

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22590078

研究課題名(和文) 休止期の毛包に高発現する細胞増殖因子は毛成長をどのように制御するか？

研究課題名(英文) How does a telogen-elevated growth factor regulate hair growth?

研究代表者

今村 亨 (Imamura, Toru)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長

研究者番号：80356518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の増殖や分化を制御するシグナル分子群の一員であるFGF18が、休止期における毛包幹細胞領域で発現することは、既に発見されていた。しかし、FGF18の遺伝子を欠失させた実験動物では健康な個体が成長できないため、FGF18の生理的機能は十分に分かっていなかった。本研究では、皮膚の細胞のFGF18の遺伝子を特異的に欠失させたマウス(遺伝子ノックアウト動物)を作成しその性質を調べることで、FGF18が毛成長周期の休止期を維持するシグナル分子であることを初めて示した。

研究成果の概要(英文)：Hair follicles repeatedly cycle through growth (anagen), regression (catagen), and resting (telogen) phases. Although the signaling molecules involved in the anagen and anagen-catagen transition have been studied extensively, the signaling that controls telogen is only partly understood. Here we show that fibroblast growth factor (Fgf)18 is expressed in a hair stem cell niche throughout telogen, and that it regulates the hair cycle through the non-growth phases. When the Fgf18 gene is conditionally knocked out in keratin 5-positive epithelial cells in mice, telogen becomes very short, giving rise to a strikingly rapid succession of hair cycles. In wild-type mice, hair follicle growth during anagen is strongly suppressed by local delivery of FGF18 protein. Our results demonstrate that epithelial FGF18 signaling and its reduction in the milieu of hair stem cells are crucial for the maintenance of resting and growth phase, respectively.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：細胞生物学 細胞増殖因子 毛成長

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは一貫して細胞増殖因子 FGFs (fibroblast growth factors) の研究を行い、その受容体の精製に初めて成功し (Imamura et al. BBRC 1988)、疾病組織における FGF1 の細胞核局在の生物学的意義を初めて示し (Imamura et al. Science 1990)、FGF 群の有する生理的病理的な機能と分子機構の解析に先鞭をつけた。毛成長に関して、Fgf5 遺伝子の 2 種の産物による退行期の誘導制御を示してきた (Ozawa et al. J Biol Chem 1998, Suzuki et al. J Invest Dermatol 2000 他)。そして毛の成長を司る毛包で Fgf18 が、22 種類の Fgf 遺伝子中で最も高いレベルで発現することを初めて示した (Kawano et al. J Invest Dermatol 2005)。

Fgf18 は増殖因子でありながら、毛成長が休止する時期に、幹細胞に隣接する部位で最高レベルで発現する。その近傍には対応する受容体も発現している。FGF18 の薬理作用を調べたところ、休止期毛包を有する皮下に投与すると成長期の開始を早め、成長期毛包へ投与すると毛成長を抑制するという二相性の活性を示したことから、FGF18 の有する生理的な毛成長制御機能を理解するためには内在性の Fgf18 遺伝子発現を抑制するなどの解析が必要であることがわかった。

他の器官と異なり、毛包においては、個体発生の間だけでなく一生にわたり、周期的に器官形成類似の現象が繰り返される。すなわち、他の器官にはない、成長期・退行期・休止期というステージを有し、形態形成と動的恒常性の両視点から興味深い研究対象である。これまでに、一般の器官形成でも重要性の知られている上皮-間葉相互作用の責任シグナル分子群候補である FGFs, bone morphogenetic proteins (BMPs), Wnts, hepatocyte growth factor (HGF), epidermal growth factor (EGF) などの細胞増殖因子群の一部が、毛包の形成や成体の毛成長制御に関わる分子群として報告されている。しかし、休止期毛包に選択的に発現する細胞増殖因子の毛成長制御機能やその機構については、十分に研究されていなかった。

2. 研究の目的

本研究は申請者らが休止期の毛包に高発現することを発見した細胞増殖因子 FGF18 について、「休止期毛包に高発現する細胞増殖因子は毛成長をどのように制御するか?」という疑問に答えることを目的とした。

すなわち、ノックアウトマウスの表現型や毛包構成細胞に対する活性などのまだ解明されていない基礎的な問題を解決し、さらに FGF18 関連分子を毛成長関連疾患の診断治療薬として臨床応用へと展開するための研究基盤を確立することが目的である。

計画した具体的な研究項目は以下のものである。

(1) Fgf18 の皮膚特異的ノックアウトマウス

の毛成長表現型を解析する。

(2) 毛包構成細胞の増殖分化と in vitro 実験系などを用いて毛包形成への FGF18 の影響を解析する。

より具体的には、本研究では、皮膚特異的に Fgf18 遺伝子をノックアウトしたホモ変異体マウスを作成して、その個体の解析を通じて、毛包の形成と成長に Fgf18 遺伝子がどのように関与するかを解析することが目的である。その上で、野生型マウス及び Fgf18 ノックアウトマウスから取り出した毛包構成細胞とそれらによる生体外毛包形成系を用いて、FGF18 による制御をより精密に解析することとした。以下に詳細に述べる。

生理的な FGF18 がどのように毛成長制御に関与するかを調べるためには、薬理学的実験では限界があることが示されたため、内在性 Fgf18 遺伝子発現を抑制して表現型を調べる事が重要である。しかし、Fgf18 遺伝子の単純ノックアウトマウスは毛包の成長周期が始まる前である出生前後に死亡するため、本研究には利用不可能である。研究代表者は既に、Fgf18 遺伝子の皮膚特異的ノックアウトマウスの作成を開始していたので、本研究によってそれを完成させた上で、期間内に安定なホモノックアウトマウス系を確立できる。この皮膚特異的 Fgf18 ノックアウトマウスの毛包形成と成体での毛成長周期を、形態学的、生理学的、分子生物学的、生化学的に解析することにより、FGF18 が毛成長をどのように制御するかを明らかにすることが本課題のゴールであった。

さらに、毛包構成細胞を成体から分離して生体外で毛包形成を行う実験系についても、野生型マウスでこの系を確立しつつあることから期間内に計画通りの実行が可能であり、FGF18 が上皮-間葉系相互作用の中で誘起する反応を細胞レベルでも明らかにすることができると考えた。

本研究ではさらに、各種脱毛症の患者の患部皮膚における FGF18 発現と病態との関連を解析することにより、人の毛成長関連疾患においても FGF18 の関与があるかどうかを明らかにして、その知見を診断や治療に応用するための基盤を見出すことを目指した。

3. 研究の方法

研究では休止期の毛包に高発現することを発見した細胞増殖因子 FGF18 について、ノックアウトマウスの表現型や毛包構成細胞に対する活性などのまだ解明されていない基礎的な問題を解決し、さらに FGF18 関連分子を毛成長関連疾患の治療薬として臨床応用へと展開するための研究基盤を確立した。

具体的な研究項目は、(1) Fgf18 の皮膚特異的ノックアウトマウスの毛成長表現型の解析、(2) 毛包構成細胞の増殖分化と in vitro 実験系を用いた毛包形成への FGF18 の影響の解析、(3) 脱毛症と FGF18 の関連の解

析である。

(1) FGF18 の皮膚特異的のノックアウトマウスの毛成長表現型の解析

floxed Fgf18/Cre ホモ変異体マウスの作出

全身で Fgf18 遺伝子をノックアウトしたマウスは出生前後に死亡するため、出生後のイベントである毛の発生と周期的成長制御の研究ができなかった。本研究では、Fgf18 遺伝子のエクソン 3 を flox でターゲティングしたマウス ES 細胞を胚盤胞に移植し得られた産子から、薬剤耐性マーカーを取り除いた後、皮膚特異的に Cre recombinase を発現するマウスと交配することにより、Fgf18 遺伝子を皮膚特異的にノックアウトしたマウス (floxed/Cre ホモ変異体マウス) を作成する。既に Fgf18-floxed マウスと K-Cre マウスとの交配によって、floxed/Cre ヘテロ変異体マウスを作成できた。これを交配して、得られた産子を哺育させ、耳及尾部の皮膚から DNA を抽出し、サザンハイブリダイゼーションにより、Fgf18 遺伝子皮膚特異的のノックアウトマウスを同定した。

皮膚特異的 Fgf18 遺伝子ノックアウトマウス (ホモ変異体) の解析

皮膚特異的 Fgf18 遺伝子ノックアウトマウスにおける毛包形成と毛成長周期の進行について、対照群と比較し解析する。毛包制御機能分子に関する先行研究から、毛包形成期の毛成長と成体の周期を持った毛成長では制御機構が異なる部分があることが、知られている。このため、ノックアウトマウスの皮膚組織標本を経時的に作成し、毛包形成の段階 (胎生後期～生後 4 週間) と、成体の周期的な毛成長の両者について解析した。

具体的には、新生児～7 週齢までは自然飼育し、それ以降は抜毛処置による成長周期同調のあと飼育し、成長期、退行期、休止期の各段階で毛包を含む皮膚を採取する (右図)。毛包の変異を、組織学的、免疫学的、分子生物学的な手法で野生型及びヘテロマウスと比較対照することにより、Fgf18 遺伝子欠損が毛成長に与える影響を解析した。

(2) 毛包構成細胞の増殖分化と in vitro 毛包形成への FGF18 の影響の解析

野生型マウスの毛包構成細胞への FGF18 の活性の解析

休止期において、FGF18 の発現部位は毛包の最下部領域であることを既に見出している。この領域には毛包の基となる表皮幹細胞及び毛成長の司令塔である毛乳頭細胞の両者が存在する。そこでこれら両者をそれぞれ含む細胞集団を、野生型マウスの皮膚から単離し、初代培養を行う。その培養液に FGF18 タンパク質を 1, 10, 100, 1000ng/ml の各濃度で添加し、24 時間培養後の細胞の、細胞増殖、角化細胞については分化マーカーであるケラチン 14 (低分化型)、ケラチン 1 (高分

化型) など分化遺伝子発現、毛乳頭細胞については、Wnts, FGF7 など毛成長促進因子の発現、を解析した。

野生型マウス皮膚細胞を用いた毛包形成系における FGF18 活性の解析

最近、出生直前の胎児皮膚に由来する細胞は hanging drop 法により培養すると凝集し、適切な培養液で数日間培養すると毛包様構造体を自己形成することが明らかにされた。これは、出生直前の胎児の真皮画分には、真皮細胞及び表皮プラコード (毛包上皮原基) 由来細胞が含まれるため、これらを in vitro で培養することにより、自己凝集能による集合塊形成を経て前駆毛包様構造を形成するのだと解釈されている。生体内で FGF18 が生理的に機能するのは、休止期 成長期と考えられるため、このモデルは FGF18 の異種細胞集団での機能を解析するために適した系である。そこで、野生型マウス由来細胞を用いた in vitro 毛包形成系で毛包様構造体 (proto-hair follicles) 形成に与える FGF18 の影響を、形態形成、細胞増殖、角化細胞分化マーカーの点から解析した。

皮膚特異的 Fgf18 KO マウス皮膚細胞による毛包形成系での解析

本課題で作成した Fgf18 KO マウスの胎児から単離した皮膚構成細胞を用い、上記 b. と同様にして、毛包様構造体の形成を促し、その形成や各種遺伝子発現について解析する。さらに、形成された毛包様構造をヌードマウス皮下に移植し生着させて毛成長を促し、ヌードマウスに形成される毛包の成長と周期を解析した。

(3) 脱毛症と FGF18 の関連の解析

脱毛症患者の患部皮膚における FGF18 発現と病態との関連の相関の解析

脱毛症には様々な原因に起因する複数の種類があることが知られている。その中で FGF18 の機能と関連する脱毛症があるか否かを解析することが本項目の目的である。そのため、研究協力者の坪井教授より、東京医大病院皮膚科を受診した原発性瘢痕性脱毛症と男性型脱毛症患者の皮膚生検標本の供与を受けて、FGF18 の mRNA 及びタンパク質発現を解析する (倫理委員会承認)。可能であれば、laser micro dissection 法を用いる。得られた結果から、FGF18 の発現と病態との関連について予備的な検討を行う。この解析により、より詳細な解析が望まれる結果が得られた場合には、別途、本格的な解析研究を計画することとした。

4. 研究成果

研究責任者らは、シグナル分子 (細胞制御因子) である FGF18 が、毛の成長周期のうち、休止期を維持する重要な役割を果たしてい

ることを明らかにした。毛の成長は成長期、退行期、休止期の3相を周期的に繰り返す(毛成長周期)。この周期が適切に制御されることで、一生にわたって動物の体毛や頭髪が維持される。これまでに成長期を制御する分子は複数見つかっているが、幹細胞の静止を伴う休止期を生理的に維持するシグナル分子については、これまで個体レベルで明確に示されたものはなかった。

細胞の増殖や分化を制御するシグナル分子群の一員であるFGF18が、休止期における毛包幹細胞領域で発現することは、既に発見されていた。しかし、FGF18の遺伝子を欠失させた実験動物では健康な個体が成長できないため、FGF18の生理的機能は十分にわかっていなかった。本研究で、皮膚の細胞のFGF18の遺伝子を特異的に欠失させたマウス(遺伝子ノックアウト動物)を作成しその性質を調べることで、FGF18が毛成長周期の休止期を維持するシグナル分子であることを初めて示した。これにより、脱毛症などの疾病の診断・治療や創薬、毛包幹細胞を用いた神経損傷治療など再生医療に向けた貢献が期待される。

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1件)

Kimura-Ueki M, Oda Y, Oki J, Komi-Kuramochi A, Honda E, Asada M, Suzuki M, Imamura T. Hair cycle resting phase is regulated by cyclic epithelial FGF18 signaling. *J. Invest. Dermatol.* 132(5), 1338-1345, 2012.

〔学会発表〕(計7件)

1. Oda Y, Ueki M, Oki J, Kuramochi A, Asada M, Suzuki M, Imamura T. Cyclic epithelial fibroblast growth factor 18 signaling regulates telogen phase of hair cycle. *International Investigative Dermatology* 2013, Scotland, 2013

2. 今村 亨、細胞増殖因子 FGF ファミリーの生理機能及び分子機構と応用の研究、受賞記念講演、日本薬学会第133年会、2013/03/29

3. 今村 亨、織田 裕子、隠岐潤子、倉持 明子、本田 絵美、浅田 眞弘、鈴木 理、植木 美穂、Maintenance of hair cycle resting phase by cyclic epithelial FGF18 signaling, 第35回日本分子生物学会年会、2012/12/13

4. 今村 亨、織田 裕子、隠岐 潤子、倉持 明子、本田 絵美、浅田 眞弘、鈴木 理、植木 美穂、Telogen phase of hair growth cycle is regulated by cyclic epithelial FGF18 signaling, 日本研究皮膚科学会第37回年次学術大会、2012/12/07

5. 植木美穂、織田 裕子、本田 絵美、今村 亨、In vitro formation of proto hair follicles

with potential to develop into hair follicles in vivo., 第10回LS-BT合同研究発表会、2011/02/01

6. 植木 美穂、織田 裕子、倉持 明子、浅田 眞弘、鈴木 理、今村 亨、FGF18 signaling in regressing and resting phases of hair growth cycle in mice, 第10回LS-BT合同研究発表会、2011/02/01

7. 植木 美穂、織田裕子、本田 絵美、今村 亨、Morphogenesis of proto hair follicles in vitro and effects of growth factor signaling, 日本研究皮膚科学会第35回年次学術大会、2010/12/03

〔図書〕(計1件)

1. 今村 亨、毛髪周期の休止期を維持する分子機構、毛髪再生の最前線 - Advanced Technology of Hair Follicle Regeneration, p.16-25 (シーエムシー出版)、2013

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

名称: 毛の成長周期研究モデル動物

発明者: 今村 亨、植木美穂、織田裕子

権利者: 産業技術総合研究所

種類:

番号: 米国 13/819659

出願年月日: 2011年9月16日

国内外の別: 国外(PCT各国移行)

名称: 毛の成長周期研究モデル動物

発明者: 今村 亨、植木美穂、織田裕子

権利者: 産業技術総合研究所

種類:

番号: 欧州 11825257.6

出願年月日: 2011年9月16日

国内外の別: 国外(PCT各国移行)

名称: 毛の成長周期研究モデル動物

発明者: 今村 亨、植木美穂、織田裕子

権利者: 産業技術総合研究所

種類:

番号: 特願 2012-534060

出願年月日: 2011年9月16日

国内外の別: 国内(PCT国内移行)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

http://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2012/pr20120202/pr20120202.html

「産総研: 発毛サイクルの「休止期」を維持する因子を発見」

新聞報道 複数

6. 研究組織

(1)研究代表者

今村 亨（産業技術総合研究所）

研究者番号：80356518

(2)研究分担者

なし

研究者番号：

(3)連携研究者

なし

研究者番号：

(4)研究協力者

坪井良治（東京医科大学皮膚科学教室教授）

研究者番号：70221421