

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06952

研究課題名(和文)毛周期、毛包幹細胞維持における局所コルチゾール産生の役割

研究課題名(英文)The role of local cortisol during hair regeneration

研究代表者

寺尾 美香(Terao, Mika)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座講師

研究者番号：40570669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：毛包は生涯にわたり成長と退縮を繰り返す成体唯一の組織であり、この毛周期はさまざまな内分泌ホルモンの影響を受ける。本研究ではコルチゾール再活性化酵素である11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD1)の毛周期、毛包幹細胞維持における役割を検討した。マウス毛包では11 β -HSD1は休止期の毛包幹細胞と成長期の毛球部で強く発現していた。また、11 β -HSD1ノックアウトマウスは野生型マウスに比べて高齢でも毛が多く維持されているが、9週齢、2.5歳齢のマウスの毛包幹細胞数を検討したところ、ともに11 β -HSD1ノックアウトマウスのほうが多く見られた。

研究成果の概要(英文)：Hair follicle (HF) is a highly organized structure and undergoes hair cycle of anagen-catagen-telogen. Hair cycle is affected by various endocrinological factors including glucocorticoid. The aim of this study is to address the role of local cortisol activation in HF. The expression of 11 β -HSD1 was especially strong in CD34 positive HF stem cells and LGR5 positive secondary hair germ. Old age keratinocyte-specific-11 β -HSD1 knockout mice (K5-11 β -HSD1 KO mice) maintained more hair and the number of hair follicular stem cells was higher compared with wildtype mice. To know the importance of local cortisol activation in keratinocytes, we investigated hair cycle of K5-11 β -HSD1 KO mice. After hair plucking, K5-11 β -HSD1 KO mice entered anagen earlier than wildtype mice. Keratinocyte migration was also enhanced in keratinocytes derived from K5-11 β -HSD1 KO mice compared with wildtype mice.

研究分野：皮膚科学

キーワード：角化細胞 コルチゾール コルチコステロン 毛包幹細胞 毛周期 マウス 11 β -HSD1

1. 研究開始当初の背景

【毛周期とコルチゾール】

毛包は周期的に再生を繰り返す小さな組織である。毛周期における色素産生や細胞内代謝は多分子の影響をうけるが、ホルモンや神経ペプチドもその一つである (R Paus et al. Trends in Mol Med 2014)。コルチゾールは身体的・精神的ストレス時に副腎から産生され、代謝・血圧・血糖をコントロールする生体に必須のホルモンである。毛包はグルココルチコイドレセプター、コルチコトロピン放出ホルモン (CRH) コルチゾール再活性化酵素などのコルチゾール関連分子、ホルモンを発現していることが報告されており (Slominski A et al. J Steroid Biochem Mol Biol. 2013) これらのホルモン、酵素による毛包局所でのコルチゾール濃度の調整が毛包周期に重要な役割を果たしていることが推測される。外来性の高濃度グルココルチコイドは退行期を誘導することが報告されているが (R Paus et al. J Invest Dermatol 1994) 内因性のコルチゾールが毛周期に及ぼす影響の *in vivo* での報告は過去にない。

【局所コルチゾール産生】

近年、副腎からの全身性コルチゾールだけでなく、毛包を含む局所でもコルチゾールが産生されることが明らかにされつつある。我々は、皮膚の表皮角化細胞がコルチゾールの再活性化酵素である 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD1) を発現し、不活性型のコルチゾンを変換することにより、細胞の恒常性維持や増殖を調節していることを報告した (Terao M et al. PLoS One. 2011 Sep;6(9):e25039)。さらに、表皮が過剰増殖をきたす皮膚の良性・悪性腫瘍 (Terao M et al. Exp Dermatol. 2013 Feb;22(2):98-101.) や尋常性乾癬やアトピー性皮膚炎 (Murota H, Terao M et al. Exp Dermatol. 2014 Jan;23(1):68-70.) ではそ

の発現が低下する。また、表皮における 11 β -HSD1 が局所の炎症制御にも関与することを見出した (Terao M et al. Am J Pathol. 2016 Jun;186(6):1499-510, Itoi S, Terao M et al. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Oct 18;440(2):265-70, Terao M et al. Dermato-Endocrinology 2016 in press)。このように表皮角化細胞における 11 β -HSD1 による局所のコルチゾール/コルチコステロンの活性化は細胞の増殖と大きく関与するが、毛包での報告はない。我々の免疫組織学的検討によると 11 β -HSD1 は外毛根鞘細胞でも発現していることより、毛包の周期に関する可能性が考えられる。さらに我々が作成した 11 β -HSD1 ノックアウトマウスでは加齢による毛の減少が少ないことより長期的な毛包の周期にも関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではヒトおよびマウス毛包における 11 β -HSD1 発現を詳細に検討し、また、表皮特異的 11 β -HSD1 ノックアウトマウスおよび全身型 11 β -HSD1 ノックアウトマウスを用いて、毛周期および毛周期に関わる因子の検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 毛包における 11 β -HSD1 発現の検討：ヒト及び C57BL/6 マウス毛包 (成長期、休止期) における 11 β -HSD1 発現を免疫組織学的検討、ウェスタンブロットで詳細に検討する。
(2) ノックアウトマウスを用いた検討：表皮角化細胞特異的 11 β -HSD1 ノックアウトマウスを用いて毛周期を観察し、毛包形成および毛周期における 11 β -HSD1 による局所コルチコステロン活性化の重要性を明らかにする。加齢による変化を検討するために若年マウスと高齢マウスによる観察も行う。さらに、抜毛後の成長期誘導を観察し、成長期開始シ

グナル、毛幹形成シグナル、退行期移行シグナルを免疫組織学的に検討する。

(3) 低濃度コルチコステロンの毛周期に与える効果の検討：マウスに外来性に低濃度（11⁻-HSD1 活性領域）コルチコステロンを投与し毛周期を観察する。

(4) 脱毛症サンプルにおける 11⁻-HSD1 発現を免疫組織学的に検討する。

具体的には

【1】ノックアウトマウスを用いた検討

申請者が作成した皮膚角化細胞特異的 11⁻-HSD1 ノックアウトマウス（K-HSD11B1 KO）を用いて実験を行う。さらに、全身型の 11⁻-HSD1 ノックアウトマウス（HSD11B1 KO）でも同様の実験を行う。

マウス毛包における 11⁻-HSD1 発現の検討

マウス毛包における 11⁻-HSD1 発現細胞を免疫染色（K5、CD34、K24、K6 など）、アルカリフォスファターゼ染色、オイルレッド染色を用い発現細胞を詳しく同定する。

- 1 毛周期による変化

成長期、退行期、休止期の毛包を採取し免疫組織学的・ウエスタンブロット・RT-PCR で 11⁻-HSD1 を検討する。

- 2 加齢による変化

若年マウス（4 - 8 週）と高齢マウス（1 . 5 年以上）を用いて上記を検討する。

無刺激時の毛包周期の検討

- 1

K-HSD11B1 KO、HSD11B1 KO を剃毛し成長期、休止期にある毛包の割合を各週齢の野生型マウスと比較する。マウスは 6 日齢（成長期）、3 週齢（休止期）、4 週齢（成長期）、8 - 11 週齢（休止期）、16 週齢（成長期、休止期）、1 . 5 年齢（成長期、休止期）を用いる予定である。

- 2

組織を採取し、形態学的に毛包を検討する。具体的には成長期毛の密度、Hair Shaft の太さ、脂腺の検討など行う。免疫組織化学的に細胞増殖能の検討（Ki-67、BudU）や hair follicle bulg の幹細胞の検討（CD34）を行う。また FACS 解析で CD34、ITGA6 陽性毛包幹細胞の解析を行う。さらに誘導される炎症性サイトカイン（IL-1、IL-1、TNF など）の評価を RT-PCR、ELISA で行う。

抜毛（depilation）による成長期誘導後の検討

8 週齢（休止期）の K-HSD11B1 KO、HSD11B1 KO、野生型マウスの毛を depilation し、視覚的、組織学的に成長期誘導にかかる時間、変化を と同様に観察する。4 週齢の若年マウスと 1 . 5 年齢の高齢マウスを用いて検討する。

【2】毛周期に関わる因子の検討

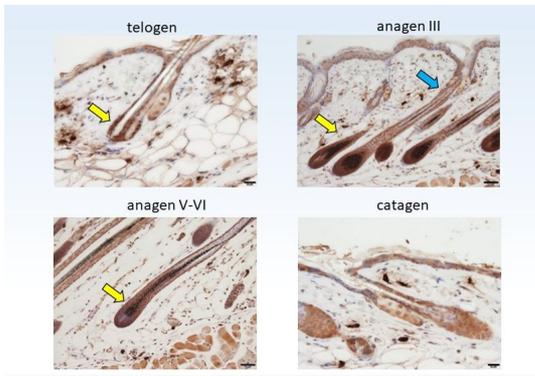
11⁻-HSD1 ノックアウトマウスで高齢でも毛が保たれている原因を解明すべく周期に関わるさまざまな因子の検討を行う。具体的には depilation 後の成長期開始シグナル（Wnt、Shh、KGF、TGF-²、Tmeff1、GLI2）毛幹形成シグナル（Notch、GATA-3 など）退行期移行シグナル（FGF5、TGF-¹、TNF、VDR）休止期シグナル（BMP、FGF18、NFTc1、Lhx2）などを免疫組織学的に検討する。また、各週齢における毛幹細胞数の検討を行う。

4 . 研究成果

【1】マウス毛包における 11⁻-HSD1 発現の検討

まずはじめにマウス毛包の各周期における 11⁻-HSD1 を検討した。11⁻-HSD1 の発現は休止期毛包の Bulge、成長期毛包の Bulb に強く認められた（図 1）

図 1



【2】マウス毛包幹細胞 (HFSC) 数の検討

高齢の 11⁻HSD1 ノックアウトマウスは野生型マウスに比べて毛が多く維持されていることより、マウス毛包幹細胞 (HFSC) 数の検討を行った。若年 (9 週齢) 高齢 (2.5 才齢) 皮膚より表皮を単離し、FACS にて CD34 陽性、 $\alpha 6$ integrin 陽性の HFSC 数を検討した。図 2、3 に示すように、野生型マウスに比べて 11⁻HSD1 ノックアウトマウスでは若年マウス (図 2) でも高齢マウス (図 3) でも HFSC 数の割合が多かった。このことより 11⁻HSD1 ノックアウトマウスでは何らかの理由で HFSC が多く保たれていることがわかった。

図 2

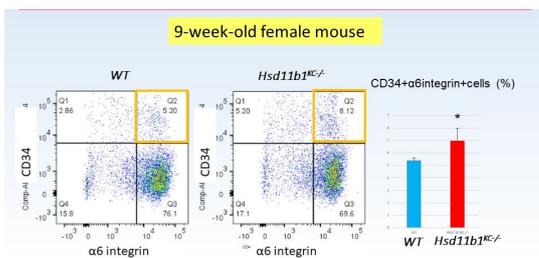
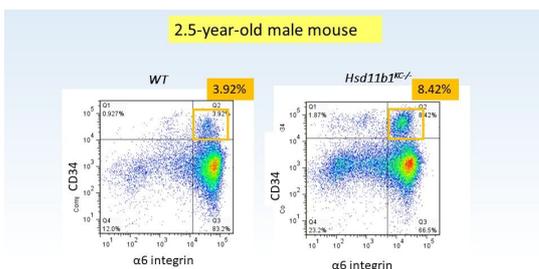


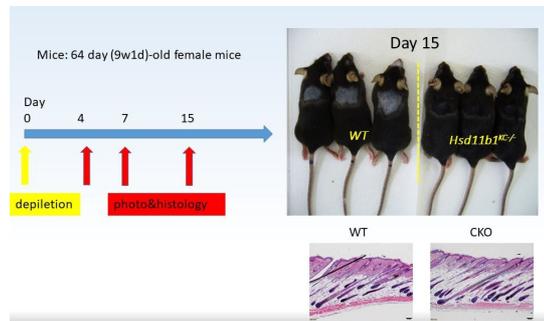
図 3



【3】抜毛後の毛周期の検討

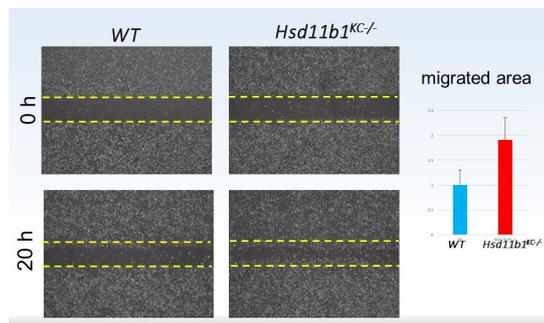
マウスに抜毛処理を行うと成長期が誘導される。次に 11⁻HSD1 ノックアウトマウスと野生型マウスにおいて抜毛後の成長期誘導の期間を検討した。図 4 は抜毛後 15 日目の写真を示すが、11⁻HSD1 ノックアウトマウスは野生型マウスより有意に成長期誘導が早くみられた。

図 4



さらに、毛の再生は創傷治癒と過程が類似していることより、細胞遊走能の検討を行った。図 5 に示すように 11⁻HSD1 ノックアウトマウスより単離した角化細胞は野生型マウスの角化細胞にくらべて細胞遊走能が亢進していることがわかった。

図 5



以上の結果より、11⁻HSD1 ノックアウトマウスでは毛幹細胞の数が有意に保たれており、しかし、予想に反して毛周期は野生型マウスに比べてやや早いことがわかった。この結果を 11⁻HSD1 をターゲットとした毛の再生につなげていきたい。

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 5 件)

1) Matsumura S, Terao M, Itami S, Katayama I. Local cortisol activation is involved in EGF-induced immunosuppression. *Dermatoendocrinol.* 2017 Dec 26;9(1):e1412018.

doi:10.1080/19381980.2017.1412018. (査読あり)

2) Matsumoto A, Murota H, Terao M, Katayama I. Attenuated activation of homeostatic glucocorticoid in keratinocytes induces alopecia via aberrant artemin production. *J Invest Dermatol.* 2018 in press

3) Terao M, Itoi S, Matsumura S, Yang L, Murota H, Katayama I. Local glucocorticoid activation by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 in keratinocytes: the role in hapten-induced dermatitis. *Am J Pathol.* 2016 Jun;186(6):1499-510. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.01.014. (査読あり)

4) Terao M, Katayama I. Local cortisol/corticosterone activation in skin physiology and pathology. *J Dermatol Sci.* 2016 Oct;84(1):11-16. doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.06.014. (査読あり)

5) Itoi-Ochi S, Terao M, Murota H, Katayama I. Local corticosterone activation by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 in keratinocytes: the role in narrow-band UVB-induced dermatitis.

Dermatoendocrinol. 2016 Jan 5;8(1):e1119958 doi: 10.1080/19381980.2015.1119958. (査読あり)

[学会発表] (計 8 件)

1) Terao M, Matsumura S, Katayama I, Itami S. Local cortisol activation in keratinocytes influences on mouse hair cycle. 42nd JSID Kochi, Japan (2017. 12. 15-17)

2) Matsumura S, Terao M, Itami S, Katayama I. Topical Dexamethasone application increased IL-1 α and IL-1 receptor expression in mouse skin. 42nd JSID Kochi, Japan (2017. 12. 15-17)

3) Terao M, Itami S. Local cortisol activation in keratinocytes influences on mouse hair cycle. 第 31 回 表皮細胞研究会 名古屋 (2017. 11. 11)

4) Matsumoto A, Murota H, Terao M, Katayama I. Homeostatic activation of epidermal HSD11 β 1 regulates TSLP production. 42nd JSID Kochi, Japan (2017. 12. 15-17)

5) Matsumoto A, Murota H, Terao M, Katayama I. Homeostatic activation of epidermal HSD11 β 1 affects skin innervation and non-histaminergic itch 2017 Society for Investigative Dermatology, Portland Oregon, USA (2017. 4. 26-29)

6) Matsumoto A, Murota H, Terao M, Katayama I. Attenuated activation of endogenous glucocorticoids in keratinocytes induces alopecia in atopic dermatitis via

aberrant artemin production. 9th World Congress on Itch. Wroclaw, Poland (2017. 10.16)

7) Terao M, Yang L, Itoi S, Murota H, Katayama I. 11 HSD1 as homeostatic regulator of skin inflammation. Combined Asia Pacific Dermatology Research (2016. 08. 25)

8) Matsumura S, Terao M, Itami S, Katayama I. Local cortisol activation is involved in EGF-induced immunosuppression. 41st JSID Sendai, Japan (2016. 12. 9-11)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺尾 美香 (Terao Mika)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座
講師

研究者番号：40570669

(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

()