

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23650241

研究課題名(和文) ヒトと類似した発症機構を持つ革新的白髪モデル動物の開発

研究課題名(英文) Development of a model mouse line for hair graying

研究代表者

加藤 昌志 (Masashi, Kato)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10281073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：白髪は極めてありふれた毛髪の機能異常で、老化の象徴でもある。しかし、白髪の発症機構には現在でも不明な点が多い。近年の分子生物学の進歩により、生下時の黒毛が白毛に変化する遺伝子改変マウスの報告が国際科学誌に掲載されているが、ヒトと同じように加齢とともに白髪が発症するマウスはほとんど報告がない。研究代表者らは、生下時は黒色毛であるが、加齢とともに徐々に白髪を自然発症するオリジナルの動物モデルを開発した。本研究では、本マウスの白髪発症機構や病態を解明し、ヒトと極めて類似した白髪発症機構を持つモデル動物であることを証明するとともに、白髪予防剤・治療に有効な分子標的療法の開発に挑戦する。

研究成果の概要(英文)：Hair graying is an ordinary disorder for hair pigmentation and a symbol for aging. At present, mechanism of hair graying remains largely unknown, whereas reports for genetically modified mice with changing levels of hair pigmentation are increasing in international scientific journals, according to the recent progression of molecular biology. However, there is very limited report showing model mouse lines for hair graying with aging. We developed original mouse lines for hair graying with aging. In this study, we clarify pathogenesis and molecular mechanism of hair graying in the mice. We also provide the evidence that the mice could be appropriate model mice for hair graying with aging. Moreover, we challenge to develop molecular target therapy for anti-hair graying.

研究分野：分子生物学、皮膚科学、衛生学

キーワード：モデル動物 遺伝子改変マウス 白髪 メラノサイト

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトの白髪は長い歳月をかけて徐々に発症する。ゆえに、白髪発症機構の経時的解析を行うためには、ヒトと同じように加齢とともに白髪を自然発症する動物モデルが有効である。一方、現在までに白髪を発症する動物として、Bcl2-ノックアウトマウス、Tyr::Cre⁰;RBP-J^{flox/flox}-マウス Tyr::Cre⁰;Notch1^{flox/+};Notch2^{flox/flox}-マウス、ATR^{mKO}-マウス、Collagen 17-ノックアウトマウス、Mitf^{vit/vit}-マウス等が報告されている。しかし、生後数週間で発症する若白髪のモデル動物であったり、寿命が1-2ヶ月以下と短命であったり、白髪とともに脱毛になってしまったりと、加齢とともに白髪を発症するとは言い難いマウスも多い。出生時から白毛のマウスや一時的に白毛を発症するマウスはあるが、1年を超える寿命を持ち、加齢とともに白髪が進行するモデル動物は世界的にみても稀である。

(2) 研究代表者らは、15年以上にわたり皮膚および毛髪におけるメラニン・メラノサイトの制御機構を解明する研究を推進している (Kato et al. 2001; Kato et al. 2006)。本研究では、メラニン・メラノサイトの制御に関与する可能性のある分子を標的とした遺伝子改変マウスを作成し、加齢に伴い徐々に黒毛が白毛に変化するマウスを樹立した。本マウスにおける白髪発症機構がヒトと類似していることを証明できれば、世界的にも珍しい白髪モデルマウスを樹立することができる。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、本マウスが加齢とともに白髪を発症する機構を分子生物学および形態学的手法を用いて解析し、白髪の病態を解明するとともに、発症機構を解析する。

(2) 本マウスに発症した白髪とヒトの白髪を形態学的に比較し、白髪の病態や発症機構について類似性を検討する。

(3) マウスおよびヒトにおける白髪発症機構の解析結果に基づき、科学的根拠のある白髪の予防・治療に有効な分子標的療法の開発に挑戦する

3. 研究の方法

(1) Dct/LacZ-トランスジェニックマウスと代表者らの樹立した白髪を自然発症するモデルマウスを交配し、皮膚および毛胞のメラノサイトをLacZにより特異的に染色した。本染色法に加えて、フォンタナマッソン等の特殊染色・HE染色等を施行し、皮膚および毛包のメラニン・メラノサイトを形態学的に調べる。

(2) メラニン産生およびメラノサイトの増殖・細胞死の制御に関与する分子を標的として、免疫組織染色・ウェスタンブロット・定量PCRを施行し、皮膚および毛包における発現や活性を調べる。

(3) 白髪の原因となる可能性が報告されている酸化ストレスおよびDNA障害に対する皮膚・毛包への影響を8OHdG等のバイオマーカーを用いて調べる。

(4) 紫外線の皮膚およびメラニンに対する影響について、上記のマウスを用いた研究に加え、年齢・喫煙歴・Body Mass Index (BMI)・性別等を交絡因子として用いた多変量解析を用いた疫学的手法により、ヒトのレベルで解析する。

4. 研究成果

(1) 本マウスに発症した白髪を肉眼的に観察した。図1の左から右に示すように、加齢とともに白髪が増加していることが肉眼的観察により証明された。本モデルマウスにおける白髪の肉眼所見は、ヒトの白髪と類似していると評価した。



図1：白髪モデルマウスにおける1-2ヶ月齢(左)、3-4ヶ月齢(中)、9-10ヶ月齢(右)の毛髪の肉眼所見を示す。

(2) 白髪を自然発症するモデルマウスと野生型モデルマウスについて、LacZにより特異的に染色された毛胞のメラノサイトを組織学的に観察した。図2に示すように、黒毛には存在しているメラノサイトが白毛には存在しないことが証明された。ヒトの白髪には、メラノサイトがほとんど存在していないという過去の報告を合わせて考えると、本マウスとヒトの白髪の病態は類似していると考えられた。

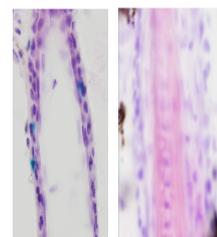


図2：白髪モデルマウスにおける黒毛(左)と白毛(右)におけるHE染色の組織所見を示す。

(3) 白髪モデルマウスを用いて、定量 PCR 解析・免疫組織解析等、さらに詳細な検討を行い、白髪の病態および発症に関する新しい白髪制御分子を見つけた。さらに、本分子機構の一部が、ヒトの白髪における病態および発症機構と共通している可能性を示し、モデルマウスとヒトの白髪間の類似性について考察した。

(4) 動物レベルの研究において、メラニン・メラノサイト制御分子に着目し、毛包における発現を免疫組織染色法にて解析した。さらに、メラニン・メラノサイト制御分子の発現を制御する可能性のある新規候補分子を発見した。

(5) 加齢に伴う組織障害について、特定の分子機能を修飾した遺伝子改変マウスを用いて検討した。先天的に分子機能に異常のある遺伝子改変マウスでは、野生型マウスに比較して、加齢性変化による組織障害の進行が加速されることにより、機能障害がより若年で顕性化する可能性が考えられた。

(6) メラノサイトの機能およびメラノサイトの生存制御に中心的関与する可能性が報告されている複数の分子に焦点をあて、これらの分子機能および発現を制御する可能性のある分子を発見した。さらに、これらの分子機能を修飾する可能性のある環境因子を提案した。

(7) メラノサイト系細胞の機能および生存を解析するには、メラノサイト以外の細胞に関する機能解析を同時に進める必要があることを考察した。

(8) メラノサイト系細胞の増殖・細胞死・遊走を制御する可能性のある新規分子を発見した。さらに、メラノサイト系細胞を用いて標的分子を過剰発現またはノックダウンさせることにより、分子機能の一部を解明した。本成果は、分子標的療法開発のための基礎データとして有効であると考えられた。

(9) 肉眼所見、組織所見といった形態学的解析結果に、発症および病態に関する分子機構解析を合わせ、本研究により樹立されたマウスは、白髪モデルマウスであると定義できると判断した。

(10) メラノサイト系細胞の増殖を制御する免疫細胞をターゲットとする免疫療法を動物レベルで検討し、分子標的療法開発のための基礎データを固めた。

(11) 試験管レベルの皮膚細胞を用いた実験により、酸化ストレス等の刺激により特定の分子経路が活性化され、皮膚細胞の増殖が促進される機構の一部を解明した。

(12) 皮膚メラニン量の少ないマウスと多いマウスを用いた動物実験において、酸化ストレスに対する影響を実験的に調べた。酸化ストレスおよび DNA 損傷のレベルについて、バイオマーカー (8OHdG) を指標とした解析により、皮膚メラニンが紫外線により誘発されるダメージを防御する作用がある可能性を示した。今後は、上記に示した効果について、単純にメラニンの紫外線防護作用によるものか、メラニンの抗酸化作用によるものか、その他の作用によるものか、を解明する必要がある。

(13) 色彩色差計を用いてヒトの皮膚メラニン量を客観的に評価しながら酸化ストレスおよび DNA 損傷のレベルを尿中 8OHdG レベルにて評価する疫学研究を遂行した。紫外線照射量 (mJ/cm^2) や紫外線暴露時間ではなく、1-2 日前に暴露された紫外線強度 (mW/cm^2) が尿中 8OHdG レベルに、より強く影響する可能性を示した。

(14) 疫学研究において、皮膚メラニン量が多いと、紫外線により誘発される酸化ストレスおよび DNA 損傷のレベルは、低減される可能性があることを示した。

(15) 疫学研究において、サンスクリーン (日焼け止め) の常用により、紫外線により誘発される酸化ストレスおよび DNA 損傷のレベルは、低減される可能性は低い (統計学的に有意な相関関係はない) ことが示された。

(16) メラノサイト系細胞を用い、MITF に関係する分子ネットワークの視点から、細胞増殖を考察した。

(17) G 蛋白質に焦点を当て、メラノサイト系細胞の増殖および遊走への影響を、試験管レベルと動物レベルで解析した。さらに、増殖および遊走を制御する c-SRC、AKT 等に着目し、G 蛋白質との関係を考慮しながら分子機構を解析した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

- ①. Yanagishita T, Yajima I, Kumasaka M, Iida M, Xiang L, Tamada Y, Matsumoto Y, Watanabe D, Kato M., An actin-binding protein Espin is a novel growth regulator for melanoma. *J Invest Dermatol*, 134:2996-9, 2014

- 査読あり
DOI: 10.1038/ni.2925.
- ②. Omata Y, Iida M, Yajima I, Takeda K, Ohgami N, Masaru Hori H, Kato M., Non-thermal atmospheric pressure plasmas as a novel candidate for preventive therapy of melanoma., *Environ Health Prev Med* 19:367-9, 2014. 査読あり
DOI: 10.1007/s12199-014-0399-1.
- ③. Végran F, Berger H, Boidot R, Mignot G, Bruchard M, Dosset M, Chalmin F, Rébé C, Dérangère V, Ryffel B, Kato M, Prévost-Blondel A, Ghiringhelli F and Apetoh L. , The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of TH9 cells., *Nature Immunology*, 15:758-66, 2014. 査読あり
DOI: 10.1038/ni.2925.
- ④. Yajima I, Iida M, Kumasaka MY, Ohgami N, Chang J, Ichihara S, Hori M, Kato M., Non-equilibrium atmospheric pressure plasmas modulate cell cycle-related gene expression levels in melanocytic tumors of RET-transgenic mice., *Exp Dermatol*, 23:424-5, 2014. 査読あり
DOI: 10.1111/exd.12415.
- ⑤. Iida M, Yajima I, Ohgami N, Tamura H, Takeda K, Ichihara S, Hori M, Kato M., Effects of non-thermal atmospheric pressure plasma irradiation on expression levels of matrix metalloproteinases in benign melanocytic tumors in RET-transgenic mice., *Eur J Dermatol*, 24: 392-4, 2014. 査読あり
DOI: 10.1684/ejd.2014.2330.
- ⑥. Yajima I, Kumasaka MY, Yamanoshita O, Zou C, Li X, Ohgami N, Kato M., GNG2 inhibits invasion of human malignant melanoma cells with decreased FAK activity., *Am J Cancer Res*, 4:182-8, 2014. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=GNG2+inhibits+invasion+of+human+malignant+melanoma+cells+with+decreased+FAK+activity.%2C>
- ⑦. Yanagishita T, Yajima I, Kumasaka M, Kawamoto Y, Tsuzuki T, Matsumoto Y, Watanabe D, Kato M., Actin-binding Protein, Espin: a Novel Metastatic Regulator for Melanoma., *Mol Cancer Res*, 12:440-6, 2014. 査読あり
DOI:10.1158/1541-7786.MCR-13-0468-T.
- ⑧. Yajima I, Kumasaka YM, Tamura H., Ohgami N, Kato M. Functional analysis of GNG2 in human malignant melanoma cells. *J Dermatol Sci*, 68:172-8, 2012. 査読あり
DOI: 10.1016/j.jdermsci.2012.09.009
- ⑨. Yajima I, Kumasaka YM, Thang ND, Goto Y, Takeda K, Yamanoshita O, Iida M, Ohgami N, Tamura H, Kawamoto Y, Kato M., RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT signaling in malignant melanoma progression and therapy., *Dermatol Res Prac* 2012:354191, 2012. 査読あり
DOI: 10.1155/2012/354191.002.
- ⑩. Yajima I, Kumasaka YM, Naito Y, Yoshikawa T, Takahashi H, Funasaka Y, Suzuki T, Kato M. Reduced GNG2 expression levels in mouse malignant melanomas and human melanoma cell lines. *Am J Cancer Res*, 2:322-329, 2012. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22679562>
- ⑪. Thang ND, Yajima I, Kumasaka MY, Ohnuma S, Yanagishita T, Hayashi R, Shekhar HU, Watanabe D, Kato M., Barium promotes anchorage-independent growth and invasion of human HaCaT keratinocytes via activation of c-SRC kinase. *PLoS ONE*, 6:e25636, 2011. 査読あり
DOI: 10.1371/journal.pone.0025636.
- ⑫. Yajima I, Kumasaka YM, Thang ND, Goto Y, Takeda K, Iida M, Ohgami N,

Tamura H, Yamanoshita O, Kawamoto Y, Furukawa K, Kato M., Molecular network associated with MITF on skin melanoma development and progression., J Skin Cancer, 2011:730170, 2011. 査読あり
DOI:10.1155/2011/730170.

- ⑬. Kato M, Iida M, Goto Y, Kondo T, Yajima I. Sunlight exposure-mediated DNA damage in young adults. , Cancer Epidemiol Biomaker Prevent, 20:1622-8, 2011. 査読あり
DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-11-0228.

〔学会発表〕(計5件)

①発表者：加藤昌志、飯田真智子
発表標題：メラニン制御によるアンチエイジング剤の開発
学会名：平成26年度バイオ系シーズ発表会
発表年月日：2014年12月10日
発表場所：愛知県産業労働センター ウィンクあいち（愛知県・名古屋市）

②発表者：加藤昌志
発表標題：オリジナルの動物モデルを用いた画期的なアンチエイジング剤の開発
BioTech 2014 国際バイオテクノロジー
発表年月日：2014年6月14～15日
発表場所：東京ビックサイト（東京都・江東区）

③発表者：加藤昌志
発表標題：環境因子により誘発される疾患の発症機構の解明と予防法の開発
学会名：第84回日本衛生学会学術総会 若手有志の会企画シンポジウム
発表年月日：2014年5月25-27日
発表場所：岡山コンベンションセンター（岡山県・岡山市）

④発表者：加藤昌志
発表標題：メラニン制御を可能にする画期的なアンチエイジング剤の開発
第2回国際化粧品展
発表年月日：2013年6月26日
発表場所：東京ビックサイト（東京都・江東区）

〔図書〕(計2件)

①加藤昌志 他、株式会社 エル・アイ・シー、モデル動物利用マニュアルシリーズ 疾患モデルの作製と利用、2012、第I部疾患モデルの作成と利用、第2章多臓器発がんモデル、第7節 Ret 633 (237-242)

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)
①名称：幹細胞を標的とした薬効及び毒性の評価法
発明者：飯田真智子、加藤昌志
権利者：名古屋大学
種類：特許
番号：特願2012-243119（特願2013-131956 国内優先）
出願年月日：2012年11月2日（2013年6月24日国内優先）
国内外の別：国内

②名称：加齢性白髪モデル動物
発明者：加藤昌志、飯田真智子
権利者：名古屋大学
種類：特許
番号：特願2012-010573
出願年月日：2012年1月23日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等
名古屋大学大学院医学系研究科・医学部医学科
<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/2511/index.html>

名古屋大学大学院医学系研究科 環境労働衛生学
<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/hygiene/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
加藤 昌志 (KATO, Masashi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10281073

(2) 研究分担者
武田 湖州恵 (TAKEDA, Kozue)
中部大学・生命健康科学部・准教授
研究者番号：80345884
(平成23-24年度)

(3) 研究分担者
後藤 友二 (GOTO, Yuji)
中部大学・生命健康科学部・助手
研究者番号：70362522
(平成23-24年度)