

称号及び氏名	博士（獣医学）	加藤 智彩
学位授与の日付	平成29年3月31日	
論文名	<b>Studies on the Epitope of Rat Somatic Stem Cell-Recognizing Antibody (A3), and the Participation of Labeled Cells in Hair Follicle Formation and Cutaneous Wound Healing</b> (ラット体性幹細胞認識抗体 A3 のエピトープと毛包形成及び皮膚創傷治癒におけるその標識細胞の関与に関する研究)	
論文審査委員	主査	山手 丈至
	副査	岡田 利也
	副査	笹井 和美
	副査	渡来 仁

## 論文要旨

### 緒言

免疫組織化学的解析において、特定の抗原を認識する抗体は、組織発生における細胞動態や、異常な細胞の出現の追究に不可欠である。近年、特に体性幹細胞を認識する抗体は、分離した幹細胞を用いた分化誘導実験や、再生医療に向けた幹細胞の挙動や役割などの基盤研究において広く利用されている。

本研究室において、ラットの未熟な間葉系細胞に由来するとされる悪性線維性組織球腫（MFH）から異なるクローン細胞株（MT-8, MT-9）を誘導し、さらに組織発生を追究するために、MT-8 細胞を抗原として新たなモノクローナル抗体 A3 を開発した。A3 はこれらの腫瘍細胞を特異的に標識するとともに、正常組織では血管周皮細胞や骨髄間質細胞などの、体性幹細胞の特徴を有する細胞を標識し、さらにラットの胎子発生過程における毛包を標識した。

皮膚は、外界の様々な刺激から生体を保護する第一のバリア組織である。毛包は皮膚の付属器として存在し、皮膚の生理的な再生や創傷後の被蓋上皮化には毛包のバルジに存在する毛包幹細胞が関与するとされる。さらに、毛包は上皮性成分と毛包結合織鞘の間葉系成分から構成され、周期的にこれらの組織再生と退行（毛周期）を繰り返す、mini-organ と形容される複雑な機能を有する組織である。つまり、毛包

は皮膚の恒常性維持や修復において、重要な役割を担っている。しかし、毛包に出現する A3 標識細胞の動態と、その標識細胞の皮膚再生への関与については未だ十分には研究されていない。そこで今回の一連の研究では、体性幹細胞の特徴をもつとされる A3 標識細胞の皮膚と毛包における役割を解明することを目的に、A3 が認識する抗原 (A3 抗原) のエピトープ解析 (第 1 章) を行うとともに、ラットの全身分布、特に毛包の発生と毛周期 (第 2 章)、そして創傷治癒過程 (第 3 章) における A3 標識細胞の動態と特性を組織学的に解析した。

## 【第 1 章】 A3 認識エピトープ解析

MT-9 培養細胞と同系ラットで誘発した MT-9 腫瘍の材料を用い、免疫沈降によって A3 抗原を精製した。BlueNative-PAGE, SDS-PAGE と同時に A3 を用いたウエスタンブロッティング法による検出と Coomassie Brilliant Blue (CBB) あるいは Mass 用銀染色によるタンパク染色を行った。A3 抗原は BlueNative-PAGE による分離では 200 kDa., SDS-PAGE による分離では 75-100 kDa. 付近に、拡散した単一のバンドとして出現し、同バンドは PAS 染色に対し陽性を示した。N 型糖鎖を特異的に消化する Peptide-N4-(N-acetyl-glucosaminyl)-asparagine amidase (Glycopeptidase F) と反応させるとウエスタン法でバンドが消失し、さらに N 型糖鎖修飾阻害物質である Tunicamycin を添加して細胞培養を行うと、A3 抗原の発現が減弱した。以上から A3 抗原はエピトープとして糖鎖を認識する可能性が示された。A3 のシグナルと対応するバンドを切り出し、MALDI-TOF/TOF MS および MASCOT サーチを行ったところ、Actin, Gelsolin precursor, Calnexin precursor などのタンパクが候補として挙げられた。Calnexin は A3 抗原の産生過程で共免疫沈降されたものであると考えられた。その他は Actin に関連するものであり、その意義は今後さらに検討する必要がある。

## 【第 2 章】 ラットにおける A3 標識細胞の局在および特性

### 第 1 節 ラットの発生及び成体における A3 標識細胞の局在

ラット生後 15 日, 20 日, 母体, 生後 4 日齢及び 6 週齢以上の組織を用い、A3 標識細胞の局在を調べた。発生段階では、A3 は血管, 神経, 骨, 眼, 腸管, 及び未分化生殖腺の周囲を取り囲む間葉細胞と、エナメル芽細胞に分化する細胞, 毛包構成細胞, 上部消化管および肛門の重層上皮の、基底細胞およびその直上の細胞を標識した。成体では、これまでに未解析の子宮卵巣および上部消化管での分布を調べた。卵巣では白膜, 卵胞膜, 子宮では間質細胞, 上部消化管では口腔内から前胃に至る重層扁平上皮の基底細胞と基底直上細胞を標識した。これらは組織形成に関与する体性幹細胞の分布と一致した。

### 第 2 節 発生期および成体における A3 標識細胞の局在

18 日齢の胎子から生後 21 日齢の新生子のラット組織を用いた。ラットの毛包は胎齢 18 日頃に皮膚基底細胞からプラコードが形成され、その後、毛芽, 毛栓を経て生後 4 日から 8 日齢以降成熟した毛包が形成された。A3 は E-cadherin 発現の毛芽や毛栓の中心部の上皮細胞と、Collagen IV 発現の基底膜の外側に位置する、Vimentin 発現の間葉細胞を標識した。A3 標識上皮細胞は、CK6 (毛包上皮細胞) 発現細胞と一致し、かつ CK15 (基底細胞) 発現細胞に隣接し、さらに Lgr6 (未分化上皮細胞)

や CK19 (未分化上皮細胞) 発現細胞と局在が類似した。A3 標識上皮細胞には、細胞増殖活性を示す Ki-67 の発現はほとんどみられなかったが、増殖活性のある基底細胞層の上方に隣接して存在していた。一方、毛包結合織鞘の A3 標識間葉細胞は、CD90 (間葉系幹細胞) や CD34 (未分化細胞) を共発現し、一部では CD133 (未分化細胞) や Nestin (未分化細胞) とともに共発現を示したが、 $\alpha$ -SMA (筋線維芽細胞) とは異なる局在を示した。以上より、毛包発生における A3 標識細胞は、毛芽・毛栓のバルジから漏斗部の基底細胞上層に位置する分裂活性の低い未分化上皮細胞と、毛包結合織鞘の未分化間葉細胞であることが示された。すなわち A3 標識細胞は、上皮成分および間葉成分として毛包の発生に関与することが分かった。

### 第 3 節 毛周期毛包における A3 標識細胞の局在と特性

生後 4 日から 21 日齢、成体 6 週齢以上の体幹皮膚を検査に供した。発生が完了した毛包は、毛包上皮幹細胞が存在するとされるバルジ領域を起点に、上皮性毛包および間葉性毛包が真皮に伸長し、その後退縮することで、休止期、成長期、退行期という 3 つのステージを繰り返す。休止期では、A3 はバルジ領域上端と漏斗部の毛包上皮細胞を標識したが、間葉細胞での発現は認められなかった。成長期では、A3 は峽部から漏斗部および下方へ再生しつつある上皮性毛包、さらに間葉系では再生結合織鞘と初期毛乳頭を標識した。退行期では A3 は、退行しつつある毛包上皮と間葉細胞を標識した。免疫組織化学的にこれらの A3 標識上皮細胞は、発生期と同様の特性を示した。以上より、A3 標識細胞は、毛包の未分化上皮細胞および毛包結合織鞘の未分化間葉細胞であり、毛周期の維持に関与することが示された。

## 【第 3 章】 ラット皮膚創傷治癒における A3 標識細胞の局在および特性

### 第 1 節 皮膚創傷治癒における A3 標識細胞の局在

成体ラットの体幹皮膚にパンチで直径 5 mm の創傷を作製し、その後 0 日 (対照) と、1 日から 26 日の組織を経時的に検査した。治癒過程初期の炎症相では、創床において炎症反応や血管新生が進行し、続く増殖相では、肉芽組織が形成されると同時に被蓋上皮化が進み、創床周囲の毛包は、成長期の形態を示した。その後修復相では肉芽組織の消退と、被蓋上皮化の完了および創床周囲の退行期毛包が観察された。対照群と比較して、A3 標識上皮細胞は創傷部に隣接する毛包から創床部の被蓋上皮に連続して広範囲に出現し、A3 標識間葉細胞は、結合織鞘の特に毛球上部で増数し、かつ広範囲に出現した。修復相では、その発現は退行期毛包の上皮および間葉成分とともに増殖相と比較して減少傾向にあった。以上から A3 標識細胞は創床部の被蓋化上皮と、被蓋化上皮と連続する創床周囲の成長期毛包の上皮細胞、および結合織鞘の間葉細胞であり、そのシグナルは増強することがわかった。

### 第 2 節 皮膚創傷治癒における A3 標識細胞の特性

創傷治癒過程での A3 標識毛包上皮細胞は、一部で CK15, Nestin および CD34 など未分化細胞マーカーを発現し、CK19 発現細胞と局在がほぼ一致した。A3 標識間葉細胞は、毛包結合織鞘の  $\alpha$ -SMA 発現筋線維芽細胞とは一致せず、CD34 および CD90 などの未分化マーカー発現細胞と一致した。以上より、A3 標識の毛包上皮細胞および間葉細胞は、未分化な細胞の特徴を有し、創傷治癒、特に組織の再生 (被

蓋上皮化) に関与していることが示された。

#### 【まとめ】

本研究ではラット体性幹細胞認識抗体 A3 の抗原エピトープと、標識細胞の正常ラット分布、特に毛包および創傷治癒における特性を追究し、以下の結果を得た。

1. A3 抗原は、非還元状態で分離後 **Western Blotting** で高分子量域に拡散した単一のバンドとして分離され、N 型糖鎖の存在が示唆された。
2. A3 は、重層上皮の基底細胞およびその直上の細胞と、組織周囲を取り巻く間葉細胞を標識し、これらの分布は体性幹細胞の分布と一致した。
3. 毛包発生と毛周期における A3 標識細胞は、毛包バルジ周囲と漏斗部の、基底細胞上層の未分化上皮細胞および結合織鞘の未分化間葉細胞であり、その発現は毛包発生と毛周期に伴い変化し、これらの組織形成に関与することが示された。
4. 創傷治癒では、A3 はシグナルの増強を伴い、創床周囲の成長期毛包の未分化上皮と、それに続く被蓋上皮を標識し、同時に毛包結合織鞘の増生した未分化間葉細胞を標識し、皮膚創傷治癒に関与することが示された。
5. A3 は上皮系と間葉系の分化する過程にある未分化な細胞 (体性幹細胞) を標識する、新奇かつ有用な抗体であることが示された。

#### 審査結果の要旨

特定の抗原を認識する抗体は、抗原を発現する細胞の機能特性や動態を免疫組織化学的に追究する上で有用である。ラットの間葉系幹細胞に由来する悪性線維性組織球腫 (MFH) から樹立したクローン細胞株を抗原として新たなモノクローナル抗体 A3 が開発された。A3 は、ラットの MFH の腫瘍細胞の他に、毛包構成細胞を含む正常組織に存在する未分化な体性幹細胞を標識することが分かった。毛包は、上皮系細胞と間葉系細胞から成り、再生と退行を周期的に繰り返す器官である。また、毛包には、上皮系組織であるバルジに存在する毛包幹細胞と、毛球周囲の結合織鞘に存在する未分化間葉系細胞が、毛周期のみならず、皮膚の生理的な再生や創傷後の皮膚組織の修復に深く関与しているとされる。このような複雑な組織構造と機能を有する毛包における A3 標識細胞の動態と特性については未だ十分には検討されていない。

そこで、今回の一連の研究では、A3 が認識するエピトープの解析に加え、主に免疫組織化学的手法を用いて、ラットの毛包、特に毛包の発生と毛周期、そして皮膚の創傷後の再生過程における A3 標識細胞の出現動態を詳細に解析し、毛包における A3 抗原を発現する細胞のユニークな特性を明らかにしている。

第 1 章では、ラット MFH 由来クローン細胞株 (MT-9) と同系ラットにおける MT-9 誘発腫瘍組織を用いて、A3 のエピトープ解析を行っている。抽出した A3 抗

原は、Blue Native-PAGE では 200 kDa 付近に、SDS-PAGE では 75-100 kDa に、拡散したバンドとして出現し、そのバンドは糖を染める PAS 染色に対し陽性を示した。さらに、N 型糖鎖を特異的に消化する Glycopeptidase F の処理でバンドが消失し、N 型糖鎖修飾阻害物質である Tunicamycin を添加した培養 MT-9 細胞で A3 抗原の発現が減弱した。以上から、A3 のエピトープには N 型糖鎖が含まれる可能性を示している。

第 2 章では、第 1 節において、ラットの発生段階と成体の全身組織における A3 標識細胞の局在を網羅的に調べている。その結果、A3 は、重層扁平上皮と毛包構成細胞の未分化な上皮系細胞と、内臓器の未分化な間葉系細胞を標識することを示している。特に、骨髄では未分化細胞マーカーである CD90 や CD105 を発現する細胞と A3 標識細胞が一致したことから、A3 は、体性幹細胞を標識することを確認している。第 2 節では、毛包の発生段階における A3 標識細胞の特性を解析している。A3 は、上皮性毛包では、バルジ領域から漏斗部の細胞を標識し、その標識細胞は CK15、Lgr6 や CK19 で標識される未分化細胞と関連して存在することを明らかにしている。一方、間葉性毛包では、CD90、CD34 や Nestin で標識される未分化細胞と局在が一致することを示している。すなわち、発生段階の毛包における A3 標識細胞は未分化な上皮性と間葉性の双方の毛包構成細胞を標識することを明らかにしている。第 3 節では、毛周期における A3 標識細胞の動態を解析している。A3 は、休止期ではバルジに接する峽部と漏斗部の一部の上皮性細胞を標識し、続く成長期ではその標識された上皮性細胞の範囲がさらに拡大したが、退行期では減退した。間葉性毛包においては、休止期では、A3 のシグナルは観察されなかったが、成長期では真皮乳頭、結合織鞘と毛乳頭の広範囲の細胞を標識し、退行期ではその標識細胞の範囲が減退した。以上から、A3 は、毛包の組織発生に関与する上皮系と間葉系の未分化な細胞を標識し、その出現は毛周期に依存して変化することを提示している。

第 3 章では、ラットの皮膚にパンチ創傷を作製し、創傷後の皮膚再生における A3 標識細胞の動態を解析している。A3 は、増殖相から修復相において、創床周囲の成長期の特性を示す毛包のバルジ領域を中心とした外根鞘とその上方の漏斗部の未分化な上皮細胞を標識した。さらに、標識された上皮細胞は、創床部の覆蓋上皮へと連続しており、成長期の未分化な毛包上皮が表皮再生に係ることを明らかにしている。また、その創床周囲の成長期の毛包では結合織鞘の未分化な間葉系細胞が A3 により標識され、その標識細胞は増殖相において拡大することを示している。以上より、皮膚の創傷治癒過程において、A3 により標識される上皮性と間葉性の未分化な毛包構成細胞と覆蓋上皮が、皮膚の修復に深く関与することを提示している。

本研究成果は、A3 のエピトープには N 型糖鎖が含まれること、さらに A3 標識細胞は、未分化な上皮性と間葉性の特性のある毛包構成細胞で、毛包の発生と毛周期、さらには皮膚創傷後の組織再生に関与することを明らかにしている。A3 は、ラットの体性幹細胞を認識する新たな抗体であることから、この成果は、獣医学・

医学、特に生命科学分野の基礎研究の新たな展開に資するものと考え。よって、最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。