

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 B

研究期間：平成 20～21 年度

課題番号：20790812

研究課題名（和文）成体マウス毛包幹細胞を用いた発毛再生と Wnt の役割

研究課題名（英文）The role of Wnt signaling pathway in hair regeneration  
by using mouse adult hair follicle epithelial stem cells

研究代表者

王寺 幸輝 (OUJI YUKITERU)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：50343421

## 研究成果の概要（和文）：

近年、毛包に存在する毛包上皮幹細胞（HFESCs）のキャラクターゼーションおよび分化メカニズムの解明が進んでおり、また、分泌糖タンパク Wnt は皮膚・毛包の発生過程に重要な細胞間シグナルであることが明らかにされている。そこで本研究では、マウス HFESCs のセルソーティングを行い、*in vitro*での HFESCs に対する Wnt ファミリー（Wnt-3a、5a、10b、11）の影響を精査した。Wnt-3a のみが増殖を亢進させ、さらに、canonical pathway を介したシグナル伝達により未分化状態を維持する因子であることが明らかとなり、毛包・発毛のメカニズムに関する重要な知見が得ることができた。

## 研究成果の概要（英文）：

Characterization and elucidation of the differentiation mechanism of stem cell in skin hair follicle (hair follicle epithelial stem cells: HFESCs) is important for understanding the differentiation of epithelial cells and hair follicle morphogenesis. Recently, it is thought that the Wnt signaling pathway is critical for regulating a number of basic cell functions, such as cell proliferation, differentiation, and migration, leading to morphogenesis and organogenesis, and we have already reported that the Wnt signal is important for hair reconstitution and hair growth *in vitro* and *in vivo*. In this study, we performed cell sorting of mouse HFESCs and examined the effects of the various Wnts (Wnt-3a, -5a, -10b, and -11) on HFESCs *in vitro*. Interestingly, only HFESCs cultured with Wnt-3a showed proliferated, and expressed stem cell markers compared with control condition. Furthermore, involvement of the canonical Wnt signal pathway was demonstrated by a TCF reporter (pTOPFLASH) assay. Our results suggest that Wnt-3a promotes the proliferation of HFESCs and may play an important role in HFESCs maintenance.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2008 年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2009 年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚炎症・再生学、毛包再生医学

### 【1. 研究開始当初の背景】

毛の発生に関しては、不明な点が多いが、最近、毛包形成で特に注目を浴びている Wnt シグナルがある。しかしながら、本来の毛包組織での作用機序やターゲット細胞については未だ不明な点が多いのが現状である。

毛包組織内の発毛に関わる細胞種として、毛包上皮幹細胞 (hair follicle epithelial stem cells; HFESCs) が注目されている。この HFESCs に関しても、毛包組織構築に寄与する分子の同定・解析は依然として十分ではないが、ここ数年の研究で、HFESCs のマーカーが同定されたため、純化 HFESCs に対する Wnt シグナルの影響を調べることで、幹細胞がどのような分化の運命をたどり、毛包組織を構築するメカニズムを解明できると考えられた。

ここで注目する分泌性糖タンパク質 Wnt に関して、既に私は、活性化されたリンパ球から種々の Wnt ファミリーが分泌されることを確認しており、また、Wnt の精製プロセスの樹立にも成功している (Y. Ouji, et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 342: 28-35. 2006.)。また、*in vivo* での Wnt の影響を調査すべく、無毛マウス (BALB/c-nu/nu; ノードマウス) を用いた発毛再生実験により、Wnt シグナルは発毛再生を促進するという結果も得られている (Y. Ouji, et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 345: 581-587. 2006.)。さらに、マウス口髭より単離した毛包器官培養を行い、Wnt-10b は発毛の促進に直接的な影響を与えていることが示唆されるデータも得ている (Y. Ouji, et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 359: 516-522. 2007.)。

近年明らかにされつつある各種組織幹細胞の「能力」は目覚しく、私が注目する毛包幹上皮細胞 HFESCs も例外ではない。その HFESCs を十分「利用」することで皮膚再生および発毛医療に役立たせるためには、Wnt シグナルが HFESCs に対してどのような変化をもたらすのか (増殖や分化誘導、あるいは未分化の維持などに寄与するか等) を詳細に解析することが重要ではないかと考え、以上の点から本研究を計画した。

### 【2. 研究の目的】

成体マウス毛包由来幹細胞 (hair follicle epithelial stem cells; HFESCs) における Wnt の役割 (メカニズム) を解析するために、①成体マウスより HFESCs をセルソーター (FACS) により単離し、そのキャラクタリゼーションを行う、②種々の Wnt protein (組み換えタンパク質 Wnt-3a, -10b, -5a, -11) を用いて HFESCs に対する影響を *in vitro* で調べ、③Wnt protein が HFESCs による皮膚・毛包構築過程でどのような役割を果たしているのか、また、初期過程で皮膚・毛包組織各種細胞に対し、時間的・空間的にどのような細胞に影響を及ぼすのかを *in vivo* で詳細に多元的に解析する、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) HFESCs の単離

これまでに報告されている毛包幹上皮細胞 HFESCs のマーカーとしては、CD34, CD49f (integrin  $\alpha 6$ ) があり、共陽性細胞が HFESCs である。そこでまず、マウス (C3H/HeN) より背中皮膚を可及的に切除し、トリプシンにより、真皮と上皮を分離後、上皮細胞を単離し、CD34, CD49f 抗体との反応後、フローサイト (FACS Aria) により HFESCs の細胞分取を行った。

#### (2) HFESCs の *in vitro* 培養

フローサイトにより得られた HFESC は、皮膚上皮細胞培地 Epilife を基本培地とし、各種 Wnt 組み換えタンパク質を培養液に添加し、培養した。解析は、RT-PCR による遺伝子解析の他、免疫細胞染色などにより未分化あるいは分化マーカーの検出を行った。

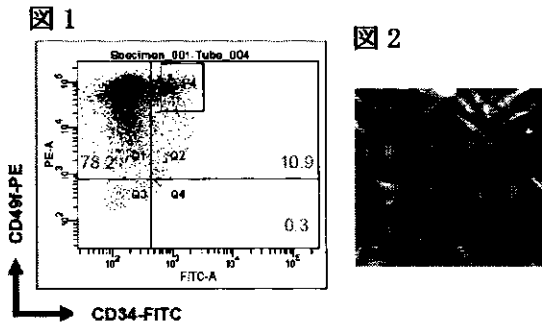
#### (3) HFESCs の *in vivo* 移植

ノードマウス (BALB/C -nu/nu) を用いてグラフトチャンバーを埋め込み、C3H/HeN マウス由来 HFESCs と毛乳頭細胞を移植した。移植から一定の時間経過後 (1週間~2ヶ月) の皮膚表面の評価 (マクロ解析) および皮膚組織を摘出し、組織学的な評価 (ミクロ解析) を行った。

#### 【4. 研究成果】

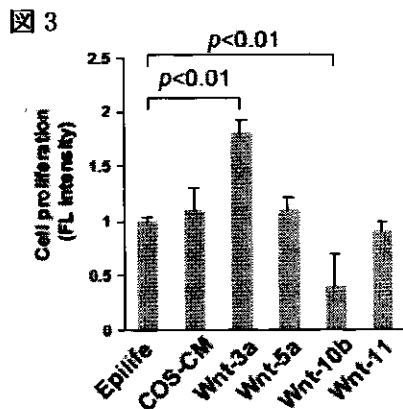
##### (1) HFESCs の *in vitro* 培養

マウスより単離した毛包上皮幹細胞 HFESCs を CD34, CD49f の表面抗原マーカーによりソーティングを行った (図 1)。単離した細胞は接着系の細胞であり、上皮様形態を示していた (図 2)。

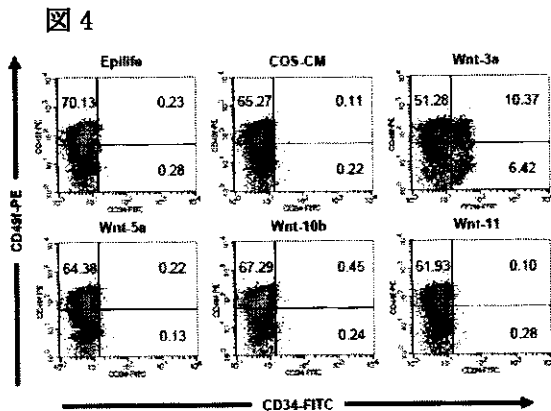


##### (2) HFESCs の各種 Wnt による影響

*In vitro* 培養によって、各種 Wnt 添加を行った結果、Wnt-3a は増殖を亢進し、一方で Wnt-10b は増殖を有意に抑制した (図 3)。

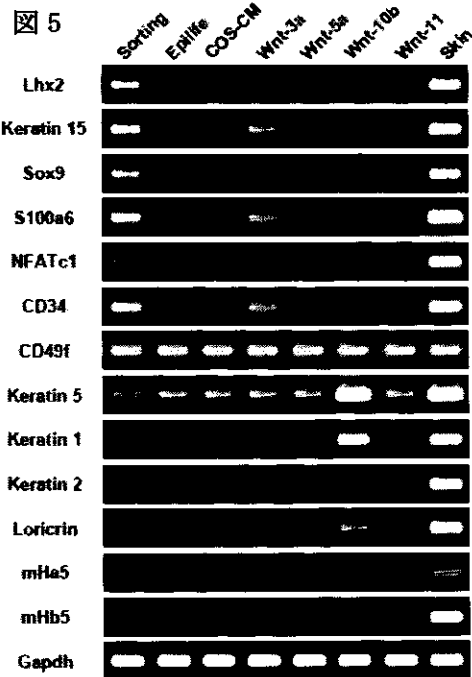


また、CD34, CD49f 分画を培養すると、Wnt-3a のみが、陽性分画の維持に働いていることが明らかとなった (図 4)。



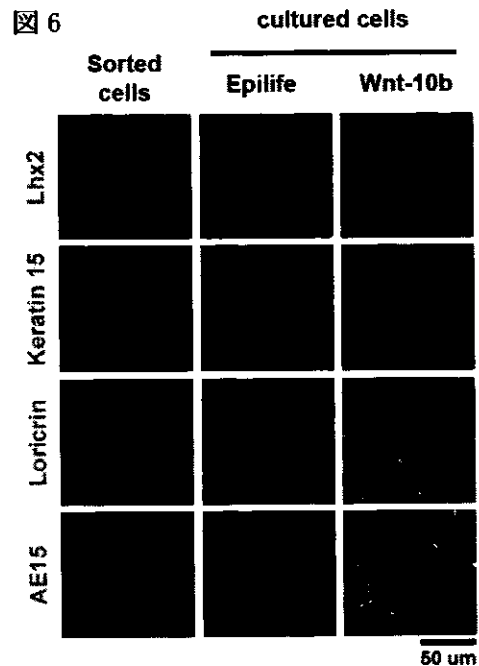
##### (3) Wnt-3a は HFESCs の未分化を維持する

Wnt-3a はさらに解析を進めたところ、遺伝子発現レベルにおいても未分化な細胞を維持できていることが明らかとなった (図 5)。



##### (4) Wnt-10b は HFESCs の分化を促進させる

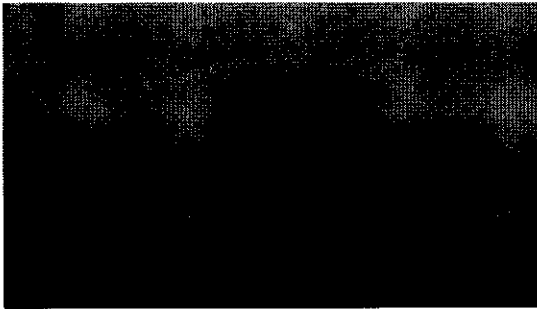
いっぽうで、同じ canonical pathway である Wnt-10b には HFESCs の分化を促進させる働きがあることが明らかとなった (図 5)。さらに免疫細胞染色の結果、分化誘導は、対照群に比べても強力な分化誘導を引き起こしていることが明らかとなった (図 6)。



(5) Wnt-3a による HFESCs の未分化維持とその機能解析— *in vivo* 移植による多分化能の証明—

Wnt-3a を添加して維持した HFESCs をヌードマウスにグラフトチャンパーを用いて移植した結果、C3H/HeN 由来である褐色の毛を有した発毛が認められ、組織レベルにおいても毛包を再構築できていることが明らかとなった (図 7)。

図 7



(6) 結論と今後の展望

発毛メカニズムの解明をすべく、発毛の原点となる毛包上皮幹細胞 HFESCs に注目し、Wnt シグナルの影響を *in vivo* で解析した結果、Wnt-3a は HFESCs の未分化状態維持に働き、いっぽうで、Wnt-10b は分化を促進させるという新たな機能を見出した。また、*in vivo*での移植実験で、*in vitro*で Wnt-3a により維持された HFESCs は多分化能を有することから、HFESCs の未分化状態維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。これらの結果は、毛包組織の幹細胞維持、いわゆる niche の解明に重要な知見を与えるばかりでなく、Wnt による毛包細胞を用いた再生医療への基礎的な研究データとしても十分意義のあるものと考えられた。

今後は、*in vitro*で、HFESCs に対する Wnt の影響をさらに調べ、*in vitro*発毛システムへの応用、また、他分野への応用 (医薬品スクリーニング) も考慮し、更なる解析、開発を進める予定である。

【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 2 件)

①

Yukiteru O uji, Masahide Yoshikawa, Mariko Nishiofuku, Noriko O uji-Sageshima, Atsushi Kubo and Shigeaki Ishizaka. Effects of Wnt-10b on proliferation and differentiation of adult murine

skin-derived CD34 and CD49f double-positive cells

*J Biosci Bioeng.*

査読有

in press, 2010 年

②

王寺幸輝, 吉川正英, 石坂重昭

発毛の再生医学

*Journal of Nara Medical Association*

査読有

59 巻、2008 年、33-41 ページ

〔学会発表〕 (計 4 件)

①

王寺幸輝, 吉川正英, 石坂重昭

毛包幹細胞を用いた発毛再生 — Wnts の影響について—

第 9 回日本再生医療学会総会

2010 年 3 月 2 日、岡山

②

Yukiteru O uji, Masahide Yoshikawa, Shigeaki Ishizaka

Effects of Wnt families in the hair follicle stem cells

第 39 回日本免疫学会総会・学術集会

2009 年 12 月 3 日、大阪

③

王寺幸輝, 久保篤史, 後藤達志, 吉川正英, 石坂重昭

毛包幹細胞の樹立を目指して — 毛包幹細胞に対する Wnt family の影響について—

第 8 回日本再生医療学会総会

2009 年 3 月 6 日、東京

④

Yukiteru O uji, Masahide Yoshikawa, Tatsushi Goto, Shigeaki Ishizaka

Effects of Wnts on differentiation and hair shaft growth in mouse skin epithelial cells and hair follicle organ

第 38 回日本免疫学会総会・学術集会

2008 年 12 月 2 日、京都

【6. 研究組織】

(1) 研究代表者

王寺 幸輝 (OUJI YUKITERU)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 50343421