

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08349

研究課題名（和文）女性ホルモン欠乏による難治性皮膚疾患に対する糖鎖関連治療薬の開発と作用機序解明

研究課題名（英文）Development and elucidation of the mechanism of action of glycan-related therapeutics for refractory skin disorders due to female hormone deficiency

研究代表者

武藤 潤 (Muto, Jun)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30338131

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：女性型脱毛は難治で患者のQOLを障害する疾患であるが、高いエビデンスを有する治療薬は現在のところ存在しない。我々は、トレハロース含有外用剤を閉経モデルマウス（卵巣摘出マウス、ovariectomized『OVX』マウス）の剃毛した皮膚に外用することで、トレハロースの効果について動物実験（in vivo）にて検討したところ、トレハロースを含有する剤を塗布した群で毛量が増加していた。さらに、皮膚に存在する細胞を培養してトレハロース処理後のRNA-seqによる全トランスクリプトーム解析を含めたmRNAレベルや蛋白発現を解析して作用機序の解明のための研究を行った（in vitro）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トレハロースはショックモデルに於けるマクロファージの炎症活性抑制やオートファジーの誘導作用が報告されている。また、生理作用としては、トレハロース内服により女性ホルモンの欠乏状態にて生じる骨粗鬆症予防効果について報告がある。さらにはハンチントン病などの神経変性疾患に対する効果などが報告されている。そしてこれまで実験動物やヒトでの毒性や有害事象は報告されていない。女性型脱毛などは難治な疾患であり、患者にとって重大なQOL障害となる。ところが、これらに対して高いエビデンスを有する治療薬は現在のところ存在しないため、未解明の作用メカニズムを解明することにより安全安価な新規治療薬となりうる。

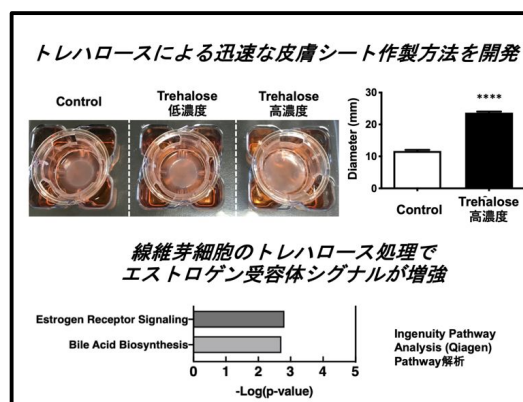
研究成果の概要（英文）：Menopause induces systemic changes due to the decline in ovarian function and subsequent deficiency in female hormones. In the skin, this deficiency leads to decreased amounts of extracellular matrix components. Conditions like female pattern hair loss represent intractable diseases, significantly impacting the quality of life (QOL). We have investigated the effects of a trehalose-containing topical agent on hair loss due to hormone deficiency using an ovariectomized (OVX) mouse model. Both the sham and OVX groups that received the trehalose-containing treatment showed a significant increase in hair volume at shaved sites. Furthermore, we are conducting in vitro studies to elucidate the mechanism of action, including RNA-seq analysis of the whole transcriptome and protein expression in human fibroblasts, dermal papilla cells, and keratinocytes treated with trehalose. These studies aim to validate the efficacy of topical trehalose ointment and develop new treatments.

研究分野：皮膚科

キーワード：女性型脱毛症

## 1. 研究開始当初の背景

閉経による女性ホルモン欠乏によりコラーゲンやエラスチン、ヒアルロン酸の量が低下し、表皮が薄くなり乾燥症状や血管拡張を呈する酒さや脱毛を伴うようになる。我々は、トレハロースが特有の線維芽細胞活性化作用を有することを発見し、トレハロースを線維芽細胞に作用させて作製した3次元培養皮膚シートでは線維芽細胞から発現する各種増殖因子により表皮成分であるケラチノサイト層の水平方向への迅速な増殖と拡大がみられたこと、またトレハロース処理した二次元または三次元培養線維芽細胞を用いたRNA-seqによる全トランスクリプトーム解析において、トレハロース処理により女性ホルモン受容体シグナルが有意に活性化されることを発見した(Muto J *et al*, J Invest Dermatol 2020;140:S104)。また、皮膚はエストロゲンの非生殖器官系最大の標的臓器である。興味深いことに線維芽細胞など皮膚においてはエストロゲンレセプターが卵巣の1/10という十分に高いレベルで発現されているため、エストロゲンレセプターを介して女性ホルモンが皮膚の恒常性維持、コラーゲンやヒアルロン酸などの産生促進、血流改善など重要な役割をしていることが知られている。しかしながら、この点に着目した外用医薬品は現在のところ存在しない。我々が新たにその特異な作用を見出したトレハロースを外用剤として用いて真皮に多数存在する線維芽細胞を刺激することで、閉経後の女性ホルモン欠乏により生じて生活の質(QOL)を障害する皮膚疾患に対する新規治療法とできるかどうか、さらには機序を解明して新しい治療法への臨床応用へ展開するための基盤研究を行った。



## 2. 研究の目的

女性ホルモンが欠乏することで、生活の質(QOL)を障害する様々な皮膚疾患、酒さ、脱毛症などが生じる。トレハロースで処理した線維芽細胞のトランスクリプトーム解析から、トレハロースによって Senescence-like な状態に誘導された線維芽細胞からケラチノサイト層の水平方向への迅速な増殖を促す各種増殖因子群が発現増強されるため、これを利用した新規三次元皮膚シート培養方法を開発したことを第52回日本結合組織学会にて報告して注目された。皮膚はエストロゲンの非生殖器官系最大の標的臓器であり、新たにエストロゲンシグナル増強作用を有するトレハロースを外用剤として用いることで女性ホルモン欠乏により生じる皮膚疾患に対する新規治療法開発のための基盤研究を行うことが本研究の目的である。トレハロースは有害事象の報告もなく、トレハロースとエストロゲンシグナルに特記した外用剤も存在しないため、本研究はさらなる独自性と創造性を有する。

### 3. 研究の方法

#### 1. 卵巣摘出 (ovariectomized 『OVX』)マウスに対するトレハロース含有軟膏外用治療

C57BL/6 WT マウス (雌) の卵巣を摘出し (ovariectomized 『OVX』 マウス)、剃毛した背部皮膚にトレハロース を含有した軟膏を外用後、脱毛やバリア機能、細胞外マトリックスへの効果について *in vivo* でその効果を検討した。2-5 % イソフルレン吸入麻酔下に C57BL/6 WT マウス (雌 6 週齢) に対し卵巣摘出術 (OVX) または偽手術 (Sham) を実施し、OVX 群および Sham 群をランダムに 2 群に分けて、8 週齢から剃毛した背部皮膚に 2 週間連日線維芽細胞活性化物質であるトレハロース含有軟膏を外用する群をコントロール (ワセリン外用) 群と比較検討した。上記剃毛処理から 24 日後 (塗布開始から 23 日後) に、背部全体の観察に加えて剃毛部のダーモスコピーを行った。さらに、各群のマウスの剃毛部を実体顕微鏡で観察し、単位面積当たりの体毛の本数を計数した。さらに皮膚生検を施行して病理組織学的な解析を行なった。

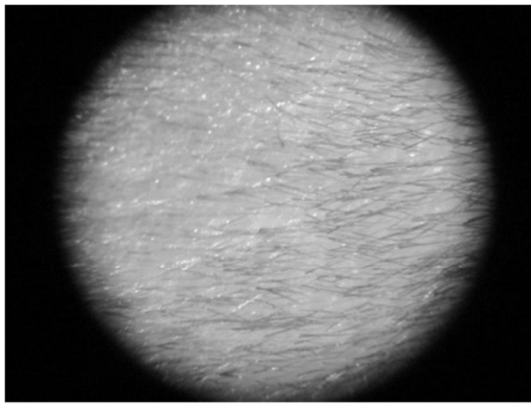
#### 2. 機序解明のための線維芽細胞、角化細胞、毛乳頭細胞など培養細胞を用いたトレハロース刺激実験

トレハロース処理後の 2 次元培養線維芽細胞、角化細胞、毛乳頭細胞での mRNA レベル (リアルタイム PCR) 及び蛋白レベル (LEGENDplex growth factor panel、各種 ELISA) での発現解析を行い、増殖因子やエスロトゲン受容体関連分子の変化を測定して、トレハロースによる効果発現の機序について検討した。

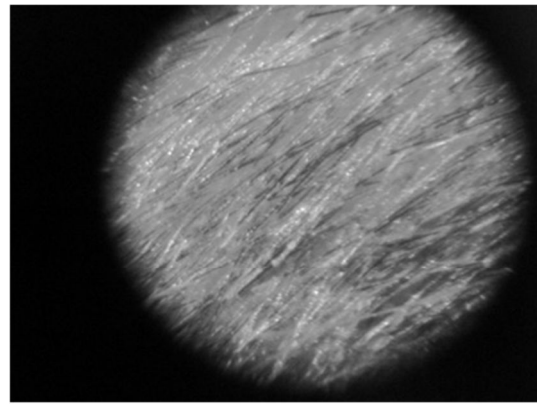
### 4. 研究成果

#### 卵巣摘出 (ovariectomized 『OVX』)マウスに対するトレハロース含有軟膏外用治療

トレハロース処理培養線維芽細胞を用いた RNA-seq による全トランスクリプトーム解析によりトレハロース処理により Senescence-like な状態へ線維芽細胞は誘導されて女性ホルモンシグナル等が有意に活性化されることを報告した (Muto J, *et al.*, *Commun Biol* 6, 13, 2023)。次に、C57BL/6 WT マウス (雌) の卵巣を摘出し (ovariectomized 『OVX』 マウス)、剃毛した背部皮膚にトレハロース を含有した軟膏を外用後、脱毛への効果について *in vivo* でその効果を検討した。C57BL/6 WT マウス (雌 6 週齢) に対し卵巣摘出術 (OVX) または偽手術 (Sham) を実施した。OVX 群および Sham 群をランダムに 2 群に分けて、8 週齢から剃毛した背部皮膚に 2 週間連日線維芽細胞活性化物質であるトレハロース含有軟膏を外用する群をコントロール (ワセリン外用) 群と上記剃毛処理から 24 日後 (塗布開始から 23 日後) に、背部全体の観察に加えて剃毛部のダーモスコピーを行った。さらに、各群のマウスの剃毛部を実体顕微鏡で観察し、単位面積当たりの体毛の本数を計数した。剃毛処理 1 日後 (塗布前) と剃毛処理 24 日後 (塗布開始から 23 日後) の各群のマウスの背部で検討したが、Sham 群、OVX 群ともに、トレハロースを含有する剤を塗布した群のほうが、顕著に剃毛部の体毛量が増加していた。OVX 群について、対照群 (Ctl) とトレハロース群 (TH) のマウスの剃毛部の典型的なダーモスコピー像を図 1 に示したが、ダーモスコピー像より明らかなように、トレハロース群において毛は太くなり本数が増加していた。



**OVX Ctrl**



**OVX TH**

図 1. トレハロース群において毛は太くなり本数が増加していた。

さらに、体毛の本数を測定したところ、OVX 群ではトレハロースを含有する外用剤を外用後に、剃毛部から発毛した体毛の本数が有意に増加していた（図 2）。以上から、トレハロースは発毛促進、毛の成長促進の効果を有することが明らかとなった。

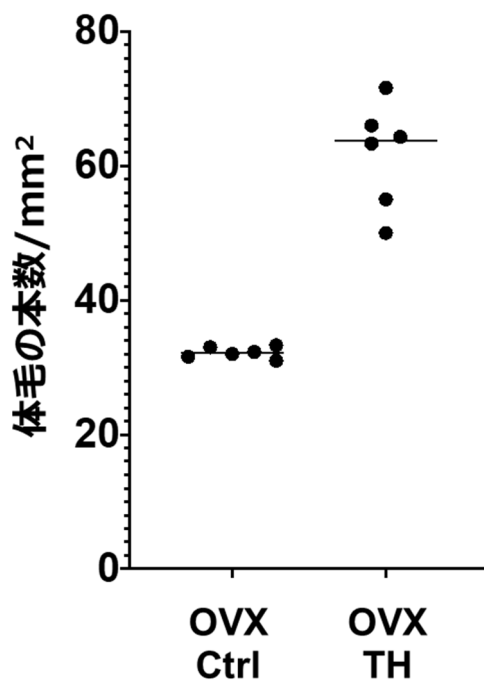


図 2. OVX 群ではトレハロースを含有する外用剤を外用後に、剃毛部から発毛した体毛の本数が有意に増加していた。

### 線維芽細胞、角化細胞、毛乳頭細胞など培養細胞におけるトレハロース刺激実験

トレハロース処理後の2次元培養ヒト線維芽細胞、角化細胞、毛乳頭細胞を用いて、mRNAレベル(リアルタイムPCR)及び蛋白レベル(WBおよびELISA)での増殖因子やエスロトゲン受容体関連分子について発現解析を行って、トレハロースによる機序につき検討した。qPCRの結果を図4に示した。培養24時間後において、30 mg/ml又は100 mg/mlトレハロースで処理した線維芽細胞(TH30及びTH100)では、処理前の細胞(0h)に比べてANGPT2 mRNA発現量の顕著な増加が見られた(図3)。トレハロースなしで培養を行った群(TH0)では、逆にANGPT2 mRNA発現量が減少した。トレハロースの代わりにヒアルロン酸オリゴ糖で処理した群(HA Oligo)は、トレハロースなしの場合と同様にANGPT2 mRNA発現量が減少した。トレハロースは線維芽細胞中のANGPT2遺伝子の発現を亢進する作用を有することが明らかとなったため、これにより女性ホルモンが減少した脱毛において抑制効果をもたらすことが示唆された。

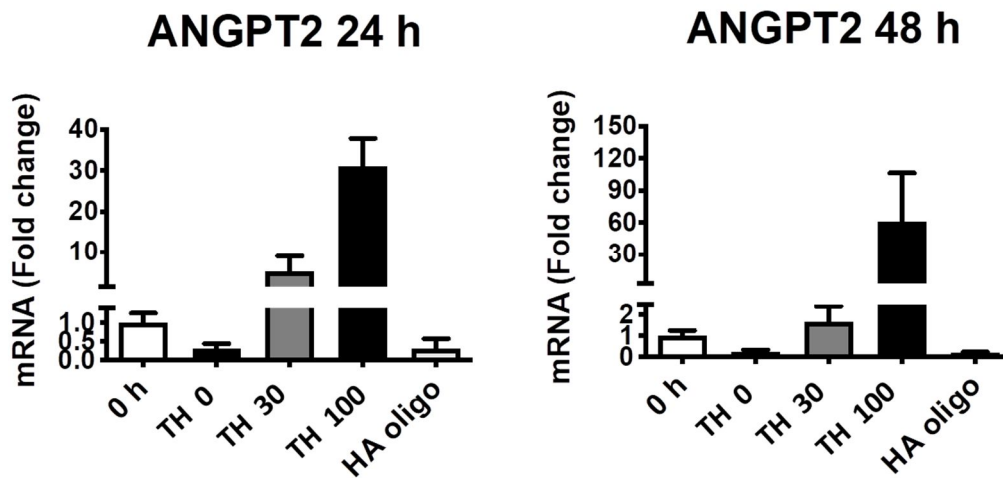


図3. トレハロースは線維芽細胞においてANGPT2遺伝子の発現を亢進する作用を有する

また、同様にヒト角化細胞、毛乳頭細胞についても、高濃度トレハロースにて処理した細胞からのサンプルを用いて細胞のmRNAレベルおよび培養液中の増殖因子群の蛋白発現につき、RNAseq解析とLEGENDplex growth factor panelを用いた測定を施行した。これらのデータを用いて、現在トレハロースによる育毛促進機序解明のための解析を詳細に行なっている。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Muto Jun, Fukuda Shinji, Watanabe Kenji, Dai Xiuju, Tsuda Teruko, Kiyoi Takeshi, Kameda Kenji, Kawakami Ryosuke, Mori Hideki, Shiraishi Ken, Murakami Masamoto, Imamura Takeshi, Higashiyama Shigeki, Fujisawa Yasuhiro, Mizukami Yoichi, Sayama Koji	4. 巻 6
2. 論文標題 Highly concentrated trehalose induces prohealing senescence-like state in fibroblasts via CDKN1A/p21	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-04408-3	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Jun Muto, Shinji Fukuda, Kenji Watanabe, Xiuju Dai, Teruko Tsuda, Takeshi Kiyoi, Kenji Kameda, Ryosuke Kawakami, Hideki Mori, Ken Shiraishi, Masamoto Murakami, Takeshi Imamura, Shigeki Higashiyama, Yasuhiro Fujisawa, Yoichi Mizukami, Koji Sayama
2. 発表標題 Highly concentrated trehalose induces prohealing senescence-like state in fibroblasts via CDKN1A/p21
3. 学会等名 International Society for Investigative Dermatology（国際学会）
4. 発表年 2023年～2024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
---------	---------