

令和元年6月13日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10133

研究課題名(和文) Wntシグナルによる発毛の制御

研究課題名(英文) Regulation of hair growth and development by Wnt signaling pathway

研究代表者

王寺 幸輝 (Ouji, Yukiteru)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50343421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：発毛を制御するには、発毛に重要な因子を特定し、それらの影響を解析することが重要と考えられる。そこで、本研究では発毛の鍵となるWntシグナルに着目し、それらの発現を詳細に解析し、細胞・器官・組織レベルでの影響を精査することで発毛制御を検討した。発毛段階で種々のWntファミリーの発現、分布を解析し、発毛に必須の(高発現の)Wntシグナルを特定した。各種Wntの影響を細胞、器官、組織で解析した結果、Wntファミリーにおける影響の差異が認められ、発毛制御の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、発毛現象に重要と考えられているWntシグナルに焦点を絞り、その発現を変化させ、発毛を制御するというコンセプトである。これは、従来の発毛研究(育毛剤開発・植毛等)とは全く異なり、分子レベルで発毛を制御するという特色があり、学術的には発毛メカニズムの解明し、社会的には脱毛治療薬の開発に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to control the growth and development of hair, it is necessary to identify the key factors and analyze their roles on trichogenesis. In the present study, I focused on Wnts and examined their expression in the hair growth stages and effects on the hair development using mouse follicle epithelial stem cells (EpSCs), dermal papilla cells (DPCs), isolated hair follicle organs and dorsal skin tissues. Various Wnts and Wnt-related molecules were found to be expressed apparently in complicated manners in the skin at each stage of hair development. Furthermore, some Wnts showed different effects of cell proliferation and gene expressions in cells, organs, and tissues. More precise expression analysis of the differences among Wnts was considered to lead to the identification of specifically important Wnt(s) in the respective stages of hair development and the control of trichogenesis.

研究分野：再生医学

キーワード：発毛 Wnt 細胞 培養 移植 幹細胞 毛乳頭 マウス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

毛には、様々な役割がある。しかし、熱傷などによる永久脱毛では、発毛機能が消失する。発毛(毛の発生・成長)を制御し、発毛機能の再生が可能ならば、脱毛治療の新技術として寄与すると考えられる。最近、毛の発生(毛包形成)で注目を浴びているシグナル伝達因子として、Wntシグナルがある。Wntは、種々の臓器から産生される分泌糖タンパク質であり、個体の対軸形成や臓器形成に重要なシグナル伝達系として注目されている。これまでに、私はWntシグナルに着目し、発毛における役割を解析した結果、Wntシグナルは発毛出発材料(毛包上皮幹細胞: epithelial stem cells; EpSCs、毛乳頭細胞: dermal papilla cells; DPCs)に対して顕著な影響を及ぼし、発毛制御を可能とする知見を得ていた(Ouji *et al.*, BBRC, 2006, 2008, 2007, 2013; *J Biosci Bioeng*, 2010; *J Invest Dermatol*, 2015)。そこで、私はまず、発毛現象の鍵となるWntサブファミリーを選出し、それらの影響を *in vitro* で解明し、更に得られた情報をもとにWntシグナルによる発毛制御に着手することとした。

2. 研究の目的

発毛を制御することを念頭に、その構成細胞に着目し、発毛段階でのWntシグナルの発現パターンを解析し(①)、構成細胞ごとのWntの影響を精査し(②)、得られた成績をもとに、器官・組織レベルでのWntシグナルによる影響を精査し、発毛制御メカニズムを探る(③)、以上の3点について検討することを本研究計画の目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス皮膚を用いたWntシグナルの解析

胎児(E10)および生後マウス(P0、P7)の皮膚よりtotal RNAを抽出し、real time RT-PCRを用いて皮膚におけるWntシグナル関連遺伝子の遺伝子発現解析を行った。また、同時に固定を行った皮膚組織を凍結切片化し、各種Wntの発現局在等を組織学的に解析した。

(2) マウス皮膚細胞を用いたWntシグナルの影響

毛包上皮幹細胞(EpSCs)の単離は、以前の報告(Ouji *et al.*, *J Invest Dermatol*, 2015)に従ってマウス皮膚をより単離した。毛乳頭細胞(DPCs)の単離についても、以前の報告(Ouji *et al.*, *Cell Transplant*, 2012)に従ってマウス口髭より単離し、培養後に増殖した細胞を回収することで、実験に供した。皮膚線維芽細胞(FBCs)については、マウス皮下組織を細切した断片を細胞培養plateに静置させ、増殖した細胞を回収することで、実験に供した。各種Wnt添加培養実験により、培養後の細胞からtotal RNAを抽出し、遺伝子発現をreal time RT-PCRにより精査した。さらに、4%PFAにより固定した細胞を用いて免疫染色によりタンパクレベルでの発現解析を行った。

(3) マウス毛包器官を用いたWntシグナルの影響

マウス口髭より、以前の報告(Ouji *et al.*, BBRC, 2007)に従って毛包ユニットを単離し、Wntの添加培養を行うことで、shaftの伸長を評価した。更に、4%PFAによる固定後、凍結切片により組織学的評価を行った。

(4) マウス皮膚組織におけるWntシグナルの影響

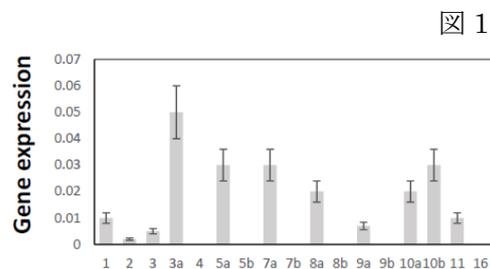
成獣マウスの背中皮膚をWaxにて脱毛後、各種Wntを担持させたbeadsを皮内移植することで、発毛誘導能の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 発毛に関与するWntシグナルの発現解析

まず、発毛に関わるWntシグナルの遺伝子発現を経時的に精査した。胎児および生後マウスの皮膚よりtotal RNAを抽出し、real time RT-PCRによりリガンド(Wnt)およびレセプター(Frizzled)について発現解析を行った。発現しているWntおよびFrizzledのサブファミリーのいくつかは、Reddyらが報告した成績(*Mech Dev.* 2001, *J Invest Dermatol.* 2004)と一致した。しかし、それ以外のWntおよびFrizzledのファミリーが発現していることを新たに発見したため、これまでの報告とは異なるWnt/Frizzledファミリーが発毛に関与していることが示唆された(図1)。

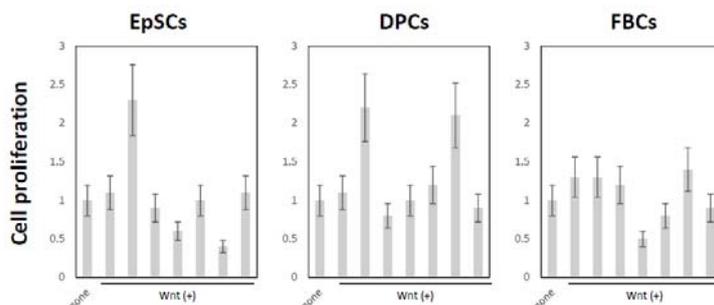
次に、新たなWnt/Frizzledファミリーを含め、発毛に関わるWntシグナルが発毛プロセスのどの段階(発現時期)で、どこに発現しているのか(発現部位)を、皮膚組織を用いて精査した。胎生期、生後、成獣マウスの各時期における皮膚を免疫組織化学的に解析したところ、Reddyらの報告と一致する部位も存在した。しかしながら、毛包組織における広い部位(表皮から皮下組織)での発現を詳細に調べた結果、Wnt/Frizzled各種ファミリーの複雑な発現パターンが存在することが明らかとなった。



(2) 発毛に関する細胞レベルでの Wnt シグナルの影響

図 2

発毛段階で、特に発現の高かった Wnt に着目し、毛包幹細胞 (EpSCs)、毛乳頭細胞 (DPCs)、および皮膚線維芽細胞 (FBCs) の培養系で細胞増殖や各種マーカーの遺伝子発現変化を調べた。その結果、Wnt の影響に差異が認められ、各種細胞に対しても影響が異なっていることが明らかとなった (図 2)。



(3) 発毛における器官・成体レベルでの Wnt シグナルの影響

図 3

生理的環境下での Wnt シグナルによる発毛制御を実現するために、成獣マウス口髭より単離した毛包器官ユニットの培養により、組織 (器官) レベルでの Wnt シグナルの影響を調べた。その結果、各種 Wnt により差異が生じ、発毛制御の可能性が示唆された (図 3)。しかしながら、培養細胞系の成績と若干異なる影響もあることから、各種細胞から構成される「器官」内では、細胞間の影響 (液性因子や細胞間相互作用) が考えられた。さらに、より生理的条件下として成獣マウスの体毛を用いて *in vivo* 実験を行った結果、発毛再生における各種 Wnt の明らかな差異を認めた (図 4)。

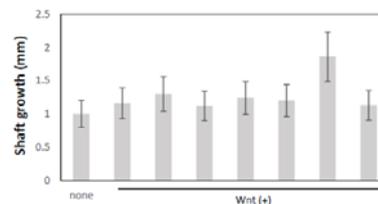
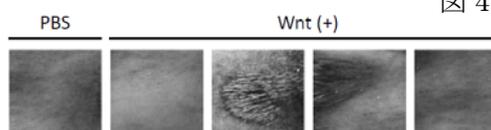


図 4



(4) 結論

以上の成績から生体内での発毛制御後に生じる発現変動を、今後、より詳細に解析することで発毛制御のメカニズムが解明できる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 12 件)

①

Sakagami M, Ouji Y, Kawai N, Misu M, Yoshikawa M, Kitahara T.

Differentiation of embryonic stem cells into inner ear vestibular hair cells using vestibular cell derived-conditioned medium.

Biochem Biophys Rep, (査読あり)、2019、in press.

②

Kawai N, Suzuki S, Ouji Y, Takeda M, Sakagami M, Tojo T, Sawabata N, Yoshikawa M, Ikada Y, Taniguchi S.

Effect of covering with cross-linked gelatin glue on tissue regeneration in a rat lung injury model.

Interact Cardiovasc Thorac Surg, (査読あり)、2019、ivy297.

10.1093/icvts/ivy297.

③

Kawai N, Ouji Y, Sakagami M, Tojo T, Sawabata N, Yoshikawa M, Taniguchi S.

Induction of lung-like cells from mouse embryonic stem cells by decellularized lung matrix.

Biochem Biophys Rep, (査読あり)、2018、15:733-738.

10.1016/j.bbrep.2018.06.005.

④

Yoshikawa M, Ouji Y, Hirai N, Nakamura-Uchiyama F, Yamada M, Arizono N, Akamatsu N, Yoh T, Kaya D, Nakatani T, Kikuchi E, Katanami Y, Satoh K, Maki R, Miyazato Y, Oba Y, Kasahara K, Mikasa K.

Ancylostoma ceylanicum, novel etiological agent for traveler's diarrhea-report of four Japanese patients who returned from Southeast Asia and Papua New Guinea.

Trop Med Health, (査読あり)、2018、46:eCollection2018

10.1186/s41182-018-0087-8.

⑤

Ouji Y, Sakagami M, Omori H, Higashiyama S, Kawai N, Kitahara T, Wanaka A, Yoshikawa M. Efficient induction of inner ear hair cell-like cells from mouse ES cells using combination of Math1 transfection and conditioned medium from ST2 stromal cells. *Stem Cell Res*, (査読あり), 2017, **23**:50-56.
10.1016/j.scr.2017.06.013.

⑥

Tsuchido Y, Nakamura-Uchiyama F, Toyoda K, Iwagami M, Tochitani K, Shinohara K, Hishiya N, Ogawa T, Uno K, Kasahara K, Ouji Y, Kano S, Mikasa K, Shimizu T, Yoshikawa M, Maruyama H. Development of Delayed Hemolytic Anemia after Treatment with Oral Artemether-Lumefantrine in Two Patients with Severe Falciparum Malaria. *Am J Trop Med Hyg*, (査読あり), 2017, **96**:1185-1189.
10.4269/ajtmh.16-0460.

⑦

Marutani A, Nakamura M, Nishimura F, Nakazawa T, Matsuda R, Hironaka Y, Nakagawa I, Tamura K, Takeshima Y, Motoyama Y, Boku E, Ouji Y, Yoshikawa M, Nakase H. Tumor-inhibition effect of levetiracetam in combination with temozolomide in glioblastoma cells. *Neurochem J*, (査読あり), 2017, **11**: 43-49.

⑧

Kaya D, Yoshikawa M, Nakatani T, Tomo-Oka F, Fujimoto Y, Ishida K, Fujinaga Y, Aihara Y, Nagamatsu S, Matsuo E, Tokoro M, Ouji Y, Kikuchi E. Ancylostoma ceylanicum hookworm infection in Japanese traveler who presented chronic diarrhea after return from Lao People's Democratic Republic. *Parasitol Int*, (査読あり), 2016, **65**: 737-740.
10.1016/j.parint.2016.07.001.

⑨

Ouji Y, Yoshikawa M. Maintenance of Dermal Papilla Cells by Wnt-10b In Vitro. *Methods Mol Biol*, (査読あり), 2016, **1516**:269-277.
10.1007/7651_2016_319.

⑩

Ouji Y, Yoshikawa M. Maintenance of Skin Epithelial Stem Cells by Wnt-3a In Vitro. *Methods Mol Biol*, (査読あり), 2016, **1516**:279-288.
10.1007/7651_2016_320.

⑪

Yoshikawa M, Ouji Y. Induction of Inner Ear Hair Cells from Mouse Embryonic Stem Cells In Vitro. *Methods Mol Biol*, (査読あり), 2016, **516**:257-267.
10.1007/7651_2016_328.

⑫

Nakazawa T, Nakamura M, Matsuda R, Nishimura F, Park YS, Motoyama Y, Hironaka Y, Nakagawa I, Yokota H, Yamada S, Tamura K, Takeshima Y, Omoto K, Tanaka Y, Ouji Y, Yoshikawa M, Tsujimura T, Nakase H. Antitumor effects of minodronate, a third-generation nitrogen-containing bisphosphonate, in synergy with $\gamma \delta$ T cells in human glioblastoma in vitro and in vivo. *J Neurooncol*, (査読あり), 2016, **129**: 231-241.

〔学会発表〕（計 9 件）

①

阪上雅治、王寺幸輝、河合紀和、吉川正英、北原紘
卵形嚢由来細胞を用いた ES 細胞から内耳前庭有毛細胞への分化誘導法の開発
第 19 回 日本再生医療学会総会、2019 年

②

Ouji Y, Kawai N, Sakagami M, Yoshikawa M
Characterization of murine hair follicle stem cells under long-term culture conditions
16th International Society for Stem Cell Research Annual Meeting、2018 年

③

Sakagami M, Ouji Y, Kawai N, Kitahara T, Yoshikawa M
Differentiation of mouse embryonic stem cells into inner ear cell-like cells using
vestibular cell-conditioned medium
16th International Society for Stem Cell Research Annual Meeting、2018 年

④

王寺幸輝、河合紀和、阪上雅治、吉川正英
長期培養維持した毛包上皮幹細胞のキャラクタリゼーション
第 17 回 日本再生医療学会総会、2018 年

⑤

Sakagami M, Ouji Y, Kawai N, Kitahara T, Yoshikawa M
Effects of vestibular cell-conditioned medium on differentiation of embryonic stem cells
into inner ear vestibular hair cells
41st Annual MidWinter Meeting, Association for research in otolaryngology、2018 年

⑥

Ouji Y, Sakagami M, Kawai N, Yoshikawa M
Maintenance and long-term expansion of murine skin epithelial stem cells by Wnt signaling
pathway
10th World Congress for Hair Research、2017 年

⑦

王寺幸輝、河合紀和、阪上雅治、三須政康、吉川正英
皮膚上皮幹細胞の長期培養条件の検討と Wnt シグナル
第 16 回 日本再生医療学会総会、2017 年

⑧

河合紀和、王寺幸輝、阪上雅治、東条尚、谷口繁樹、吉川正英
無細胞化マトリックスを用いた ES 細胞から肺細胞への効率的分化誘導法の開発
第 16 回 日本再生医療学会総会、2017 年

⑨

阪上雅治、王寺幸輝、河合紀和、北原紘、吉川正英
ES 細胞から分化誘導した内耳有毛細胞のキャラクタリゼーション
第 16 回 日本再生医療学会総会、2017 年

〔図書〕（計 2 件）

①

吉川正英、沢田敦、間瀬史絵、平位暢康、大西智子、武山雅博、笠原敬、王寺幸輝
金原出版、小児科・小児寄生虫感染症の対策・予防、2018、14 ページ

②

王寺幸輝、吉川正英
Medical Technology、日常検査で役立つ寄生虫・原虫検出法 抗原・抗体反応を利用した寄生
虫検査、2017 年、6 ページ