



Title	創傷治癒における皮膚幹細胞の系譜細胞は毛包の発生を停止させながら表皮下水疱を治癒させる〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	藤村, 悠
Description	配架番号 : 2651
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14710号
Issue Date	2021-09-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/83036
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yu_Fujimura_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 藤村 悠

学 位 論 文 題 名

創傷治癒における皮膚幹細胞の系譜細胞は

毛包の発生を停止させながら表皮下水疱を治癒させる

(Hair follicle stem cell progeny heal blisters while pausing hair development)

【背景と目的】 成長の完了した組織が損傷を受けると、発生期の遺伝子発現プログラムが再活性化し、組織を修復する。しかし、発生期にある成長段階の組織損傷がどのように修復されるかは不明であった。また、従来の創傷治癒アッセイに用いられる皮膚全層創傷モデルでは、皮膚付属器を含む上皮成分が創床から失われるため、創傷治癒と発生の両者を同時に観察することは不可能であった。本研究の目的は、発生期のマウスの表皮下水疱モデルを用いて、表皮の選択的損傷が皮膚の発生に与える影響を調べることである。

【材料と方法】 サクシヨンプリスター法を新生仔マウスの背部皮膚に応用し、創傷部に発生期の毛包を含む表皮下水疱モデルを作成した。野生型マウス、*Col17a1*^{-/-}マウス（17 型コラーゲンノックアウトマウス）、*Col17a1*^{-/-}マウス（7 型コラーゲンノックアウトマウス）などの遺伝子改変マウス、CaCl₂を水疱内に投与したマウス、ヒトの水疱検体の表皮下水疱の治癒過程を免疫蛍光染色、免疫組織化学、電子顕微鏡を用いて詳細に観察した。RNA シーケンシングを用いて、表皮下水疱の再生上皮における発生に関わる遺伝子群の発現変化を解析した。系統追跡実験、細胞増殖標識、数理モデルを組み合わせ、接合部毛包幹細胞および毛包間表皮幹細胞の動態を解析した。

【結果】 野生型マウスの表皮下水疱では水疱部の真皮内に発生期の毛包が残存し、創傷治癒と毛包付属器の発生の同時観察に適したモデルであることを確認した。電子顕微鏡で表皮下水疱の水疱蓋にはヘミデスモソームが、水疱底には lamina densa が観察され、lamina lucida で裂隙が形成されていた。水疱形成の 1 日後には 1-2 層の再生上皮が確認でき、3 日後には顆粒層を伴って上皮化が完了した。表皮下水疱の再生上皮の RNA シーケンシングでは、Wnt シグナル、メラニン形成、Hedgehog シグナルなどの毛包の発生に関わる遺伝子の発現の低下が見られた。水疱形成の 3 日後の病変部ではステージ 5 または 6 の発生段階の毛包が観察されたが、正常皮膚の毛包にはステージ 7 の毛包も観察されていることから、水疱形成によって毛包の成長は遅延することが判明した。これと一致して、また、Wnt レポーターマウスでは水疱部の毛包における Wnt シグナル活性が低下していた。水疱部における増殖細胞は、毛包角化細胞および水疱辺縁部の表皮角化細胞に豊富であり、毛包および水疱辺縁部から遊走する角化細胞が観察された。水疱形成の 1 日後および 3 日後の水疱部に浸潤

する免疫細胞（CD3、F4-80、Ly6G で標識）は、正常部皮膚と比較して同程度であった。野生型マウスの表皮下水疱の系統追跡法では、再上皮化には Lrig1（Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1）で標識された接合部毛包幹細胞の系譜細胞が大きく寄与し、K14（ケラチン 14）で標識された毛包間表皮幹細胞の寄与は水疱辺縁部の上皮化のみに留まった。*Col17a1*^{-/-}マウスに表皮下水疱を作成したところ、野生型マウスと同様、裂隙は lamina lucida で形成されたが、水疱部からほとんどの毛包が剥離した。毛包の減少に伴って上皮化は遅延し、対照マウスで上皮化が完了する水疱形成の 3 日後には顆粒層の再生が見られなかった。*Col17a1*^{-/-}マウスにおけるヒト COL17 の過剰発現によるトランスジェニックレスキューでは、水疱形成の 3 日後の再生上皮に顆粒層の再生が確認でき、水疱治癒を改善していた。*Col17a1*^{-/-}マウスの表皮下水疱の系統追跡法では、水疱辺縁の K14 で標識された毛包間表皮幹細胞の系譜細胞が上皮化に大きく寄与した。*Col17a1*^{-/-}マウスに表皮下水疱を作成したところ、野生型マウスや *Col17a1*^{-/-}マウスとは対照的に、裂隙形成は基底膜下で生じていた。さらに、*Col17a1*^{-/-}マウスとは対照的に毛包が真皮内に残存した。水疱部の毛包の増殖細胞数は対照マウスと同程度であったが創傷治癒は遅延しており、再生上皮の角化細胞の遊走における扁平化が対照マウスと比較して小さく、創傷治癒遅延と関連していた。CaCl₂ 投与マウスの表皮下水疱では水疱形成 1 日後の再生上皮が対照マウスより少なく、創傷治癒が遅延していた。水疱部の毛包の増殖細胞数は対照マウスと同程度であったが、再生上皮の角化細胞の遊走における扁平化が対照マウスと比較して小さく、創傷治癒遅延と関連していた。野生型マウス、*Col17a1*^{-/-}マウス、*Col17a1*^{-/-}マウスおよび CaCl₂ 投与マウスの in vivo の創傷治癒過程における細胞増殖や細胞形態の扁平化率等のデータを用い、数理モデルで可視化し、表皮下水疱における接合部毛包幹細胞および毛包間表皮幹細胞の動態を再現、比較した。ヒトの水疱検体でも水疱部の毛包から再上皮化していることを確認した。

【考察】 本研究では、これまで詳細にわかっていなかった創傷治癒と組織発生の関わりにおける重要な細胞メカニズム、および in vivo の創傷治癒における遊走細胞の形態学的変化の重要性を解明した。我々のサクシヨンプリスターモデルは、上皮のみを剥離することによって in vitro の創傷治癒アッセイにも類似し、in vivo の創傷治癒における上皮細胞の観察に非常に有用である。また、表皮水疱症、類天疱瘡群、熱傷、スティーブンス・ジョンソン症候群/中毒性表皮壊死症などの疾患と病理学的に同等の表皮化水疱を再現できるため、これらの疾患の病態の解明に寄与する可能性がある。また、特に *Col17a1*^{-/-}マウスおよび *Col17a1*^{-/-}マウスの水疱形成は、それぞれヒトの接合部型および劣性栄養障害型の表皮水疱症表皮水疱症の創傷モデルマウスとなり得る。さらに、水疱内投与実験は水疱内への直接の薬剤投与を可能にする。本研究の成果は、水疱性疾患の病態解明、治療開発に繋がることが期待される。

【結論】 我々は、成長段階の皮膚において、接合部毛包幹細胞の系譜細胞が毛包の成長を犠牲にして表皮下水疱を治癒させることを見出した。また、再生上皮における細胞の扁平化は創傷治癒を促進させる重要な因子である。