

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17789

研究課題名(和文) WNT10A欠損マウスを用いた発毛および男性型脱毛症の機序の解明

研究課題名(英文) WNT10A knock out mice can be a model for androgenetic alopecia.

研究代表者

田崎 貴嗣 (Tasaki, Takashi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：10800782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：WNT10Aは男性型脱毛症の原因遺伝子の候補として近年注目を集めている。我々は世界で初めて開発したWNT10Aノックアウト(KO)マウスを用いてその組織学的、分子生物学的手法を用いて検討した。

WNT10A-KOマウスでは野生型に比し有意な毛包の形態学的変化は見られなかったが、毛髪は細く、毛包周囲の毛細血管の減少が見られた。また血清中の17 beta-estradiol(女性ホルモン)は有意に低く、testosterone(男性ホルモン)は有意に高かった。その原因として男性ホルモンから女性ホルモンに変換する酵素であるcytochrome P450 19A1の有意な減少が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はWNT10AがWntシリーズで従来言われていた毛包幹細胞の増殖活性を促すだけでなく、cytochrome P450 19A1の発現低下に伴う男性ホルモンの増加と女性ホルモンの減少を来たことが分かった。WNT10A-KOマウスにおける毛包や毛髪、真皮の形態学的特徴は男性型脱毛症と類似しており、男性ホルモンの増加との関連が強く示唆された。我々の研究から、Wnt10aの発現量が男性型脱毛症のリスク因子となる他、局所の補充療法など治療のターゲットとしても考慮される。加えて、我々が開発したWNT10A-KOマウスは男性型脱毛症のよいモデルマウスといえ、創薬の効果判定の面での活用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Recently, WNT10A is attracting attention as one of genetic risk for androgenetic alopecia. We experimented with conventional male and female WNT10A-KO mice we created. In WNT10A-KO mice, no significant morphological changes in hair follicles were observed compared to the wild type mice. However, the hair shaft was thin and the number of capillaries around the hair follicles was reduced. By ELISA kit, 17 beta-estradiol (female hormone) was lower, and testosterone (male hormone) was significantly higher. cytochrome P450 19A1, an enzyme that converts androgens to female hormones, was decrease in WNT10A-KO mice compared to the wild type mice.

研究分野：病理学

キーワード：WNT10A 脱毛

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

Wnt は 1990 年代以降、初期発生における器官形成や腫瘍の増殖など幅広い機能を示す細胞外分泌タンパク質として注目されて、2000 年以降 Wnt について多くの論文が報告されてきた。Wnt は種を超えて保存され、ヒト、マウスともに 19 種類が同定されている。ヒトでは Wnt10A 欠損が原因となる外胚葉形成異常 (odonto-onycho-dermal dysplasia や Schopf-Schulz-Passarge 症候群) があり、毛髪の減少などの症状を呈し<sup>1)</sup>、Cre-loxP による WNT10A コンディショナルノックアウトマウス(WNT10A<sup>fl/fl</sup>)を用いた実験では、毛包幹細胞の増殖が障害されていることが示された<sup>2)</sup>。また WNT10A は稀な疾患の原因遺伝子というだけではなく、男性型脱毛症の原因遺伝子の 1 つと目されている<sup>3)</sup>。我々は WNT10A のコンベンショナルノックアウトマウス (WNT10A<sup>-/-</sup>)の作成に世界で初めて成功し、WNT10A<sup>-/-</sup>マウスでは毛の密度が疎で毛色が薄く、皮膚の創傷治癒モデルにおいて毛の再生が野生型に比し遅いことを見出した<sup>4)</sup>。

しかしながら Wnt10A と発毛との関連について着目した論文は少なく、男性型脱毛症の機序に WNT10A がどのように関連しているかについて検討した論文はほとんどなく、その解明は十分ではない。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、我々が世界で初めて開発した WNT10A<sup>-/-</sup>マウスを用いて実験を行う。従来より男性型脱毛症では男性ホルモン(テストステロン、ジヒドロテストステロン)や毛包周囲の血流低下などの周囲環境との関連が示唆されているが、WNT10A と発毛の関連については他の WNT 蛋白と同様に毛包幹細胞の増殖との関連が示されているに過ぎない。我々は WNT10A と性ホルモン産生との関連、毛包周囲の微小環境の違いに特に着目して検討した。この研究によって、外胚葉形成異常の症状改善ならびに男性型脱毛症の原因究明およびその治療に貢献できると考えている。

## 3. 研究の方法

### (1) オス WNT10A<sup>-/-</sup>マウスを用いた発毛実験

25-30 週齢のオスの WNT10A<sup>-/-</sup>マウス、野生型マウス (WT; wild type) の背部皮膚を Rosin と bees wax の混合物を用いて、毛包周期を休止期とする。両群の発毛時期の差を検討した。

### (2) オス WNT10A<sup>-/-</sup>マウスを用いた発毛実験毛包および周囲構造の組織学的検索

(1)のマウスを毛周期にあわせて day0 (3 hour), day3, day5, day10, day12, day16 で屠殺し、その皮膚を用いて Hematoxylin-Eosin 染色(HE 染色)を行い、組織学的に検索した。毛包上皮について cytokeratin 14, cytokeratin 15, Ki-67、血管内皮の同定について CD31 を用いた免疫組織化学的検討を行った。また毛髪について卓上透過型電子顕微鏡(TM3000®, 日立ハイテク)で形態学的計測を行った。

### (3) オス WNT10A<sup>-/-</sup>マウス全血清を用いた性ホルモン値の測定

ELIZA 法によって、女性ホルモン (17β-estradiol; E2)、男性ホルモン(testosterone)をそれぞれ測定した。

### (4) オス WNT10A<sup>-/-</sup>マウス皮膚組織を用いた cytochrome P450 19A1 の発現の検討

屠殺後採取した WNT10A<sup>-/-</sup>マウス、WT マウスの皮膚組織から蛋白を抽出し、Western blotting によって男性ホルモンを女性ホルモンに変換する cytochrome P450 19A1 (cyp19A1) の発現量を検討した。

(5) メス WNT10A<sup>-/-</sup>マウスを用いた子宮・卵巣の形態学および組織学的変化の検討

妊娠可能な週齢(8-24w)のメスの WNT10A<sup>-/-</sup>マウス、WT マウスを用いて、8 週齢、12 週齢、16 週齢、20 週齢、24 週齢で屠殺し、子宮および卵巣の重量の測定、HE 染色による組織学的検討を行った。

(6) メス WNT10A<sup>-/-</sup>マウスを用いた性ホルモンおよび cyp19a1 の発現量の検討

屠殺時の全血清を用いた ELISA 法により、E2, testosterone, progesterone, luteinizing hormone(LH), follicle stimulating hormone(FSH)の測定を行った。また卵巣より蛋白を抽出し、Western blotting によって cyp19A1 の発現量を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) オス WNT10A<sup>-/-</sup>マウスを用いた発毛実験

照明等同条件で撮影し、day10-12(anagen IV 期)より肉眼的に明らかな WNT10A<sup>-/-</sup>マウスの発毛の遅れが示唆された。

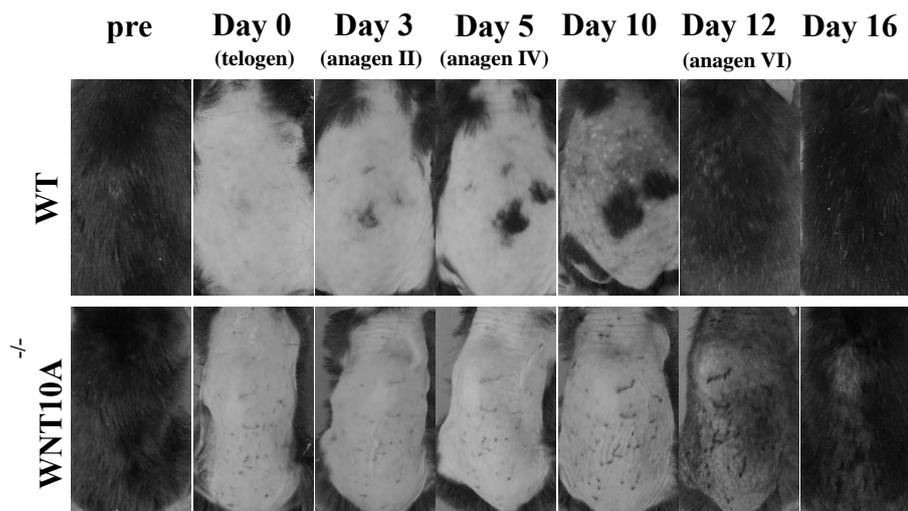


図 1. 各毛周期における WT と WNT10A<sup>-/-</sup>マウスの比較

(2) オス WNT10A<sup>-/-</sup>マウスを用いた発毛実験毛包および周囲構造の組織学的検索

しかしながら、WNT10A<sup>-/-</sup>マウスの皮膚の組織学的検索では、HE 染色で毛包構造に明らかな異常はなく、毛包周期に一致した組織像であった。また毛包の数についても有意差は認められなかった。また免疫組織化学的に、cytokeratin14 陽性の外毛根鞘細胞、cytokeratin15 陽性の毛包上皮幹細胞の数や分布に有意な差は見られず、Ki-67 の陽性数や分布にも有意差は認められなかった。一方で、真皮の厚さは WNT10A<sup>-/-</sup>マウスで有意に薄く、毛包周囲の毛細血管数が有意に減少していた。

また毛髪(hair shaft)の卓上透過型電子顕微鏡を用いた検討では、WNT10A<sup>-/-</sup>マウスで毛幹部が有意に細いことが分かった。

(3) オス WNT10A<sup>-/-</sup>マウス全血清を用いた性ホルモン値の測定

オス WNT10A<sup>-/-</sup>マウスでは WT に比し、E2 が有意に低く、testosterone が有意かつ顕著に高値であった。

(4) オス WNT10A<sup>-/-</sup>マウス皮膚組織を用いた cyp19A1 の発現の検討

オス WNT10A<sup>-/-</sup>マウスでは WT に比し、cyp19a1 の発現量が有意に低かった。

(5) メス WNT10A<sup>-/-</sup>マウスを用いた子宮・卵巣の形態学および組織学的変化の検討

メス WNT10A<sup>-/-</sup>マウスでは WT に比し、子宮内膜は有意に薄く、卵巣は有意に重量が減少していた。卵胞では 8 週齢より閉鎖卵胞が多く、早期早熟の傾向が認められた。

(6) メス WNT10A<sup>-/-</sup>マウスを用いた性ホルモンおよび cyp19a1 の発現量の検討

メス WNT10A<sup>-/-</sup>マウスでは WT に比し、E2、progesterone が有意に低く、testosterone が有意に高値であった。LH, FSH に有意差は見られなかった。また cyp19a1 は、免疫組織化学的、real time RT-PCR、western blotting のいずれの手法においても、メス WNT10A<sup>-/-</sup>マウスでは WT に比し有意に減少していた。

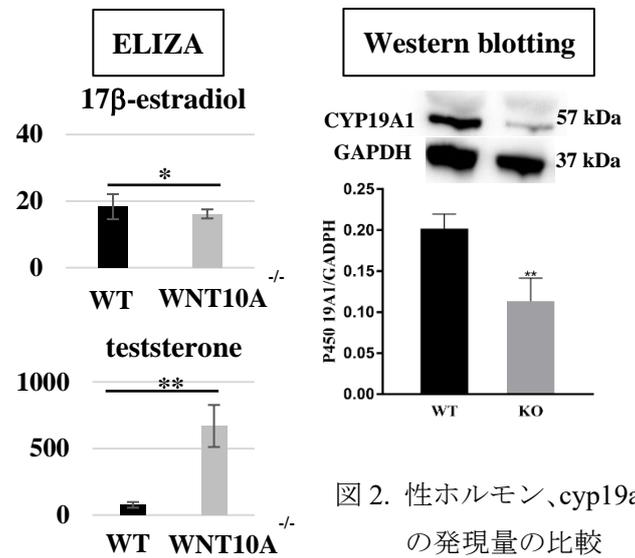


図 2. 性ホルモン、cyp19a1 の発現量の比較

<引用文献>

- 1) Adaimy L, Chouery E, Megarbane H, Mroueh S, Delague V et al. Mutation in WNT10A is associated with an autosomal recessive ectodermal dysplasia: the odonto-onycho-dermal dysplasia. *Am J Hum Genet.* 2007; 81: 821-8.
- 2) Xu M, Horrell J, Snitow M, Cui J, Gochnauer H et al. WNT10A mutation causes ectodermal dysplasia by impairing progenitor cell proliferation and KLF4-mediated differentiation. *Nat Commun.* 2017; 8: 15397.
- 3) Heilmann S, Kiefer AK, Fricker N, Drichel D, Hillmer AM et al. Androgenetic alopecia: identification of four genetic risk loci and evidence for the contribution of WNT signaling to its etiology. *J Invest Dermatol.* 2013 Jun;133(6):1489-96.
- 4) Wang KY, Yamada S, Izumi H, Tsukamoto M, Nakashima T, Tasaki T et al. Critical in vivo roles of WNT10A in wound healing by regulating collagen expression/synthesis in WNT10A-deficient mice. *PLoS One.* 2018; 13: e0195156.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田崎貴嗣、王克よう、野口紘嗣、佐藤奈帆子、名和田彩、熊元啓一郎、片渕瑛介、島尻正平、中山敏幸
2. 発表標題 WNT10A-Knockout マウスを用いたWNT10A/ -catenin経路による性ホルモン産生への関与の検討
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------