101/cshperspect.a005124
2) Amano S. Possible involvement of basement membrane damage in skin photoaging. J Investig Dermatol Symp Proc. 2009 Aug;14(1):2-7. PMID: 19675545 DOI: 10.1038/jidsymp.2009.5
3) Watanabe M, Natsuga K, Nishie W, Kobayashi Y, Donati G, Suzuki S, Fujimura Y, Tsukiyama T, Ujiie H, Shinkuma S, Nakamura H, Murakami M, Ozaki M, Nagayama M, Watt FM, Shimizu H. Type XVII collagen coordinates proliferation in the interfollicular epidermis. Elife. 2017 Jul 11;6. pii: e26635. PMID: 28693719 DOI: 10.7554/eLife.26635

4) Matsumura H, Mohri Y, Binh NT, Morinaga H, Fukuda M, Ito M, Kurata S, Hoeijmakers J, Nishimura EK. Hair follicle aging is driven by transepidermal elimination of stem cells via COL17A1 proteolysis. Science. 2016 Feb 5;351(6273):aad4395. PMID: 26912707 DOI: 10.1126/science.aad4395
5) Nishie W, Sawamura D, Goto M, Ito K, Shibaki A, McMillan JR, Sakai K, Nakamura H, Olasz E, Yancey KB, Akiyama M, Shimizu H. Humanization of autoantigen. Nat Med. 2007 Mar;13(3):378-83. PMID: 17322897 DOI: 10.1038/nm1496
6) Jones PH, Harper S, Watt FM. Stem cell patterning and fate in human epidermis. Cell. 1995 Jan 13;80(1):83-93. PMID: 7813021