

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08746

研究課題名(和文)毛包ケラチノサイトに発現するHMGB2遺伝子の色素細胞幹細胞維持機能

研究課題名(英文) Maintenance of melanocyte stem cell function by HMGB2 gene expressed in hair follicles.

研究代表者

國貞 隆弘 (Kunisada, Takahiro)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30205108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：正常ヒト表皮角化細胞にHMGB2のsiRNAを投与し発現量を減少させた後、放射線を照射すると活性酸素量、ミトコンドリアの傷害性、DNA損傷が増加した。次に、CRISPR-Cas9システムを用いてHMGB2KOマウスを作製したところ、通常老化では白髪化の促進は認められなかったが、放射線照射により毛包幹細胞がDNA損傷を受け、放射線による白髪化が有意に促進された。また、ヒトの表皮では年齢依存的にHMGB2量が減少していた。以上のことから、表皮のHMGB2は老化に伴って減少し、放射線による白髪化防止に寄与していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HMGB2がどのような老化現象に関わるか詳細に解明するにはHMGB2の発現細胞、発現部位の確認、HMGB2と既存老化マーカーとの相関性などのデータが必要である。さらに、表皮を含めた様々な細胞でHMGB2発現を促進する化合物をスクリーニングすれば、HMGB2を標的にした有効なアンチエイジング薬(白髪防止剤を含む)を提供できると考えている。最近、適度な運動により神経細胞でのHMGB2発現を高め、老化によって減少する海馬の神経刺激・神経新生を促進できることが報告された。このようにHMGB2は様々な老化現象に関与することが知られてきており、注目すべき抗老化因子と考えられる。

研究成果の概要(英文)：HMGB2 siRNA was administered to normal human epidermal keratinocytes to reduce the expression level, then X-ray irradiation increased the amount of active oxygen, mitochondrial damage, and DNA damage. Next, HMGB2KO mice prepared by using the CRISPR-Cas9 system, did not show whitening of hair, but caused DNA damage to hair follicle stem cells, resulting in significant radiation-induced whitening. In addition, the amount of HMGB2 decreased in the human epidermis in an age-dependent manner. It was suggested that HMGB2 in the epidermis decreases with aging and contributes to the prevention of hair graying by X-ray radiation.

研究分野：発生生物学、再生医学、幹細胞生物学

キーワード：白髪 毛包幹細胞 HMGB2 老化

### 1. 研究開始当初の背景

色素細胞幹細胞 (MSC) を含む組織幹細胞は生体組織の恒常性を維持するために厳密に増殖が制御されており、組織幹細胞を取り囲む細胞が形成するニッチと呼ばれる環境が制御の主役である (Scadden Cell 157, 41-50, 2014)。実際、皮膚由来の細胞を適切な条件で培養するとケラチノサイトをニッチとして皮膚 MSC 由来の色素細胞のコロニーが形成されるが、マウスの白毛化 (MSC の喪失) を誘導する 5 Gy の X 線を照射した後の皮膚の培養では、色素細胞のコロニーが形成されなくなる。さらに、X 線を照射した皮膚の細胞 (ほとんどはケラチノサイト) は X 線を照射していない皮膚の色素細胞コロニー形成を阻害することから、表皮ケラチノサイトは X 線照射でニッチ能力を失い、MSC が存在してもコロニーが形成されないと考えられる (Aoki et al JID 133, 2143, 2013)。

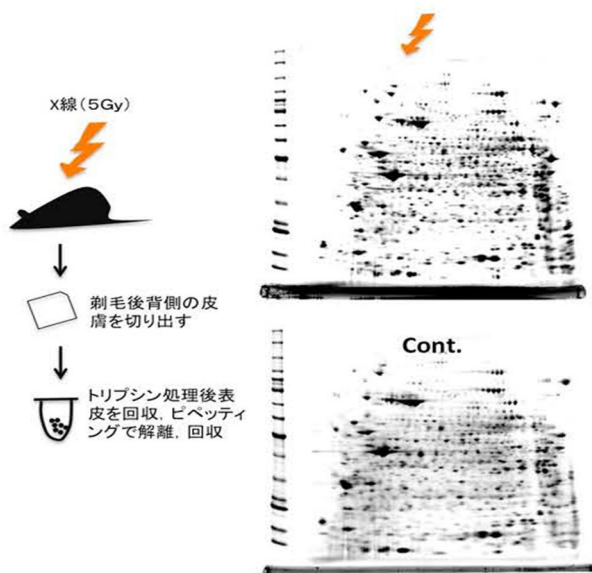


図 1 X 線照射後 3～5 匹分の背側表皮のケラチノサイトからタンパクを回収し、2 Dゲルに展開した。それぞれのスポットを専用の画像解析ソフトと TOF-MS で調べ、無照射のもの (Cont.) と比較して強度が変化したスポット (MSC ニッチ候補因子) を同定した。

そこで、X 線照射前後で表皮に発現している分子を図 1 のようなプロテオーム解析により網羅的に比較することで MSC ニッチを同定可能であると考え、126 個の候補分子 (遺伝子) のリストを得た。本申請では、その中から X 線照射後にタンパクとして発現量が 2 倍程度増加した遺伝子 HMGB2 (High Mobility Group B family 2) に関して、MSC のニッチ機能を担うことを確認し、ニッチのどのような機能を受け持っているかを解明する。増殖因子を中心に解明されてきた幹細胞ニッチ分子を、異なる観点で同定された HMGB2 の新たな機能を持ち込むことにより拡張し、MSC を含む様々な幹細胞の制御に応用した。

放射線による白髪化において、最初に障害を受けるのは色素幹細胞ではなく、ニッチを構成している毛包幹細胞 (ケラチノサイト系) の DNA 損傷が原因であることから、マウスに放射線を照射した際に表皮 (ケラチノサイト系) で変動が大きいタンパク質が白髪化に関与すると推測した。放射線照射したマウス表皮タンパクの二次元電気泳動により変動の大きいタンパク質を検討した結果、HMGB2 (High mobility group protein B2) に有意な変動があることが分かった。HMGB2 はこれまでに放射線抵抗性があることや老化により軟骨・神経で減少することなどが報告されているが、表皮・毛包での昨日に関する報告はほとんどない。

### 2. 研究の目的

幹細胞ニッチは細胞機能であり特定の分子ではない。例えば、ニッチを構成するケラチノサイトの生存に必要な解糖系の酵素を阻害すれば、MSC も維持できないので、解糖系の酵素ですらニッチ因子と言える。人工的にニッチ機能を一時的に低下させると発現量が変動する遺伝子産物は、より直接的にニッチの形成に参加している分子である可能性が高く、この意味でこれまで MSC の制御に関して知見のない HMGB2 に注目した。HMGB2 は、老化細胞特異的な転写因子としてがん化の抑制に寄与すること (Aird et al JCB 215, 325, 2016)、神経幹細胞の増殖に関与すること (Kimura et al Dev Dyn 247, 229, 2018) などが報告されており、MSC の制御に直接関与する可能性もある。これまで同定されている様々な MSC のニッチ因子は、それらの機能を阻害することで誘導される表現型 (白毛) が根拠であり、本申請の手法で白毛という表現型に依存せずに同定された HMGB2 はこれまでにない新たなメカニズムでニッチ機能を担う分子であると期待される。

### 3. 研究の方法

HMGB2 ホモ K0 マウスを用いて 1) 長期に維持した後の白毛の発生率、2) X線による白毛誘導の域値、3) 繰り返し抜毛(抜毛するごとに毛包が再生し、同時に毛包の MSC も再生する)による白毛の出現率の変化、についてそれぞれヘテロ K0 マウスと比較する。これらの実験により、HMGB2 が MSC の維持・活性化に関与しているかどうか、それが白毛にどの程度寄与しているかが推定できる。

我々は共同研究者を中心に、植物から抽出された低分子化合物の白髪抑制作用を明らかにしつつある。これらの化合物には、X線照射後のマウスの白毛化を抑制するという明確な作用があり、その白髪抑制効果はヒトでも検証されている。これらの低分子化合物の標的経路(分子)を明らかにすることは作用機構を明確にするためにも重要な課題である。これらの化合物はケラチノサイトに作用することは現時点で我々の実験から強く示唆されており、まず白髪抑制化合物の添加により HMGB2 ノックアウトマウスの X 線による白毛化が抑制可能かどうかを検証する。続いて、このノックアウトマウスに放射線を照射後、表皮あるいは毛包ケラチノサイトが受けている傷害を、細胞の生存率、H2AX による DNA 切断の定量、ミトコンドリア内の活性酸素の測定などにより評価する。得られる知見は、白髪抑制薬の開発だけでなく、ロドデノール白斑症や尋常性白斑症の治療法開発につながるエビデンスとして医学的・社会的な意義が高い研究になる。HMGB2 の発現と白髪との関連に関しては、マウスでの結果が確定した段階で個人の白髪と黒毛の毛包における HMGB2 の発現を比較することで調べる。

#### 4. 研究成果

##### 1. HMGB2 は NHEK の放射線照射による細胞死を有意に抑制する

NHEK に siHMGB2 をトランスフェクションすることで HMGB2 の発現量を減少させたところ、タンパク質量を 19.8%にまで減少させた(図 2-1)。そして siHMGB2 は放射線による細胞死が有意に促進していた(図 2-2)。また、siHMGB2 をトランスフェクションした細胞は放射線により、活性酸素量が増加し(図 3)、ミトコンドリアの傷害性が増加することで(図 4)、DNA 損傷をより多く受けることが分かった(図 5)。

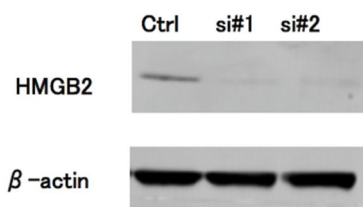


図 2-1 ウェスタンブロットによる HMGB2 サイレンシング効果の確認

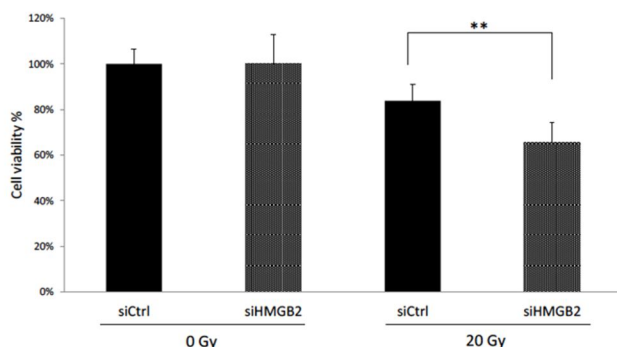


図 2-2 MTT アッセイによる細胞生存率。放射線照射 48 時間後の細胞生存率。student t-test により統計解析を行った (\*\*p < 0.01)。

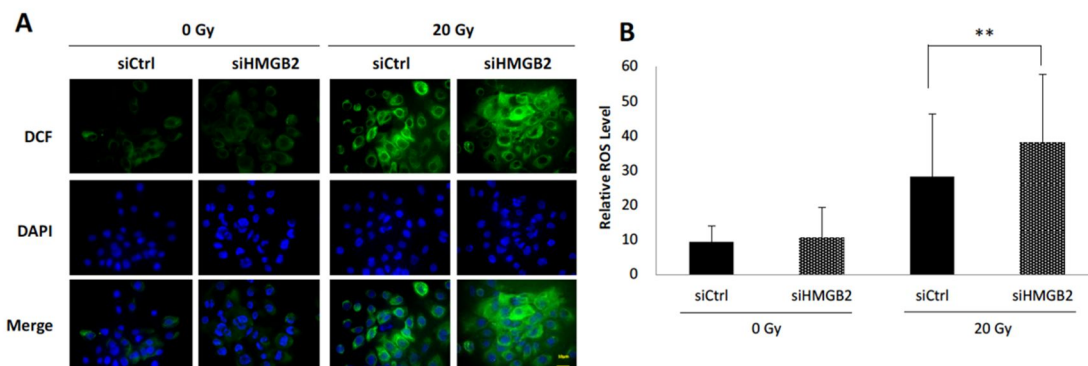
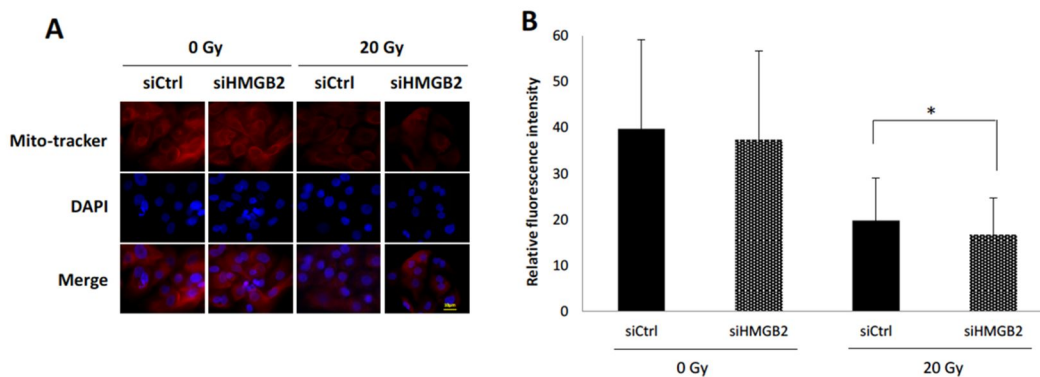
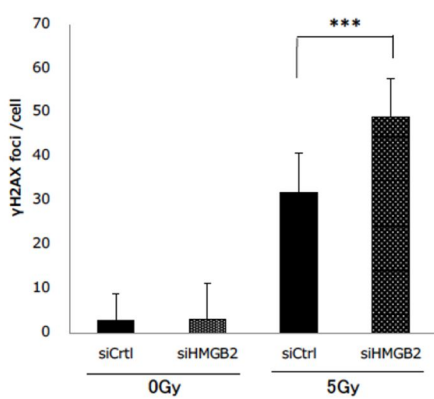


図 3 DCFDA による活性酸素測定。放射線照射 48 時間後の活性酸素を DCFDA 検出キットにより検討した。緑; ROS、青; DAPI。student t-test により統計解析を行った (\*\*p < 0.01)。



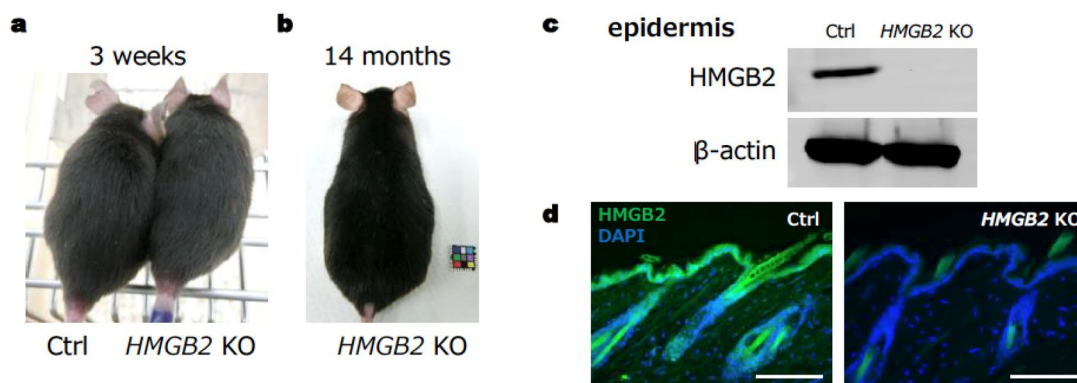
**図4** Mito-Trackerによるミトコンドリアの観察。放射線照射48時間後のミトコンドリア膜をMito-trackerにより検討した。赤；ミトコンドリア、青；DAPI。student t-testにより統計解析を行った (\* $p < 0.05$ )



**図5** 細胞あたりの H2AX foci の数。放射線照射48時間後のDNA損傷をH2AX foci数にて検討した。student t-testにより統計解析を行った (\*\* $p < 0.001$ )

## 2. HMGB2は老化による白髪化を誘導しない

CRISPR-Cas9システムを用いてHMGB2 KOマウスを作製した。その結果、生後~14か月齢において、白髪化が促進されることはなかった(図6a, b)。また、作製したHMGB2 KOマウスは表皮HMGB2の発現は完全にKOされていたことをウエスタンブロットにより確認した(図6c, d)。以上のことから、HMGB2 KOマウスは通常老化により白髪化が促進されることはない結論付けた(抜去は未検討)。



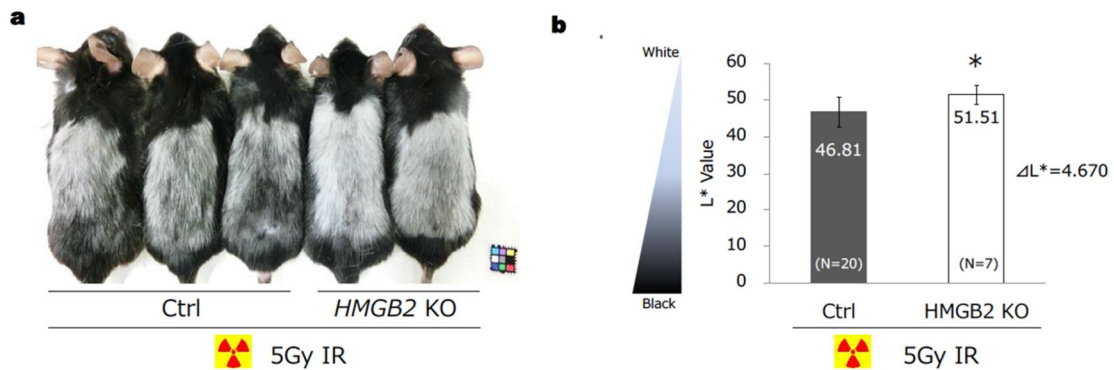
**図6** HMGB2は表皮で発現している。

- (a) HMGB2 KOとそのLittermateの写真(3週齢)
- (b) HMGB2 KOの写真(14か月齢)
- (c) 表皮HMGB2のウエスタンブロットの結果。HMGB2 KOマウスでは表皮でのHMGB2発現がないことが分かる。
- (d) 表皮HMGB2の免疫染色(3週齢)。緑；HMGB2、青；DAPI。Bars=100  $\mu$ m。

## 3. HMGB2KOマウスは放射線による白髪化を促進する

HMGB2 KO マウスに 5Gy の放射線を照射した。照射 1 か月後の写真と回収した毛の L\* 値を図 7 a、b に示す。試験の結果、HMGB2 KO に放射線を照射することで白髪化が有意に促進されることが分かった。

図 7 HMGB2 KO の白髪化促進作用



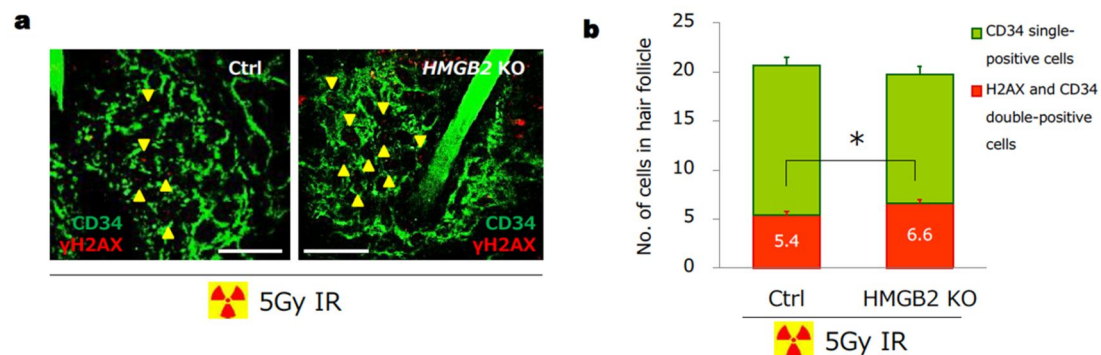
(a) HMGB2 KO とその Littermate に 5Gy の放射線を照射後、1 か月後の写真。  
(b) 放射線照射後の L\* 値。student t-test により統計解析を行った ( $***p < 0.001$ )。

#### 4. HMGB2 KO マウスは放射線による毛包幹細胞の DNA 損傷が有意に増加していた

HMGB2 KO マウスに 5Gy の放射線を照射した際の毛包幹細胞の DNA 損傷を検討した。試験の結果、HMGB2 KO に放射線を照射することで毛包幹細胞 (CD34 陽性細胞) の DNA 損傷が同配子 (Littermate) に比べて有意に多いことが分かった (図 8 a、b)。

図 8 HMGB2 KO の DNA 損傷促進作用

(a) HMGB2 KO とその Littermate に 5Gy の放射線を照射 6 時間後のバルジ領域。緑；CD34、



赤； H2AX。

(b) 毛包幹細胞に占める DNA 損傷細胞数。student t-test により統計解析を行った ( $*p < 0.05$ )。

#### 5. HMGB2 はヒト表皮において、年齢依存的に減少する可能性がある

ヒト表皮 (腹) での HMGB2 は免疫染色にて検討した。その結果、年齢により発現量が減少するタンパク質である可能性が示された (N=2)。

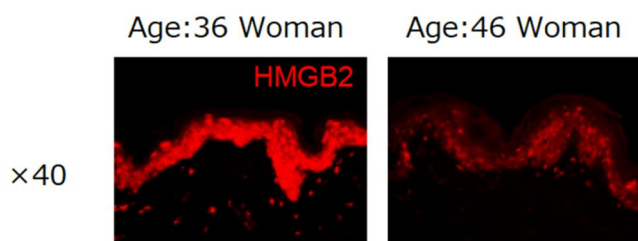


図 9 ヒト表皮 HMGB2 の免疫染色 (赤； HMGB2)

\*ただし、露光部 (手の甲) では年齢と相関しない染色像も得られたため、今後の検討課題とする。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Taguchi N, Homma T, Aoki H, Kunisada T.  | 4. 巻<br>43              |
| 2. 論文標題<br>Dietary Eriodictyon angustifolium Tea Supports Prevention of Hair Graying by Reducing DNA Damage in CD34+ Hair Follicular Keratinocyte Stem Cells                       | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Biol Pharm Bull.   | 6. 最初と最後の頁<br>1451-1454 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1248/bpb.b20-00455.   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Motohashi T, Kawamura N, Watanabe N, Kitagawa D, Goshima N, Kunisada T.  | 4. 巻<br>29              |
| 2. 論文標題<br>Sox10 Functions as an Inducer of the Direct Conversion of Keratinocytes Into Neural Crest Cells   | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Stem Cells Dev.  | 6. 最初と最後の頁<br>1510-1519 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1089/scd.2020.0106.   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Le Coz M, Aktary Z, Watanabe N, Yajima I, Pouteaux M, Charoenchon N, Motohashi T, Kunisada T, Corvelo A, Larue L.  | 4. 巻<br>141             |
| 2. 論文標題<br>Targeted Knockout of $\beta$ -Catenin in Adult Melanocyte Stem Cells Using a Mouse Line, Dct::CreER T2, Results in Disrupted Stem Cell Renewal and Pigmentation Defects | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>J Invest Dermatol.   | 6. 最初と最後の頁<br>1363-1366 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.jid.2020.08.025.   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>該当する            |
| 1. 著者名<br>Kanayama T, Tomita H, Binh NH, Hatano Y, Aoki H, Okada H, Hirata A, Fujihara Y, Kunisada T, Hara A.  | 4. 巻<br>14              |
| 2. 論文標題<br>Characterization of a BAC transgenic mouse expressing Krt19-driven iCre recombinase in its digestive organs.  | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>PLoS One   | 6. 最初と最後の頁<br>e0220818  |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1371/journal.pone.0220818   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-               |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Taguchi N, Yuriguchi M, Ando T, Kitai R, Aoki H, Kunisada T.                      | 4. 巻<br>42              |
| 2. 論文標題<br>Flavonoids with Two OH Groups in the B-Ring Promote Pigmented Hair Regeneration. | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Biol Pharm Bull.  | 6. 最初と最後の頁<br>1446-1449 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1248/bpb.b19-00295.  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-               |

|   |                    |
|---|--------------------|
| 1. 著者名<br>Taguchi N, Hata T, Kamiya E, Homma T, Kobayashi A, Aoki H, Kunisada T.                                    | 4. 巻<br>10         |
| 2. 論文標題<br>Eriodictyon angustifolium extract, but not Eriodictyon californicum extract, reduces human hair greying. | 5. 発行年<br>2020年    |
| 3. 雑誌名<br>Int J Cosmet Sci.   | 6. 最初と最後の頁<br>1-10 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/ics.12620   | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-          |

|  |                    |
|--|--------------------|
| 1. 著者名<br>Nobuhiko Taguchi, Ryosuke Kitai, Takuya Ando, Toshihiro Nishimura, Hitomi Aoki, Takahiro Kunisada                | 4. 巻<br>1          |
| 2. 論文標題<br>Protective effect of hydroxygenkwanin against hair graying induced by X-ray irradiation and repetitive plucking | 5. 発行年<br>2021年    |
| 3. 雑誌名<br>JID Innovations  | 6. 最初と最後の頁<br>1-31 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.xjidi.2022.100121  | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-          |

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

|                              |
|------------------------------|
| 1. 発表者名<br>國貞隆弘, 青木仁美, 田口暢彦  |
| 2. 発表標題<br>白髪を予防する天然化合物の作用機構 |
| 3. 学会等名<br>日本色素細胞学会 (招待講演)   |
| 4. 発表年<br>2021年              |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|               | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                    | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                | 備考 |
|---------------|--|--------------------------------------|----|
| 研究<br>分担<br>者 | 青木 仁美<br><br>(Aoki Hitomi)<br><br>(10550361) | 岐阜大学・大学院医学系研究科・講師<br><br><br>(13701) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|