

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：82601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670160

研究課題名(和文)ヌードマウスに発毛を誘導する因子の同定

研究課題名(英文)Identification of hair growth factor in nude mice

研究代表者

堀内 新一郎(Horiuchi, Shinichiro)

国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・非常勤職員

研究者番号：60588234

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)：本研究では癌細胞株Aの移植によりヌードマウスの発毛が促進することを見出した。発毛を促進する因子を同定するために、癌細胞株Aの腫瘍抽出物により発現が変化する遺伝子を網羅的に解析したところ、ミトコンドリア、細胞内のカルシウムの恒常性に関する遺伝子の発現が上昇し、細胞死に関する遺伝子発現が低下していることが明らかになった。これらは発毛や脱毛の抑制にとって重要な因子である。また、癌細胞株Aの培養上清がヒト毛乳頭細胞の増殖を促進することを見出した(分担者の成果)。

研究成果の概要(英文)：The hair growth promotion in nude mouse by transplanting cancer cell line A was observed in this research. Global analysis of gene expression was performed using iTRAQ to identify hair growth factors, and expression altered genes by supplement of tumor cell extract were categorized based on gene ontology using DAVID Bioinformatics Resources. Upregulated genes were categorized into group related to mitochondria and calcium homeostasis. On the other hand, downregulated genes were categorized into group related to cell death. These factors play an essential role in hair growth and suppression of hair loss. Furthermore, culture supernatant of cancer cell line A promoted significantly to proliferation in human dermal papilla cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：発毛 癌細胞 腫瘍細胞 増殖促進 毛乳頭細胞 網羅的解析

1. 研究開始当初の背景

申請者は癌研究の手法として、種々の培養癌細胞を用いて、in vitro での実験を行うとともに、癌細胞をヌードマウス皮下に移植し、in vivo での増殖機構解明、増殖抑制法の開発などを行っている。最近、胸膜浸潤性の培養ヒト肺腫瘍細胞をヌードマウス(Balb C nu/nu, オス4-6週齢)皮下に移植する実験を進めている過程で、きわめて興味深い現象を見いだした。皮下移植腫瘍の増殖が進むとともに、無毛のヌードマウスに体毛が出現し、全身に体毛が密生した。再現性を確認するため、15匹のヌードマウスに腫瘍を移植した。マウスにより体毛出現の程度に差はあるものの、全てのマウスに同様の現象が出現した。このことより腫瘍から発毛を促進する因子が分泌されている可能性が強く示唆された。

2. 研究の目的

癌細胞は自らが増殖するために種々の成長因子が分泌している。それらの成長因子は癌細胞以外の細胞においても増殖を誘導することが知られている。申請者はヌードマウスの皮下に癌細胞株を移植した際にヌードマウスにおいて発毛が促進することを見いだした。本研究は、癌細胞株をヌードマウスの皮下に移植した際に出現した発毛現象の作用機序を解明するとともに、癌細胞株より分泌される発毛促進因子を同定することを目的とする。発毛促進因子の精製・同定を進めるにあたり必要な癌細胞株 A による発毛促進効果の指標となる遺伝子の探索を行った。また、ヌードマウスは FOXP1 遺伝子が欠損することによって無毛と胸腺欠損の両方の形質を発現する。そこで癌細胞株 A の FOXP1 シグナル経路への影響を検討し、発毛と胸腺の関係を明確にすることを試みた。さらに毛髪の発生や成長を促す毛乳頭細胞の増殖への癌細胞株 A の影響について検討した。

3. 研究の方法

(1) ヌードマウスの発毛への影響

3種類の癌細胞株(A、B、C)をヌードマウスの皮下に移植して発毛の様子を観察した。その後、発毛効果が観察された癌細胞株と発毛効果が観察されなかった細胞株をそれぞれ6匹のヌードマウスの皮下に移植し、長期間(2ヶ月)にわたり発毛の様子を比較観察した。

(2) FOXP1 シグナル経路への影響

各種細胞株(皮膚由来細胞3株、メラノーマ細胞1株、腎臓由来細胞1株、肺癌細胞1株)を至適条件下でコンフレントな状態まで培養した後、無血清培地に置換し、癌細胞株 A の腫瘍抽出物を添加して24時間培養した。培養終了後直ちにRIPAバッファーでタンパク質を回収した。回収したタンパク質はウェスタンブロットに供じ、FOXP1 シグナル経路の遺伝子(FOXP1、PLC-1、KRTHA3B)の発現

を調べた。

(3) 網羅的発現解析

ヒト皮膚由来細胞株を至適条件下でコンフレントな状態まで培養した後、無血清培地に置換し、癌細胞株 A の腫瘍抽出物を添加して24時間培養した。培養終了後直ちにRIPAバッファーでタンパク質を回収した。回収したタンパク質は-80℃で凍結した。凍結したタンパク質はBioGARAGEに発送し、iTRAQにて網羅的にタンパク質の発現を測定した。iTRAQは、タンパク質のトリプシン処理により得られたペプチドを標識し、MS解析することにより、複数のサンプル間においてタンパク質の網羅的な比較定量を行う技術である。iTRAQ測定結果から独立した2回の実験で腫瘍抽出物により発現が2倍以上となった遺伝子のリスト、もしくは1/2以下となった遺伝子のリストを作成した。それぞれの遺伝子リストはThe Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery(DAVID: <https://david-d.ncifcrf.gov/>)により解析し、リストに濃縮されている遺伝子群を遺伝子オントロジーに基づき分類した。

(4) 癌細胞株 A の分泌サイトカイン解析

癌細胞株 A と癌細胞株 B 至適条件下でコンフレントな状態まで培養した後、無血清培地に置換し、24時間培養した。培養終了後、培養上清を回収した。回収した培養上清中の炎症系のサイトカイン(IL1B, IL4, IL6, IL10, IL12, IL17A, IFN, TNF, TGF-1, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b)をELISAにより測定した。

(5) ヒト毛乳頭細胞の増殖への影響

ヒト毛乳頭細胞を癌細胞株 A の培養上清を用いて培養した場合と通常の培地を用いて培養した場合で増殖を比較した。

(6) 発毛促進因子の同定

癌細胞株 A の培養上清を陰イオン交換樹脂で2分画に分類し、ヒト毛乳頭細胞の増殖への影響を観察した。また、増殖促進効果が観察された分画において、ヒト毛乳頭細胞の増殖促進効果が知られている既知の成長因子(TGF-、VEGF、b-FGF)をELISAで解析した。

4. 研究成果

(1) ヌードマウスの発毛への影響

発毛効果の高い癌細胞株を見いだすために、発毛を誘導する候補となる癌細胞株 A と癌細胞株 C、発毛を誘導しないことが確認されている細胞株 B をヌードマウス(1匹ずつ)の皮下に移植し、発毛の経過を観察した。移植後19日目に癌細胞株 A を移植したヌードマウスにおいて、癌細胞株 B、C を移植したヌードマウスや癌細胞を移植していないヌードマウスと比較して明確な発毛の促進が

観察された (図 1)。そこで癌細胞株 A と癌細胞株 B を各 6 匹のヌードマウス移植し、長期間 (2 ヶ月間) にわたり発毛の様子を比較観察した。全てのヌードマウスで発毛は観察され、発毛部位が頭部から臀部へと徐々に移動するサイクルが繰り返された。この際、癌細胞株 A を移植したヌードマウスでは、毛髪の長さが全体的に長く、他のマウスでは脱毛している部位においても発毛が観察された。以上のことから癌細胞株 A は発毛を促進するとともに、脱毛を抑制していることが示唆された。

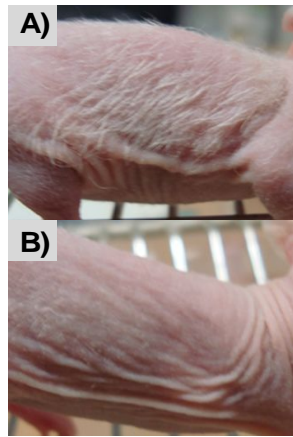


図 1 ヌードマウスにおける発毛の様子 (19 日目)
A) 癌細胞株 A B) 移植なし

(2) FOXN1 シグナル経路への影響

ヌードマウスは FOXN1 遺伝子の欠損によって無毛と胸腺欠損の両方の形質が発現する。このため癌細胞株 A の分泌物は FOXN1 シグナル経路を活性化し、発毛を促進している可能性が考えられる。FOXN1 シグナル経路への癌細胞株 A の影響を検討するために、癌細胞株 A の腫瘍抽出物を各種細胞株 (皮膚細胞 3 株、メラノーマ細胞 1 株、腎臓癌細胞 1 株、肺癌細胞 1 株) に添加し、FOXN1 シグナル経路の遺伝子 (FOX-1、PLC-1、KRTHA3B) の発現変化をウェスタンブロットにより観察した。いずれの細胞においても腫瘍抽出物の添加による FOXN1 シグナル経路の遺伝子の発現変化は観察されなかった。以上のことから癌細胞株 A による発毛促進効果には、FOXN1 シグナル経路以外の経路が関与していることが推察される。

(3) 網羅的発現解析

癌細胞株 A による発毛促進の作用機序解明や発毛促進因子を同定する際のマーカー遺伝子の探索のために、癌細胞株 A の腫瘍抽出物による発現変化を網羅的に解析した。癌細胞株 A の腫瘍抽出物を添加した条件と添加しない条件でヒト皮膚由来細胞株を培養し、そのヒト皮膚由来細胞株から回収したタンパク質の発現を iTRAQ により測定し、発現比較解析を行った。2 度の独立した実験で発現が 2 倍以上となった遺伝子のリスト (71 遺伝子) 1/2 以下となった遺伝子のリスト (49 遺伝子) を作成し、それぞれのリストを DAVID により解析した。癌細胞株 A の腫瘍抽出物により発現が増加した遺伝子リストには、ミトコンドリアやカルシウムの恒常性に関する遺伝子

が濃縮されており (図 2)、癌細胞株 A の腫瘍抽出物により発現が低下した遺伝子リストには、細胞死に関する遺伝子が濃縮されていた。発毛にはミトコンドリアの活性化やカルシウム恒常性の維持が重要であること、またアポトーシスなどの細胞死が脱毛に関与することが知られており、DAVID による解析結果は、癌細胞株 A による発毛促進を支持するものであった。また、これらの発毛との関連性が示唆された遺伝子の中で発現量が多く、発現変化が大きい遺伝子をマーカーとし、発毛促進因子のスクリーニングを行える可能性が考えられる。

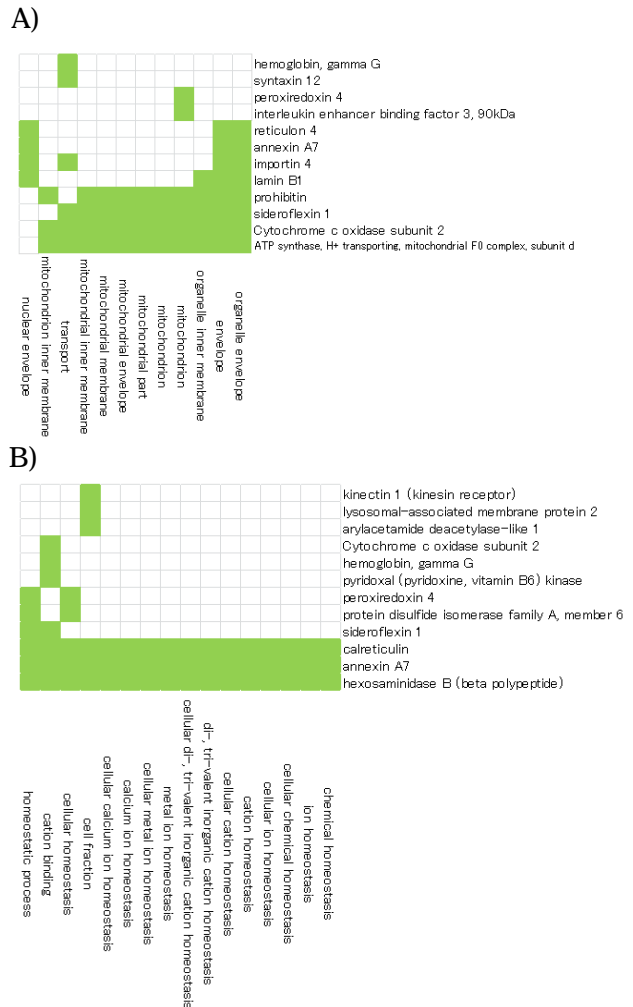


図 2 DAVID 解析により形成されたクラスター - 癌細胞株 A の抽出物により発現が上昇した遺伝子を DAVID により解析した。

- A) ミトコンドリアに関連するクラスター
- B) 細胞の恒常性に関連するクラスター

(4) 癌細胞株 A の分泌サイトカイン解析

炎症系サイトカイン (IL1B, IL4, IL6, IL10, IL12, IL17A, IFN, TNF, TGF-1, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b) が脱毛を誘導することが知られている。癌細胞株 A による発毛促進効果と炎症系サイトカインの関連性を検討するために、発毛促進効果が観察された癌細胞株 A と発毛促進効果が観察されなかった癌細胞

株 B において炎症系サイトカインの分泌を ELISA により比較した。癌細胞株 A では 12 種類の炎症系サイトカインのうち 11 種類が検出限界以下で、検出された TGF- β 1 の分泌も癌細胞株 B の 1/3 以下であった。以上のことから、癌細胞株 A は、脱毛を誘導する炎症系サイトカインの分泌が少なく、発毛促進効果が現れやすい環境であることが推察される。

(5) ヒト毛乳頭細胞の増殖への影響
(分担者の成果)

癌細胞株 A の分泌物がヒト毛乳頭細胞の増殖に及ぼす影響を検討するために、ヒト毛乳頭細胞を癌細胞株 A の培養上清を用いて培養した場合と通常の培地を用いて培養した場合で増殖を比較した。ヒト毛乳頭細胞の培養に癌細胞株 A の培養上清を用いることで、ヒト毛乳頭細胞の増殖が促進することが明らかになった。このことから、癌細胞株 A の分泌物がヒト毛乳頭細胞の増殖を介して発毛促進効果に關与している可能性が示唆された。

(6) 発毛促進因子の同定 (分担者の成果)

癌細胞株 A の培養上清からヒト毛乳頭細胞の増殖を促進する因子を同定するために、培養上清を陰イオン交換樹脂で 2 分画 (A、B) に分類し、ヒト毛乳頭細胞の増殖への影響を観察した。B 分画において増殖を促進する効果が観察された。そこで、ヒト毛乳頭細胞の増殖促進効果が知られている既知の成長因子 (TGF- β 、VEGF、b-FGF) を ELISA で解析した。いずれの成長因子も検出限界以下であった。このことから、B 分画には新規の成長因子が含まれる可能性が示唆された。

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)

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀内 新一郎 (HORIUCHI Shinichiro)

国立医薬品食品衛生研究所 薬理部
非常勤職員

研究者番号 : 60588234

(2) 研究分担者

久保田 俊一郎 (KUBOTA Shunichiro)

帝京平成大学 薬学部
教授

研究者番号 : 00260480