# 皮膚の発生と恒常性維持における
# 転写因子 Tbx3 の機能解析

一條　遼

# 皮膚発生過程における Tbx3 の機能解析

# 目次

要旨　1

第一章　序論　3

第二章　材料及び方法　8

第三章　結果　12

第四章　考察　24

文献　27

謝辞　34

# 要旨

皮膚は表皮、真皮、皮下組織から形成される。表皮は体表側から順に、角質層、顆粒層、有棘層、基底層から成る層状構造を形成しており、表皮の中で増殖能をもつ細胞は、基底層に存在する基底細胞と呼ばれる未分化の細胞群である。この基底細胞が、有棘細胞、顆粒細胞、角質細胞へと段階的に分化することで重層構造が形成される。

表皮細胞の段階的な分化は重層上皮の発生に必要であるが、そのメカニズムは不明な点が多い。私は、本研究で、器官形成に重要な働きを担う転写因子 T-box ファミリーの 1 つである Tbx3 が、表皮細胞の段階的分化に重要な役割を果たすことを明らかにした。マウス胎仔の表皮発生過程において、Tbx3 は基底細胞と基底層上層細胞に発現していることを見出した。そこで、K14-CreERT と $Tbx3^{floxed/floxed}$ マウスを交配させ、タモキシフェン投与により表皮特異的に Tbx3 をノックアウトできる Tbx3 conditional knockout (cKO)マウスを作製した。母体マウスに妊娠 9 日目から 15 日目までタモキシフェンを連日腹腔注射し、胎仔の表皮で Tbx3 をノックアウトした。その結果、Tbx3 cKO 胎仔は、身体の縮小、表皮の薄化、皮膚バリア機能の低下という表現型を示した。また、通常、基底層と基底層直上層に存在する Keratin5 陽性未分化細胞が、Tbx3 cKO 胎仔の表皮では、基底層にのみ存在すること、また有棘層が薄化し、有棘層で顆粒層マーカーが発現する現象が観察された。さらに、表皮を回収して qPCR 解析を行ったところ、顆粒層マーカーである involucrin、filaggrin、loricrin の mRNA 発現レベルが Tbx3 cKO 表皮では増加していた。これらの結果から、Tbx3 は、顆粒層の細胞の早期分化を抑制していると考えられた。次に、基底細胞の増殖と細胞分裂軸について検討した。その結果、Tbx3 cKO 胎仔の表皮では、増殖マーカーである Ki67 陽性の基底細胞の割合が有意に減少すること、また、基底膜に対して平行に分裂する基底細胞の割合が減少することが分かった。「表皮の薄化」「皮膚バリア機能の低下」「有棘層の早期分化」という表

現型は、Notch シグナルのターゲット遺伝子である Hes1 の cKO マウスの表現型と類似していた。そこで、Tbx3 と Hes1 の関連について解析を行った。その結果、有棘層の Hes1 陽性細胞の多くが Tbx3 を発現しており、さらに Tbx3 cKO 胎仔の表皮では Hes1 の発現が有意に減少することが分かった。以上の結果から、Tbx3 は、Hes1 の発現を促進することで表皮細胞の増殖と段階的分化を制御することが示唆された。

# 第一章

# 序論

皮膚は最外層の表皮、中間層の真皮、その下にある皮下組織からなり、身体の重要なバリアとして働く。表皮は、最下層側から、基底層、有棘層、顆粒層、角質層の４層からなる、ケラチノサイトの重層上皮である（Fig. 1A)。表皮の中で増殖能をもつ細胞は、基底層に存在する基底細胞と呼ばれる未分化の細胞群である。この基底細胞が、有棘細胞、顆粒細胞、角質細胞へと段階的に分化することで重層上皮が形成される(Blanpain & Fuchs 2009; Sotiropoulou & Blanpain 2012)。

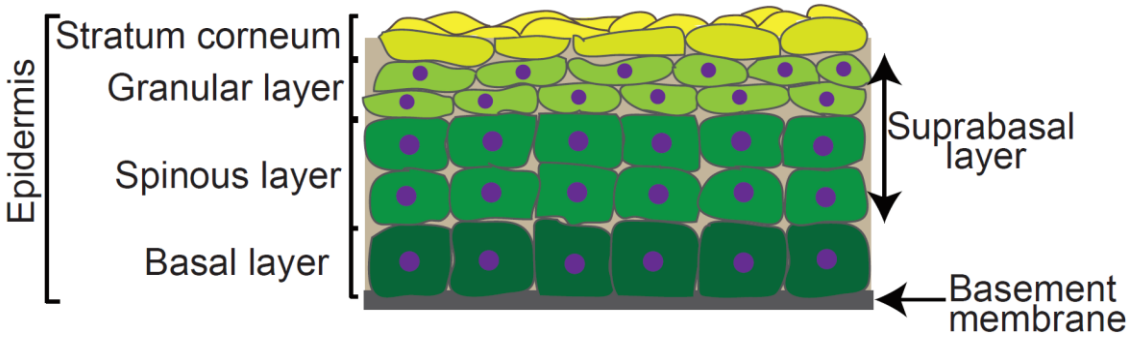


Fig. 1A 表皮の重層構造

表皮(Epidermis)は最下層側から、基底層(Basal layer)、有棘層(Spinous layer)、顆粒層(Granular layer)、角質層(Stratum corneum)の４層から構成されている。基底層の細胞は、基底膜(Basement membrane)に接着している。

マウスの皮膚発生過程において、表皮は embryonic day (E) 8.5~E18.5 で形成される。まず、E9.5 で基底細胞が形成され、Keratin5（K5）と Keratin14（K14）を発現するようになる（Byrne *et al.* 1994)。E12.5 で、基底細胞の一部が基底膜から外れて胎仔特異的な周皮を形成し、皮膚の重層化が開始する（Hardman *et al.* 1999)。E14.5 で、基底層と周皮の間に、Keratin1（K1）と Keratin10（K10）を発現する中間層が形成される（Richardon *et al.* 2014)。中間層の細胞は、基底細胞と同様に増殖能を有するが、やがて有棘細胞となり、増殖能を失う（Koster *et al.* 2007)。E16.5~E17.5 で、有棘細胞から顆粒細胞への分化と顆粒細胞から角質細胞への分化が起こり、皮膚の重層構

造が完成する（Hardman *et al.* 1999）。ケラチノサイトの分化マーカーとしては、involucrin、loricrin、filaggrin が知られる。involucrin と loricrin は角化の際に、トランスグルタミナーゼにより、架橋されて周辺帯の構成成分となる（Kalinin *et al.* 2001）。filaggrin は前駆体である profilaggrin が角化の際に脱リン酸化等の作用を介して分解されることにより産生される。産生された filaggrin は keratin 線維を凝集する機能を持つ。これらの顆粒層、角質層での細胞分化は、皮膚バリア機能の獲得に必須である（Sandilands *et al.* 2009）。

表皮発生過程では、基底細胞が活発に細胞分裂するが、この際分裂の向きに方向性がある。表皮発生初期の E12.5 では、多くの基底細胞は基底膜に対して平行に分裂する。一方、重層構造が形成されつつある E16.5 以降では、垂直方向の分裂が多くなる(Lechler *et al.* 2005)。この分裂パターンは、表皮発生過程の初期には基底層の拡張に貢献し、後期では重層化に貢献すると考えられている。垂直分裂では、一つの娘細胞は基底膜への接着を維持し、もう一つの娘細胞は基底膜から外れ有棘細胞へと分化を開始する。基底細胞から有棘細胞への分化には、Notch が重要であることが知られている（Blanpain *et al.* 2006）。Notch は、分化や器官形成の際に、細胞運命を決定する因子として働く。Notch は切断されると、細胞内ドメインである NICD が離れる。NICD は転写抑制因子である RBP-J に結合し、RBP-J のターゲット因子である Hes や Hey を活性化する（Artavanis-Tsakonas *et al.* 1999; Iso *et al.* 2003; Lai 2004）。表皮の発生過程においては、Notch1-3 の受容体とそれらのリガンドである Jagged1 は基底層上層層で発現しており、Jagged2 は基底層に発現している（Powell *et al.* 1998; Pan *et al.* 2004）（Fig. 1B）。Notch1 の表皮特異的 conditional knockout (cKO)マウスでは、有棘層マーカーである loricrin、filaggrin の発現量が上昇し、胎仔期後期における分化に異常をきたすことが報告されている（Rangarajan *et al.* 2001）。また、Hes1 の表皮特異的 cKO マウスは、有棘細胞から顆粒細胞への早期分化を伴う表皮の薄化と、基底細胞

の増殖低下が起こることが報告されている(Moriyama et al., 2008)。

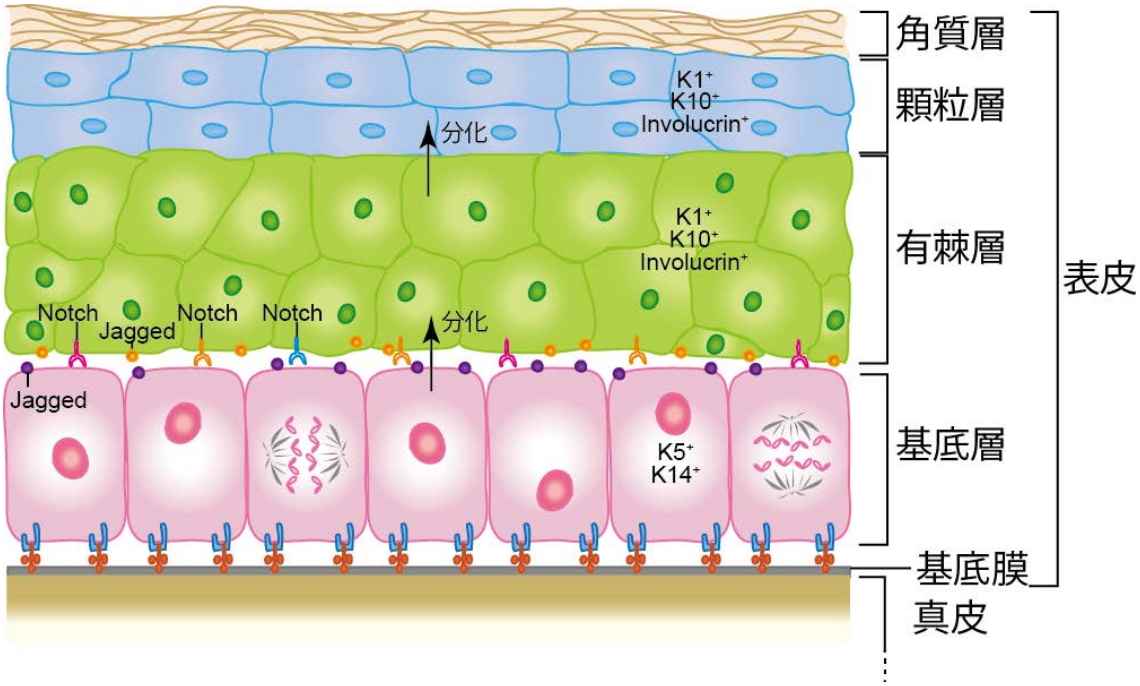


Fig. 1B 表皮における Notch シグナル

Tbx3、T-box 転写因子ファミリーに属する転写抑制因子であり、手足、心臓、膵臓を含む様々な器官の形態形成に重要な役割を果たす（Davenport *et al.* 2003; Frank *et al.* 2012）。Tbx3 のヘテロ接合変異は、ヒトの常染色体優性の尺骨・乳房症候群（ulnar-mammary syndrome）を引き起こす（Bamshad *et al.* 1997）。齧歯動物の胎仔では、Tbx3 は肝臓や心臓の発生時に前駆細胞で発現し、その増殖と分化を制御することが報告されている（Suzuki, *et al.* 2008; Ludtke, et al. 2009; Zhang, *et al.* 2012）。また、マウス胚性幹細胞（ES 細胞）では、Tbx3 が ES 細胞の自己複製と全能性の維持並びに、中胚葉や胚体外内胚葉への分化に必要であることが示されている（Niwa, *et al.* 2009; Dan, *et al.* 2013 Weidgang *et al.* 2013; Waghray, *et al.* 2015; Lu, *et al.* 2011）。Tbx3 はまた、iPS 細胞の性質の改善にも寄与することが報告されている（Han, *et al.* 2010）。このように、Tbx3 は様々な幹細胞や前駆細胞の増殖、分化を支配する。しか

し、皮膚の表皮発生における Tbx3 の機能は不明であった。本研究では、Tbx3 が表皮基底細胞の増殖を促進し、有棘層の早期分化を抑えることで、表皮の発生とバリア機能の獲得に重要な役割を果たすことを明らかにした。

# 第二章

# 材料及び方法

【マウス】

マウスは C57BL/6 バックグラウンドを用いた。Tbx3$^{floxed/floxed}$マウス（Anne Moon 博士から分与、Weis Center for Research、University of Utah）、Keratin14-CreERT マウス（Jackson Laboratory、005107）を交配しタモキシフェン投与により表皮基底層特異的に Tbx3 をノックアウトできる Tbx3 conditional knockout (cKO)マウスを作製した。マウス胎仔皮膚特異的に Tbx3 を KO するため、母親マウスに 3mg のタモキシフェン（Sigma、コーンオイル 100μL に溶解）を妊娠 9 日目から 15 日目まで連日腹腔注射し、Tbx3 cKO（Tbx3$^{floxed/floxed}$ Keratin14-CreERT$^{+/-}$）の胎仔を解析した。Control として Keratin14-CreERT を含まない Tbx3$^{floxed/floxed}$ Keratin14-CreERT$^{-/-}$マウス胎仔を用いた。

【皮膚切片染色】

マウス胎仔を OCT compaund を入れたクリオモルド 3 号（SAKURA）に入れ、液体窒素で凍結し、凍結切片を作製した。クリオスタット（Lica）を使用し、凍結切片から皮膚切片を作製し 2 時間、風乾した。TBS-TritonX100-0.02%（Nacalai）で 3 回 wash し、4% paraformaldehyde（PFA）（Nacalai）に 15 分間浸した後、TBS-TritonX100-0.02%で wash した。-20℃でメタノール（Nacalai）に 30 分間浸した。TBS-TritonX100-0.02%で 3 回 wash 後、5%BSA- TBS-TritonX100-0.02%で 1 時間 Blocking し、その後 TBS-TritonX100-0.02%で wash した。1 次抗体を 1%BSA-TBS-TritonX100-0.02%に希釈し、sample に滴下しパラフィルムをかけて 4℃で一晩処理した。TBS-TritonX100-0.02%で 3 回 wash し、2 次抗体（1:500）と Hoechst 33342（1:500）を 1%BSA-TBS-TritonX100-0.02%に入れ、sample に滴下しパラフィルムをかけて 1 時間遮光しながら処理した。TBS-TritonX100-0.02%で 3 回 wash し、ミリ Q 水でリンスして封入した。1 次抗体は anti-Ki67（rabbit、1:500; Novus)、

anti-Tbx3 (rabbit、1:200; Abcam; goat、1:100、Santa Cruz Biotechnology)、anti-Hes1 (rabbit、1:100; Santa Cruz Biotechnology; guinea pig、1:200; Baek *et al.*2006)、anti-K5 (rabbit、1:1000; Covance)、anti-K10 (mouse、1:200; Millipore), anti-involucrin (rabbit, 1:500;, Covance)、anti-phospho-histone H3 (rabbit、1:100; Millipore)、and anti-β4-integrin (rat、1:1000; BD Pharmingen)、2 次抗体は Alexa Fluor 488-、546-conjugated goat anti-rabbit、anti-mouse、anti-rat、anti-guinea pig (Molecular Probes)、Alexa Fluor 488-conjugated anti-chicken、Cy3-conjugated anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch)を使用した。

【表皮からの RNA 抽出】

ISOGEN（NIPPON GENE）500μL 中に表皮片を入れ、ホモジナイザー（Nippi）で破砕した。5 分間室温で静置し、4℃、2000rpm で 2 分遠心して上清を回収した。クロロホルム（Nacalai）100μL を上清に加えた。室温で 3 分 incubate した後、4℃、3500rpm で 15 分遠心した。水層を回収し、等量のイソプロパノール（Nacalai）を加えた。室温で 10 分静置した後、4℃、15000rpm で 20 分遠心して上清を廃棄した。沈殿物に 80%エタノールを 1000μL 加え、4℃、15000rpm で 5 分遠心し、沈殿物を DEPC 処理水（Nacalai）10μL に懸濁した。RNeasy Micro kit（QIAGEN）を使用し、推奨手順に従って RNA clean up を行い、NanoDrop2000（Thermo）で RNA 濃度を測定した。

【Real-time quantitative PCR】

表皮片より抽出した RNA 1μg を Random primer、M-MLV Reverse Transcriptase（Invitrogen）を用いて First-strand cDNA を合成した。その後、合成した cDNA を鋳型として、94℃1 分（1 cycle)、94℃10 秒、58℃10 秒、72℃40 秒（25-35cycles)、

72℃5 分（1 cycle）で RT-PCR を行った。得られた cDNA（1/4 希釈）を鋳型として、SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) を使用し、ABI PRISM 7500 sequence Detection System にて q-PCR を行った。PCR 反応は ABI 7500 SDS software 1.2 の既定に従った（50℃2 分、95℃10 分の後、95℃10 秒、60℃1 分を 40 cycles、最後に Dissociation Stage)。検量線は 5 点（1、1/4、1/16、1/64、1/256 希釈）で作製し、各遺伝子発現量は β-actin で標準化した。使用した primer 配列は Tbx3 fw、TTGCAAAGGGTTTTCGAGAC; Tbx3 rev、TGGAGGACTCATCCGAAGTC; Involucrin fw、CAGGTCCAAGACATTCAACC; Involucrin rev、CAAGTTCACAGATGAGACGG; Filaggrin fw、GGCGCGGGCAGTCCTCATC; Filaggrin rev、CTGGTGCCCGCGTTGCTGTT; Loricrin fw、CGTCCCAACAGTATCAGTGCC; Loricrin rev、TGGTCTGCTGAGAGGAGTAATAG; β-actin fw、GGTCAGAAGGACTCCTATGTGG; β-actin rev、TCTCAGCTGTGGTGGTGAAG

【表皮の厚さの測定】

3 枚のイメージから最も厚い、薄い部分を除く部位を測定した。

【Skin permeability assay】

マウス胎仔は PBS で洗浄し、メタノールで 1 分間処理した。次に、0.1% toluidine blue O (WALDECK)に 30 分間浸した。染料の浸透程度により皮膚バリア機能を評価した。

# 第三章

# 結果

## 結果

**[Tbx3 はマウス胎仔の皮膚発生過程において、基底細胞と基底層上層細胞に発現する]**

皮膚の発生における Tbx3 の役割を検討するため、マウス胎仔皮膚での Tbx3 の発現パターンを観察した。表皮の多層化が部分的に開始する E14.5 では、一部の基底細胞で Tbx3 が低レベルに発現していることが観察された（Fig. 2A、E14.5)。表皮が多層化し、増殖性の基底細胞と、段階的分化過程にある上層細胞が現れる E17.5 では基底細胞と基底層上層細胞で Tbx3 が強く発現していた(Fig. 2A、E17.5)。Tbx3 陽性基底細胞の数は、出生後 1 日目にすみやかに減少した(Fig. 2A P1、2B)。そこで次に、$Tbx3^{floxed/floxed}$ マウスと K14-CreERT マウスを交配し、タモキシフェン投与により表皮特異的に Tbx3 をノックアウトする Tbx3 cKO マウスを作製した。タモキシフェンを E9.5~E15.5 の間、母体マウスに連日腹腔注射したところ、胎仔の背側表皮で Tbx3 mRNA の発現が減少し、基底層と基底層上層の両方において Tbx3 陽性細胞の数が減少した(Fig. 2C-E)。これらの結果から、皮膚発生過程において、基底細胞と基底層上層細胞で Tbx3 が発現することが分かった。

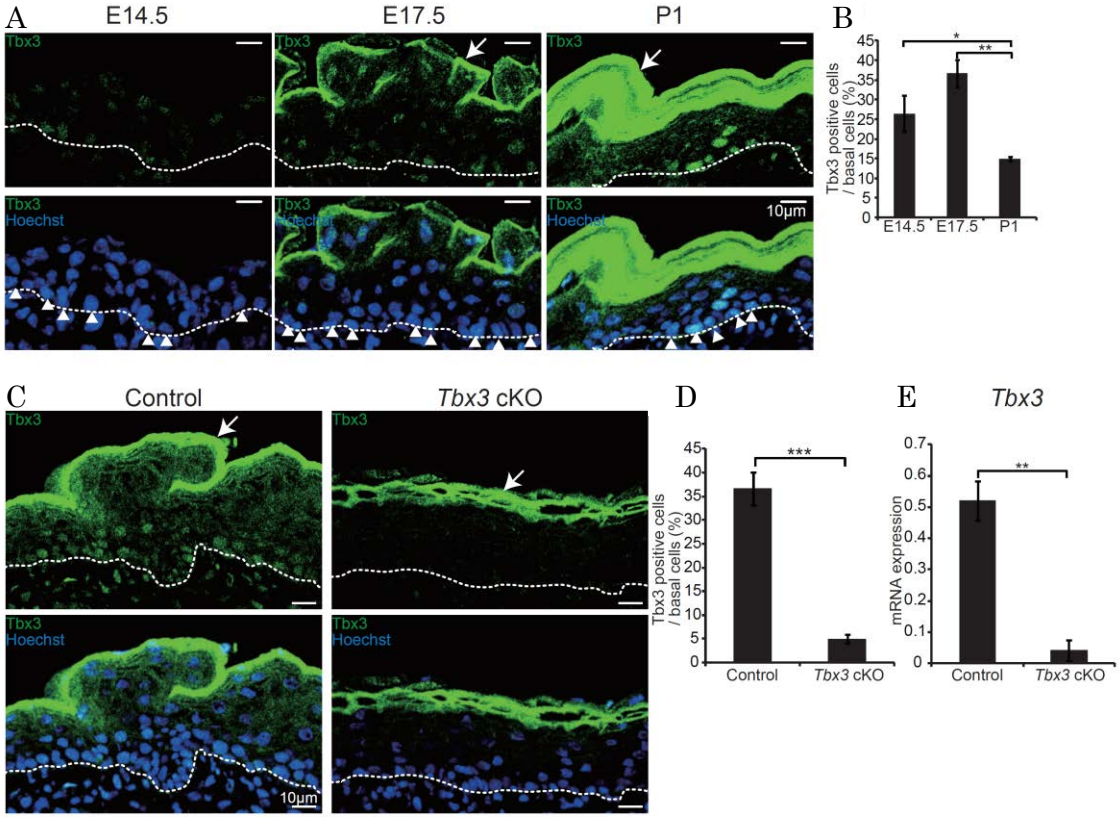


Fig. 2 マウス胎仔皮膚発生期に Tbx3 は表皮基底細胞で発現する

(**A**) E14.5、E17.5、P1 でのマウス胎仔背側皮膚の切片。Tbx3、Hoechst による染色。(**B**) 基底層における Tbx3 陽性細胞の定量化。(**C**)E17.5 Control (*Tbx3*$^{floxed/floxed}$; *WT*)と *Tbx3* cKO(*Tbx3*$^{floxed/floxed}$; *K14-CreERT*)マウス胎仔の背側皮膚の切片。Tbx3、Hoechst による染色。n=3、同腹子、n＞110 細胞／胎仔(**D**) 基底層における Tbx3 陽性細胞の定量化。± s.e.m.; n=3、非同腹子、n＞110 細胞／胎仔(**E**) E17.5 での背側表皮における *Tbx3* の qPCR による解析。± s.e.m.; n=3、非同腹子、*P<0.05、**P<0.01、Dunnett's multiple comparison test(**B**)、**P<0.01、***P<0.001、two-tailed t-test (**D**、**E**) 。白線は基底膜。矢印は 1 次抗体による非特異的シグナル。

**[Tbx3 は表皮の発生と皮膚バリア機能の獲得に必要である]**

Tbx3 cKO マウス胎仔は身体が小さく、背が丸くなる表現型を示した（Fig. 3A）。背側皮膚組織を H&E 染色したところ、Control マウス胎仔と比較し、*Tbx3* cKO 胎仔の皮膚は、多層構造は認められるものの、表皮が単層化し、その厚さも顕著に薄くなっていることが分かった（Fig. 3B、C）。*Tbx3* cKO マウスの皮膚バリア機能を評価するため、背側皮膚がバリア機能を獲得する E17.5 で、toluidine blue を用いて skin permeability assay を行った（Hardman *et al.* 1998）。その結果、Control の胎仔背側皮膚は toluidine blue を取り込まないのに対し、*Tbx3* cKO の胎仔背側皮膚は色素を取り込み、青く染まった（Fig. 3D）。これらの結果から、Tbx3 は表皮の発生と皮膚バリア機能の獲得に必要であることが明らかとなった。

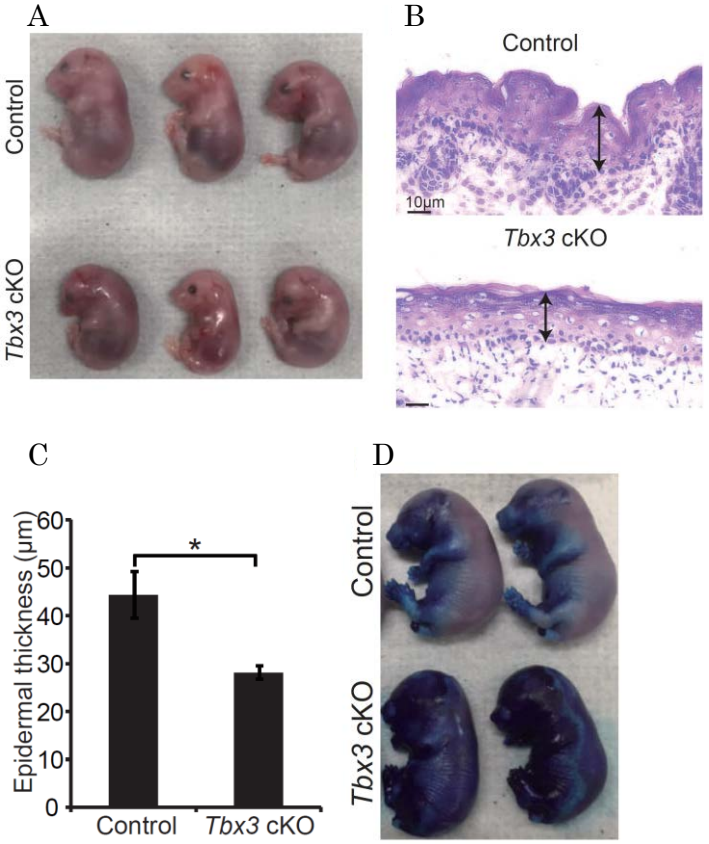


Fig. 3 Tbx3 は表皮の発生と皮膚バリアの獲得に必要である

(**A**) Control と *Tbx3* cKO の E17.5 胎仔。(**B**) E17.5 胎仔の背側を H&E 染色した染色像。(**C**) Control と *Tbx3* cKO の E17.5 胎仔の表皮の厚さ。± s.e.m. n=3、非同腹子、*P<0.05、two-tailed t-test (**D**) Toluidine blue staining による、E17.5 胎仔の skin permeability assay。

**[Tbx3 は皮膚発生過程において、有棘細胞の早期分化を防いでいる]**

表皮の発生における Tbx3 の役割を解明するため、未分化な基底細胞マーカーである keratin5（K5）と、有棘層の分化細胞マーカーである keratin10（K10）の発現パターンを検討した。Control の胎仔では、K5 は基底細胞と基底層上層の細胞の一部に発現していた（Fig. 4A）。しかし、*Tbx3* cKO の表皮では、K5 の発現が基底層 1 層に限定され、結果として、Control 胎仔よりも K5 陽性層の厚さが薄くなった（Fig. 4A、B）。*Tbx3* cKO の表皮は Control 胎仔と比較し、平らな形状となり、K10 陽性有棘層が薄くなる傾向が認められた（Fig. 4A、C）。この結果は、*Tbx3* cKO 表皮で有棘細胞の早期分化が起こっている可能性を示唆している。そこで、有棘層の最上層と顆粒層に発現する involucrin の発現パターンを E17.5 胎仔の表皮で観察したところ、顆粒層の厚さには変化がなかったが（Fig. 5A、B）、Control の表皮では K10 陽性層（有棘層）でみられる involucrin 陽性層は 1 層だけであるのに対し、*Tbx3* cKO の表皮では、2～3 層以上の K10 陽性層が involucrin 陽性であった（Fig. 5A）。さらに、定量 PCR（qPCR）解析によって、顆粒層・角質層マーカーである loricrin、involucrin、filaggrin の発現量が Control と比較して、*Tbx3* cKO 表皮で有意に増加していることが分かった（Fig. 5C）。これらの結果から、Tbx3 は有棘細胞から顆粒細胞への早期分化を抑制するのに必要であることが示唆された。

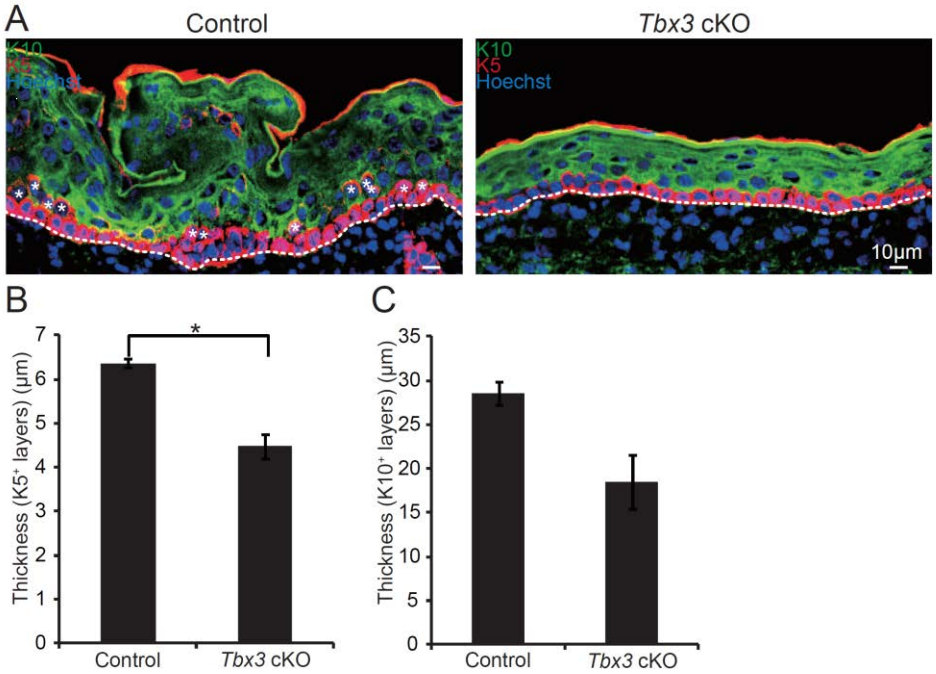


Fig. 4 *Tbx3* cKO の表皮では有棘層の厚さが薄くなる

(A) Control と *Tbx3* cKO の E17.5 マウス胎仔の背側皮膚切片。Keratin5、Keratin10、Hoechst による染色。(B) Control と *Tbx3* cKO の E17.5 マウス胎仔における表皮 Keratin5 層の厚さ。(C) Control と *Tbx3* cKO の E17.5 マウス胎仔における表皮 Keratin10 層の厚さ。± s.e.m. n=3、非同腹子、*P<0.05、two-tailed t-test（B、C）。白線は基底膜。*は基底層上層で K5 陽性細胞。

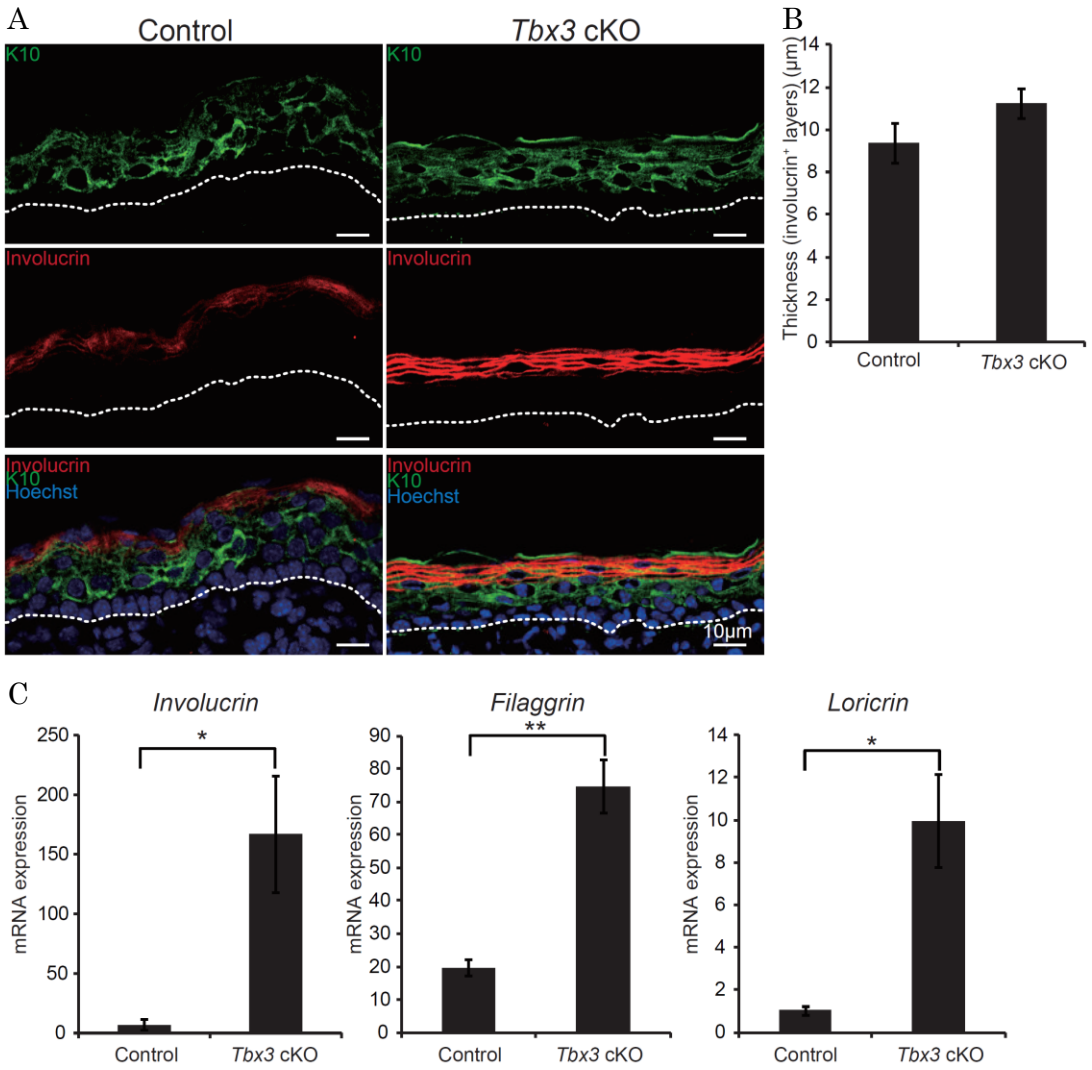


Fig. 5 *Tbx3* cKO の表皮では有棘細胞の早期分化が起こる

(**A**) Control と *Tbx3* cKO の E17.5 マウス胎仔の背側皮膚切片。Involucrin、Keratin10、Hoechst による染色。(**B**) Control と *Tbx3* cKO の E17.5 マウス胎仔における表皮 Involucrin 層の厚さ。(**C**) Control と *Tbx3* cKO の E17.5 マウス胎仔の背側表皮における *involucrin, filaggrin, loricrin* の発現量を qPCR により解析した。± s.e.m. n=3、非同腹子、*P<0.05、**P<0.01、two-tailed t-test（**B**、**C**）。

白線は基底膜。

**[Tbx3 は皮膚発生過程おいて、基底細胞の増殖と平行分裂を促進する]**

*Tbx3* cKO 胎仔では表皮が薄くなり、身体が小さくなるという表現型が観察された（Fig. 3）。これらの表現型は、有棘細胞の早期分化が原因であるとは考えにくく、表皮の拡大を促進する何らかのメカニズムが破綻している可能性が示唆された。そこでまず、基底細胞の増殖について検討を行った。増殖マーカーである Ki67 陽性の基底細胞の割合を測定したところ、Control 表皮に比べて、*Tbx3* cKO 表皮では有意に減少していることが分かった（Fig. 6A、B）。次に、基底細胞の分裂方向について調べた。表皮発生では、基底細胞は基底膜に対して平行か垂直に分裂し、それぞれ表皮の拡大と多層化に寄与する（Lechler *et al.* 2005）。基底細胞の分裂軸を決定するため、有糸分裂染色体マーカーである phospho-histone H3 で染色し、細胞分裂軸と基底膜表面の角度を測定した（Fig. 6C）。その結果、垂直分裂する細胞の割合は Control と *Tbx3* cKO 表皮で差は見られなかったが、平行に分裂する細胞の割合が *Tbx3* cKO 表皮で有意に減少した（Fig. 6D）。これは Tbx3 が基底細胞の平行分裂を促進していることを示している。以上の結果から、Tbx3 は、基底細胞の増殖能と平行分裂を促進することで、表皮の拡大に貢献することが示唆された。

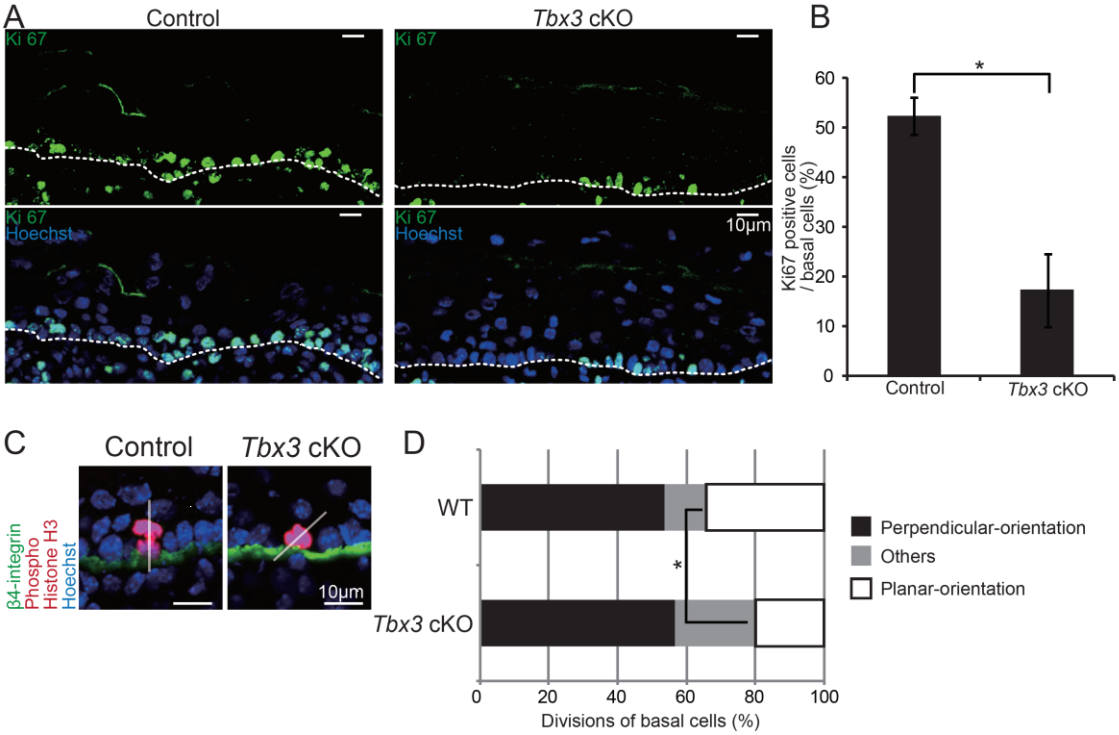


Fig. 6 Tbx3 は皮膚発生過程において基底細胞の増殖と平行分裂を促進する

**(A)** Control と *Tbx3* cKO の E17.5 マウス胎仔の背側皮膚切片。Ki67、Hoechst による染色。**(B)** 基底層での Ki67 陽性細胞の定量化。± s.e.m. n=3、非同腹子、n＞100 細胞／胎仔**(C)** Control と *Tbx3* cKO の E17.5 胎仔における有糸分裂細胞の染色像。β-4integrin、phospho-Histon H3、Hoechst による染色。白線は細胞分裂軸。**(D)** Control と *Tbx3* cKO の E17.5 マウス胎仔の表皮における分裂方向の割合。基底膜に対して垂直に分裂（90°±30°、黒色）、基底膜に対して平行に分裂（0°±30°、白色）、その他（灰色）。± s.e.m. n=3、非同腹子、n=10-17 細胞／胎仔、*P<0.05、two-tailed t-test (**B**、**D**)。

**[Tbx3 は皮膚発生過程において、Hes1 の発現に必要である]**

Notch シグナルは表皮の発生に重要である（Fuchs and Raghavan 2002; Okuyama *et al.* 2008; Massi and Panelos 2012; Nowell and Radtke 2013）。また、Notch シグナルのターゲット遺伝子である Hes1 は、未分化な基底細胞から分化細胞への細胞運命決定と、有棘細胞の維持に必要であることが報告されている（Blanpain *et al.* 2006; Moriyama et al. 2008）。有棘層の早期分化を伴う表皮の薄化と基底細胞の増殖能の低下という *Tbx3* cKO 皮膚の表現型は、以前報告された *Hes1* cKO 胎仔表皮の表現型と類似している（Moriyama et al. 2008）。そこで、Tbx3 と Hes1 の関連について検討した。先行研究と同様に（Blanpain *et al.* 2006; Moriyama *et al.* 2008）、Hes1 タンパク質は E17.5 の有棘層で主に発現しており、一部の基底細胞でも発現が認められた（Fig. 7A）。この時、有棘層の Hes1 陽性細胞の大多数が、Tbx3 を発現していた（Fig. 7C、61±2%、±s.e.m. n=100 細胞／マウス、3 匹）。さらに、*Tbx3* cKO 表皮では、Hes1 陽性細胞数が有意に減少していた（Fig. 7A-C）。これらの結果から、Tbx3 が Hes1 の発現に必要であることが分かった。

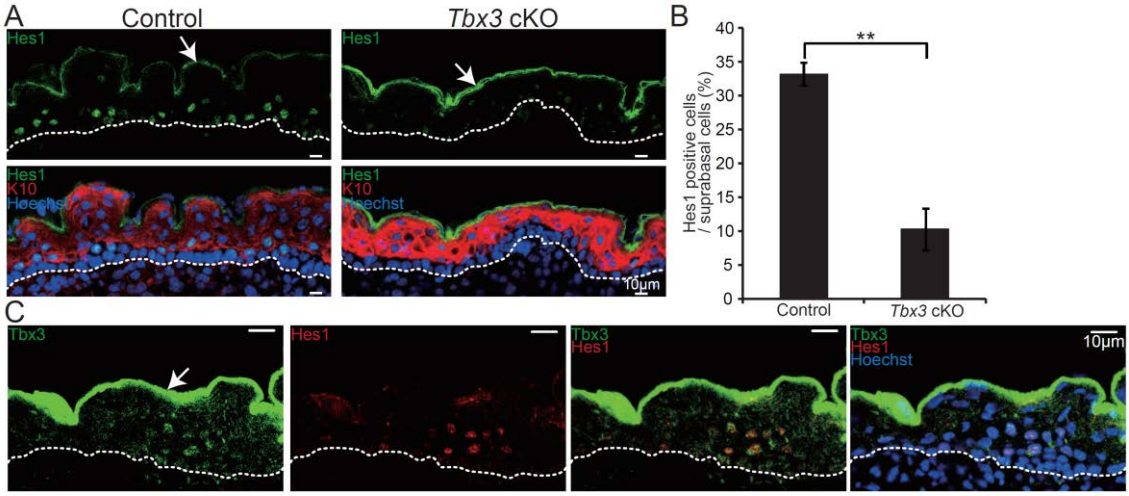


Fig. 7 Tbx3 は Hes1 の発現に必要である

(A) Control と *Tbx3* cKO の E17.5 マウス胎仔の背側皮膚切片。Hes1、Keratin10、Hoechst による染色。(B)有棘層での Hes1 陽性細胞の定量化。± s.e.m. n=3、非同腹子、n＞100 細胞／胎仔、*P<0.05、two-tailed t-test 。(C) E17.5 マウス胎仔の背側皮膚切片。Tbx3、Hes1、Hoechst による染色。 矢印は 1 次抗体による非特異的シグナル。

# 第四章

# 考察

本研究で私は、Tbx3 が表皮発生で重要であることを明らかにした。*Tbx3* cKO 表皮で見られる「表皮の薄化」「有棘細胞の早期分化」「基底細胞の増殖能低下」などの表現型は、以前報告された *Hes1* KO 表皮の表現型と類似している(Moriyama *et al.*, 2008)。Tbx3 cKO 表皮では Hes1 の発現が減少していたことから (Fig. 7)、Tbx3 cKO 表皮の異常は Hes1 の発現低下が原因であると思われる。Hes1 は、主に有棘層細胞で発現が認められ、有棘層の Hes1 陽性細胞は多くが Tbx3 を発現していた(Fig. 7)。この結果は、Hes1 が有棘細胞の維持に重要な役割を果たすこと、また有棘層からのシグナルを通して間接的に基底細胞の増殖を促進するという先行研究の結果と合致する (Moriyama *et al.* 2008)。従って、皮膚発生過程における Tbx3 の主な役割は、有棘細胞での Hes1 の発現誘導なのかもしれない。しかし、Tbx3 は抑制性の転写因子として機能するため、Hes1 の発現を直接促進するとは考えにくい。恐らく、Tbx3 は Hes1 制御因子を介して間接的に Hes1 の発現を促進すると思われる。本研究では、Hes1 の発現を制御する Tbx3 のターゲット遺伝子は同定できなかった。しかし、以前報告された Tbx3 ChIP-seq データによると、マウス胚性幹細胞(ES 細胞)において、Tbx3 は transducin-like enhancer of split 3 (TLE3) のゲノム領域に結合することが分かっている (Han *et al.* 2010)。TLE3 は Hes1 に直接相互作用する転写コレプレッサーであり (Cuevas *et al.* 2005)、このファミリーの因子は胚発生において、Notch シグナル経路を制御することが報告されている (Kageyama *et al.* 2007)。従って、Tbx3 は TLE3 を介して Hes1 の発現を促進している可能性がある。

本研究で私は、Tbx3 が基底細胞の細胞分裂軸を制御することを示した(Fig. 6)。興味深いことに、Tbx3 は基底細胞の垂直分裂には関与せず、平行分裂に必要であることが分かった。皮膚発生過程においては、基底細胞の垂直分裂が表皮の多層化に重要であることが示されており、分子機構について多くの報告がなされている。特に、進化的に保存された分裂軸制御因子である LGN/NuMA が基底細胞の頂上側に局在し、Gαと

Inscuteable と共に垂直分裂を規定していることが知られている（Lechler and Fuchs, 2005; Williams *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2014)。また、基底細胞の垂直分裂が有棘層での Notch 依存的なケラチノサイトの分化の開始に必要であることが報告されている(Williams *et al.*, 2011)。しかし、LGN や NuMA を基底細胞でノックダウンすると、垂直分裂が無くなり、ほとんどの細胞が平行分裂をする(Williams et al., 2011)。この表現型は、Tbx3 cKO 基底細胞の表現型とは明らかに異なり、また Tbx3 cKO 基底細胞では垂直分裂の割合には変化が見られなかった。従って、Tbx3 cKO 基底細胞でみられる分裂軸の異常は、LGN/NuMA 経路とは関係しないと考えられる。LGN/NuMA 経路以外で基底細胞の分裂軸を制御する因子として、インテグリン、α-catenin、転写因子 Srf (serum response facto)、PDK1 などが報告されている(Lechler and Fuchs, 2005; Luxenburg *et al.*, 2011; Dainichi *et al.*, 2016)。基底細胞の分裂軸制御において、これらの因子と Tbx3 の相関を検証する必要がある。

Tbx3 は、発生過程における様々な臓器の形態形成に重要な役割を果たしている。また最近、Tbx3 は成体の組織幹細胞の維持にも必須であることが報告された(Wang *et al.*, 2015)。Tbx3 は、幹細胞から前駆細胞への細胞運命決定や増殖に必須のマスター制御因子なのかもしれない。今後、Tbx3 の制御メカニズムの解明が幹細胞研究の重要課題であり、その再生医療への応用が期待される。

## 参考文献

Artavanis-Tsakonas. S., Rand. M. D. & Lake. R. J. (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284,** 770-776.

Baek, J. H., Hatakeyama, J., Sakamoto, S., Ohtsuka, T. & Kageyama, R. (2006) Persistent and high levels of Hes1 expression regulate boundary formation in the developing central nervous system. *Development* **133**, 2467-2476.

Bamshad, M., Lin, R. C., Law, D. J. *et al.* (1997) Mutations in human TBX3 alter limb, apocrine and genital development in ulnar-mammary syndrome. *Nat Genet.* **16,** 311-315.

Blanpain, C. & Fuchs, E. (2009) Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **10,** 207-217.

Blanpain, C., Lowry, W. E., Pasolli, H. A. & Fuchs, E. (2006) Canonical notch signaling 14 functions as a commitment switch in the epidermal lineage. *Genes Dev.* **20,** 3022-3035.

Byrne, C., Tainsky, M. & Fuchs E. (1994) Programming gene expression in developing epidermis. *Development* **120,** 2369-2383.

Cuevas, I. C., Slocum, A. L., Jun, P., Costello, J. F., Bollen, A. W., Riggins, G. J., McDermott, M. W. & Lal, A. (2005) Meningioma transcript profiles reveal deregulated Notch signaling pathway. *Cancer. Res.* **65,** 5070-5075.

Dainichi, T., Hayden, M. S., Park, S. G. et al. (2016) PDK1 Is a Regulator of Epidermal Differentiation that Activates and Organizes Asymmetric Cell Division. *Cell Rep.* **15,** 1615-1623

Dan, J., Li, M., Yang, J., Li, J., Okuka, M., Ye, X. & Liu, L. (2013) Roles for Tbx3 in regulation of two-cell state and telomere elongation in mouse ES cells. *Sci Rep.* **3,** 3492.

Davenport, T. G., Jerome-Majewska, L. A. & Papaioannou, V. E. (2003) Mammary gland, limb and yolk sac defects in mice lacking Tbx3, the gene mutated in human ulnar mammary syndrome. *Development* **130,** 2263-2273.

Frank, D. U., Carter, K. L., Thomas, K. R., Burr, R. M., Bakker, M. L., Coetzee, W. A., Tristani-Firouzi, M., Bamshad, M. J., Christoffels, V. M. & Moon, A. M. (2012) Lethal arrhythmias in Tbx3-deficient mice reveal extreme dosage sensitivity of cardiac conduction system function and homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109,** 154-163.15

Fuchs, E. and Raghavan, S. (2002) Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 199-209.

Han, J., Yuan, P., Yang, H. *et al.* (2010) Tbx3 improves the germ-line competency of induced pluripotent stem cells. *Nature* **463,** 1096-1100.

Hardman, M. J., Sisi, P., Banbury, D. N. & Byrne, C. (1998) Patterned acquisition of skin barrier function during development. *Development* **125,** 1541-1552.

Iso. T., Kedes. L. & Hamamori. Y. (2003) HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J. Cell. Physiol.* **194,**237-255.

Kageyama, R., Ohtsuka, T. & Kobayashi, T. (2007) The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development* **134,** 1243-1251.

Kalinin, A., Marekov, L. N. & Steinert, P. M. (2001) Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *J Cell Sci.* **114,** 3069-3070.

Koster, M. I., Dai, D., Marinari, B., *et al.* (2007) p63 induces key target genes required for epidermal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104,** 3255-3260.

Lai. E. C. (2004) Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* **131**, 965-973.

Lechler, T. & Fuchs, E. (2005) Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* **437,** 275-280.

Lu, R., Yang, A. & Jin, Y. (2011) Dual functions of T-box 3 (Tbx3) in the control of self-renewal and extraembryonic endoderm differentiation in mouse embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* **286,** 8425-8436.

Lüdtke, T. H., Christoffels, V. M., Petry, M. & Kispert, A. (2009) Tbx3 promotes liver bud expansion during mouse development by suppression of cholangiocyte differentiation. *Hepatology* **49**, 969-978.16

Luxenburg, C., Pasolli, H. A., Williams, S. E. & Fuchs E. (2011) Developmental roles for Srf, cortical cytoskeleton and cell shape in epidermal spindle orientation. *Nat .Cell. Biol.* **13,** 203-214

Massi, D., and Panelos, J. (2012) Notch signaling and the developing skin epidermis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **727**, 131-141.

Moriyama, M., Durham, A. D., Moriyama, H., Hasegawa, K., Nishikawa, S., Radtke, F. & Osawa, M. (2008) Multiple roles of Notch signaling in the regulation of epidermal development. *Dev Cell.***14,** 594-604.

Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D. & Adachi, K. (2009) A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* **460,** 118-122.

Nowell, C. and Radtke, F. (2013) Cutaneous Notch signaling in health and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**, 12.

Okuyama, R., Tagami, H., and Aiba, S. (2008) Notch signaling: its role in epidermal homeostasis and in the pathogenesis of skin diseases. *J. Dermatol. Sci.* **49**, 187-194.

Pan. Y., Lin. M. H., Tian. X., Cheng. H. T., Gridley. T., Shen. J. & Kopan R. (2004) γ-secretase functions through Notch signaling to maintain skin appendages but is not required for their patterning or initial morphogenesis. *Dev. Cell.* **7**, 731-743.

Powell. B. C., Passmore. E. A., Nesci. A. & Dunn. S. M. (1998) The Notch signalling pathway in hair growth. *Mech. Dev.* **78,**189-192.

Rangarajan. A., Talora. C., Okuyama. R. *et al.*(2001) Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO. J.* **20,** 3427-3436.

Richardson, R. J., Hammond, N. L., Coulombe,. P. A, *et .al.* (2014) Periderm prevents pathological epithelial adhesions during embryogenesis. *J Clin Invest.* **124,** 3891-3900.

Sandilands, A., Sutherland, C., Irvine, A. D. & McLean, W. H. (2009) Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci.* **122,** 1285-1294

Sotiropoulou, P. A. & Blanpain, C. (2012) Development and homeostasis of the skin epidermis. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* **4,** a008383.

Suzuki, A., Sekiya, S., Büscher, D., Izpisúa, Belmonte, J. C. & Taniguchi, H. (2008) *Development* **135,** 1589-1595.

Waghray, A., Saiz, N., Jayaprakash, A. D. *et al.* (2015) Tbx3 Controls Dppa3 Levels and Exit from Pluripotency toward Mesoderm. *Stem Cell Reports* **5,** 97-110.17

Wang, B., Zhao, L., Fish, M., Logan, C. Y. & Nusse, R. (2015) Self-renewing diploid Axin2$^{+}$ cells fuel homeostatic renewal of the liver. *Nature* **524,** 180-185.

Weidgang, C. E., Russell, R., Tata, P. R. *et al.* (2013) TBX3 Directs Cell-Fate Decision toward Mesendoderm. *Stem Cell Reports* **1,** 248-265.

Williams, S.E., Beronja, S., Pasolli, H. A. & Fuchs E. (2011) Asymmetric cell divisions promote Notch-dependent epidermal differentiation. *Nature* **470,** 353-358.

Williams, S. E., Ratliff, L. A., Postiglione, M. P., Knoblich, J. A. & Fuchs E (2014) Par3-mInsc and Gαi3 cooperate to promote oriented epidermal cell divisions through LGN. *Nat. Cell. Biol.* **16,** 758-769.

Zhang, X., Guo, J. P., Chi, Y. L., Liu, Y. C., Zhang, C. S., Yang, X. Q., Lin, H. Y., Jiang, E. P., Xiong, S. H., Zhang, Z. Y., Liu, B. H. (2012) Endothelin-induced differentiation of Nkx2.5$^{+}$ cardiac progenitor cells into pacemaking cells. *Mol. Cell Biochem.* **366**, 309-318.

## 謝辞

本研究を行うにあたり、豊島文子教授には細胞の取扱い、蛍光免疫染色像の観察、また研究の心得まで幅広いご指導を賜りましたこと心より感謝申し上げます。

また、松村繁助教、小田裕香子助教には研究を進める上で多くの助言を賜りましたこと感謝申し上げます。

最後に、細胞増殖統御学分野研究室構成員の皆様には、適切なご指導賜りましたこと深く感謝申し上げます。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Ryo Ichijo, Yui Iizuka, Hirokazu Kubo, and Fumiko Toyoshima

Essential roles of Tbx3 in embryonic skin development during epidermal stratification

Genes to Cells　in press 2017

2017 年 1 月 6 日

一條　遼