

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 21 日現在

機関番号：24402

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06551

研究課題名(和文) 原発性瘢痕性脱毛症における上皮間葉転換の関与の解析

研究課題名(英文) Epithelial-mesenchymal transition in human hair follicle epithelial stem cells of primary cicatricial alopecia.

研究代表者

今西 久幹 (Imanishi, Hisayoshi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・登録医

研究者番号：10571276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：毛孔性扁平苔癬(LPP)を含む原発性瘢痕性脱毛症は疼痛、炎症、浸出液、感染を伴う永久脱毛になる疾患であるため、QOLは著しく低下するが、発症メカニズムは明らかではなく、治療も症状緩和と増悪を止めることに留まっている。我々はLPP患者の毛包上皮幹細胞において上皮間葉転換が生じていることを示し、これがLPPの発症機序の一つであることを証明した。また毛器官培養で、毛包上皮幹細胞に上皮間葉転換マーカーの特徴的変化を発現させることができた。このモデルにPPAR gamma作動薬を投与することで上皮間葉転換マーカーの変化を阻止し、PPAR gamma作動薬がLPPの新規治療薬になりうることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Primary cicatricial alopecias (PCA) including lichen planopilaris (LPP), which is one of the most frequently encountered PCA, is clinically important inflammatory alopecias that result in skin scarring and permanent hair loss. However, the mechanism is unclear and the goals of primary cicatricial alopecias treatment are currently limited to relieve symptoms and to control or block further spread of lesions. We showed that EMT occurs within the epithelial stem cells of human scalp hair follicles in LPP. We also showed that a molecular EMT signature can be experimentally induced in healthy human epithelial stem cells of hair follicles in situ by cocktail of agents which are antagonizing E-cadherin, and moreover induction of EMT can be prevented ex vivo by PPAR gamma agonists.

研究分野：形成外科学

キーワード：原発性瘢痕性脱毛症 毛孔性扁平苔癬 上皮間葉転換 線維化 毛包上皮幹細胞

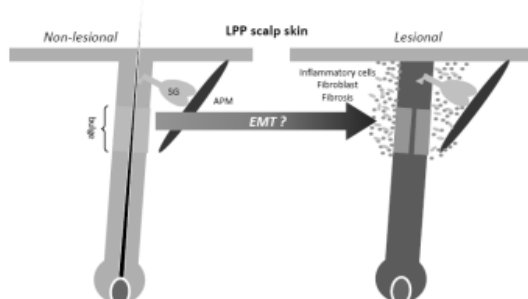
1. 研究開始当初の背景

原発性癬痕性脱毛(PCA)は炎症性脱毛症であり、癬痕化と永久脱毛を特徴とする。疼痛、炎症、浸出液、感染を伴い、心理面、生活の質(QOL)などにも大きな影響を及ぼす。PCAは幾つかの疾患に分類され、中でも毛孔性扁平苔癬(LPP)は、PCAの中では高頻度に認められる。

LPPの発症機序として、PPAR γ 関連シグナルの欠如や毛包上皮幹細胞での免疫寛容の破綻が示唆されている。しかし線維化についてのメカニズムは不明である。事実、マウスでK15陽性バルジ毛包上皮幹細胞を選択的に除去すると、癬痕を伴わない脱毛を呈する。これは線維化については他のメカニズムが働いていることを示唆している。

線維化に関与するメカニズムの一つに、上皮間葉転換(EMT)がある。EMTは、上皮細胞が極性や細胞間接着を喪失し間葉系細胞の形質を獲得するプロセスである。EMTは発生段階における組織構築(type I)、癌における浸潤・転移(type II)、そして線維化(type III)に関与している。EMTにおいて、上皮系マーカーは減弱し、間葉系マーカー及びEMT関連転写因子は発現が強まる。Snai1, Snai2, Twistなどのtranscriptional factorは、EカドヘリンのE-boxに結合することでEカドヘリンの発現を抑制しEMTを誘導する。これまでに肝臓・腎臓の線維化、強皮症、ケロイドなどでEMTの関連が示唆されている。

PCAにおけるEMTの関係性はこれまで不明であるが、LPPの亜型であるpostmenopausal frontal fibrosing alopecia(FFA)の1例で、線維化した真皮内でのSnai1の発現を示す報告がある(Nakamura M et al. Br J Dermatol 2010)。また、以前我々はLPP患者の病変部と非病変部のバルジ領域の毛包上皮幹細胞から、レーザーマイクロダイセクションの技術を用いてRNAを抽出した(Harries MJ et al. J Pathol. 2013)が、これを用いてマイクロアレイを施行し、EMTマーカーについて解析したところ、Fibronectin, α SMA, CD44, SNAI2(Slug), ZEB1の発現上昇を認めた。これらの結果はLPPの発症メカニズムにEMTが関与していることを示唆しているが、詳細な検討はなされていない。(図1)



2. 研究の目的

PCAの代表的疾患であるLPP患者の検体を使用し、毛包上皮幹細胞での上皮間葉転換の発現を調べる。また、毛器官培養において毛包上皮幹細胞のEMT導入モデルを確立することで、PCAに効果がある薬剤を検索することを目標とする。

3. 研究の方法

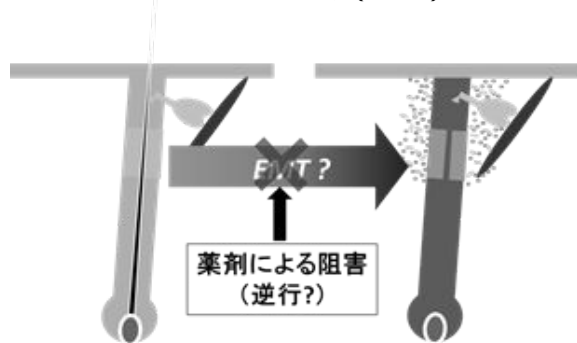
(1) LPP病変部の毛包上皮幹細胞からマイクロダイセクションで得られた検体を用いて、EMTマーカーについてqRT-PCRを行う(RNAレベルの解析)。

(2) LPP病変部の生検検体を使用して、EMTマーカーについてimmunohistomorphometryを行う(タンパク質レベルの解析)。

(3) 透過型電子顕微鏡を用いてLPP病変部の生検検体を観察し、上皮間葉転換の形態学的特徴の発現の有無を確認する。

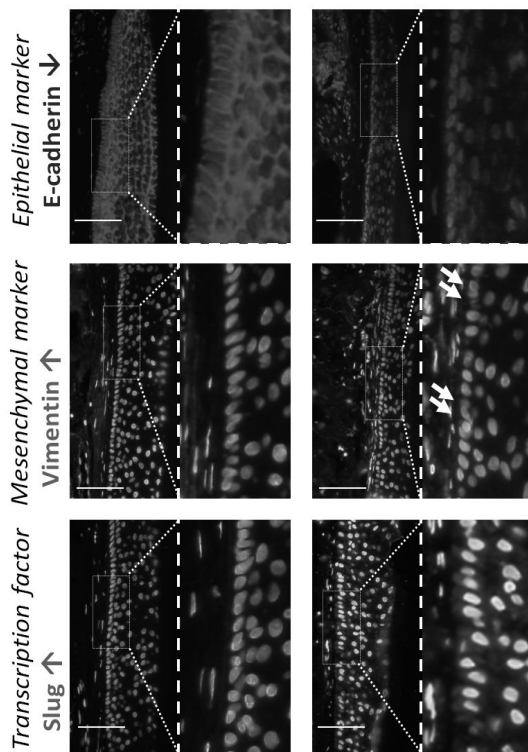
(4) これまでに細胞培養でEMTを導入する報告がある薬剤をヒト毛器官培養に添加することで、毛包上皮幹細胞にEMTを導入する。これにより毛器官培養におけるEMT導入モデルを確立する。

(5) EMTを阻害し得る薬剤をこのモデルに投与することで、毛器官においてEMTを阻害できる薬剤を検討する。(図2)



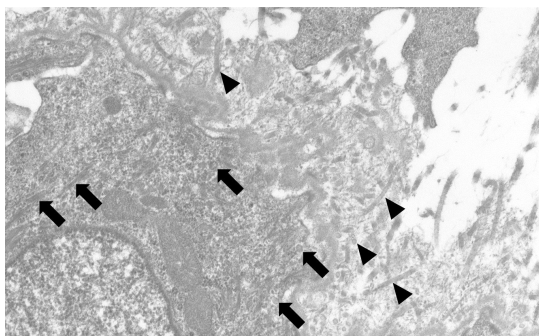
4. 研究成果

(1)(2) LPP患者の検体を用いてimmunohistomorphometryおよびqRT-PCRを施行した。Immunohistomorphometryでは、上皮系マーカーであるEカドヘリンの低下、間葉系マーカーであるvimentin, fibronectinの発現上昇、また転写因子であるSNAIL, SLUGの発現上昇を認めた。TWIST1も発現上昇の傾向を認めた。

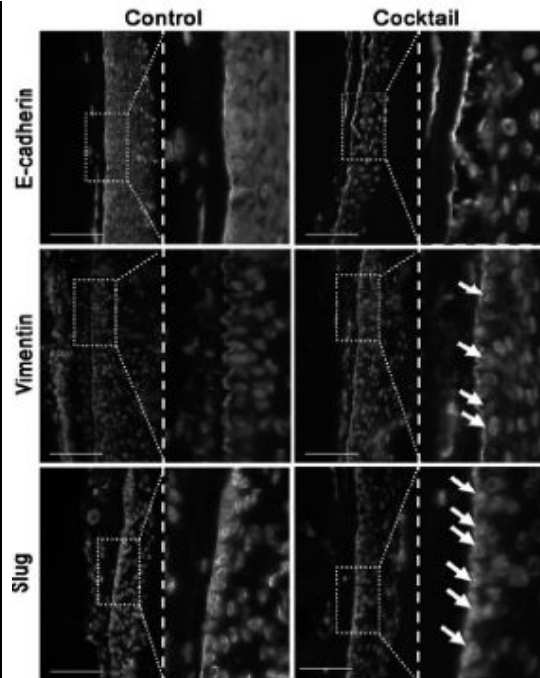


また、qRT-PCR では LPP 患者検体で TWIST1、ZEB2、FN1、ACTA2 (α -smooth muscle actin)、EMP1 などの EMT 関連マーカーの発現を認めた。タンパク質レベル及び転写レベルで毛包上皮幹細胞での上皮間葉転換の発現を確認し、同疾患の発症メカニズムに毛包上皮幹細胞の EMT が関与していることを示した。

(3) LPP 患者検体において毛包上皮幹細胞を電子顕微鏡で観察し、線維芽細胞様の細胞への変化や膠原線維の産生を認めた。これにより、超微細構造でも EMT の関与が示唆された。



(4) これまで毛器官培養での癬痕性脱毛症の実験モデルは確立されていなかった。我々は正常ヒト頭皮の検体を用いた毛器官培養で、毛包上皮幹細胞に EMT を導入することで、原発性癬痕性脱毛症の ex vivo モデル確立を試みた。TGF β 1、EGF を含む 4 種類の薬剤を投与することで、ヒト毛器官培養での毛包上皮幹細胞に EMT を導入することに成功した。



(5) 過去の報告で、糖尿病治療薬である PPAR γ 作動薬は、培養細胞レベルで EMT 抑制効果が見出されている。更に臨床的にも、糖尿病を合併している原発性癬痕性脱毛症患者に PPAR γ 作動薬が投与されたところ、同疾患が改善された報告がある。我々が確立したヒト毛器官培養で毛包上皮幹細胞に EMT を導入した実験系に、PPAR γ 作動薬を投与したところ、培養毛器官の毛包上皮幹細胞での EMT の発現を抑制することができた。これにより、EMT 発現抑制の観点からも、PPAR γ アゴニストが新たな原発性癬痕性脱毛症の治療法になる可能性を見出すことが出来た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Imanishi H, Ansell DM, Chéret J, Harries M, Bertolini M, Sepp N, Bíró T, Poblet E, Ward CM, Paus R. J Invest Dermatol. (in revision)

[学会発表](計 1 件)

Human hair follicle epithelial stem cells undergo epithelial-mesenchymal transition (EMT) in primary cicatricial alopecia: Lessons from lichen planopilaris. Imanishi H, Ansell DM, Harries M, Sepp N, Bíró T, Tsuruta D, Ward CM, Paus R. Society for Investigative Dermatology 2015 Annual Meeting.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今西久幹 (IMANISHI Hisayoshi)
大阪市立大学大学院医学研究科・講師
研究者番号：10571216

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
鶴田大輔 (TSURUTA Daisuke)
大阪市立大学大学院医学研究科・教授
研究者番号： 90382043

Ralf Paus
Centre for Dermatology Research,
University of Manchester, Professor