



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	17型コラーゲンは毛包間表皮の増殖を制御する
Author(s)	渡邊, 美佳
Description	配架番号 : 2353
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12939号
Issue Date	2017-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12939
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/68614
Type	doctoral thesis
File Information	Mika_Watanabe.pdf



学位論文

17 型コラーゲンは毛包間表皮の増殖を制御する

(The role of Type XVII collagen in the
interfollicular epidermis)

2017 年 12 月

北海道大学

渡邊 美佳

学位論文

17 型コラーゲンは毛包間表皮の増殖を制御する

(The role of Type XVII collagen in the
interfollicular epidermis)

2017 年 12 月

北海道大学

渡邊 美佳

目 次

発表論文目録及び学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	6 頁
実験方法	7 頁
実験結果	16 頁
考察	48 頁
総括および結論	52 頁
謝辞	53 頁
引用文献	54 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Mika Watanabe, Ken Natsuga, Wataru Nishie, Yasuaki Kobayashi, Giacomo Donati, Shotaro Suzuki, Yu Fujimura, Tadasuke Tsukiyama, Hideyuki Ujiie, Satoru Shinkuma, Hideki Nakamura, Masamoto Murakami, Michitaka Ozaki, Masaharu Nagayama, Fiona M Watt, and Hiroshi Shimizu

Type XVII collagen coordinates proliferation in the interfollicular epidermis

eLife, 2017;6:e26635

本研究の一部は以下の学会に発表した。

Watanabe M, Natsuga K, Nishie W, Shimizu H.

The relevance of collagen XVII expression in epidermal differentiation and proliferation

The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Osaka, Japan, 2014.12

Watanabe M.

The role of basement membrane proteins in regulating epidermal homeostasis

The 46th Annual European Society for Dermatological Research meeting, Munich, Germany, 2016.9

Watanabe M.

The role of basement membrane proteins in regulating epidermal homeostasis

The 41th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Sendai, Japan, 2016.12

緒言

皮膚は、下層から脂肪層・真皮・基底膜・扁平上皮（表皮）からなる多重構造の組織であり、人体において最大の臓器である。このうち最も表層にある表皮は外界とのバリア機能を担っており、表皮の厚さの異常はバリア機能障害を引き起こす¹。また、表皮基底膜は真皮と表皮をつなぐ重要な接着装置として機能している。表皮は重層扁平上皮であるがゆえ、組織の恒常性維持のために半永久的に表皮幹細胞が自己再生、細胞増殖、分化を繰り返している²⁻⁴。表皮は、毛包や汗腺などの様々な付属器の表皮と、それ以外のいわゆる毛包間表皮に分類される。

生物としての老化、及び肉体的な老化は、時間経過に伴う様々な内因性及び外因性細胞傷害因子の集積で引き起こされる組織の機能的障害として定義される。それぞれの組織の維持を担っている組織幹細胞の多様性は、老化によって失われると指摘されている⁵。ヒト皮膚における老化は、真皮及び皮膚付属器の変化、いわゆる真皮の菲薄化や皺・白髪・脱毛といった表現型として顕著に表出される⁶。しかしながら、毛包間表皮における老化の影響は、報告された結果がまちまちであり、議論が分かれる。表現型以前は、ヒト及びマウスの老化した個体を使った *in vivo* 及び *in vitro* 両者の研究において、表皮の細胞増殖の減少が報告されているが^{2,7,8}、近年の報告においては逆に老化した表皮において細胞増殖の増加や、細胞増殖が持続するとされている^{9,10}。それゆえ、生物の個体における老化がどのように毛包間表皮及びその幹細胞に影響しているのかは未だ明らかにされていない¹¹。

表皮基底膜における細胞外基質タンパクは、真皮と表皮をつないでおり、また毛包間表皮の幹細胞のニッチとして重要な構成要素である。17 型コラーゲン（COL17）は II 型膜貫通型コラーゲンであり、基底膜において真皮と表皮をつなぐ接着装置であるヘミデスモソームの一部として存在している（図 1）

（Hemidesmosomal COL17、ヘミデスモソーム COL17）。COL17 の N 末端はヘミデスモソームに位置し、その細胞外ドメインは基底膜を構成する lamina densa（基底板）へと到達している¹²。また、一方で表皮基底細胞においてヘミデスモソーム以外の細胞膜上に COL17 が存在することも知られている¹³（図 2）（Non-hemidesmosomal COL17、非ヘミデスモソーム COL17）。COL17 は自己免疫性水疱症の 1 つである水疱性類天疱瘡の標的抗原であることが知られており¹⁴、また遺伝性の接合部型表皮水疱症（junctional epidermolysis bullosa、JEB）において欠失することもわかっている¹⁵。近年、COL17 が毛包幹細胞のニッチを形成していると報告された。COL17 をコードする *COL17A1* 遺伝子に変異をもち COL17 が欠損しているマウス及び JEB 患者においては白髪や脱毛

といった老化の表現型が早期から出現する、いわゆる早老化の表現型を認める^{16・18}。さらに、COL17を含めた基底膜タンパクが加齢に伴い減少することも知られている¹⁹。しかしながら、COL17の毛包間表皮維持における役割は未だ不明である。

本研究は、COL17の毛包間表皮の恒常性維持における包括的な役割を探索し、加齢における毛包間表皮の変化、加齢に伴う基底膜タンパクの動態について明らかにすることを目的としている。

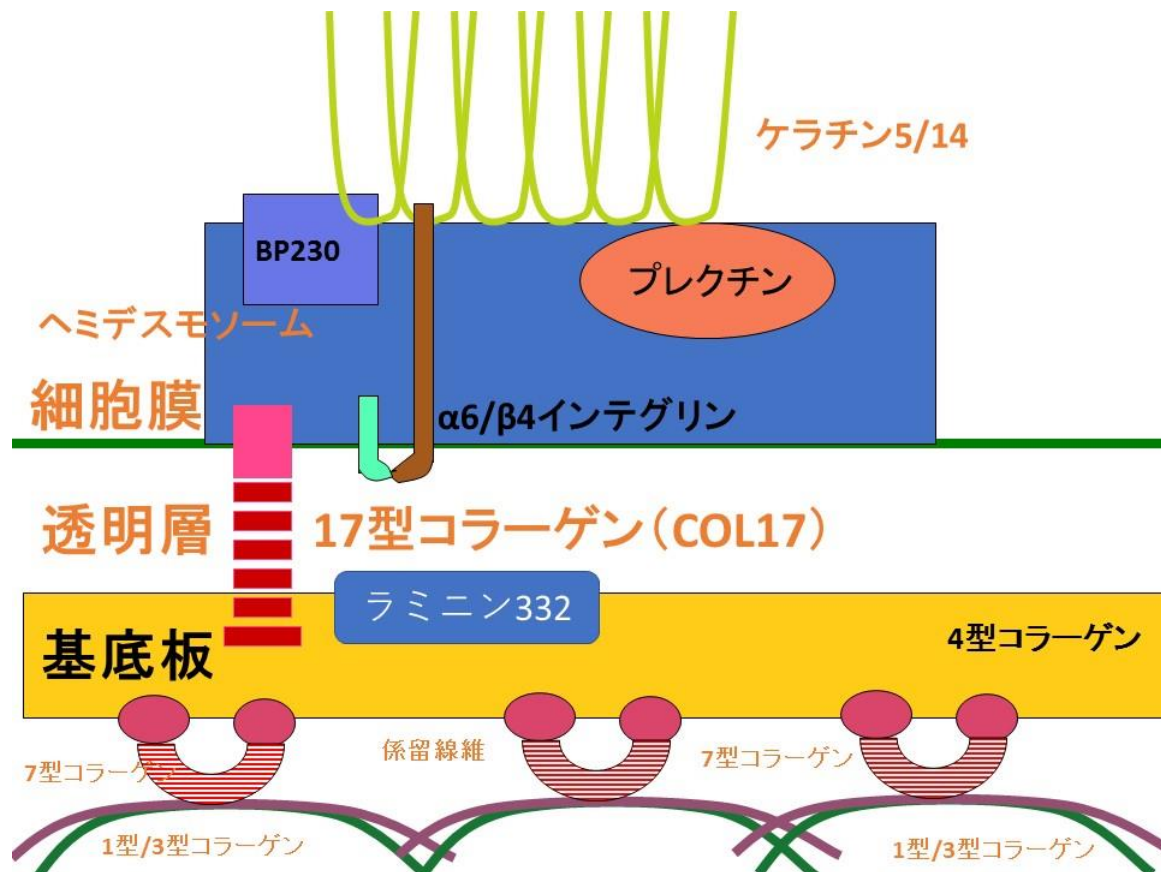


図1 皮膚基底膜領域と構成タンパク

表皮基底細胞および表皮真皮接合部におけるヘミデスモゾーム構成タンパク群と基底膜の模式図。



図 2 表皮基底細胞と COL17

表皮基底細胞および基底膜における 17 型コラーゲン（COL17）の分布模式図。

本研究の目的

COL17 は、表皮基底細胞のヘミデスモソームを構成し、表皮の恒常性・接着の維持に関わっていると考えられている。また、過去の研究から、COL17 はメラノサイトや毛包幹細胞の維持にも関与していると示されており、ヒト及びマウスでの COL17 欠損において白髪、皮膚萎縮など皮膚及び皮膚付属器の早老化がみられることから、COL17 が表皮幹細胞維持への影響を介し、皮膚の老化現象そのものにも関与している可能性も考えられる。そこで本研究は、表皮における包括的な視点での COL17 の表皮恒常性の維持、加齢における役割を解明することを目指すものである。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

BrdU	bromodeoxyuridine
BSA	bovine serum albumin
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
COL17	type XVII collagen
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	deoxyribonucleic acid
DIF	direct immunofluorescence
DMEM	dulbecco's modified eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
ECM	extracellular matrix
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FITC	fluorescein isothiocyanate
HRP	horseradish peroxidase
IIF	indirect immunofluorescence
EB	epidermolysis bullosa
JEB	junctional epidermolysis bullosa
MMP	metalloproteinases
mRNA	messenger ribonucleic acid
NHEKs	normal human epidermal keratinocyte
PBS	phosphate buffered saline
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	polymerase chain reaction
PFA	paraformaldehyde
PH3	phospho-histone 3
PI	propidium iodide
PVDF	polyvinylidene difluoride
TBS	tris buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction

実験方法

本研究はヘルシンキ宣言に則り、北海道大学大学院医学研究科医学倫理委員会の承認を得た上で、参加者から書面による同意を得て施行した。臨床検体の取り扱いは北海道大学病院自主臨床研究審査委員会に承認を受け、「北海道大学における臨床研究の取り扱いに関する指針」に則した。遺伝子組み換え実験は「北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規程」に則した。動物実験は、「北海道大学動物実験に関する規程」に則した。

1. 動物

Col17a1-/-マウスは当研究室で作成し、繁殖したものを使用した¹⁷。表皮特異的な K14 プロモーター下にヒト COL17 (hCOL17) を発現する K14-hCOL17 マウスは Kim B Yancey 教授 (テキサス大学、アメリカ) から譲り受け、繁殖したものを使用した。hCOL17 を発現しマウス COL17 を欠損した hCOL17+; Col17a1-/-マウスは、Col17a1-/-マウスと K14-hCOL17 マウスを交配させ作成し繁殖したものを使用した¹⁷。表皮特異的な K14 プロモーター下に Wnt シグナルの重要因子の一つである Lef1 の一部が欠損した deltaNLef1 を発現しドミナントネガティブ効果により Wnt シグナルが表皮特異的に阻害されている K14-deltaNLef1 マウスは Fiona M Watt 教授 (King's college London、イギリス) より譲り受け使用した²⁰。Wnt シグナルを可視化できる TOPGAL ベクターが全ての臓器で発現している ins-TOPGAL+マウスは RIKEN BRC (日本) より購入し²¹、Col17a1-/-マウスと交配し ins-TOPGAL+; Col17a1-/-マウスを作出し、繁殖させ使用した。C57BL/6 マウス (WT マウス) は、日本クレア (日本) より購入した。早老化モデルマウスである Klotho マウス²² も、日本クレアより購入した。プラスミノージェン活性化抑制因子をコードする Serepine1 を欠損する Serepine1-/-マウスは Jackson ラボラトリー (アメリカ) より購入した。ジェノタイピングは、アルカリ法を用いて 1cm 程度のマウス尾から粗雑な DNA を抽出し鋳型として、GoTaq Green Master Mix (Promega 社、アメリカ)、特異的プライマーを用いて PCR の後、アガロースゲル電気泳動をして確認した。全てのマウスは、sevoflurane (和光株式会社、日本) を使用した麻酔後に安楽死させて、サンプリングを行った。サンプリングは、産まれてから 1 日目を postnatal day 1 (P1) とし、P4、P10、P20、及び adult では 6 週から 10 週を若年、1 年 7 ヶ月以上を老年としてサンプリングした。また、Col17a1-/-マウスについては 3 ヶ月齢でもサンプリングを行った。

2. BrdU を使用した増殖細胞標識化

BrdU (BD pharmingen 社, アメリカ) は PBS に溶解し、100 μ g/ml となるように調整し、0.22 μ m の MILLEX G フィルター (Millipore 社, アメリカ) を用いて滅菌した。安楽死 4 時間前に腹腔内注射にて、新生仔マウスには一頭あたり 10 μ g を投与し、成体マウスには体重 1g あたり 8.33 μ g を投与した。

3. 組織学的解析に使用した抗体

下記の抗体を使用した。抗 E-cadherin 抗体 (Cell Signaling Technology 社, アメリカ ; 24E10)、抗 phospho histone H3 (PH3) (Ser10) 抗体 (Merck Millipore 社, アメリカ)、抗 PCNA 抗体 (Dako 社, アメリカ ; PC10)、anti-BrdU (Dako ; M0744)、抗 loricrin 抗体 (Covance 社, アメリカ)、抗 cleaved caspase-3 抗体 (Cell Signaling Technology)、FITC (fluorescein isothiocyanate) 結合抗 CD3e 抗体 (BioLegend 社, アメリカ ; 145-2C11)、Alexa Fluor 488 結合抗 F4/80 (Affymetrix 社, アメリカ, BM8)、FITC 結合抗 Ly-6G 抗体 (Beckman coulter 社, アメリカ ; RB6-8C5)、抗 TGF β 1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社, アメリカ)、抗 p-Smad2 抗体 (Cell Signaling Technology ; 138D4)、抗 LEF1 抗体 (Cell Signaling Technology ; C12A5)、抗 β -catenin (BD pharmingen ; 14/Beta-catenin)、抗 hCOL17 NC16A domain 抗体 (自家作成 ; TS39-3)²³、抗 hCOL17 細胞外部位認識抗体 (平子善章講師 (名古屋大学) より譲受 ; mAb233)²⁴、抗 m COL17 NC14A domain 抗体 (自家作成 ; MoNC14A)²⁵、抗 COL17 細胞内部位認識抗体 (Abcam 社, イギリス ; ab186415、平子善章講師 (名古屋大学) より譲受 ; 1A8c²⁴)、抗 plectin 抗体 (Abcam ; ab32528)、抗 BP230 抗体 (Cosmo bio 株式会社, 日本 ; 239)、抗 desmogleins 1 and 2 抗体 (PROGEN 社, ドイツ ; DG3.10)、抗 integrin β 1 抗体 (Chemicon International 社, アメリカ ; MB1.2)、抗 integrin α 6 抗体 (BD Pharmingen ; GoH3)、抗 ELANE 抗体 (Abcam)、抗 phospho aPKC 抗体 (Santa Cruz ; sc-271962)、抗 survivin 抗体 (Cell Signaling Technology ; 71G4B7)、抗 anti-laminin γ 1 抗体 (Abcam ; LT3)。全ての抗体において、至適濃度はマウス皮膚もしくはヒト皮膚を用いて事前に検討を行った。

4. 組織学的解析

マウス毛包間表皮の観察対象として、マウス掌蹠の皮膚を用いた。マウス及びヒト皮膚のサンプルは、10%ホルマリン溶液 (和光) で固定して脱水後にパラ

フィンへ包埋したブロックを作成し、薄切して 5 μ m 切片とした。もしくは、凍結切片としてクリオモルド・プラスチック包埋皿 (サクラファンテックジャパン株式会社、日本) にサンプルを入れ、クリオマウント (武藤化学株式会社、日本) で充填した。ドライアイス上で急速に凍結し、固定台に載せて薄切して 5 μ m 切片を作成した。凍結切片については、4% パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde、PFA、和光) /PBS 溶液もしくは冷凍アセトン (和光) で 10 分固定、または未固定で使用した。パラフィン切片については、キシレン (和光) 及びエタノール溶液を使用した脱パラフィン処理の後、抗原賦活化のため、pH6.0 のクエン酸 (和光) バッファーまたは pH9.0 の Tris-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA、和光) バッファーにて 20 分圧力鍋で電子レンジを使用して加熱した。PBS にて 3 回洗浄後、ブロッキングバッファー (0.5% fish skin gelatin (和光)、5% goat serum (和光)、4% BSA (和光) in PBS) にて 1 時間室温にてブロッキングし、1 次抗体を同じくブロッキングバッファーに至適濃度に希釈して、4°C で 1 晩静置した。その後、PBS で 3 回洗浄し、同じくブロッキングバッファーに希釈した Alexa488 (Thermo fisher scientific 社、アメリカ) もしくは Alexa647 (Thermo fisher scientific)、FITC (Thermo fisher scientific) 結合二次抗体を室温で 1 時間静置した。また propidium iodide (PI、和光) は 100 倍、もしくは 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI、和光) は 10000 倍でブロッキングバッファーに希釈して、二次抗体と同時に核染色を施行した。切片の封入には、Permaflour aqueous mounting medium (Thermo fisher scientific) もしくは ProLong diamond antifade mountant with DAPI (Thermo fisher scientific) を使用した。全ての染色切片は共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus fluoview FV1000、オリンパス株式会社、日本) を使用して観察した。得られた結果は FV1000 software (オリンパス)、もしくは Image J software (NIH、アメリカ) を使用して解析した。免疫蛍光染色における全ての値は組織切片の長さもしくは組織切片面積で標準化を施行し、任意単位 (Arbitrary unit、AU) として表記した。

免疫組織化学染色においては、horseradish peroxidase (HRP) 結合の抗体を使用した。上記の免疫蛍光染色と同様に、ブロッキング後、対比染色としてヘマトキシリン染色を同時に施行した。画像は光学顕微鏡 (NIKON、日本; Keyence、日本) で観察し取得した。

ヒト皮膚に関しては、健常人の若年 (10 歳以下) と老年 (85 歳以上) の非露光部から採取した。表皮基底細胞におけるヘミデスモソーム COL17 と非ヘミデスモソーム COL17 を区別するための免疫染色においては、未固定の凍結切片を 1 次抗体静置前に 0.5% Triton X-100 (Sigma Aldrich、アメリカ) 溶液で 1 時間室温に静置した¹³。

皮膚の厚さの計測には、最低 3 箇所 footpad (組織に汗腺が存在する部位) 近傍から 3 箇所ずつ画像を撮影し、平均化した。表皮細胞数は PI 陽性細胞数を計測し、切片の長さで標準化した。表皮細胞層数に関しては、E-cadherin 染色で得られた画像を使用して計測した。細胞増殖マーカーもしくは Wnt 関連分子の基底細胞における陽性細胞計測においては、基底細胞のみに陽性な細胞を、切片の長さもしくは切片における基底細胞の総数で標準化した。全ての組織学的な解析において、免疫染色は全て 3 回の独立した実験を施行し、汗腺の影響を避けるため観察部位から汗腺そのものは除いた。

超解像度顕微鏡 (high-resolution structured illumination microscopy、SIM) には N-SIM 顕微鏡 (NIKON) 及び CCD カメラ (Andor technology、日本) を用いた²⁶。画像再構成には NIS-elements software (NIKON) を用いた。

分裂方向決定の計測は、細胞分裂の方向に関して survivin 染色を用いて決定した²⁷。具体的には、細胞分裂の方向は laminin β 1 染色で標識した基底膜に対して 2 つの分裂する娘細胞の中心に発現する survivin が平行であるか、もしくは垂直であるかを計測した。全ての細胞分裂数が非対称性分裂 (asymmetrical cell division、ACD) と対称性分裂 (symmetrical cell division、SCD) を含んで 100% となるように計算した。

5. TOPFLASH ベクターを使用した in vitro アッセイ

Wnt シグナルを luciferase で可視化する the SuperTopFlash コンストラクトの安定発現した 293 細胞 (SuperTopFlash 293、STF293)²⁸ を、10% 胎児ウシ血清 (Sigma Aldrich) 及び 1% penicillin-streptomycin-amphotericin B 溶液 (和光) を添加した Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM) 中で培養して使用した。マイコプラズマに細胞が感染していないことを PCR 法を用いて確認した。Wnt の activator である Wnt3a conditioned medium (Wnt3a CM) は高田慎治教授 (自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター) より提供された。

human COL17A1 cDNA (Kim B. Yancey 教授より供与) を pcDNA3.1/Zeo にサブクローニングし、293STF 細胞へ Opti-MEM (Thermo scientific fisher) 及び Lipofectamine2000 (Thermo scientific fisher) を利用してトランスフェクションした。コントロールとして hCOL17 が挿入されていない同ベクターを使用した。Zeocin (Thermo fisher scientific) を利用して、シングルセルクローニングした。ウェスタンブロットを用いて hCOL17 が発現していることを確認した後、アッセイへと進んだ。

空ベクター及び hCOL17 in pcDNA3.1/Zeo を安定発現した 2933STF 細胞を

96 穴プレートへ播種し、Renilla を発現する pGL4.75 プラスミドをコントロールとして同時に Lipofectamine2000 (Thermo scientific fisher) と Opti-MEM (Thermo scientific fisher) を利用してトランスフェクションした。播種 24 時間後に Wnt3a CM を培地の 30%濃度になるように添加した。Wnt3a CM 添加 2 日後に Renilla と Luciferase の発光を Dual-Luciferase reporter assay system (Promega) を使い、Spectra Max Paradigm (Molecular Device 社、日本) を用いて計測した。全ての計測値は Renilla の発光値で標準化した。

6. Wnt シグナル阻害剤を WT マウス新生仔に投与する in vivo での増殖能解析

Wnt シグナル阻害剤である、IWP-2 (Sigma Aldrich) 及び Wnt-C5 (Cayman chemical 社、アメリカ) をそれぞれ Dimethyl sulfoxide (DMSO) 及び PBS に溶解し、IWP-2 は体重 1g あたり 10mg、Wnt-C59 は体重 1g あたり 20mg 投与となるように調整し^{29,30}、新生仔 WT マウスの腹腔内に投与した。投与 1 日後にサンプリングした。

7. ホールマウント染色

X-gal 染色で Wnt シグナリングが可視化される ins-*TOPGAL* マウスでの X-gal 染色においては、beta-galactosidase staining kit (Takara-bio 社、日本) を付属のプロトコールに則り使用した。まずマウス後肢の足底を 4%PFA・PBS 溶液にて 2 時間室温で静置し固定し、染色液に 1 晩室温で静置した。PBS で洗浄後に *Moiwol-mount solution* で包埋した。LacZ 陽性部位の撮影は、汗腺の影響を除外するため、後肢足底の踵の部分を使用して行った。光学顕微鏡下でのコントロール及び Col17a1-/-マウスの LacZ 陽性部位の撮影は、それぞれコントロールと Col17a1-/-マウスでの光量が同等となるように設定した。LacZ 陽性部位の解析は Image J を用いて行った。

表皮ホールマウントでの蛍光染色においては、表皮シートをマウス手掌測定から剥離する際に、既報告のプロトコール³¹に若干の修正を加えて剥離を施行した。表皮シートにおける細胞膜検出には、Alexa633 結合 wheat germ agglutinin (WGA、Thermo fisher scientific) を利用した。3 次元再構成画像の構築は Metamorph software (Molecular Device 社、日本) を用いた。

8. Ex vivo での atypical PKC 阻害剤を用いたアッセイ

マウス掌蹠の whole skin をサンプルした後、下記の阻害剤に 4℃で 1 時間静置した。EDTA、pan-PKC 阻害剤である Go6983 (Tocris bio 社、イギリス)、atypical PKC (aPKC) 特異的阻害剤である mylistoylated pseudosubstrate inhibitor (myr PSI、Calbiochem 社、アメリカ) をそれぞれ至適濃度で使用した³²⁻³⁴。

9. ヒト表皮細胞 (Normal human keratinocytes, NHEKs) を使用した 3D 再構成表皮での aPKC 阻害剤を用いたアッセイ

ヒト表皮細胞 (Normal human keratinocytes, NHEKs) を使用した 3D 再構成表皮 (LabCyte EPI-MODEL) は J-TEC (日本) より購入した。添付のプロトコールに従い、薬剤投与 12 時間前に培地での培養を開始した。aPKC 阻害剤を使用した ex vivo でのアッセイと同様の薬剤濃度にて、4℃で 1 時間薬剤を投与しサンプリングを行った。

10. 定量的 PCR (quantitative RT-PCR, qRT-PCR)

mRNA はマウス掌蹠皮膚より RNeasy Mini kit (Qiagen、アメリカ) を用いて抽出し、SuperScript III First-strand Synthesis System (Thermo fisher scientific) を利用し cDNA を作成した。quantitative RT-PCR (qRT-PCR) は、目的遺伝子検出に合わせた primer 及び Fast SYBR (Thermo scientific fisher) を利用し、STEP-One plus システム (Applied biosystem、アメリカ) で PCR シークエンスを行なった。使用した全ての primer は表 1 に記載した。

遺伝子名	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
<i>mTcf7l1</i>	TGGTCAACGAATCGGAGAAT	TCACTTCGGCGAAATAGTCG
<i>mTcf7l2</i>	CTCCACAGCTCAAAGCATCA	CACCACCTTCGCTCTCATCT
<i>mLef1</i>	CGCTAAAGGAGAGTGCAGCTA	GCTGTCTCTCTTTCCGTGCT
<i>mTcf7</i>	GCCAGAAGCAAGGAGTTCAC	ACTGGGCCAGCTCACAGTAT
<i>mCtnnb1</i>	AAGGCTTTTCCCAGTCCTTC	CCCTCATCTAGCGTCTCAGG
<i>mFzd7</i>	GACCAAGCCATTCTCCGTG	CAGGTAGGGAGCAGTAGGGTA
<i>mFzd4</i>	AACCTCGGCTACAACGTGAC	GGCACATAAACCGAACAAAGGAA
<i>mNfatc4</i>	CAAGCTGCGAGGATGAGGAG	ACAGCATGGAGGGGTATCCT
<i>mWnt4</i>	GTCAGGATGCTCGGACAACAT	CACGTCTTTACCTCGCAGGA

<i>mWnt5a</i>	GGACCACATGCAGTACATTGG	CGTCTCTCGGCTGCCTATTT
<i>mFzd3</i>	TGATGAGCCATATCCCCGACT	GCCTATGAAATAGCGAGCAAATG
<i>mFzd8</i>	CCGCTGGTGGAGATACAGTG	CGGTTGTAGTCCATGCACAG
<i>mItga6</i>	ATGCCACCTATCACAAGGCT	GCATGGTATCGGGGAATGCT
<i>mItgb1</i>	ATCATGCAGGTTGCGGTTTG	TGGAAAACACCAGCAGTCGT
<i>mTgm1</i>	TTTGATGGGTGGCAGGTTGT	GCCATTCTTGACGGACTCCA
<i>mCol17</i>	GATGGCACTGAAGTCACCGA	TATCCATTGCTGGTGCTCCC
<i>mPpl</i>	GCATGCTGAGTGGAAGGAGT	AAGTCTGAGTCCACCTTGCG
<i>mEvpl</i>	TCCTACAAGCTGCAAGCACA	TCTAAGGAGCAGCGGTAGGT
<i>mIvl</i>	CTCCTGTGAGTTTGTTTGGTCT	CACACAGTCTTGAGAGGTCCC
<i>mCyc1</i>	ATCGTTCGAGCTAGGCATGG	GCCGGGAAAGTAAGGGTTGA
<i>mGusb</i>	CAGGGTTTCGAGCAGCAATG	ACCCAGCCAATAAAGTCCCCG
<i>mGapdh</i>	TCCTGCACCACCAACTGCTTAGC	TGGATGCAGGGATGATGTTCTGG
<i>hCOL17</i>	TCAACCAGAGGACGGAGTCA	TCGACTCCCCTTGAGCAAAC
<i>h18S</i>	GGCGCCCCCTCGATGCTCTTAG	GCTCGGGCCTGCTTTGAACACTCT

表 1 qRT-PCR に使用した primer 一覧

11. バリア機能解析アッセイ

トルイジンブルー（和光）を用いた皮膚透過性の in situ 試験によるバリア機能解析は下記の論文の記載に従った³⁵。経皮的水分量喪失（Transepidermal water loss、TEWL）は胎児齢 18.5 日の胎児マウスの背部皮膚を用いて蒸発計（AS-VT100R、アサヒバイオメッド、日本）にて測定した³⁶。

12. 透過型電子顕微鏡を用いた組織学的解析

マウス掌蹠から採取したサンプルは、2%グルタルアルデヒド溶液で固定後、1%四酸化オスミウム溶液でさらに置換・固定し、エポン 812 樹脂にて包埋した。包埋されたサンプルは光学顕微鏡での観察用には 1 μ m で薄切し、電子顕微鏡での観察用には 70nm で薄切した。70nm の薄切切片は、ウラニルアセテート及びクエン酸鉛で染色し、透過型電子顕微鏡（H-700、日立製作所、日本）を用いて観察を行った。

13. NHEKs を用いた COL17 ノックダウンでの増殖能アッセイ

Lonza (アメリカ) より購入した NHEKs は KGM-Gold (Lonza、アメリカ) で培養した継代数 3-4 のものを使用し、96 穴プレートに播種した。播種と同時に 10 μ M の human COL17A1 siRNA2 種類とコントロール (Mock) (Thermo fisher scientific) を RNAimax (Thermo fisher scientific) 及び Opti-MEM (Thermo fisher scientific) を利用してトランスフェクションした。細胞増殖のカーブは、xCELLigence system (ACEA bioscience、アメリカ) を用いて計測・計算した。

コロニーフォーメーションアッセイにおいては、上記と同様の継代数 3-4 の NHEKs を利用し、1000 個/ml となるように調整しマイトマイシン C (和光) で処理した 3T3-J2 細胞上に 6 穴フォーマットで播種した。播種と同時に上記と同様に human COL17A1 siRNA2 種類と Mock をトランスフェクションした。播種した細胞は 10%胎児ウシ血清 (Sigma Aldrich) 含有 KGM-Gold (Lonza) にて 2 週間培養した。コロニー検出のため、4%PFA で 10 分固定後、1%ローダミン (和光) 水溶液にて 20 分静置し染色した。コロニー数とコロニーサイズは Image J software (NIH) にて解析した。使用した細胞はマイコプラズマ陰性であることを確認した。

14. 免疫ブロットアッセイ

培養した NHEKs は 1%NP-40 バッファー (組成: 1%NP-40 (Sigma Aldrich) 0.1M NaCl、25mM Tris-HCl (pH 7.4) 10mM EDTA、1:100 希釈プロテアーゼインヒビターカクテル (Sigma-Aldrich)) にて氷上で 30 分間反応させて細胞を溶解した。セルスクレーパーを用いて細胞溶解物を回収した後、4 $^{\circ}$ C、14000rpm、30 分間遠心し、上清をセルライセートとして回収した。セルライセートは NuPAGE4-12% Bis Tris gel (Thermo fisher scientific) を用いて泳動して分離した後、PVDF 膜へ転写した。PVDF 膜は COL17 検出用の 1 次抗体 (抗 hCOL17C 末端認識抗体、自家作成、09040)²³、及びローディングコントロールとして β -tubulin 検出用の 1 次抗体 (抗 β -tubulin 抗体、Abcam、イギリス) にて 4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。HRP 結合 2 次抗体と室温で 1 時間反応させた後、ECL-plus (GE Healthcare、アメリカ) を室温で 5 分間反応させ、LAS-4000 mini (富士フイルム) でシグナルを検出した。

15. JEB 患者ヒト

正常ヒト皮膚は手術検体の正常部余剰皮膚組織から、JEB 患者皮膚は病変部皮膚組織から採取した。皮膚はエピネフリン添加 1%キシロカインで局所麻酔し、15 番メスを用いて皮膚を切除し、5-0 PDS あるいは 4-0 PDS で真皮縫合し、5-0 ナイロンで皮膚縫合した。採取した皮膚はホルマリン固定後パラフィンブロックを作成し、薄切した後、免疫染色で使用した。JEB 患者については、2 人の JEB, generalized other subtype 患者の皮膚サンプルを使用した³⁷ (Masuda et al.,論文準備中)。これらの JEB 患者は COL17A1 に早期停止コドンをもたらす変異を有しており、COL17 が皮膚において全く発現しておらず、15 歳と新生児の日本人男児である。コントロールとしての正常ヒト皮膚は、年齢・性別・皮膚採取部位を一致させた健常人から取得した。

16. マイクロアレイ解析

トータル RNA は若年 WT マウス及び老年 WT マウスの掌蹠皮膚から抽出し、各グループサンプル数を 4 として、Agilent SurePrint G3 Mouse v2 8×60K 1 color 8 microarray (Agilent Technology、アメリカ) へハイブリダイズさせた。得られたマイクロアレイデータは、GeneSpring software (Agilent Technology) を用いて解析した。

17. アレイデータオンライン公開

マイクロアレイ解析により得られたデータは、ArrayExpress データベースにて、E-MTAB-4916 の番号の元に公開済みである。

18. 統計学的解析

統計学的解析は GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, アメリカ) を用いた。全ての解析結果は平均 ± 標準誤差で示した。P 値 は student-t 検定、Mann-Whitney 検定、もしくは One-way Anova 検定とそれに続く Tukey 検定によって測定した。P 値は 0.05 未満を有意差ありとみなし、*0.01 ≤ p < 0.05, **0.001 ≤ p < 0.01, ***0.0001 ≤ p < 0.001, ****p < 0.0001 で示した。

実験結果

1. COL17 の欠失によりマウス新生仔毛包間表皮は一過性に過増殖となる

まず、Col17a1-/-マウス¹⁷の掌蹠皮膚を用いて、毛包のない毛包間表皮の表現型を調べた。新生仔 (P1) において、表皮細胞数・表皮層数両者において一過性の過増殖を認め、細胞増殖マーカーである PH3 陽性細胞数も増加していた (図 3a-b)。Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 陽性細胞及び、BrdU 陽性細胞も Col17a1-/-マウスの P1 毛包間表皮にて増加しており (図 3c)、これらは COL17 の欠損の影響により、細胞周期において S 期・M 期両者が P1 毛包間表皮の keratinocyte で増殖していることを示している。この Col17a1-/-マウスの新生仔期で過増殖となる毛包間表皮の表現型は、徐々に失われ、表皮の厚さ・PH3 陽性細胞数も P20 にはコントロールとほぼ同等となった (図 3a-b)。

次に、我々はその他の基底細胞のマーカーや、角化細胞のマーカーが Col17a1-/-マウスの過増殖な P1 毛包間表皮で変化しているかどうかを観察した。Col17a1-/-マウスの P1 毛包間表皮の qPCR では、COL17 欠損に伴う代償性変化として Integrin $\alpha 6$ (Itga6) の発現は上昇していたが、その他の基底膜タンパクである Integrin $\beta 1$ (Itgb1)、Integrin $\beta 4$ (Itgb4)、Laminin $\beta 3$ (Lamb3)、Laminin $\gamma 2$ (Lamc2) は変化していなかった (図 3d、図 4a)。一方で、Transglutaminase1 (Tgm1)、Periplakin (Ppl)、Involucrin (Ivl) 等の角化関連タンパク遺伝子の mRNA 発現量に関して有意差はないが、上昇傾向にあった (図 3d)。しかし、Loricrin (LOR) の染色では Col17a1-/-マウス P1 毛包間表皮とコントロールで、染色される範囲に差はなかった (図 3e)。胎児齢 18.5 (Embryo 18.5 : E18.5) での Col17a1-/-マウスとコントロールにおける色素透過性試験と経表皮的水分喪失 (Trans epidermal water loss, TEWL) は、変化を認めなかった (図 4b-c)。これらから P1 の Col17a1-/-マウス毛包間表皮におけるケラチノサイトの分化は変化していないことが推測される。細胞死のマーカーである Cleaved caspase-3 染色の増加も P1 の Col17a1-/-マウス毛包間表皮では認められなかった (図 4e)。透過型電子顕微鏡画像においては、P1 の Col17a1-/-マウス毛包間表皮での真皮表皮境界部において、ヘミデスモソームの低形成を認め、この結果は Col17a1-/-マウスの背部皮膚における過去の報告と一致した (図 4d)¹⁷。また、Col17a1-/-マウス毛包間表皮 P1 における過増殖な表現型に炎症の有無が寄与しているかどうか解析した。Col17a1-/-マウス毛包間表皮 P1 の真皮における、CD3 陽性細胞 (リンパ球)、F4/80 陽性細胞 (マクロファージ)、Ly-6G 陽性細胞 (好中球) の数はコントロールと比較して変化がなく、炎症はこの表現型に寄与していないことが判明した。

P1 の Col17a1-/-マウス毛包間表皮における過増殖の表現型は、基底膜タンパクである Itga6 欠損マウス及び Itgb1 欠損マウスの背部皮膚においても認められており^{38,39}、基底膜タンパクによる真皮表皮の接着が弱まることにより、新生仔マウスにおいて一時的な表皮肥厚を引き起こしている可能性が考えられる。

さらに、このマウス掌蹠皮膚での毛包間表皮における過増殖の表現型が、部位限局的なものかを解析した。Col17a1-/-マウス背部皮膚における P1 毛包間表皮では、細胞増殖マーカーである PH3 及び PCNA 陽性細胞数はコントロールと比較して変化がなかった (図 5a)。この掌蹠皮膚と背部皮膚における増殖マーカーに示される表現型の違いは、背部皮膚毛包間表皮の個体発達に伴う毛包の影響や、毛包間表皮の存在する体の場所による制御の違いから起因する可能性があると考えられる⁴⁰⁻⁴²。また、我々は COL17 欠損による細胞の内因性に伴う変化を、正常人培養表皮細胞 (NHEKs) に対する COL17A のノックダウン (KD) による手法で解析した。細胞増殖能は COL17 を KD したものでごくわずかに低下していた (図 5b-d)。この結果は、Col17a1-/-マウス背部皮膚から樹立した細胞でも同様であった¹⁸。Colony 形成能力についてもこれらの COL17 を KD した細胞で見たが、コントロールと比較して明らかな変化はなかった (図 5e-f)。これらから、Col17a1-/-マウス毛包間表皮における増殖能力は in vivo の条件に依存することが強く示唆された。

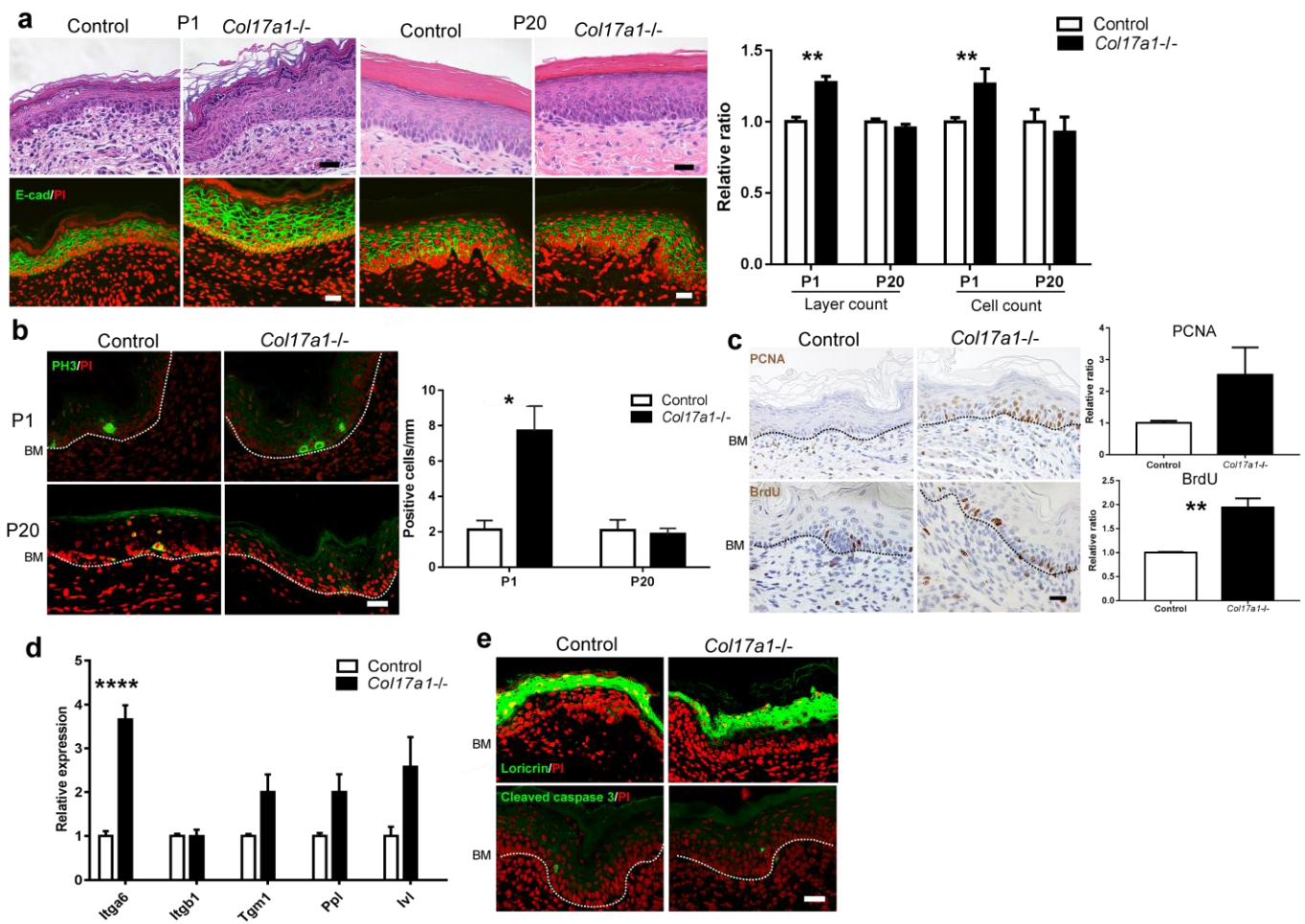


図3 COL17欠損は新生仔マウスにおいて一過性の毛包間表皮過増殖を引き起こす。

(a) P1とP20での *Col17a1*^{-/-} 及び *Col17a1*^{+/-} もしくは *Col17a1*^{+/+} の同腹仔からのコントロール (Control) 毛包間表皮におけるヘマトキシリン&エオジン (H&E) 及び E-cadherin (E-cad) 染色 (赤: PI 核染色)。P1 : n=5、P20 : n=4。スケール: 20 μ m。右グラフ: 表皮細胞層及び表皮細胞数の定量。値はコントロールと比較しての相対値。(b) 同様に P1とP20での *Col17a1*^{-/-} 及び同腹仔からのコントロール毛包間表皮における PH3 染色。スケール: 20 μ m。右グラフ: 表皮 1mm あたりの PH3 陽性表皮基底細胞数。P1 : n=4、P4 : n=4。BM: basement membrane、基底膜を示している。(c) P1とP20での *Col17a1*^{-/-} 及び同腹仔からのコントロール毛包間表皮における PCNA 及び BrdU 染色。スケール: 20 μ m。右グラフ: PCNA 及び BrdU 染色陽性細胞数、PCNA : n=5、BrdU : n=4。値はコントロールと比較しての相対値。(d) Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) における *Itga6*、*Itgb1*、*Tgm1*、*Ppl* 及び *Ivl* の発現量 (n=5)。(e) P1での

Col17a1^{-/-} 及び同腹仔からのコントロール毛包間表皮における Loricrin 及び cleaved caspase-3 染色。3 匹のサンプルより代表的な画像を示している。スケール：20 μ m。BM：basement membrane、基底膜を示している。全てのグラフにおける値は標準値 $\pm$ 標準誤差である。*0.01<p<0.05、**0.001<p<0.01、****p<0.0001。Student-t 検定を使用。

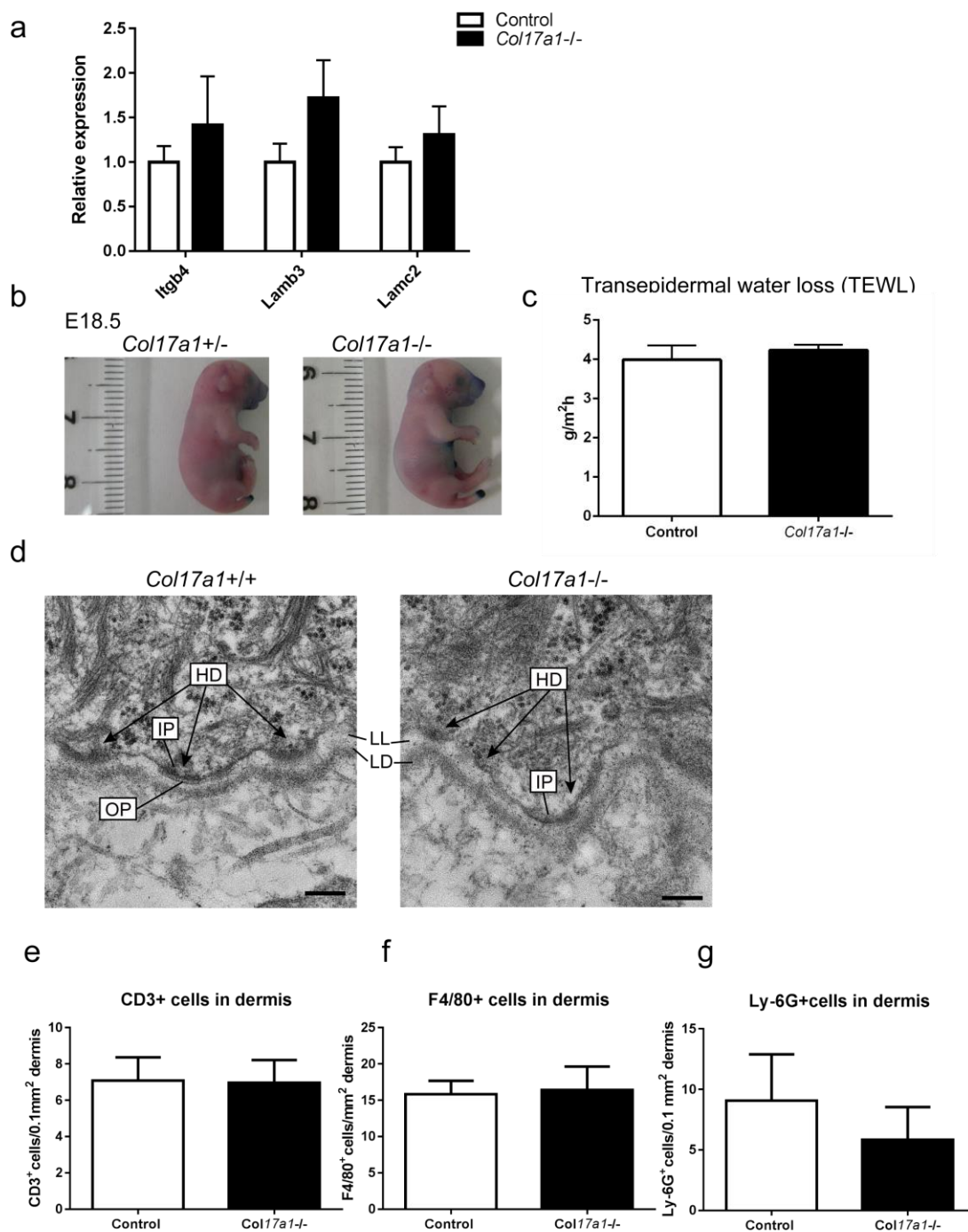


図4 E18.5における *Col17a1*^{-/-} と同腹仔コントロール (control) でのバリア機能試験結果。P1 *Col17a1*^{-/-} 毛包間表皮及び同腹仔 control での基底膜領域での超微細構造及び真皮での炎症細胞浸潤。

(a) P1 *Col17a1*^{-/-} 毛包間表皮及び同腹仔 control での *Itgb4*、*Lamb3* 及び *Lamc3* の mRNA 発現量 (n=4)。 (b) E18.5 でのトルイジンブルーを使用した色素透過試験結果。 *Col17a1*^{-/-} と control で染色性に差はない。(*Col17a1*^{-/-}

Δ -マウスは 3 匹、Control は 8 匹からの代表的な画像)。(c) 経皮的水分喪失 (transepidermal water loss、TEWL) の結果。Col17a1 Δ -マウスは 3 匹、control は 8 匹からの結果。(d) 掌蹠表皮での電顕画像。ヘミデスモソーム (hemidesmosomes、HD) はインナープラーク (inner plaques、IP)、アウタープラーク (outer plaques、OP) 及び係留線維から成り立ち、Col17a1 Δ -マウスでは Col17a1 $+/+$ マウスと比較して HD 及び係留線維が不明瞭となっている。LL : Lamina Lucida、透明帯、LD : Lamina densa、基底板。スケール : 0.2 μ m。2 個体からの代表的画像を示している。(e) - (g) Col17a1 Δ -マウス及びコントロールの掌蹠皮膚の真皮における炎症細胞浸潤の定量。n=4。全てのグラフにおける値は標準値 $\pm$ 標準誤差である。 $*0.01 < p < 0.05$ 、 $**0.001 < p < 0.01$ 。Student t 検定を使用。

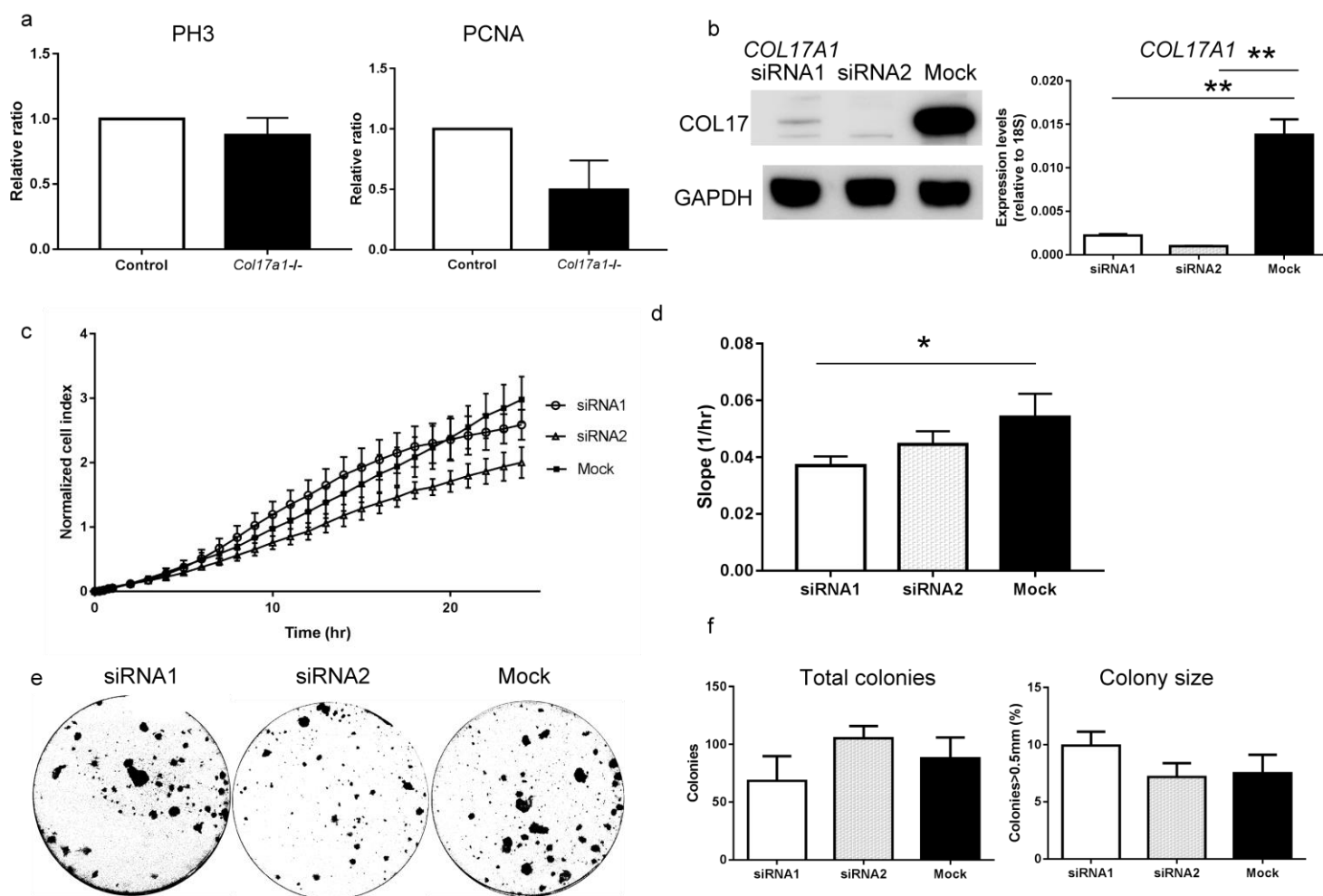


図 5 Col17a1^{-/-}マウスの背部皮膚毛包間表皮 における増殖能、及び COL17A1 siRNA にて COL17 を knockdown (KD) した際の NHEKs での増殖能。

(a) Col17a1^{-/-}マウス背部皮膚における PH3 及び PCNA 陽性細胞数 (Col17a1^{-/-}は n=4、コントロールは n=5)。(b) NHEKs における COL17A1 knockdown 効率。左パネルは COL17 を KD した NHEKs からのライセートを用いた COL17 の免疫ブロット。右のパネルは COL17 を KD した NHEKs からの mRNA を用いた COL17 の qRT-PCR における発現量 (n=3)。(c-d) COL17 を KD した NHEKs とコントロールにおける細胞増殖曲線 (c) 及び曲線の傾き (d) (n=3)。(e-f) COL17 を KD した NHEKs とコントロールにおけるコロニーフォーメーションアッセイ。全体像 (e)、全てのコロニー数 (f-左) 及び直径が 0.5 mm 以上のコロニーの割合 (f-右) を示している。(n=3)。全てのグラフにおける値は標準値±標準誤差である。*0.01<p<0.05、**0.001<p<0.01。Student-t 検定を使用。

2. COL17はWnt- β -catenin シグナリングを介してマウス新生仔毛包間表皮の増殖を調節している

様々なシグナリング分子が毛包幹細胞 (hair follicle stem cells、HFSCs) や表皮の恒常性維持に寄与していることは良く知られているが⁴³、これらのシグナリングと表皮基底膜タンパクとの関係性については不明な点が多い^{18,44,45}。Col17a1-/-マウス P1 毛包間表皮における一過性の表皮増殖に寄与しているメカニズムを検索するため、我々はスクリーニングとして Wnt、TGF- β /BMP、Notch、Hedgehog や FGF といった主なシグナリングパスウェイの受容体、共役受容体、転写因子、共役因子などの Col17a1-/-マウス P1 毛包間表皮における遺伝子発現を調べた (図 6a)。このスクリーニングの結果から Wnt 関連遺伝子の一部 (Fzd4、Nfatc2、Nfatc4 及び Tcf7) の発現が Col17a1-/-マウス P1 毛包間表皮で減少していることがわかった。一方で、TGF- β 関連の遺伝子是一部変化していたにも関わらず (図 6a)、染色では TGF- β 及び p-Smad2 の免疫染色動態は Col17a1-/-マウス P1 毛包間表皮ではコントロールと変化がなかった (図 6b)。これらは、Col17a1-/-マウスの HFSCs において TGF- β 及び p-Smad2 が減弱するという過去の報告とは異なっていた¹⁸。また、COL17 欠損に伴って Notch、Hedgehog や FGF のシグナリングには変化を認めなかった (図 6a)。

スクリーニング結果を検証するため、Wnt 関連遺伝子の詳細な発現を、別の群から取得したサンプルを用いて解析した。スクリーニングの qPCR の結果と一致して、Wnt ターゲット遺伝子 (Tcf7l1、Tcf7l2 及 Axin2)、Wnt レセプター遺伝子 (Fzd4)、Wnt 刺激因子遺伝子 (Wnt2、Wnt2b、Wnt5a) の発現は Col17a1-/-マウス P1 毛包間表皮に置いて著明に減少していた (図 7a)。一方で、Wnt 抑制因子遺伝子 (Wnt4) は発現が増加していた (図 7a)^{46,47}。これらの変化は、Wnt シグナリングの重要な核内因子の一つである LEF1 の基底細胞における陽性細胞数の減少と一致していた (図 7b)。この減少もまた一時的であり、P4 では Col17a1-/-マウスとコントロールで LEF1 陽性細胞数に変化は無くなっていた (図 7b)。これらから、LEF1 陽性細胞数減少は Col17a1-/-マウス P1 毛包間表皮における表皮過増殖に影響を及ぼしていると考えられた。Wnt シグナルのカノニカル pathway においては β -catenin が核内で LEF1 と結合するので⁴⁸、この β -catenin の染色を Col17a1-/-マウス P1 毛包間表皮において施行した。核内における β -cateni 陽性細胞数はコントロールと比較して減少していた (図 7c)。

さらに COL17 と Wnt シグナルの関連性を調べるため、SuperTopFlash ベクターを安定発現している HEK293 細胞 (293STF) を用いて実験を行った²⁸。ヒト COL17 (humanCOL17、hCOL17) を過剰発現させた 293STF は、空ベク

ターを同様に発現させたコントロールと比較して、顕著な Wnt 活性を認めた(図 7d)。さらに、Wnt 活性を LacZ 発現量として観察できる ins-TOPGAL マウス²¹ と Col17a1-/-マウスを交配し、Wnt 活性を可視化して比較した。青色で示される LacZ 陽性部分が、Col17a1-/-マウス P1 毛包間表皮で減少していた(図 7e、図 8a-c)。これらの結果からは、COL17 の発現が Wnt シグナルを安定化させていると示唆された。

次に、上記で得られた LEF1、PH3、 β -catenin の染色所見が、COL17 を先天的に欠損している JEB 患者皮膚でも見られるかを確認した。JEB 患者皮膚においては、LEF1 陽性細胞数、 β -catenin 陽性細胞数は減少し、PH3 陽性細胞数は増加していた(図 9)。これらは Col17a1-/-マウスで得られた結果と一致していたが、患者サンプル数が少ないため、より確証を持つには今後さらに大きいサンプル数が必要である。

また次に、Wnt シグナルの減弱が、表皮過増殖に実際に寄与しているかどうか、また COL17 の導入で表皮過増殖の表現型が回復するかを確認した。 β -catenin への結合部位を欠損した LEF1 を K14 プロモーター下に表皮特異的に発現し、表皮特異的に Wnt シグナルが減弱している K14-deltaNLef1 マウスを使用した²⁰。K14-deltaNLef1 マウスの P1 毛包間表皮においては、表皮肥厚を認め、PH3 陽性細胞数も増加していた(図 7f)。PCNA 陽性細胞数も増加傾向ではあったが、有意差はなかった。実際に、減弱した Wnt 活性が新 LEF1 生仔マウス表皮において表皮増殖につながるかを解析するため、Wnt 阻害剤(IWP-2、Wnt-C59)を新生仔 WT マウスに腹腔内投与して観察した^{29,30}。阻害剤を投与した WT マウス P1 毛包間表皮では BrdU 陽性細胞及び PH3 陽性細胞はコントロールと比較して増加していた(図 7g)。ヒト COL17 (human COL17、hCOL17) の K14 プロモーター下における表皮特異的なトランスジェニックな導入において、P1 毛包間表皮の表皮過増殖は抑制され、LEF1 陽性細胞及び β -catenin 陽性細胞の減少もベースラインに戻った(図 10a、c-d)。Wnt 関連遺伝子の発現量も hCOL17 の導入で野生型マウスと同様の状態へと変化した(図 10b)。これらの結果から、COL17 が Wnt シグナルを介して、新生仔マウス毛包間表皮増殖の維持に大きく貢献していることがわかった。

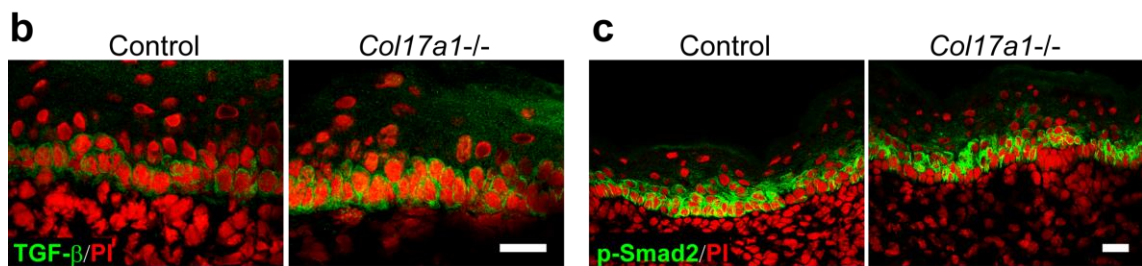
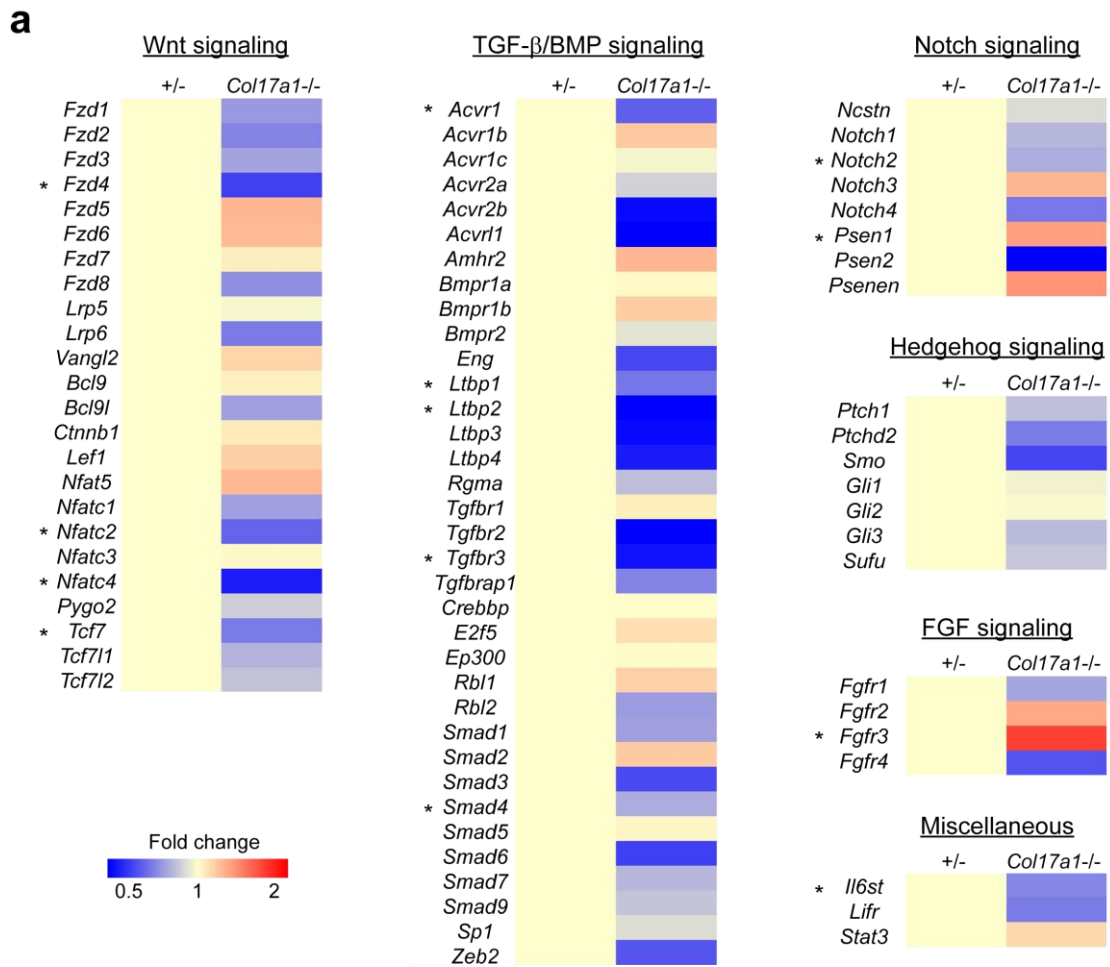


図6 Col17a1^{-/-}マウス P1 毛包間表皮での mRNA 発現におけるシグナリングパスウェイのプロファイル及び TGF-β 染色。

(a) qRT-PCR を使用した Wnt、TGF-β/BMP、Notch、Hedgehog、及び FGF シグナリング関連遺伝子の発現量。Col17a1^{-/-}及び同腹仔 control マウスの P1 毛包間表皮からの mRNA を使用している (n=5)。*0.01<p<0.05。Student-t 検定を使用。(b) Col17a1^{-/-}及び同腹仔 control マウスの P1 毛包間表皮での TGF-β 染色 (3 匹からの代表的な画像)。(c) Col17a1^{-/-}及び同腹仔 control マウスの P1 毛包間表皮での p-Smad2 染色 (3 匹からの代表的な画像)。赤 : PI 核染色。スケール : 20 μm。

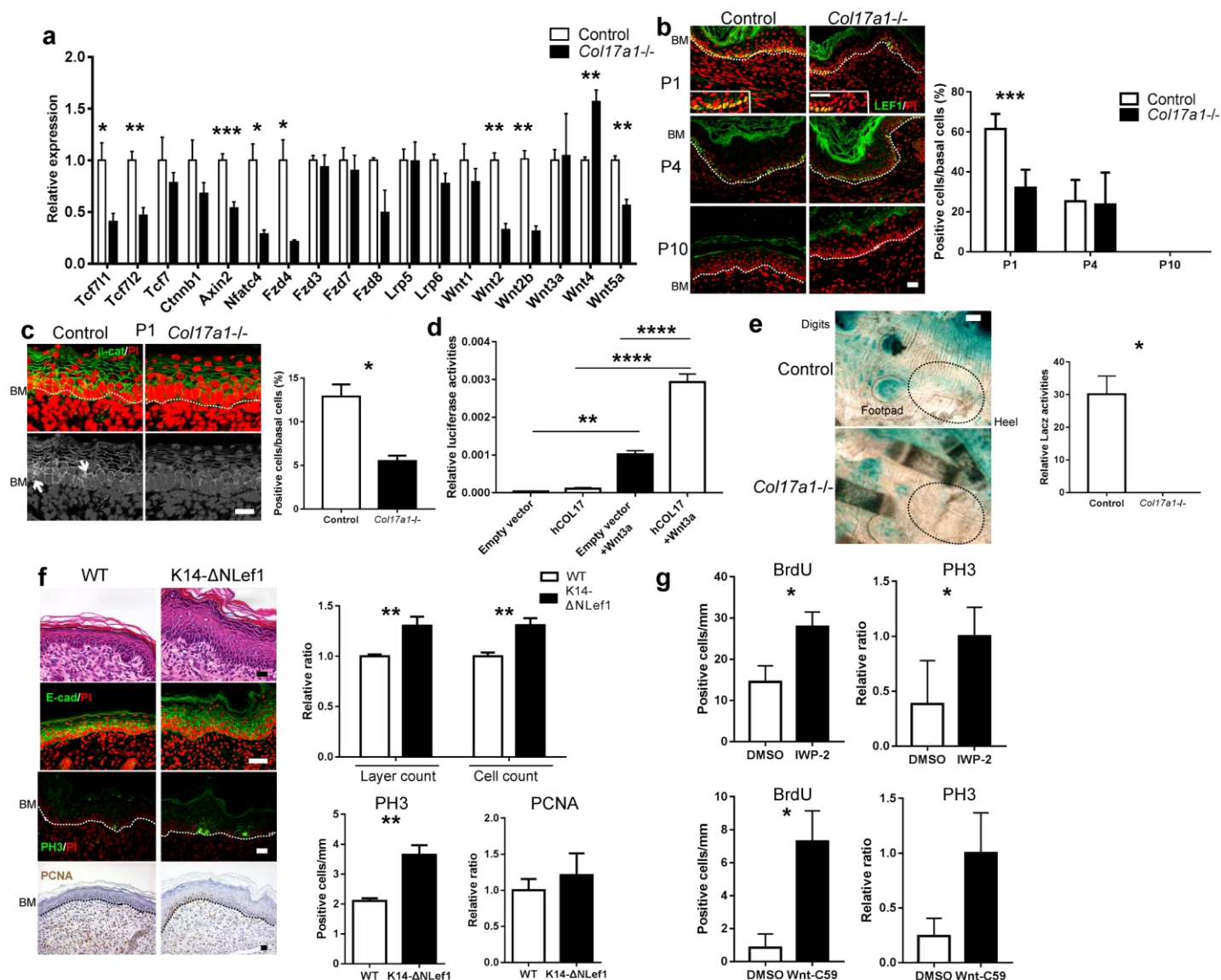


図7 COL17欠損は新生仔マウスにおいて Wnt-β-catenin シグナリングを不安定化させる。

(a) *Col17a1*^{-/-}及び同腹仔 control マウスの P1 毛包間表皮 での qRT-PCR での Wnt 関連遺伝子の発現量 (n=5)。Student-t 検定を使用。(b) *Col17a1*^{-/-}及び同腹仔 control マウス毛包間表皮での LEF1 染色。それぞれ P1 は n=5、P4 は n=4、P10 は n=4。スケール：20 μm。LEF1 陽性細胞の定量化は全基底細胞中における割合とした。赤：PI 核染色。BM：basement membrane、基底膜を示している。Student-t 検定を使用。(c) *Col17a1*^{-/-}及び同腹仔 Control マウスの P1 毛包間表皮 での β-catenin 染色。核内の β-catenin 集積は矢印で示した。定量化は核内β-catenin 陽性細胞とした (n=3)。赤：PI 核染色。BM：basement membrane、基底膜を示している。Student-t 検定を使用。(d) hCOL17 もしく

は空ベクターを発現する STF293 細胞を Wnt3aCM で刺激した際の Wnt 活性 (n=3)。One-way ANOVA 検定、及びそれに続く Tukey's 検定を使用。(e) ins-Topgal+ (上及び左)、ins-Topgal+:Col17a1^{-/-}マウス (下及び右) の後肢毛包間表皮における Wnt 活性。画像中の円で囲った領域は毛包及び汗腺の全く存在しない部位であり、測定に用いた。結果は単位面積あたりの Wnt 活性として定量化した (n=4)。スケール: 100 μ m。Mann-Whitney 検定を使用。(f) P1 の K14-deltaN^{Lef} マウス及び同腹仔 Control の毛包間表皮での H&E、E-cad、PH3 及び PCNA 染色。スケール: 20 μ m。右グラフは表皮細胞層、表皮細胞数、PCNA 陽性細胞、PH3 陽性細胞の定量 (n=4)。BM : basement membrane、基底膜を示している。Student-t 検定を使用。(g) Wnt 阻害剤 (IWP-2 投与群 (n=6) vs DMSO 投与群 (n=5) もしくは C-59 投与群 (n=6) vs DMSO 投与群 (n=4)) を WT マウスに投与した際の P1 毛包間表皮における BrdU 陽性細胞と PH3 陽性細胞の定量。全てのグラフにおける値は標準値 $\pm$ 標準誤差である。 $*0.01 < p < 0.05$ 、 $**0.001 < p < 0.01$ 、 $***0.0001 < p < 0.001$ 、 $****p < 0.0001$ 。Student-t 検定を使用。

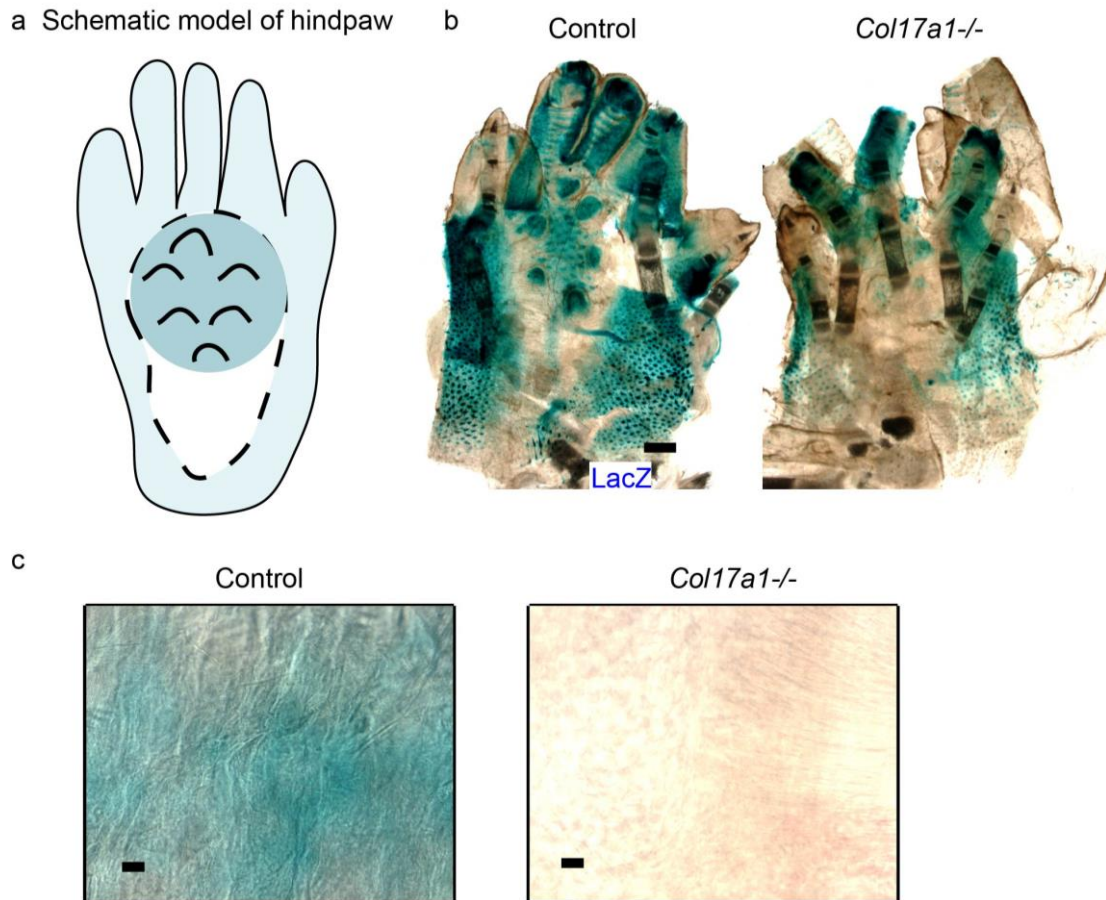


図8 COL17欠損に伴う *ins-Topgal*⁺マウス における LacZ 染色の詳細。

(a) マウス後肢足底における LacZ 染色の模式図。濃青色部分は汗腺存在部位、薄青色部分は毛包存在部位を示している。汗腺及び毛包は LacZ 染色で示される Wnt 活性の主な供給源である。白色部分は汗腺及び毛包の存在しない部位であり、定量化に使用した。(b) *ins-Topgal*⁺ (Control: 左) 及び *ins-Topgal*⁺:*Col17a1*^{-/-} (*Col17a1*^{-/-}: 右) マウスの後肢での LacZ 染色における概観。スケールは 500 μm 。(c) 定量化に使用した高倍率画像での *ins-Topgal*⁺ (Control: 左) 及び *ins-Topgal*⁺:*Col17a1*^{-/-} (*Col17a1*^{-/-}: 右) マウスの後肢での LacZ 染色。スケールは 100 μm 。

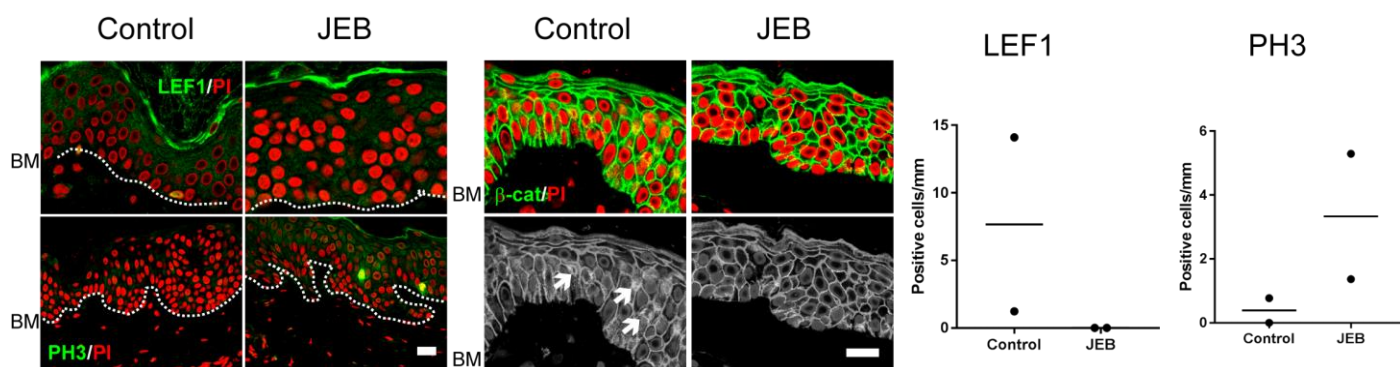


図9 COL17欠損のJEB患者におけるWntシグナル及び増殖能プロファイル

JEB患者2人及び健常人からの皮膚でのLEF1（左上）、 β -catenin（中）、及びPH3（左下）染色。LEF1陽性細胞及び核内 β -catenin染色は矢印で示した。スケールは20 μ m。BM：basement membrane、基底膜を示している。右は単位表皮あたりのLEF1及びPH3陽性基底細胞の定量。

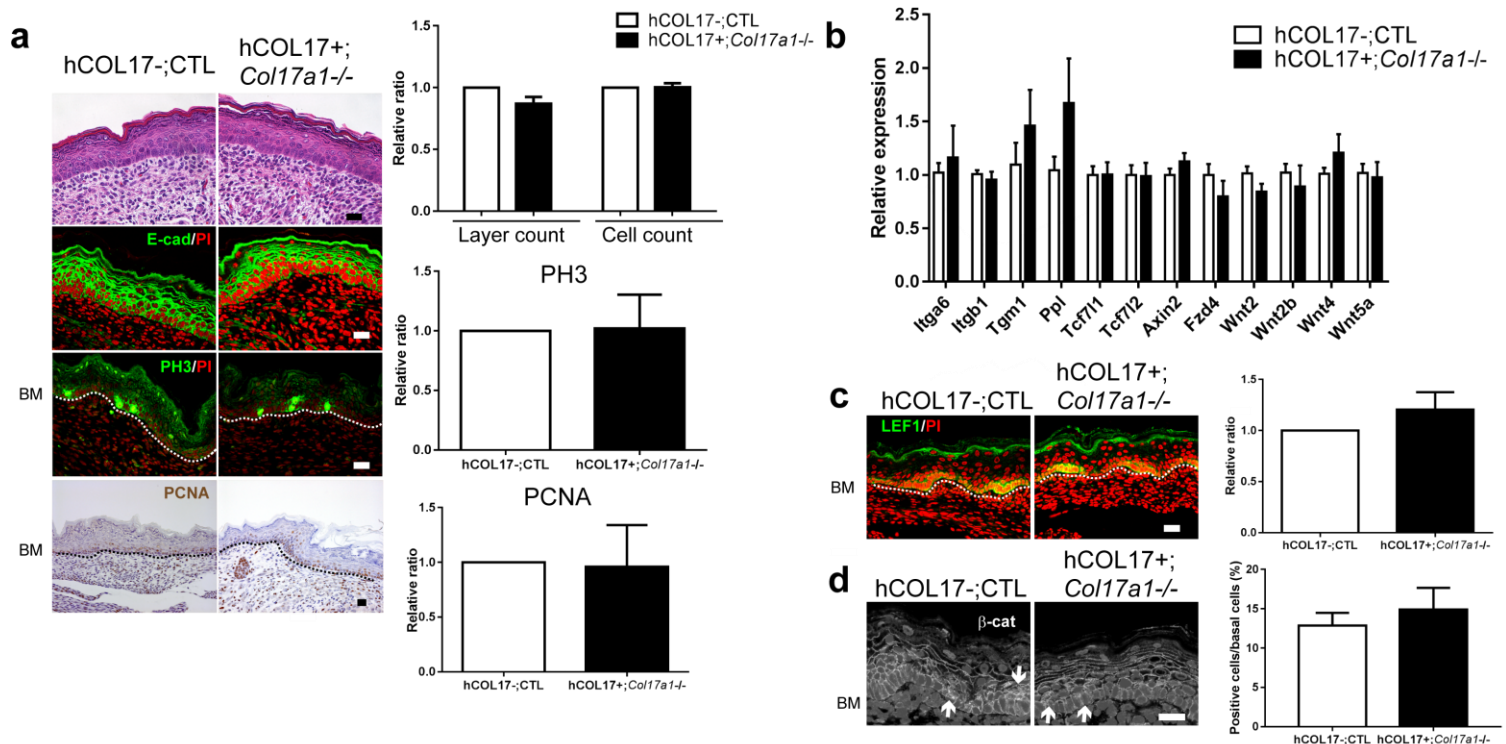


図 10 human COL17 (hCOL17) の導入によって、新生仔 Col17a1^{-/-} 毛包間表皮における過増殖と Wnt-β-catenin シグナルの不活性化は消失する

(a) Col17a1^{+/+}もしくは Col17a1^{+/-}で hCOL17 を発現していないマウス (hCOL17^{-/-}; CTL (control) と表記)、Col17a1^{-/-}かつ hCOL17 を発現しているマウス (hCOL17⁺; Col17a1^{-/-}と表記)、それぞれ同腹仔 P1 毛包間表皮における H&E、E-cad、PH3 及び PCNA 染色。右グラフは表皮細胞層、表皮細胞数、PCNA 陽性細胞、PH3 陽性細胞の定量 (n=4)。BM : basement membrane、基底膜を示している。スケールは 20μm。 (b) hCOL17^{-/-}; CTL 及び hCOL17⁺; Col17a1^{-/-}マウス P1 毛包間表皮における Wnt 関連分子の遺伝子発現量 (n=4)。 (c) hCOL17^{-/-}; CTL 及び hCOL17⁺; Col17a1^{-/-}マウス P1 毛包間表皮における LEF1 染色 (n=4)。スケール : 20μm。 (d) COL17^{-/-}; CTL 及び hCOL17⁺; Col17a1^{-/-}マウス P1 毛包間表皮における β-catenin 染色 (n=4)。核内 β-catenin 染色は矢印で示した。右グラフは核内 β-catenin 陽性細胞の定量化。スケール : 20μm。全てのグラフにおける値は標準値 ± 標準誤差である。Student-t 検定を使用。

3. COL17 の分布は個体の老化と共に変化する

3 ヶ月齢の Col17a1^{-/-}マウスは白髪・脱毛といった明らかな早老化の表現型を示すため (図 11) ^{17,18}、我々は個体老化が毛包間表皮に及ぼす影響と COL17 と老化の関連性を精査した。まず、WT マウスの 6-10 週齢を若年、19-27 月齢を老年として毛包間表皮の表現型を観察した。老年マウス毛包間表皮では、表皮肥厚を認め、PH3 陽性細胞・BrdU 陽性細胞・PCNA 陽性細胞の増加を認めた (図 12a)。これらの現象は、Col17a1^{-/-}マウス新生仔の時と同様に背部皮膚では認められず (図 13)、マウス掌蹠に特異的であった。これらの結果は、個体老化によって表皮が過増殖へと誘導されることを示している。

遺伝子発現においては、Itga6 と Itgb1 の老年 WT マウスでの減少を認めたが、Col17a1 の減少は認めなかった (図 12b)。また、分化マーカーである Tgm1、Ppl、Evpl の発現も大きくは影響を受けていなかった。mRNA レベルでの Col17a1 の発現量は変化していないのにも関わらず、COL17 の分布が老年 WT マウス及びヒト毛包間表皮で大きく変化していることを発見した。COL17 の表皮基底細胞の上方側方に分布している部分 (非ヘミデスモソーム COL17) が、COL17 の細胞外領域に対する抗体を利用した蛍光染色において老年 WT マウス及びヒト毛包間表皮にて減少していた (図 12c)。この結果は近年の既報告の染色結果とも一致した ¹⁹。この現象は、早老化を示す Klotho^{-/-}マウス ²² の毛包間表皮でも認められた (図 12c)。COL17 のタンパク分解による影響、これは COL17 の細胞外領域がプロテアソームなどにより切断される現象であり ectodomain shedding と呼ばれているが、これを評価するために切断されていない細胞内の COL17 を特異的に認識する抗体を使用して、同様に染色を施行した。老年期の WT マウス及びヒト、早老化マウスモデル全てにおいて非ヘミデスモソーム COL17 が減少している結果となり、この ectodomain shedding はこの現象には寄与していないと考えられた (図 14)。

老年期における非ヘミデスモソーム COL17 の減少を確かめるため、Triton X-100 による染色前の処理で ¹³、若年 WT マウス及び若年ヒト毛包間表皮で非ヘミデスモソーム COL17 が減少するかを観察した。実際に、Triton X-100 による処理で、若年 WT マウス・ヒト毛包間表皮の非ヘミデスモソーム COL17 は減少し、老年期と同等の表現型を呈した (図 12d)。この基底細胞上方側方における非ヘミデスモソーム COL17 の減少をさらに確認するため、WT マウス毛包間表皮を用いてホールマウント染色を行なった。ホールマウント染色でも同様に基底細胞上方側方における非ヘミデスモソーム COL17 の減少を認めることができた (図 12e)。ホールマウント染色からの 3D 再構成画像では、老年 WT マウス毛包間表皮では COL17 が基底膜近傍に局限しているのに対し、若年 WT マウスでは基底細胞の上方、側方にも認められ、基底細胞を取り

囲んで存在していることが確認できる。次に、超解像度顕微鏡を用いて、この非ヘミデスモソーム COL17 が細胞膜でどのように分布しているかを観察した。デスモソーム構成タンパクである desmoglein1/2 と COL17 を若年 WT マウス毛包間表皮で共染色を行なった。COL17 は基底細胞の上方、側方に認められたが、desmoglein1/2 とは離れて存在していた (図 12f)。これらは、非ヘミデスモソーム COL17 がデスモソームには組み込まれておらず、可溶性であることを示している。COL17 の分布変化とは違い、同じ基底膜構成タンパクである ITGA6 と ITGB1 は老化に伴って分布は変化しなかった (図 15a)。同様にヘミデスモソーム構成タンパクである BP230 及び plectin も染色動態に変化はなかった (図 15b)。老化によっても COL17 の mRNA レベルでの発現量は変化がなく、一方で真皮を構成する多くのコラーゲンやラミニンは減少を認めた (図 15c-d)。これらの結果から、個体の老化は掌蹠の表皮肥厚へと誘導し、表皮における COL17 の分布をタンパクの翻訳後のレベルで変化させることが示唆された。



図 11 3 ヶ月齢の *Col17a1*^{-/-}マウス及び同腹仔コントロールの概観（全体・掌蹠）

(a) *Col17a1*^{-/-}マウス皮膚では白髪と脱毛が顕著である。(b) *Col17a1*^{-/-}マウス掌蹠皮膚では鱗屑を伴っている。画像は 4 匹からの代表的なものである。

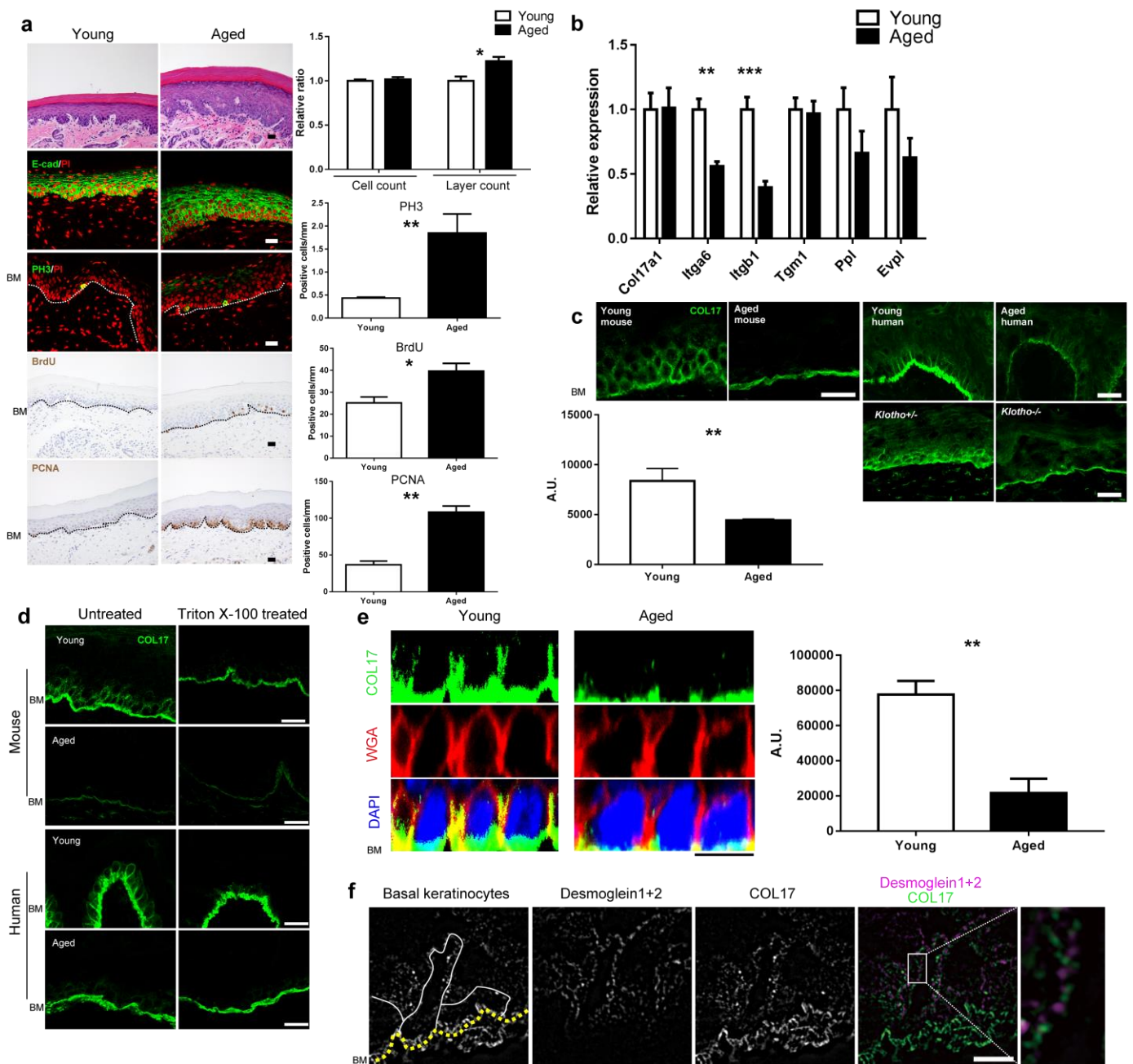


図 12 個体老化は表皮増殖と COL17 の分布に影響を及ぼしている

(a) 若年（6-10 週齢）及び老年（19-27 月齢）の C57BL/6 wild-type (WT) マウス毛包間表皮における H&E、E-cad、PH3、BrdU 及び PCNA 染色。スケールは 20 μ m。右グラフは表皮細胞層、表皮細胞数、PCNA 陽性細胞、PH3 陽性細胞の定量（n=5）。Student-t 検定を使用。(b) 若年及び老年 WT マウス毛包間表皮での Itga6、Itgb1、Tgm1、Ppl、Evpl 及び Col17a1 の遺伝子発現量（Itga6、Itgb1、Tgm1 は n=5、Col17a1、Ppl 及び Evpl は n=3）。Student-t 検定を使用。(c) 若年及び老年 WT マウス毛包間表皮

(n=5)、及び健常ヒト皮膚（15歳以下、n=3）及び健常老年ヒト皮膚（85歳以上、n=3）、6週齢の *Klotho*^{+/+}-マウス及び同腹仔の *Klotho*^{-/-}-マウス（画像は3匹からの代表的なものを使用）での COL17 細胞膜隣接部位認識抗体による COL17 染色。スケールは 20µm。下グラフは毛包間表皮基底細胞側方部分での COL17 蛍光強度の定量化したもの。Mann-Whitney 検定を使用。(d) 若年及び老年 WT マウス、ヒト皮膚の毛包間表皮を Triton x-100 処理した際の COL17 染色（画像は3検体からの代表的なもの）。BM : basement membrane、基底膜を示している。スケールは 20µm。(e) 若年及び老年 WT マウス毛包間表皮のホールマウント COL17 染色の 3D 画像からの再構成切片画像。毛包間表皮の基底細胞細胞膜は wheat germ agglutinin (WGA、赤) で可視化した。核染色には DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) を使用した。スケールは 10µm。右グラフは若年及び老年 WT マウス毛包間表皮基底細胞側方部分での COL17 蛍光染色での蛍光強度を定量化したもの (n=6)。Mann-Whitney 検定を使用。(f) 若年 WT マウス毛包間表皮における N-SIM (structured illumination microscopy、超解像度顕微鏡) 再構成画像による COL17 及び desmogleins 1/2 の分布 (2匹からの代表的画像を示している)。基底細胞は白線で囲まれた部分で示されている。BM : basement membrane。スケールは 5 µm。全てのグラフにおける値は標準値± 標準誤差である。
*0.01<p<0.05、**0.001<p<0.01、***0.0001<p<0.001。

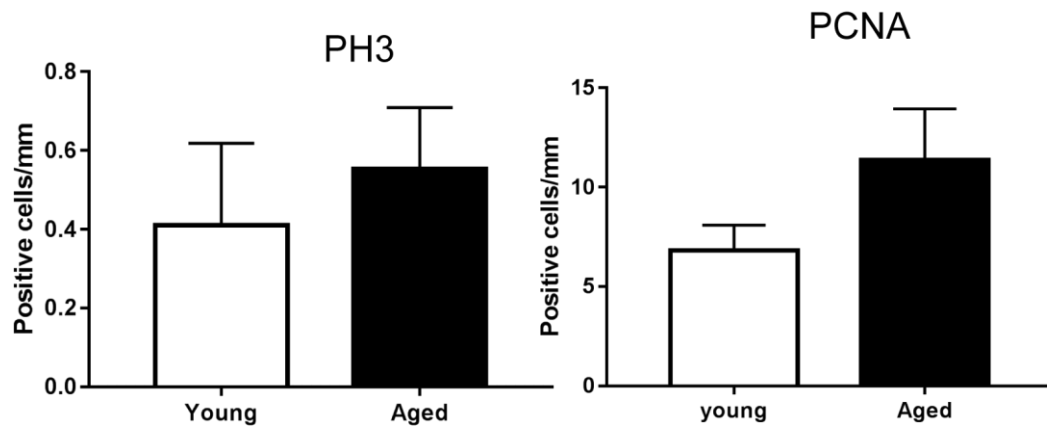


図 13 若年及び老年 WT マウス背部皮膚における増殖能

若年及び老年 WT マウス背部皮膚での PH3 及び PCNA 陽性細胞数の定量

(n=5)。全てのグラフにおける値は標準値 $\pm$ 標準誤差である。Student-t 検定を使用。

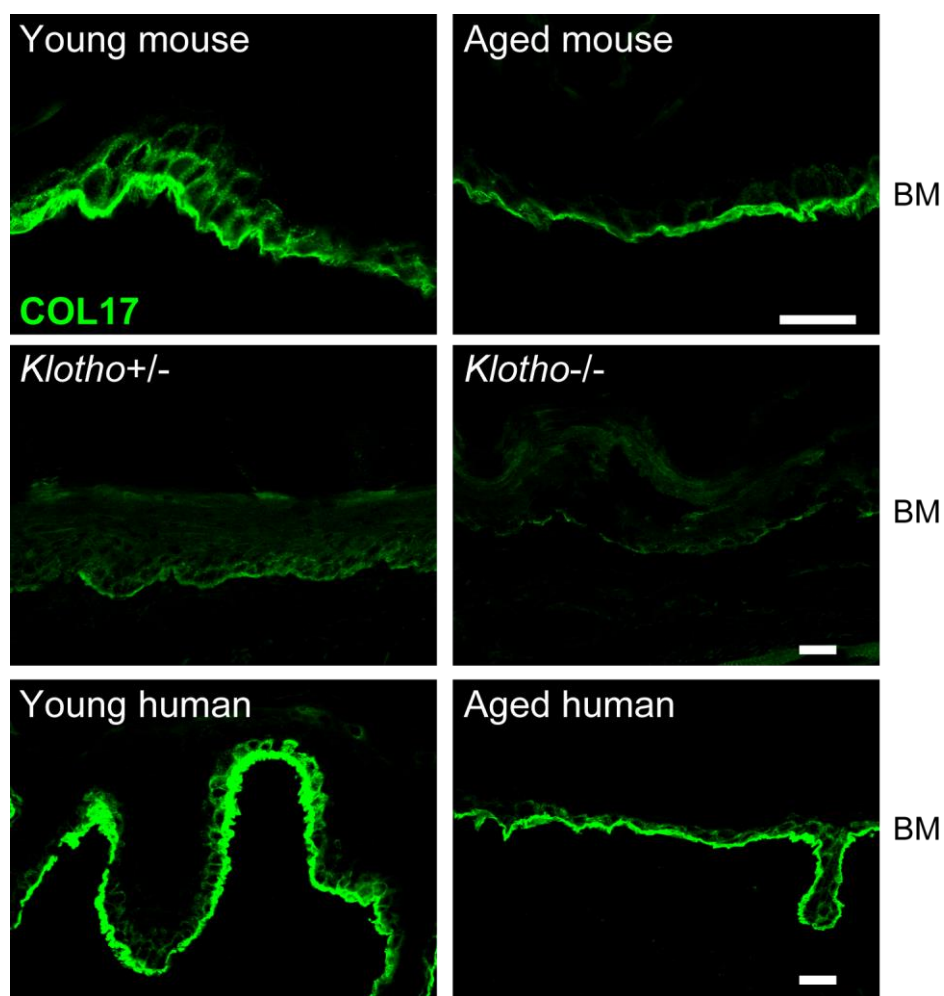


図 14 若年及び老年 WT マウスと健常人ヒト毛包間表皮における細胞内 COL17 の染色

COL17 全長を認識し、切断された COL17 には反応しない細胞内部位特異的抗体を利用した染色。スケールは 20 μ m。同腹仔からの *Klotho*^{+/-} 及び *Klotho*^{-/-} マウスは 6 週齢。画像は 3 検体からの代表的なもの。

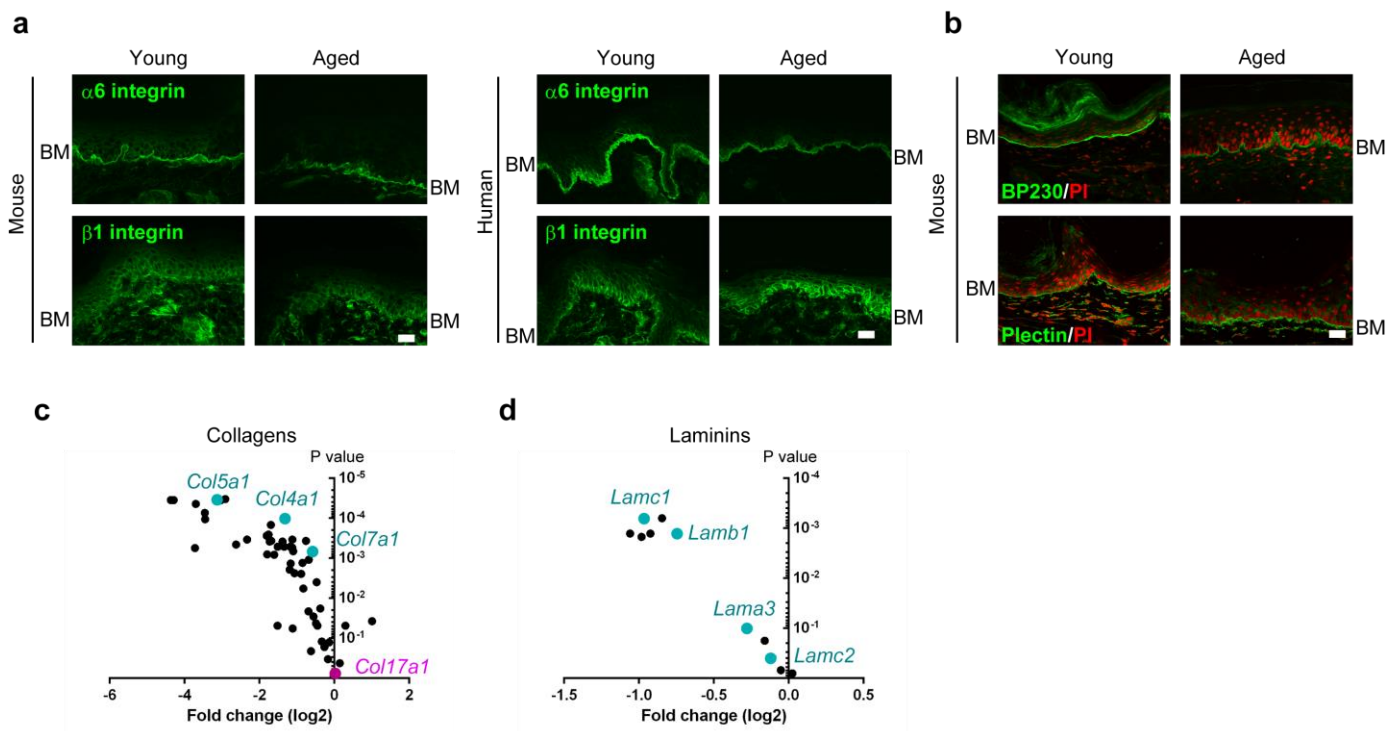


図 15 若年及び老年 WT マウス、健常人ヒト皮膚の毛包間表皮における表皮基底膜及び細胞外基質タンパクの発現量。

(a) 若年及び老年 WT マウスと健常人ヒト毛包間表皮における ITGA6 と ITGB1 染色（画像は 5 検体からの代表的なもの）。スケールは 20 μ m。 (b) 若年及び老年 WT マウス毛包間表皮における BP230 及び plectin 染色（画像は 5 検体からの代表的なもの）。スケールは 20 μ m。 (c、d) マイクロアレイによる collagen (c) 及び laminin (d) 遺伝子の発現量グラフ（若年及び老年 WT マウスからそれぞれ 4 検体を使用）。Fold change は若年グループを基準としている。

4. Atypical PKC は毛包間表皮において COL17 の分布を変化させる

COL17 が加齢に伴い分布変化を起こすメカニズムをより詳しく検討するため、我々は人為的に老化した毛包間表皮を作り上げ、COL17 の分布が変化するか観察することにした。カルシウムは表皮において分化等に大きく影響している因子の一つであるが、老化した表皮においてカルシウム濃度勾配が変化し⁴⁹、また若年のヒト皮膚と比較して老年のヒト皮膚では表皮におけるカルシウム濃度が低下していることが知られている⁵⁰。そこで、若年 WT マウス掌蹠皮膚からサンプルした毛包間表皮を用いて、EDTA 処理によりカルシウムをキレートすることによって、老化した毛包間表皮と同等の環境を作り出し、COL17 の分布を観察した。ホールマウント染色において、EDTA 処理した若年 WT マウス毛包間表皮では、基底細胞上方側方の非ヘミデスモソーム COL17 が減少し、一方でヘミデソーム COL17 は残ったままであった (図 16a)。これらは EDTA でキレートされる何らかの因子及び、カルシウム濃度が COL17 分布変化に影響していることが示唆された。

様々な細胞内でのイベントはカルシウム動態によって影響されることは知られているが、我々は細胞極性の重要な因子の一つである atypical PKC²⁷ に着目することにした。表皮基底細胞において発現している atypical PKC のアイソフォームの一つである aPKC ζ 及び aPKC λ の発現量が、培養表皮細胞においてカルシウム濃度に依存しており⁵¹、またマウスでは表皮特異的な aPKC λ の欠損が、Col17a1^{-/-} マウスと同様の脱毛や白髪といった早老化の表現型に繋がることが知られている^{27,52}。我々の検討では、この aPKC の活性体である phospho-aPKC が老年 WT マウス毛包間表皮では減少していることを見出した (図 16b)。これに伴って、老年 WT マウス毛包間表皮では細胞分裂の方向が変化し、非対称分裂 (asymmetric cell division, ACD) が増加していることも認められた (図 16c)。この変性した aPKC に伴う老化毛包間表皮を再現するため、若年 WT マウス毛包間表皮を汎 PKC 阻害剤である Go6983 及び aPKC ζ 及び aPKC λ 特異的阻害剤である myr pseudosubstrate (myr PSI) にて処理を行った^{51,53,54}。この処理により、ホールマウント染色にて若年 WT マウス毛包間表皮において基底細胞上方側方の非ヘミデスモソーム COL17 が減少した (図 16d-e)。また、3D 再構成表皮においても、EDTA 処理、aPKC 阻害において同様に基底細胞上方側方の非ヘミデスモソーム COL17 が減少した (図 16f-h)。

COL17 は、disintegrin and metalloproteinases 9、10、17 (ADAM9/10/17) や matrix metalloproteinase-9 (MMP9)、neutrophil elastase (ELANE)、及びその他のセリンプロテアーゼといった各種のタンパク分解酵素によって ectodomain shedding、分解といったタンパクへの翻訳後修飾を受けることが知られている^{13,14}。我々はこれらのタンパク分解酵素に老年 WT マウス毛包間表

皮において増加がないか解析したが、明らかな変化は認めなかった (図 17a)。また、MMP9 を抑制する plasminogen activator inhibitor-1 を欠損する *Serpine1*^{-/-} マウス毛包間表皮において COL17 の分布を認めなかった (図 17b)。さらに、近年 COL17 を HFSCs の近傍で分解するとされている ELANE¹⁶ についても染色を行ったが、既報告の毛包と背部皮膚での染色パターンとは違い老年 WT マウス毛包間表皮と若年 WT マウス毛包間表皮において変化を認めなかった (図 17c)。個体老化は毛包間表皮においては ELANE の染色結果に影響しないことが判明した。上記の結果より、老化に伴う COL17 の分布変化に、タンパク分解酵素の影響は少ないと考えられた。

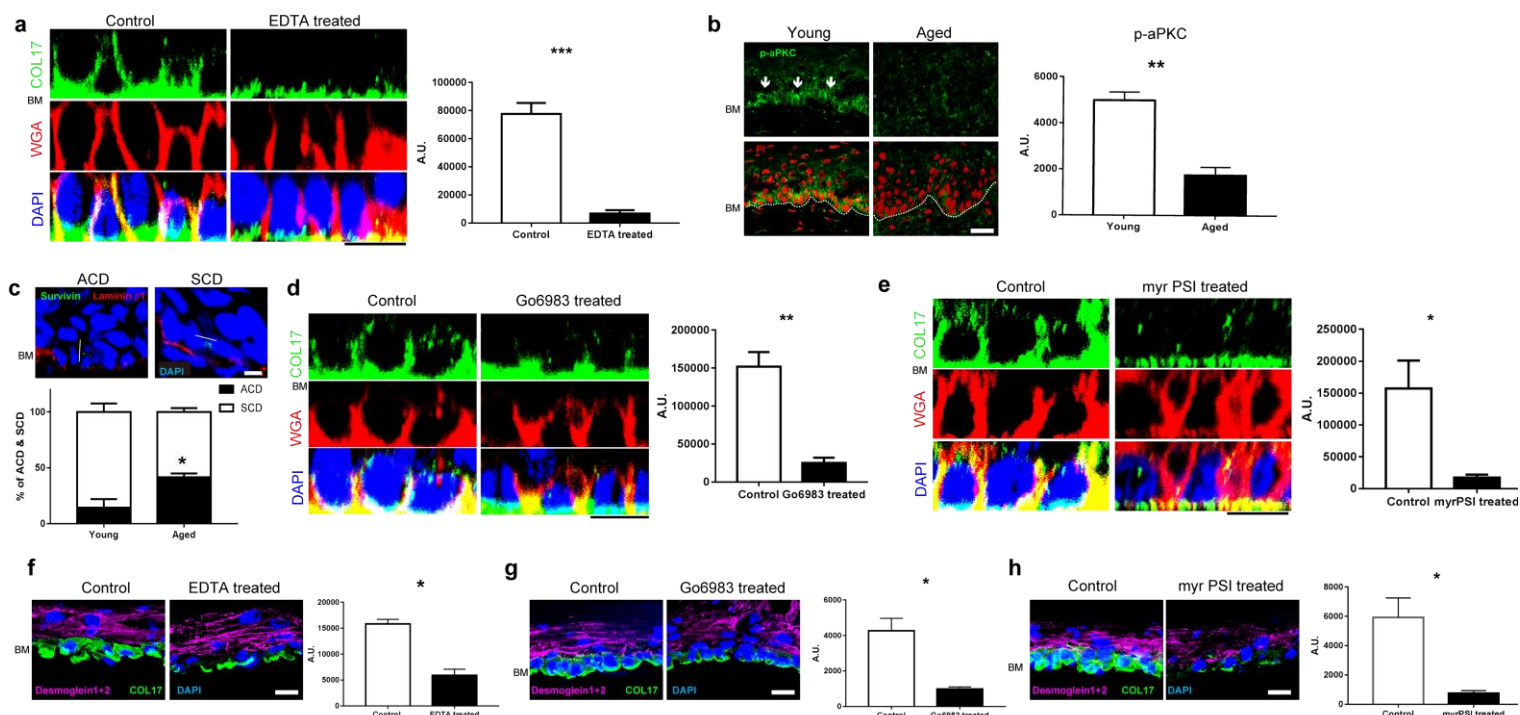


図 16 Atypical PKC (aPKC) によって COL17 の分布は調節されている

(a) 5mM EDTA 処理によるホール毛包間表皮における COL17 染色。右グラフは毛包間表皮基底細胞における COL17 の蛍光強度の定量 (control

(PBS) 及び 5mM EDTA 処理 (n=4))。Mann-Whitney 検定を使用。検体は 6-10 週齢の若年 WT マウスを使用。スケールは 20 μ m。(b) 若年及び老年 WT マウス毛包間表皮における Phospho-aPKC 染色 (矢印で示した部分) 及びその蛍光強度の定量化 (n=4)。Mann-Whitney 検定を使用。スケールは 20 μ m。(c) 若年 WT マウス毛包間表皮における非対称分裂 (asymmetric cell division、ACD、基底膜に対して垂直に分裂) 及び対称分裂 (symmetric cell division、SCD、基底膜に対して平行に分裂) の代表的画像。Survivin 染色が細胞分裂の方向を図示。Laminin $\beta 1$ は基底膜を示している。スケールは 10 μ m。図は若年及び老年 WT マウス毛包間表皮における ACD と SCD の割合のグラフ (n=4)。Student-t 検定を使用。(d-e) 若年 WT マウスホールマウント毛包間表皮における薬剤による汎 PKC 阻害 (d、1 μ M Go6983、コントロールは 0.00002% DMSO) 及び aPKC λ/ζ 特異的阻害 (e、10 μ M myr PSI、コントロールは water) での COL17 染色。それぞれ右グラフは毛包間表皮基底細胞側方部分でのコントロールと 1 μ M Go6983 処理 (d) 及びコントロールと 10 μ M myr PSI 処理 (e) において COL17 蛍光強度の定量化したもの

(n=4)。Mann-Whitney 検定を使用。BM : basement membrane。スケールは 10 μ m。(f-h) 3D 再構成表皮における EDTA 処理 (f、5mM、コントロール

は PBS)、薬剤による汎 PKC 阻害 (g、1 μ M Go6983、コントロールは 0.00002% DMSO) 及び aPKC λ/ζ 特異的阻害 (h、10 μ M myr PSI、コントロールは water) 後の COL17 染色。それぞれ右グラフは毛包間表皮基底細胞側方部分での、コントロールと 5mM EDTA 処理 (f)、コントロールと 1mM Go6983 処理 (g) 及びコントロールと 1 μ M myr PSI 処理 (h) において COL17 蛍光強度の定量化したもの (n=4)。Mann-Whitney 検定を使用。BM : basement membrane。スケールは 20 μ m。全てのグラフにおける値は標準値 $\pm$ 標準誤差である。*0.01<p<0.05、**0.001<p<0.01、***0.0001<p<0.001。

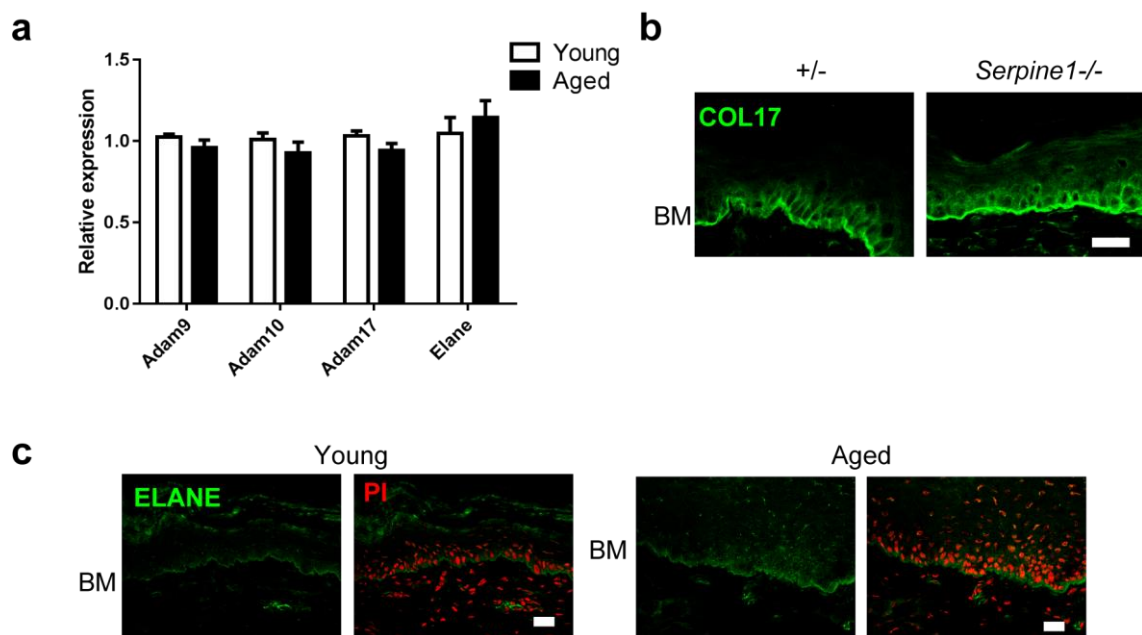


図 17 若年及び老年 WT マウス毛包間表皮における表皮プロテアーゼの解析
 (a) マイクロアレイにおける COL17 分解に関与しうるプロテアーゼ関連遺伝子発現量の解析 (n=4)。 (b) 8 週齢の *Serpine1*^{-/-} マウス及び同腹仔コントロールマウス毛包間表皮での COL17 染色 (4 匹からの代表的な画像)。COL17 の細胞膜隣接領域である NC16A を認識する抗体を使用した。 (c) 若年及び老年 WT マウス毛包間表皮 での ELANE 染色 (画像は 5 匹からの代表的なもの)。スケールは 20 μ m。

5. hCOL17 の過剰発現は老化に伴う毛包間表皮の過増殖を抑制する

次に、我々は hCOL17 の過剰発現により老年毛包間表皮の表現型が変化するか観察した。K14 プロモーター下に表皮特異的に hCOL17 を発現する K14-hCOL17 マウスの 19 月齢以上の老年期毛包間表皮では、コントロールの WT マウス毛包間表皮と比較して、基底細胞上方側方の非ヘミデスモソーム COL17 がより強く発現しているのが認められた (図 18a)。この結果と一致するように、K14-hCOL17 マウスの老年期毛包間表皮において表皮は薄く、PH3 や PCNA と言った増殖マーカーも減少していた (図 18b)。一方で、幹細胞のマーカーである *Itga6* と *Itgb1* の遺伝子発現量は老年 K14-hCOL17 マウスと老年 WT マウス毛包間表皮において変化はなかった (図 18c)。これらの結果は、COL17 は幹細胞マーカーよりも下流で機能発現し、hCOL17 過剰発現の際には毛包間表皮を若い状態に保っていると考えられた。逆に、早老化の表現型を示す 3 ヶ月齢の *Col17a1*^{-/-} マウス毛包間表皮においては、著明な表皮肥厚と BrdU 陽性細胞数の増加を認めた (図 18d-e)。一方で PH3 陽性細胞と PCNA 細胞数は有意に変化していなかった。この表皮肥厚と増殖マーカーの増加は、老年 WT マウス毛包間表皮における基底細胞上方側方の非ヘミデスモソーム COL17 減少に伴う表皮過増殖の表現型と一致していると考えられた (図 12c)。Col17a1^{-/-} マウス新生仔期毛包間表皮における表皮過増殖に Wnt シグナルが影響しているのとは違い、この 3 ヶ月齢の *Col17a1*^{-/-} マウス毛包間表皮には Wnt シグナルの変化は認められなかった (図 19)。

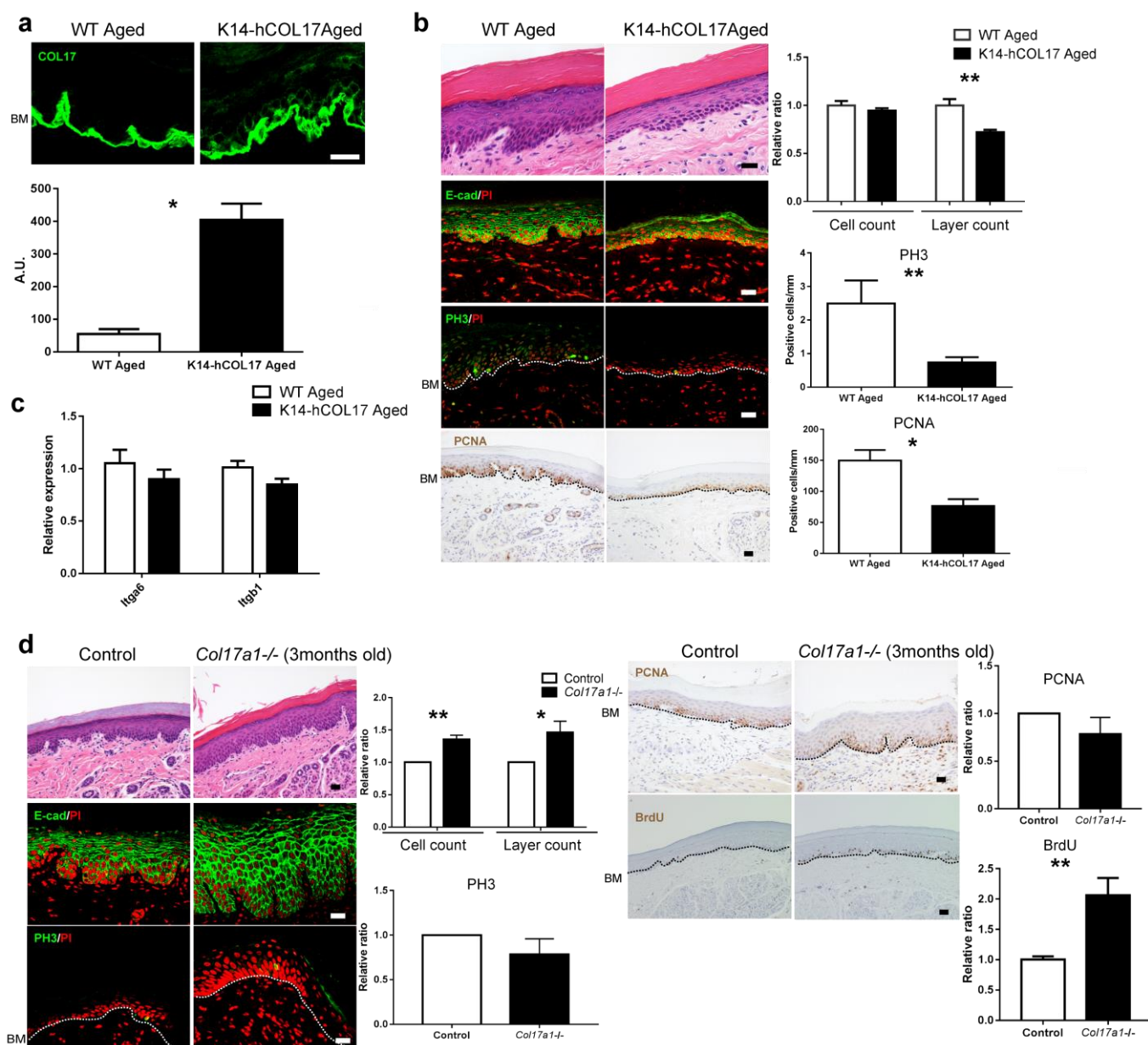


図 18 老年期毛包間表皮においてヒト COL17 の過剰発現は表皮過増殖を抑制する

(a) 老年 WT マウス及び K14-hCOL17 マウス (19 月齢以上) 毛包間表皮における COL17 染色 (n=5)。抗体はヒト及びマウス COL17 両者を認識するものを使用した。スケールは 20µm。Mann-Whitney 検定を使用。(b) 老年 WT マウス及び K14-hCOL17 マウス毛包間表皮における H&E、E-cad、PH3、及び PCNA 染色。右グラフは表皮細胞層、表皮細胞数、PCNA 陽性細胞、PH3 陽性細胞の定量 (H&E、E-cad、及び PCNA 染色は n=5、老年 K14-hCOL17 マウスでの PH3 染色は n=4、老年 WT マウスの PH3 染色は n=3)。Student-t

検定を使用。スケールは 20 μ m。(c) 老年 WT マウス及び K14-hCOL17 マウス毛包間表皮における Itga6 及び Itgb1 の mRNA 発現量 (n=5)。Student-t 検定を使用。(d) 3 ヶ月齢 Col17a1^{-/-} マウス及び同腹仔コントロールマウス毛包間表皮における H&E、E-cad、PH3、PCNA 及び BrdU 染色。右グラフは表皮細胞層、表皮細胞数、PCNA 陽性細胞、PH3 陽性細胞、BrdU 陽性細胞の定量 (n=4)。Student-t 検定を使用。スケールは 20 μ m。全てのグラフにおける値は標準値 $\pm$ 標準誤差である。*0.01<p<0.05、**0.001<p<0.01。

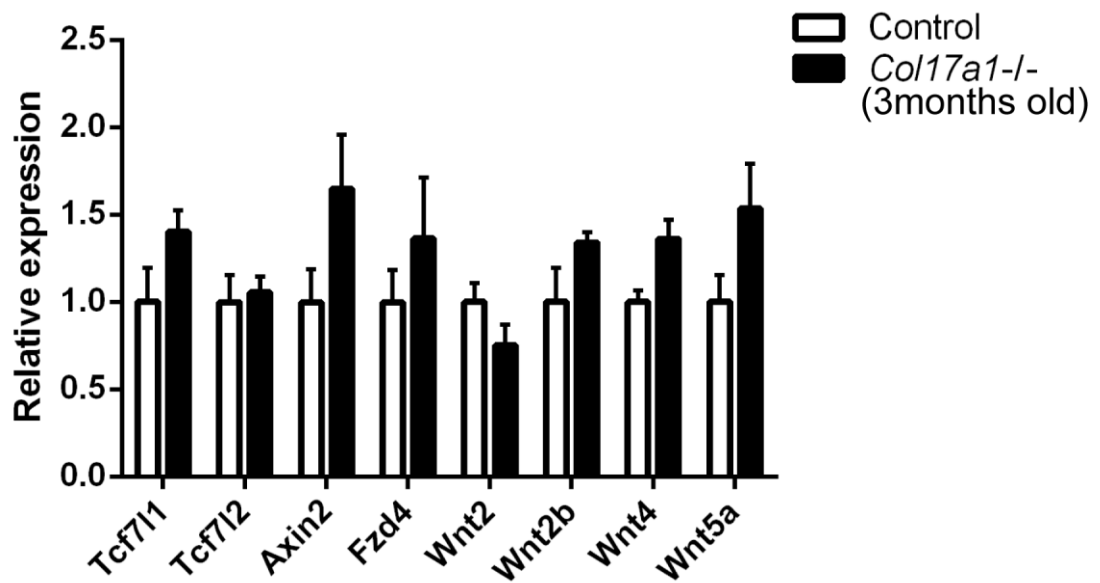


図 19 12 週齢の *Col17a1*^{-/-}マウス及び同腹仔コントロールマウス毛包間表皮における qRT-PCR による Wnt 関連遺伝子発現量の評価。

グラフにおける値はそれぞれ 3 グループからの標準値± 標準誤差である。

Student-t 検定を使用。

考察

COL17 を含めた基底膜タンパクは一個体のサイクルを通じて、表皮細胞の恒常性を維持するために重要な表皮真皮接着因子である⁵⁵。COL17 においては、HFSCs のニッチとして、またそれに伴いメラノサイトのニッチとしても機能していることが示唆されてきた^{16,18}。今回我々は本研究において、今まで同定されていなかった COL17 の新しい役割、すなわち毛包間表皮の増殖という観点から表皮恒常性を維持する役割を発見した (図 20)。COL17 は新生仔期マウス掌蹠の毛包間表皮の恒常性維持に Wnt シグナルを介して調整している。個体老化により非ヘミデスモソーム COL17 は毛包間表皮細胞において減少し、これらが減弱した aPKC の活動性と共に毛包間表皮を過増殖へと誘導する。老年期毛包間表皮での COL17 の強制発現により加齢に伴う表皮過増殖が抑制された。

Wnt- β catenin-シグナリングは、皮膚及び毛包、汗腺といった付属器を含む皮膚全体の発達と恒常性維持に大きく寄与する因子の一つである^{48,56}。Wnt 関連遺伝子においては様々な Wnt 活性を上昇もしくは抑制する変異が知られており、それらの変異を持つマウスにおいて背部皮膚における増殖や分化といった観点における毛包間表皮での様々な表現型へと寄与していることが知られている⁵⁷。近年、マウス掌蹠皮膚の毛包間表皮における Wnt- β catenin-シグナリングの重要性が報告されている⁵⁸。毛包間表皮における基底細胞は、若年の成体マウスにおいて増殖及び Wnt のリガンドやインヒビターを自己分泌で発現するため、Wnt- β catenin-シグナリングが活性化される必要がある⁵⁸。本研究では、COL17 がこの Wnt- β catenin-シグナリングを安定化させ、新生仔マウス毛包間表皮における増殖に関与しているということを発見した。しかしながら、この COL17 そのものと Wnt- β catenin-シグナリングの相互作用については多くが未解明である。また、本研究における遺伝的に、もしくは阻害剤による Wnt- β catenin-シグナリングの不活性化に伴うマウス新生仔期における掌蹠での表皮過増殖という観察結果は、これまでの報告における 1 ヶ月齢のマウスでの薬剤による誘導が可能な β -catenin の機能喪失に伴う表皮低増殖という結果とは対立するものである⁵⁸。しかし、この両者の結果の乖離は、本研究では観察時期が新生仔であり、過去の報告は 1 ヶ月齢であるという違いと、また本研究では新生仔の段階から遺伝的に Wnt- β catenin-シグナリングが減弱しているのに対して、過去の報告ではある一定の時期からしか Wnt- β catenin-シグナリングが減弱しないという、使用した実験系の違いに大きく影響されている可能性が考えられた。

基底膜タンパクの一つであるインテグリンは、表皮の増殖や分化において機能的な役割を持っていることが示唆されている^{44,59}。興味深いことに、このインテグリンの共役因子の一つである kindlin-1 の欠損したヒト及びマウス表皮で

は Wnt シグナリング及び TGF- β シグナリングが変化することが報告されている⁴⁵。Col17a1-/-マウス毛包間表皮とは反対に、kindlin-1 欠損毛包間表皮は Wnt シグナリングの活性化を呈していた。このような報告及び本研究の結果から、基底膜による Wnt シグナリングの調整はそれぞれの状況に依存していることが伺える。

表皮の維持及び増殖には、表皮幹細胞の存在が必須である。しかしながら、この表皮幹細胞がどのように維持されているのか、どのように存在しているのかは未だに不明な点が多い。また、表皮幹細胞の維持機構は、表皮の存在する部位によって左右され则认为られている^{40,60,61}。毛包間表皮においては、多くの基底細胞が幹細胞というよりは、ACD を通じて分裂し上層の細胞へと分化していく committed progenitor (前駆細胞、CPs) として存在することが示唆されている^{62,63}。マウスの掌蹠においては、この CPs の増殖能が体の他部位の表皮と比較して高いことが報告されており、またこの掌蹠表皮の CPs からできるクローンのサイズも大きいと想定されている^{10,64,65}。また、他の in vitro の研究においても、加齢した表皮の CPs は増殖能が高いことを示す報告もある⁹。本研究における加齢した毛包間表皮が過増殖を示したという結果は、個体老化が毛包間表皮において幹細胞の quiescence を失わせていることを示唆するものである。この仮説の検証のためには、いわゆる lineage tracing や遺伝子工学を施した cell fate mapping が必要である⁶⁶。さらには、本研究において hCOL17 を加齢した毛包間表皮に強制発現させることにより表皮過増殖を抑制できた点は、既報告における hCOL17 の HFSCs での過剰発現が HFSCs の若返りに繋がったという結果と一致する¹⁶。これらの結果からは、COL17 分子そのものにアンチエイジング効果がある可能性を示している。

表皮は非常に複雑な構造の組織であり、表皮の細胞極性は表皮恒常性維持のため必要である⁶⁷。ニューロンにおいて個体老化が細胞極性因子である aPKC に影響を及ぼすと既に報告されているが⁶⁸、表皮における aPKC の加齢に伴う変化については解明されていなかった。本研究において aPKC が表皮においても加齢に伴って変化することを見出した。この aPKC が欠損したマウス表皮においては、早期から早老化の表現型が出現し、毛包間表皮においても老年 WT マウスとほぼ同等の増殖の表現型を示すことがわかっている^{27,52}。これらのマウスにおいては ACD が SCD よりも増加し、ゆるやかに幹細胞の quiescence が失われるとされている⁶⁷。加齢に伴う COL17 の分布変化、また aPKC の薬剤阻害による COL17 の分布変化は、不適切な細胞極性による可能性も考えられる。この結果のさらなる追試のため、及び薬剤による非特異的な影響ではないことを証明するため、今後 aPKC 欠損マウス表皮における COL17 分布変化についても検討する必要がある。

近年、加齢は幹細胞のクローナルな増加によって癌を引き起こすトリガーの一つとして脚光を浴びている⁵。発癌実験を行ったマウス表皮において表皮肥厚し、増殖マーカーの一つである **Ki-67** 陽性細胞が蓄積するという報告があり、上記概念に一致するものである⁶⁹。肺がんや大腸がんにおいては **COL17** の発現が悪性度と相関しているという報告もあり⁷⁰⁻⁷²、**COL17** 欠損に伴う皮膚における発癌についても、今後検討の余地がある。

今後、**COL17** がどのようにして毛包間表皮において恒常性を維持しているかの詳細な動態やメカニズムの解明が必要であり、そのためには薬剤による **COL17** の過剰発現や表皮特異的欠損を誘導できるシステムの導入が必須である。本研究や既報告のように加齢に伴い表皮細胞増殖が増加するか^{9,10}、もしくは反対に表皮細胞増殖が減少するか²、この 2 つの結果の乖離は、下記のような要因に左右されていると考える。1) 皮膚における細胞増殖を抑制する UV 暴露；2) 表皮の存在する場所、個人による厚さの違い^{73,74}；3) 動物実験施設毎の衛星状況の違い、及び皮膚の発達と毛のある表皮毛包間表皮における毛のサイクルの影響、等が主な要因と考える。我々の研究結果は、観察部位を 1 施設からのマウスの毛のない表皮である掌蹠表皮に局限すること、ヒトにおいては UV 暴露のない臀部や腹部の皮膚とすることで、上記に示した主な外的因子・内的因子については概ね除外できたと考える。しかし加齢に伴うマウスの歩行による刺激の蓄積が、掌蹠毛包間表皮の恒常性の影響を及ぼした可能性は十分に考えられ、本研究の問題点である。一方でヒトにおいては今回観察部位として使用した臀部や腹部も常に刺激を受けており、そういった意味では、ヒトの臀部や腹部の毛のない毛包間表皮とマウス掌蹠毛包間表皮は同等であるとも考えられる。

最後に、本研究によって **COL17** と新生仔期及び老年期毛包間表皮における表皮増殖との今まで知られていなかった関係を明らかにすることができた。**COL17** は発癌や表皮老化において、重要な抗老化因子となりうる。

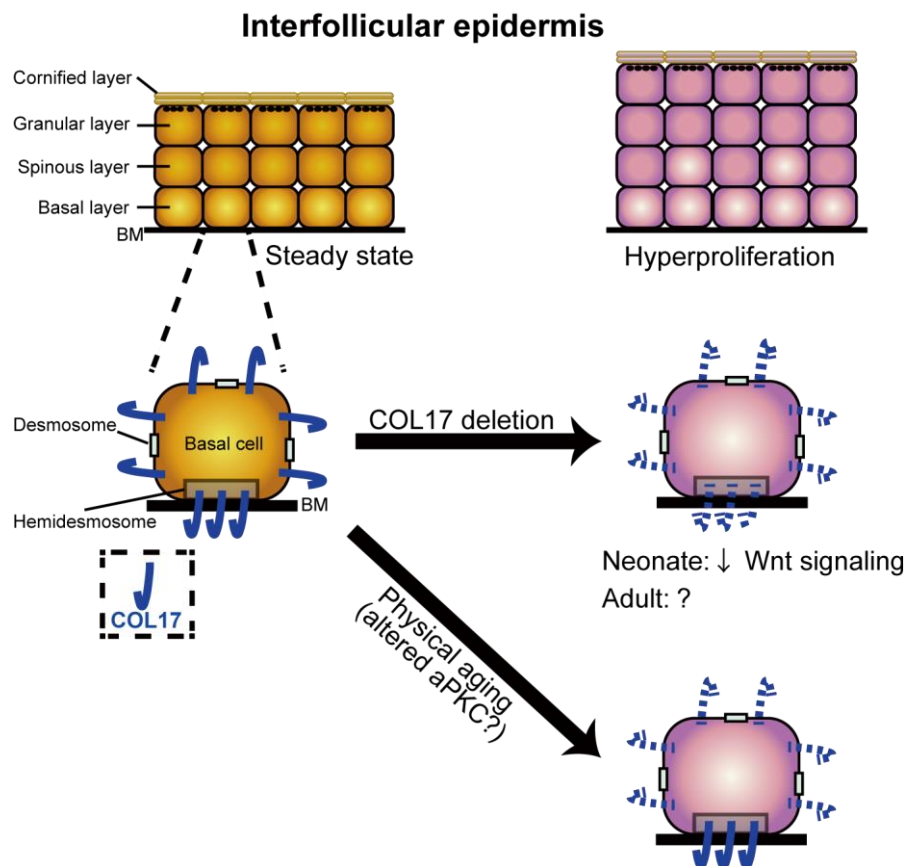


図 20 COL17 の表皮恒常性維持における役割のスキーマ

本研究の模式図。COL17 は新生仔期マウスの掌蹠の毛包間表皮の恒常性維持に Wnt シグナルを介して調整している。個体老化により非ヘミデスモソーム COL17 は毛包間表皮基底細胞において減少し、これらが減弱した aPKC の活動性と共に毛包間表皮を過増殖へと誘導する。

総括および結論

本研究では以下の新知見を得た。

- 1) マウス新生仔期における COL17 欠損は、Wnt シグナルの減弱に伴い一過性の毛包間表皮の過増殖を引き起こす。
- 2) COL17 は Wnt シグナルの安定化に寄与する。
- 3) COL17 の基底細胞における分布は加齢に伴い変化し、基底細胞側方上方部分の発現が減弱する。
- 4) COL17 の基底細胞における加齢による分布変化に伴い、毛包間表皮の肥厚と増殖が引き起こされる。
- 5) COL17 の加齢による分布変化には、加齢変性した aPKC が関与している。
- 6) COL17 の表皮への強制発現により、毛包間表皮の加齢による増殖が抑制される。

以上から COL17 が、毛包間表皮における表皮恒常性の維持に、増殖という観点で強く関与していることを証明した。今回の研究では COL17 が若年期と老年期、両者において表皮増殖にそれぞれ Wnt と aPKC という異なるシグナルメカニズムを通じて影響を及ぼし、老年期には COL17 導入により表皮増殖が抑制されるという点から抗老化分子としての可能性を見出した。

COL17 は、抗老化分子として皮膚における発癌抑制やアンチエイジング創薬へと利用可能である。

今後の課題として COL17 と Wnt シグナリングが生体内・表皮細胞内においてどのように相互作用をもたらしているのかの解析が挙げられる。また、COL17 と aPKC シグナリングの関連性についても、さらなる解析が必要である。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり多くの御指導と御助言を賜りました、北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室 清水 宏教授に、そして直接御指導いただきました北海道大学病院皮膚科 夏賀 健講師に心より感謝いたします。また、下記の基礎論文の共著者に深謝いたします。

北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室	西江 渉 准教授
お茶の水女子大学シミュレーション科学・生命情報学教育研究センター	小林 康明 特任助教
トリノ大学	Giacomo Donati 博士
北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室	鈴木 翔太朗 博士
北海道大学大学院医学院	藤村 悠 大学院生
北海道大学大学院医学研究院医化学教室	築山 忠維 助教
北海道大学病院皮膚科	氏家 英之 講師
新潟大学病院皮膚科	新熊 悟 准教授
北海道大学大学院中央研究部門	中村 秀樹 助手
愛媛大学病院皮膚科	村上 正基 講師
北海道大学大学院保健科学研究所	尾崎 倫孝 教授
北海道大学電子科学研究所	長山 雅晴 教授
キングズ・カレッジ・ロンドン	Fiona Watt 教授

このほか、北海道大学大学院医学研究院 生化学講座分子生物学教室 及川 司講師には多大な助言を頂き、この場を借りて感謝申し上げます。そして本研究にご協力いただきました患者の皆様に深く御礼申し上げます。最後に、北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野の教室員、技術員、秘書各位に心より御礼申し上げます。とくに技術員の吉田 芽亜利さんからは、多大なサポートをいただきました。厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1 Natsuga, K. Epidermal Barriers. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **4**, a018218, (2014).
- 2 Giangreco, A., Qin, M., Pinter, J. E. & Watt, F. M. Epidermal stem cells are retained in vivo throughout skin aging. *Aging Cell* **7**, 250-259, (2008).
- 3 Hsu, Y. C., Li, L. S. & Fuchs, E. Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nat. Med.* **20**, 847-856, (2014).
- 4 Jones, P. H., Simons, B. D. & Watt, F. M. Sic transit gloria: farewell to the epidermal transit amplifying cell? *Cell Stem Cell* **1**, 371-381, (2007).
- 5 Goodell, M. A. & Rando, T. A. Stem cells and healthy aging. *Science* **350**, 1199-1204, (2015).
- 6 Rittié, L. & Fisher, G. J. Natural and Sun-Induced Aging of Human Skin. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, a015370, (2015).
- 7 Gilchrist, B. A. In vitro assessment of keratinocyte aging. *J. Invest. Dermatol.* **81**, 184s-189s, (1983).
- 8 Grove, G. L. & Kligman, A. M. Age-associated Changes in Human Epidermal Cell Renewal. *J. Gerontol.* **38**, 137-142, (1983).
- 9 Charruyer, A., Barland, C. O., Yue, L., Wessendorf, H. B., Lu, Y., Lawrence, H. J., Mancianti, M. L. & Ghadially, R. Transit-Amplifying Cell Frequency and Cell Cycle Kinetics Are Altered in Aged Epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 2574-2583, (2009).
- 10 Stern, M. M. & Bickenbach, J. R. Epidermal stem cells are resistant to cellular aging. *Aging Cell* **6**, 439-452, (2007).
- 11 Keyes, B. E., Segal, J. P., Heller, E., Lien, W.-H., Chang, C.-Y., Guo, X., Oristian, D. S., Zheng, D. & Fuchs, E. Nfatc1 orchestrates aging in hair follicle stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, E4950-E4959, (2013).
- 12 McMillan, J. R., Akiyama, M. & Shimizu, H. Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions. *J. Dermatol. Sci.* **31**, 169-177, (2003).
- 13 Hirako, Y., Usukura, J., Uematsu, J., Hashimoto, T., Kitajima, Y. & Owaribe, K. Cleavage of BP180, a 180-kDa Bullous Pemphigoid Antigen, Yields a 120-kDa Collagenous Extracellular Polypeptide. *J. Biol. Chem.* **273**, 9711-9717, (1998).
- 14 Nishie, W. Update on the pathogenesis of bullous pemphigoid: an autoantibody-mediated blistering disease targeting collagen XVII. *J. Dermatol. Sci.* **73**, 179-186, (2014).
- 15 Fine, J.-D., Bruckner-Tuderman, L., Eady, R. A. J., Bauer, E. A., Bauer, J. W., Has,

- C., Heagerty, A., Hintner, H., Hovnanian, A., Jonkman, M. F., Leigh, I., Marinkovich, M. P., Martinez, A. E., McGrath, J. A., Mellerio, J. E., Moss, C., Murrell, D. F., Shimizu, H., Uitto, J., Woodley, D. & Zambruno, G. Inherited epidermolysis bullosa: Updated recommendations on diagnosis and classification. *J. Am. Acad. Dermatol.* **70**, 1103-1126, (2014).
- 16 Matsumura, H., Mohri, Y., Binh, N. T., Morinaga, H., Fukuda, M., Ito, M., Kurata, S., Hoeijmakers, J. & Nishimura, E. K. Hair follicle aging is driven by transepidermal elimination of stem cells via COL17A1 proteolysis. *Science* **351**, aad439, (2016).
 - 17 Nishie, W., Sawamura, D., Goto, M., Ito, K., Shibaki, A., McMillan, J. R., Sakai, K., Nakamura, H., Olasz, E., Yancey, K. B., Akiyama, M. & Shimizu, H. Humanization of autoantigen. *Nat. Med.* **13**, 378-383, (2007).
 - 18 Tanimura, S., Tadokoro, Y., Inomata, K., Binh, N. T., Nishie, W., Yamazaki, S., Nakauchi, H., Tanaka, Y., McMillan, J. R., Sawamura, D., Yancey, K., Shimizu, H. & Nishimura, E. K. Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells. *Cell Stem Cell* **8**, 177-187, (2011).
 - 19 Langton, A. K., Halai, P., Griffiths, C. E. M., Sherratt, M. J. & Watson, R. E. B. The impact of intrinsic ageing on the protein composition of the dermal-epidermal junction. *Mech. Ageing Dev.* **156**, 14-16, (2016).
 - 20 Niemann, C., Owens, D. M., Hülsken, J., Birchmeier, W. & Watt, F. M. Expression of Δ NLef1 in mouse epidermis results in differentiation of hair follicles into squamous epidermal cysts and formation of skin tumours. *Development* **129**, 95-109, (2002).
 - 21 Moriyama, A., Kii, I., Sunabori, T., Kurihara, S., Takayama, I., Shimazaki, M., Tanabe, H., Oginuma, M., Fukayama, M., Matsuzaki, Y., Saga, Y. & Kudo, A. GFP transgenic mice reveal active canonical Wnt signal in neonatal brain and in adult liver and spleen. *genesis* **45**, 90-100, (2007).
 - 22 Kuro-o, M. Klotho as a regulator of oxidative stress and senescence. *Biol. Chem.* **389**, 233-241, (2008).
 - 23 Ujiie, H., Sasaoka, T., Izumi, K., Nishie, W., Shinkuma, S., Natsuga, K., Nakamura, H., Shibaki, A. & Shimizu, H. Bullous Pemphigoid Autoantibodies Directly Induce Blister Formation without Complement Activation. *J. Immunol.* **193**, 4415-4428, (2014).
 - 24 Nishizawa, Y., Uematsu, J. & Owaribe, K. HD4, a 180 kDa Bullous Pemphigoid Antigen, Is a Major Transmembrane Glycoprotein of the Hemidesmosome. *J. Biochem.* **113**, 493-501, (1993).
 - 25 Nishie, W., Natsuga, K., Iwata, H., Izumi, K., Ujiie, H., Toyonaga, E., Hata, H., Nakamura, H. & Shimizu, H. Context-Dependent Regulation of Collagen XVII

- Ectodomain Shedding in Skin. *Am. J. Pathol.* **185**, 1361-1371, (2015).
- 26 Hashimoto, A., Oikawa, T., Hashimoto, S., Sugino, H., Yoshikawa, A., Otsuka, Y., Handa, H., Onodera, Y., Nam, J. M., Oneyama, C., Okada, M., Fukuda, M. & Sabe, H. P53- and mevalonate pathway-driven malignancies require Arf6 for metastasis and drug resistance. *J. Cell Biol.* **213**, 81-95, (2016).
 - 27 Niessen, M. T., Scott, J., Zielinski, J. G., Vorhagen, S., Sotiropoulou, P. A., Blanpain, C., Leitges, M. & Niessen, C. M. aPKC λ controls epidermal homeostasis and stem cell fate through regulation of division orientation. *J. Cell Biol.* **202**, 887-900, (2013).
 - 28 Tsukiyama, T., Fukui, A., Terai, S., Fujioka, Y., Shinada, K., Takahashi, H., Yamaguchi, T. P., Ohba, Y. & Hatakeyama, S. Molecular Role of RNF43 in Canonical and Noncanonical Wnt Signaling. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 2007-2023, (2015).
 - 29 Carotenuto, P., Fassan, M., Pandolfo, R., Lampis, A., Vicentini, C., Cascione, L., Paulus-Hock, V., Boulter, L., Guest, R., Quagliata, L., Hahne, J. C., Ridgway, R., Jamieson, T., Athineos, D., Veronese, A., Visone, R., Murgia, C., Ferrari, G., Guzzardo, V., Evans, T. R. J., MacLeod, M., Feng, G. J., Dale, T., Negrini, M., Forbes, S. J., Terracciano, L., Scarpa, A., Patel, T., Valeri, N., Workman, P., Sansom, O. & Braconi, C. Wnt signalling modulates transcribed-ultraconserved regions in hepatobiliary cancers. *Gut* **66**, 1268-1277, (2017).
 - 30 Kuo, T. L., Weng, C. C., Kuo, K. K., Chen, C. Y., Wu, D. C., Hung, W. C. & Cheng, K. H. APC haploinsufficiency coupled with p53 loss sufficiently induces mucinous cystic neoplasms and invasive pancreatic carcinoma in mice. *Oncogene* **35**, 2223-2234, (2016).
 - 31 Kubo, A., Nagao, K., Yokouchi, M., Sasaki, H. & Amagai, M. External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J. Exp. Med.* **206**, 2937-2946, (2009).
 - 32 Amagai, M., Ishii, K., Hashimoto, T., Gamou, S., Shimizu, N. & Nishikawa, T. Conformational Epitopes of Pemphigus Antigens (Dsg1 and Dsg3) Are Calcium Dependent and Glycosylation Independent. *J. Invest. Dermatol.* **105**, 243-247, (1995).
 - 33 Atwood, S. X., Li, M., Lee, A., Tang, J. Y. & Oro, A. E. GLI activation by atypical protein kinase C ι/λ regulates the growth of basal cell carcinomas. *Nature* **494**, 484-488, (2013).
 - 34 Wu, X., Quondamatteo, F., Lefever, T., Czuchra, A., Meyer, H., Chrostek, A., Paus, R., Langbein, L. & Brakebusch, C. Cdc42 controls progenitor cell differentiation and β -catenin turnover in skin. *Genes Dev.* **20**, 571-585, (2006).
 - 35 Hardman, M. J., Sisi, P., Banbury, D. N. & Byrne, C. Patterned acquisition of skin

- barrier function during development. *Development* **125**, 1541-1552, (1998).
- 36 Yanagi, T., Akiyama, M., Nishihara, H., Sakai, K., Nishie, W., Tanaka, S. & Shimizu, H. Harlequin ichthyosis model mouse reveals alveolar collapse and severe fetal skin barrier defects. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3075-3083, (2008).
- 37 Nakamura, H., Sawamura, D., Goto, M., Nakamura, H., Kida, M., Ariga, T., Sakiyama, Y., Tomizawa, K., Mitsui, H., Tamaki, K. & Shimizu, H. Analysis of the COL17A1 in non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa and amelogenesis imperfecta. *Int. J. Mol. Med.* **18**, 333-337, (2006).
- 38 Brakebusch, C., Grose, R., Quondamatteo, F., Ramirez, A., Jorcano, J. L., Pirro, A., Svensson, M., Herken, R., Sasaki, T., Timpl, R., Werner, S. & Fässler, R. Skin and hair follicle integrity is crucially dependent on $\beta 1$ integrin expression on keratinocytes. *The EMBO Journal* **19**, 3990-4003, (2000).
- 39 Niculescu, C., Ganguli-Indra, G., Pfister, V., Dupé, V., Messaddeq, N., De Arcangelis, A. & Georges-Labouesse, E. Conditional ablation of integrin alpha-6 in mouse epidermis leads to skin fragility and inflammation. *Eur. J. Cell Biol.* **90**, 270-277, (2011).
- 40 Rompolas, P., Mesa, K. R., Kawaguchi, K., Park, S., Gonzalez, D., Brown, S., Boucher, J., Klein, A. M. & Greco, V. Spatiotemporal coordination of stem cell commitment during epidermal homeostasis. *Science* **352**, 1471-1474, (2016).
- 41 Sada, A., Jacob, F., Leung, E., Wang, S., White, B. S., Shalloway, D. & Tumber, T. Defining the cellular lineage hierarchy in the interfollicular epidermis of adult skin. *Nat. Cell Biol.* **18**, 619-631, (2016).
- 42 Roy, E., Neufeld, Z., Cerone, L., Wong, H. Y., Hodgson, S., Livet, J. & Khosrotehrani, K. Bimodal behaviour of interfollicular epidermal progenitors regulated by hair follicle position and cycling. *EMBO J.* **35**, 2658-2670, (2016).
- 43 Kretschmar, K. & Watt, F. M. Markers of epidermal stem cell subpopulations in adult mammalian skin. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **4**, a013631, (2014).
- 44 Margadant, C., Charafeddine, R. A. & Sonnenberg, A. Unique and redundant functions of integrins in the epidermis. *The FASEB Journal* **24**, 4133-4152, (2010).
- 45 Rognoni, E., Widmaier, M., Jakobson, M., Ruppert, R., Ussar, S., Katsougkri, D., Bottcher, R. T., Lai-Cheong, J. E., Rifkin, D. B., McGrath, J. A. & Fassler, R. Kindlin-1 controls Wnt and TGF-beta availability to regulate cutaneous stem cell proliferation. *Nat. Med.* **20**, 350-359, (2014).
- 46 Bernard, P., Fleming, A., Lacombe, A., Harley, V. R. & Vilain, E. Wnt4 inhibits β -catenin/TCF signalling by redirecting β -catenin to the cell membrane. *Biol. Cell* **100**, 167-177, (2008).

- 47 Mikels, A. J. & Nusse, R. Purified Wnt5a Protein Activates or Inhibits β -Catenin–TCF Signaling Depending on Receptor Context. *PLoS Biol.* **4**, e115, (2006).
- 48 Lien, W.-H. & Fuchs, E. Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/beta-catenin signaling. *Genes Dev.* **28**, 1517-1532, (2014).
- 49 Denda, M., Tomitaka, A., Akamatsu, H. & Matsunaga, K. Altered distribution of calcium in facial epidermis of aged adults. *J. Invest. Dermatol.* **121**, 1557-1558, (2003).
- 50 Rinnerthaler, M., Streubel, M. K., Bischof, J. & Richter, K. Skin aging, gene expression and calcium. *Exp. Gerontol.* **68**, 59-65, (2015).
- 51 Helfrich, I., Schmitz, A., Zigrino, P., Michels, C., Haase, I., Bivic, A. I., Leitges, M. & Niessen, C. M. Role of aPKC Isoforms and Their Binding Partners Par3 and Par6 in Epidermal Barrier Formation. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 782-791, (2006).
- 52 Osada, S., Minematsu, N., Oda, F., Akimoto, K., Kawana, S. & Ohno, S. Atypical Protein Kinase C Isoform, aPKC λ , Is Essential for Maintaining Hair Follicle Stem Cell Quiescence. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 2584-2592, (2015).
- 53 Gschwendt, M., Dieterich, S., Rennecke, J., Kittstein, W., Mueller, H. J. & Johannes, F. J. Inhibition of protein kinase C μ by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes. *FEBS Lett.* **392**, 77-80, (1996).
- 54 Standaert, M. L., Bandyopadhyay, G., Perez, L., Price, D., Galloway, L., Poklepovic, A., Sajan, M. P., Cenni, V., Sirri, A., Moscat, J., Toker, A. & Farese, R. V. Insulin Activates Protein Kinases C- ζ and C- λ by an Autophosphorylation-dependent Mechanism and Stimulates Their Translocation to GLUT4 Vesicles and Other Membrane Fractions in Rat Adipocytes. *J. Biol. Chem.* **274**, 25308-25316, (1999).
- 55 Watt, F. M. & Fujiwara, H. Cell-Extracellular Matrix Interactions in Normal and Diseased Skin. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3** (2011).
- 56 Lu, Catherine P., Polak, L., Rocha, Ana S., Pasolli, H. A., Chen, S.-C., Sharma, N., Blanpain, C. & Fuchs, E. Identification of Stem Cell Populations in Sweat Glands and Ducts Reveals Roles in Homeostasis and Wound Repair. *Cell* **150**, 136-150, (2012).
- 57 Lim, X. & Nusse, R. Wnt signaling in skin development, homeostasis, and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a008029, (2013).
- 58 Lim, X., Tan, S. H., Koh, W. L. C., Chau, R. M. W., Yan, K. S., Kuo, C. J., van Amerongen, R., Klein, A. M. & Nusse, R. Interfollicular Epidermal Stem Cells Self-Renew via Autocrine Wnt Signaling. *Science* **342**, 1226-1230, (2013).
- 59 Watt, F. M. Mammalian skin cell biology: at the interface between laboratory and clinic. *Science* **346**, 937-940, (2014).
- 60 Mascre, G., Dekoninck, S., Drogat, B., Youssef, K. K., Brohee, S., Sotiropoulou, P. A., Simons, B. D. & Blanpain, C. Distinct contribution of stem and progenitor cells to

- epidermal maintenance. *Nature* **489**, 257-262, (2012).
- 61 Sanchez-Danes, A., Hannezo, E., Larsimont, J. C., Liagre, M., Youssef, K. K., Simons, B. D. & Blanpain, C. Defining the clonal dynamics leading to mouse skin tumour initiation. *Nature* **536**, 298-303, (2016).
- 62 Alcolea, M. P. & Jones, P. H. Lineage analysis of epidermal stem cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **4**, a015206, (2014).
- 63 Doupé, D. P., Alcolea, M. P., Roshan, A., Zhang, G., Klein, A. M., Simons, B. D. & Jones, P. H. A Single Progenitor Population Switches Behavior to Maintain and Repair Esophageal Epithelium. *Science* **337**, 1091-1093, (2012).
- 64 Dunnwald, M., Tomanek-Chalkley, A., Alexandrunas, D., Fishbaugh, J. & Bickenbach, J. R. Isolating a pure population of epidermal stem cells for use in tissue engineering. *Exp. Dermatol.* **10**, 45-54, (2001).
- 65 Dunnwald, M., Chinnathambi, S., Alexandrunas, D. & Bickenbach, J. R. Mouse epidermal stem cells proceed through the cell cycle. *J. Cell. Physiol.* **195**, 194-201, (2003).
- 66 Woodworth, M. B., Girsakis, K. M. & Walsh, C. A. Building a lineage from single cells: genetic techniques for cell lineage tracking. *Nat Rev Genet* **18**, 230-244, (2017).
- 67 Tellkamp, F., Vorhagen, S. & Niessen, C. M. Epidermal polarity genes in health and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **4**, a015255, (2014).
- 68 Pascale, A., Amadio, M., Govoni, S. & Battaini, F. The aging brain, a key target for the future: the protein kinase C involvement. *Pharmacol. Res.* **55**, 560-569, (2007).
- 69 Golomb, L., Sagiv, A., Pateras, I. S., Maly, A., Krizhanovsky, V., Gorgoulis, V. G., Oren, M. & Ben-Yehuda, A. Age-associated inflammation connects RAS-induced senescence to stem cell dysfunction and epidermal malignancy. *Cell Death Differ.* **22**, 1764-1774, (2015).
- 70 Liu, C.-C., Lin, J.-H., Hsu, T.-W., Hsu, J.-W., Chang, J.-W., Su, K., Hsu, H.-S. & Hung, S.-C. Collagen XVII/laminin-5 activates epithelial-to-mesenchymal transition and is associated with poor prognosis in lung cancer. *Oncotarget* (2016).
- 71 Liu, C.-C., Lin, S.-P., Hsu, H.-S., Yang, S.-H., Lin, C.-H., Yang, M.-H., Hung, M.-C. & Hung, S.-C. Suspension survival mediated by PP2A-STAT3-Col XVII determines tumour initiation and metastasis in cancer stem cells. *Nature Communications* **7**, 11798, (2016).
- 72 Moilanen, J. M., Kokkonen, N., Löffek, S., Väyrynen, J. P., Syväniemi, E., Hurskainen, T., Mäkinen, M., Klintrup, K., Mäkelä, J., Sormunen, R., Bruckner-Tuderman, L., Autio-Harmainen, H. & Tasanen, K. Collagen XVII expression correlates with the invasion and metastasis of colorectal cancer. *Hum. Pathol.* **46**, 434-442, (2015).

- 73 Porter, R. M., Reichelt, J., Lunny, D. P., Magin, T. M. & Birgitte Lane, E. The Relationship Between Hyperproliferation and Epidermal Thickening in a Mouse Model for BCIE. *J. Invest. Dermatol.* **110**, 951-957, (1998).
- 74 Waller, J. M. & Maibach, H. I. Age and skin structure and function, a quantitative approach (I): blood flow, pH, thickness, and ultrasound echogenicity. *Skin Res. Technol.* **11**, 221-235, (2005).