

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07980

研究課題名(和文) Runxファミリーによる毛包形成の分子基盤確立

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of hair follicle formation by Runx family proteins

研究代表者

藤田 隆司 (Fujita, Takashi)

立命館大学・薬学部・准教授

研究者番号：30319793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Shhは、毛法形成に極めて重要な形態形成因子である。初期毛包形成(early anagen)におけるShhシグナルの上流の機序は明らかではなかった。Tnfrsf19の発現パターン解析、遺伝子改変細胞のパッチ法による移植試験から、Tnfrsf19シグナルはShhシグナルの上流ではたらく、表皮ケラチノサイトに発現することがわかった。また、培養ケラチノサイトにおけるTnfrsf19の発現亢進する条件を見出した。これらの成績は、初期毛包形成期におけるTnfrsf19-Shh経路の新しい機序を提供する。

研究成果の概要(英文)：Shh is a morphogenetic factor that is extremely important for hair formation. The mechanism upstream of Shh signal in early anagen was not clear. Expression pattern analysis of Tnfrsf 19 and transplantation test by patch method of genetically modified cells showed that the Tnfrsf 19 signal functions upstream of the Shh signal and is expressed in epidermal keratinocytes. We also found conditions under which Tnfrsf 19 expression is enhanced in cultured keratinocytes. These results provide a novel mechanism of the Tnfrsf 19-Shh pathway in the early stage of hair follicle formation.

研究分野：薬理学

キーワード：毛包 Tnfrsf19 Shh ケラチノサイト 毛乳頭細胞 Runxファミリー

1. 研究開始当初の背景

これまでの『毛』を再生しようとする研究は、遺伝子改変動物の表現型から情報が集められてきた。遺伝子機能と発毛メカニズムの一部が明らかにされてきた一方で、未だにヒトの脱毛症や薄毛に酷似するモデルは存在しない。

表皮や毛包のような、生後、自己修復能を持った上皮系の幹細胞は正常時においては組織の代謝の中で生育し、創傷後のような環境におかれると、治癒を行う機能を持ち合わせた「リザーバー細胞」として存在する。成体における毛髪は、幹細胞から再生可能で、未分化の状態を保った「毛」に分化能を有した細胞は、薬剤標的となりうる。ヒトの細胞は、幹細胞から生まれ、老化は幹細胞の機能が低下することによることがわかってきた。皮膚では上皮性幹細胞と間葉系幹細胞が相互作用し、組織としての毛包が形成される。よって、上皮・間葉幹細胞のいずれにも発現を認められた Runx ファミリーの機能を、そのシグナル軸を明らかにすることで、幹細胞制御のメカニズムが明らかとなり、幹細胞を標的とする薬剤開発も可能となる。

2. 研究の目的

転写因子 Runx ファミリー (Runx1、Runx2、Runx3、および共役因子 Cbfb) の、発毛イベントにおける役割を解明するために、マイクロアレイ解析から同定した Runx ファミリー

標的遺伝子のシグナル軸を多角的に解析することを目的とした。具体的には、1. 皮膚の老化モデルを作成し、ヘッジホッグシグナルとのクロストークについて調べること、また、2. ヘアレスマウスへのパッチ法による発毛を促す試験系から、Runx ファミリーの標的遺伝子プロモーターについて、生体で機能する領域を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 皮膚新陳代謝低下モデル

毛乳頭細胞 (DPCs)

DPCs は 8 週齢メスの C57BL/6N マウスの髭から実体顕微鏡下で単離し、培養は抗生物質溶液 (64 μ g/ml penicillin G (NACALAI TESQUE, INC., Kyoto, Japan)、100 μ g/ml streptomycin (NACALAI TESQUE, INC.)) を含む Papilla Cell Growth Medium (TOYOBO CO., LTD., Osaka, Japan) を用いて行った。

CML は既報の手順に則り調製した。0.4mmol グリオキシル酸、1.2mmol シアノ水素化ホウ素ナトリウム、400 mg ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) をそれぞれ 8 ml の pH7.4 のリン酸緩衝液に溶かし、37 で 24 時間インキュベートした。PD-10 カラム (GE Healthcare Ltd., Osaka, Japan) をスタンドに固定し、pH7.4 リン酸緩衝液を 2ml 流してカラムを共洗いした後、2.5ml の CML をカラムに通した。カラム精製した試料を、ナノドロップ 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.,

Ltd. Tokyo, Japan) にて OD280 の吸光度測定により、フラクションを精製した。さらに Slide-A-Lyzer 10,000 MWC0 (Thermo Fisher Scientific Inc., Ltd) を使用して透析により CML を精製した。

皮膚創傷試験は、DPCs (Passage 4) をコンフルエントまで培養し、イエローチップでスクラッチングを行った。BSA ないしは CML を細胞に暴露し、24 時間後の wound healing 活性を測定した。

CML 皮内投与モデル

8 週齢、雌の C57BL6 マウスの背中の毛をセメダインバスコーク N (セメダイン株式会社, Tokyo, Japan) を適量塗布し、24 時間経過させ乾燥後に強制抜毛を行った。抜毛部位に 27G \times 1/2'' 注射針 (NIPRO, Osaka, Japan) を用いて、コントロールとして 1 mg/ml BSA 200 μ l、対照試験として 1 mg/ml CML 200 μ l を皮内に 10 か所程度注射し、注射箇所へのマーキングのために墨汁を同時に注射した。2 日後にマウスを安楽死させ、背部皮膚を摘出し試料とした。試料を 10% 中性ホルマリン液 (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) で組織固定を 24 時間行い、パラフィン包埋を行った。5 μ m の薄切によりパラフィン切片を得た。パラフィンは組織観察のためにヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色を行い、封入剤として Softmount (Wako Pure Chemical Industries Ltd.) を用いた。

蛍光組織化学的解析 (F-IHC)

連続するパラフィン切片の蛍光免疫染色のために 1 次抗体に anti-KLF4 antibody、anti-Oct4 antibody、anti-SSEA1 antibody、anti-CD31 antibody、anti-Sonic Hedgehog antibody、anti-Gli-1 antibody、anti-Carboxymethyl Lysine antibody、anti-CD11b antibody (Abcam CO., LTD.)、anti-LGR5 Antibody (Abgent, Inc., San Diego, CA)、anti-Fc α RI A antibody (Abxexa Ltd., Cambridge, UK)、Anti-Runx1、anti-Runx2、anti-Runx3 (長崎大学; 伊藤公正博士より提供)、anti-TNFRSF19/TROY antibody (LifeSpan BioScience, Inc., Seattle, WA)、2 次抗体に Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG、Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit IgG (Life Technologies Japan, Tokyo, Japan) を用い、封入剤として Fluore-KEEPER Antifade Reagent, Non-Hardening Type with DAPI (NACALAI TESQUE INC.) を用いた。HE 染色画像は実体顕微鏡 LEICA MZ10 F/DFC7000 T system (Leica microsystems, Tokyo, Japan) により、蛍光免疫組織化学的解析は蛍光顕微鏡 EVOS fl (Life Technology, Tokyo, Japan) により取得した。蛍光免疫染色により得られた切片を DAPI 染色したのち、取得画像を Image J software により 2 値化して、毛球部の核の凝集を相対比として示した。

低用量 Streptozotisin (STZ) による糖尿病モデル

75mg/kg STZ を 8 週齢 BL6 オスに腹腔内投与し、8 週間飼育した。その後、D; で示した強制抜毛を行った。

(2) DPCs・表皮細胞移植によるパッチ法

常法により、DPCs を 10 万細胞をスフェロイドプレートにより培養後、胎生 17.5 日齢より表皮細胞を採取、スフェロイドと混合して、ヘアレスマウス背部に移植した。

DPCs は、レトロウイルスを用いて、GFP、DN-Runx、もしくはスクランブル-shRNA、Cbfb-shRNA を安定強発現させ、同様に試験した。

RNA 抽出と qPCR: Total RNA は Sepasol®-RNA I Super G (NACAL TESQUE INC.) を用いて検出した。cDNA は Total RNA 1µg を ReverTraAce® cDNA synthesis kit (TOYOBO, Osaka, Japan) で逆転写した。定量的 real-time PCR は、KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) (Nippon Genetics Co. Ltd., Tokyo, Japan) 5µl と cDNA、0.5µM プライマーを混合した後、Piko Real PCR system (Thermo Fisher Scientific Inc.) で解析した。実験結果は、5 つの異なる濃度の cDNA 希釈列から得た検量線から定量を行った。PCR 産物はハウスキーピング遺伝子である Gapdh を内標準とし、既知サンプル間の測定値から得た Cq を指標に検量線を作成し、相対値で比較した。プライマーは以下のものを使用した。

Gapdh-F 5' -TGCACCACTGCTTAG-3'
Gapdh-R 5' -GGATGCGGGATGATGTTTC-3'
Shh -F 5' -GGAAAACACGGGAGCAGACC-3'
Shh-R 5' -CCACGGAGTTCTCTGCTTTC-3'
Gli-1-F 5' -GCTGTCCGAAGTCTATT-3'
Gli-1-R 5' -ACTGGCATTGCTAAAGG-3'
Gli-2-F 5' -CTGACCCGCAACGCCTACT-3'
Gli-2-R 5' -CCGAATGCCGTATCCAAG-3'
Gli-3-F 5' -AACCTATTCTACCTCCAAA-3'
Gli-3-R 5' -GCTGATAGTGCTGATTGCT-3'
Ptch-1-F 5' -AAAGAACTGCGGCAAGTTTTTG-3'
Ptch-1-R 5' -CTTCTCCTATCTTCTGACGGGT-3'
Ptch-2-F 5' -GGTCTCCGCACCTCATATC-3'
Ptch-2-R 5' -GCGCAGTCTGAATCAACATC-3'
CD11b-F 5' -CACAGCAGCACATCAACAAG-3'
CD11b-R 5' -GTGCTCATGTCTCATCCTG-3'
TNF -F 5' -CGGGGTGATCGGTCCCAAG-3'
TNF -R 5' -GGAGGGCGTTGGCGCGCTGG-3'
Il-1b-F 5' -CCTCTCCAGCCAAGCTTCCT-3'
Il-1b-R 5' -TTTGGGAAGCAGCCCTTCATC-3'
iNOS-F 5' -ACATCGACCCGTCCACAGTAT-3'
iNOS-R 5' -CAGAGGGGTAGGCTTGCTCTC-3'
IL-6-F 5' -TCCTACCCCAATTTCCAATGC-3'
IL-6-R 5' -CATAACGCACTAGGTTTGCCG-3'

(3) hTNFRSF19 promoter 解析

プロモータークローニング

鋳型ヒトゲノム DNA は健康者から提供され、以下のプライマーにより PCR 増幅し、pGL4.10 の XhoI サイトにサブクローン化した。

Tnfrsf19 promoter-F

5' -gcCTCGAGCTAGTGACATTTCTATACCT-3' ,
Tnfrsf19 promoter-R 5' -
gcCTCGAGCAGATCCCATGACATCATT-3'

レポーターアッセイは、ONE-Glo luciferase system (Promega Corporation, Tokyo, Japan)、Dual Luciferase Assay System (Promega) を用いて行った。hTNFRSF19 promoter-luc を皮膚線維芽細胞にエレクトロポレーション法により導入し、これを 96 ウェルマイクロプレートに 1×10^4 cells/well で播種し、24 時間培養後、発光強度を検出した。

(4) 統計解析

有意差の検定は student's unpaired t-test を用いて行い、多検体比較は Dunnett-test、Tukey-test を行った。p<0.05 の場合は有意に異なるものと判定した。

4. 研究成果

発毛・育毛モデルがほぼない中、糖尿病の病態に伴って脱毛することを、実験的に証明した(特願 2017-078540)。強制抜毛後において、発毛・育毛の過程を組織学的に調べたところ、抜毛後 2 日目でダウングロースが生じ、毛穴が明確になった。毛穴の先端部:表皮において、Runx2, Runx3 が発現、同時に Tnfrsf19/Troy が発現していた(投稿準備中)。同時に、毛球部先端にも Runx2, Runx3 が発現しており、その発現パターンはその後発現消失した。強制抜毛後 5 日目には毛球部に血管形成 (CD31 陽性) が生じ、7 日目に Klf4 陽性の幹細胞マーカーが毛球部上部に認められた。これらのアトラス解析をもとに、糖化最終産物:CML を皮内注射して、組織内変動を見定めた。その結果、NF-κB 経路依存的な炎症が抜毛 2 日目に生じていることを認め、器官形成因子:Shh の発現が低下していることを観察した。これは、炎症が生じているマーカーによらず最も顕著な表現型であった。この強制抜毛に更に CML を局所投与して生じる系を、糖尿病性抜毛モデルとした(投稿準備中)。この系に対して、4000 種より見出した発毛成分をテストし、オレアノール酸を同定した。オレアノール酸は発毛促進効果を示した。

生体で機能する TNFRSF19 promoter 領域を調べるために、E14.5 より調製した皮膚組織へ各コンストラクトをエレクトロポレーション法にて導入し、この細胞とスフェロイド化した DPs を混合し、パッチ法にて観察した。Tnfrsf19 promoter 下流に EGFP を融合したコンストラクトを用いた。検討の結果、正常な発毛過程における Tnfrsf19 の発現を再現するに至った。なお、本活性は皮膚への移植に限定される。この promoter 領域を用いて、I-κB-SR と融合させたコンストラクトを作成し、同様にパッチ法により、皮膚移植した。検討の結果、正常な発毛が生じた(投稿準備中)。

上皮系における NF- κ B 経路非依存的な機構で、Tnfrsf19 は発毛イベントを誘導することが考えられたので、Tnfrsf19 の下流のメカニズムを、ヒトケラチノサイト細胞株：HaCat を用いて調べた。その結果、NF- κ B 経路依存的に、Shh 発現を誘導することがわかったが、Shh 誘導作用は、いくつかの培養サプリメント存在下でのみ生じた。現在、この培養サプリメントを最適化しつつ、免疫担当細胞が分泌するケモカインについて更なる検討を行っている。

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4件)

- 1) Fujimoto Y, Fujita T, Kuramoto N, et al.: The Role of Interleukin-19 in Contact Hypersensitivity. *Biol Pharm Bull.* 2018;41(2): 182-189. doi: 10.1248/bpb.b17-00594. 査読あり
- 2) Nishiyama K, Fujita T, Fujimoto Y, et al.: Fatty acid transport protein 1 enhances the macrophage inflammatory response by coupling with ceramide and c-Jun N-terminal kinase signaling. *Int Immunopharmacol.* 2017; 55: 205-215. doi: 10.1016/j.intimp.2017.12.003. 査読あり
- 3) Nishidono Y, Fujita T, Kawanami A, et al.: Identification of PGC-1 activating constituents in Zingiberaceous crude drugs. *Fitoterapia.* 2017; 122: 40-44. doi: 10.1016/j.fitote.2017.08.007. 査読あり
- 4) Zhang X, Wang L, Zeng X, Fujita T, et al.: Runx3 inhibits melanoma cell migration through regulation of cell shape change. *Cell Biol Int.* 2017; 41(9): 1048-1055. doi: 10.1002/cbin.10824. 査読あり

[学会発表](計7件)

- 1) 藤田隆司: 肌のアンチエイジングとは何ですか? : 日本薬学会 第 138 回年会、2018
- 2) 水野佳奈、田中公輔、島田侑季、鄭由衣、夏目千佳、高西美紗紀、藤田隆司: N-(carboxymethyl) lysine (CML) は毛球の凝集を抑制し、毛包形成を抑制する : 日本薬学会 第 138 回年会、2018
- 3) 鄭由衣、青山朋子、田中公輔、藤田隆司: The inhibitory mechanism of cyst formation by Runx3. : 日本薬学会 第 138 回年会、2018
- 4) 藤田隆司: 肥満細胞の分化と Th2 を制御するフコキサンチン : 第 8 回 化粧品開発展、2018

- 5) 鄭由衣、島田侑季、高西美紗紀、夏目知佳、水野佳奈、田中公輔、藤田隆司: The inhibitory mechanism of cyst formation by Runx3. : Conbio2017、2017
- 6) 夏目知佳、高西美紗紀、水野佳奈、島田侑季、仙田圭祐、田邊甫樹、青山朋子、田中公輔、東泰孝、藤田隆司: フコキサンチンのアトピー性皮膚炎の治療に関する研究 : 第 131 回 薬理学会 近畿部会、2017
- 7) 1) 高西美紗紀、夏目知佳、水野佳奈、島田侑季、青山朋子、田中公輔、野口垂由美、宮本國寛、川瀬直子、野口秀人、藤田隆司: 脂漏性角化症に対するフコキサンチンの効果の検討 : 第 131 回 薬理学会 近畿部会、2017

6. 研究組織

研究代表者

藤田 隆司 (Fujita Takashi)

立命館大学・薬学部・准教授

研究者番号 : 30319793