

令和元年5月16日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10120

研究課題名(和文)水疱形成による癬痕型脱毛症の新規モデル作製と病態解明

研究課題名(英文) Establishment of cicatricial alopecia animal models

研究代表者

中村 秀樹 (Nakamura, Hideki)

北海道大学・医学研究科・助手

研究者番号：60435956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：癬痕型脱毛症は、毛包の減少と周囲の線維化を特徴とする脱毛の一種である。本研究では、マウス背部皮膚への水疱形成によって、その後継続する毛包への変化を詳細に解析することで、癬痕型脱毛症の発症機序を解明することを目的に行った。主要な成果として、水疱形成後に再上皮化した創傷部位では、毛包の発達/周期が遅延することが明らかとなった。これとともに、数層の上皮化が完了した部位に関して、炎症細胞の浸潤は乏しく、正常部位と比較して差はなかった。これらの結果を総合すると、水疱形成にともなう脱毛の初期段階では、毛包の成長に必要な上皮細胞の増殖が再上皮化反応へと向けられ、炎症の関与は乏しいことが解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癬痕型脱毛症は、全身性エリテマトーデスなどの膠原病や毛孔性扁平苔癬などでしばしば見られる症状であり、初期段階において毛包をアタックする炎症細胞浸潤を抑制するための、十分な抗炎症療法が重要であると考えられてきた。しかしながら、本研究の成果で、むしろ脱毛の初期段階では毛包上皮細胞の増殖が創傷の治癒へと傾いてしまい、十分に毛包の成長へと向けられていないことが観察されたため、抗炎症療法のみならず、上皮細胞の増殖・分化の調整が早期治療に重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cicatricial alopecia is a type of hair loss characterized by loss of hair follicles and surrounding fibrosis. The aim of this study was to elucidate the mechanism of cicatricial alopecia by analyzing the hair follicles in the blistered skin of mice in detail. A major finding was a delay in hair follicle development/cycling at the re-epithelialized wounds after blistering. At the same time, infiltration of inflammatory cells was poor at the site where several layers of epithelization were completed, and there was no difference compared to the intact site. Taken together, these results indicate that the early stage of cicatricial alopecia involves less inflammation, with the proliferation of epithelial cells required for hair follicle growth directed toward re-epithelialization.

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚病態学 癬痕型脱毛症 17型コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

表皮と真皮の両者の相互作用によって毛包組織をはじめとした皮膚の恒常性は維持されている(図 1A)。表皮と真皮の境界部に炎症や欠損蛋白による機能障害が起きると、毛包組織は退縮して線維化が進むといった癬痕型脱毛の表現型を呈する(図 1B)。例えば、膠原病の代表疾患である全身性エリテマトーデス、その皮膚限局型である円板状エリテマトーデス、あるいは扁平苔癬の亜型である毛孔性扁平苔癬では、表皮真皮境界部への炎症性変化によって、癬痕型脱毛に至る(図 1C)。また、表皮真皮境界部構成蛋白の先天的な欠損や機能異常によって生じる表皮水疱症でも、17 型コラーゲン(COL17)・ラミニン 332 欠損の接合型表皮水疱症や 7 型コラーゲン欠損の劣性栄養障害型表皮水疱症など複数の病型において癬痕型脱毛を呈する(図 1D)。しかし、癬痕型脱毛の生じる機序は全く解明されておらず、発症すると将来的に発毛は期待できないうえに、治療法も皆無である。過去の研究では、皮膚全層に対する創傷が毛包形成に与える影響が検討されてきており、マクロファージからの分泌因子が毛包幹細胞に作用し、創傷周囲から毛包が成長してくることが報告されている(Chen CC et al., *Cell* 2015)。これに対して本研究は、表皮と真皮の物理的解離である水疱を利用するという点が特徴的である。これによって、i) 表皮と真皮の相互作用の阻害による上皮形成の異常を解明でき、また ii) 表皮真皮境界部が障害されて生じる癬痕型脱毛の疾患モデルとなることから、これまで行われてきた皮膚全層の創傷治癒の研究とは大きく異なっており、独創的である。本研究では、申請者らのこれまでの知見を活かし、表皮真皮境界部に対する障害をベースとした癬痕型脱毛の疾患モデルを作製し、その病態解明によって新規治療法の開発へとつなげる。

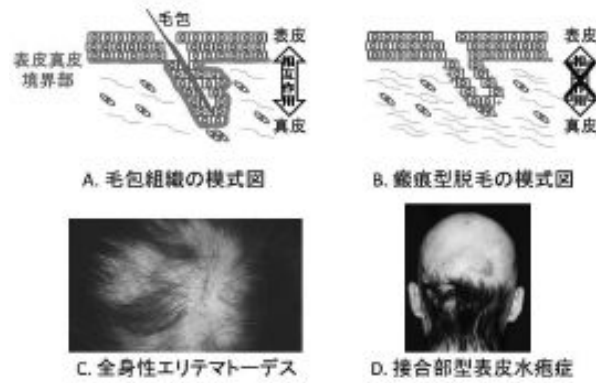


図1. 毛包組織と表皮真皮境界部の障害による癬痕型脱毛

2. 研究の目的

本研究の目的は、表皮真皮境界部に対する障害をベースとした癬痕型脱毛の疾患モデルを作製し、その病態解明によって新規治療法の開発へとつなげることである。上皮と間質は相互作用し、互いの分化や増殖を調節している。皮膚では、上皮である表皮と間質である真皮が基底膜を介して接着し、クロストークすることによって毛包組織をはじめとする皮膚の器官を維持している。表皮と真皮の境界部に炎症や機能異常が生じると、毛包組織においては毛包の破壊と線維化が進行し、癬痕型脱毛の表現型を呈する。本研究では、マウス生体皮膚に物理的刺激を加えることで水疱を形成し、表皮真皮境界部に対する障害をベースとした癬痕型脱毛の疾患モデルを作成する。表皮と真皮の相互作用を阻害した後の毛周期への影響を詳細に観察することにより、難治性癬痕型脱毛の病態解明と Key factor を同定し、新規治療法の開発へとつなげることを目的としている。

3. 研究の方法

本研究では、マウス皮膚に水疱を作成し、表皮と真皮を物理的に解離させることによって、癬痕型脱毛の新規マウスモデルを樹立する。Col17^{-/-}マウス(Nishie W, Nakamura H et al., *Nat Med* 2007)の新生仔皮膚は、軽微な擦過を加えることで水疱形成する(図 2A)。このマウスの水疱形成部位では、毛包が組織学的に著明に減少している(図 2B)。水疱形成した部位は、その 2 週間後から周囲と比較して明らかな毛包の成長阻害が確認される(図 2C)。本研究では、Col17^{-/-}マウスに対する擦過による水疱と野生型マウスに対する陰圧による水疱という 2 つの実験系を用いて、水疱形成にともなう毛周期への経時的影響を明らかにする。

- (1) 癬痕型脱毛症モデルマウスの樹立: Col17^{-/-}マウス、野生型マウスの水疱形成部位の毛包表皮幹細胞、間葉系細胞の動態を組織学的に検討する。
- (2) 毛包形成に関連するシグナリング動態の検討: Wnt シグナルや

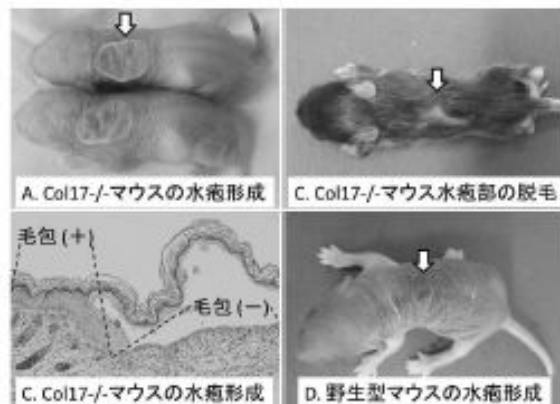


図2. 水疱形成による癬痕型脱毛モデルの作成

BMP シグナルを中心に水疱形成によって毛包組織に及ぼされるシグナル変化を解析する。

- (3) 水疱形成から生じる炎症の毛周期への影響の検討：水疱形成部位の浸潤炎症細胞を同定し、CD11cDTR マウスや Rag2^{-/-}マウス、TCR- double^{-/-}等の免疫不全マウスを用いて免疫細胞による癬痕型脱毛の病態への関与を評価する。
- (4) ヒト癬痕型脱毛症患者検体の解析
得られた知見がヒト癬痕型脱毛症患者検体で再現できるか組織学的に検討する。

4. 研究成果

水疱形成後の再上皮化においては、毛包上部の幹細胞の寄与が強く、表皮幹細胞の寄与は乏しかった。同時に、水疱形成後に再上皮化した創傷部位では、毛包の発達/周期が遅延していた(図1)。この反応は野生型マウスよりも Col17^{-/-}マウスで顕著に見られた。Wnt シグナルを LacZ で可視化する insTOP-GAL マウスの水疱形成では、再上皮化部位に一致して LacZ の発現がみられたが、遺伝子発現を確認すると再上皮化部位において Wnt シグナル分子の発現は低下していた(図2)。この結果は、insTOP-GAL マウスでみられた LacZ の再上皮化部位での発現は、Wnt シグナルが通常必要な毛包上皮細胞が再上皮化部位へと遊走する過程を観察しているものであり、実際の再上皮化部位の遺伝子発現を反映するものではないことが考えられた。また、再上皮化部位では炎症細胞をリクルートするサイトカインの遺伝子発現は上昇していたものの、数層の上皮化が完了した部位に関しては、好中球・マクロファージ・リンパ球等の炎症細胞の浸潤は乏しく、正常部位と比較して差はなかった。これらの結果を総合すると、水疱形成にともなう脱毛の初期段階では、毛包の成長に必要な上皮細胞の増殖が再上皮化反応へと向けられ、炎症の関与は乏しいことが解明された。

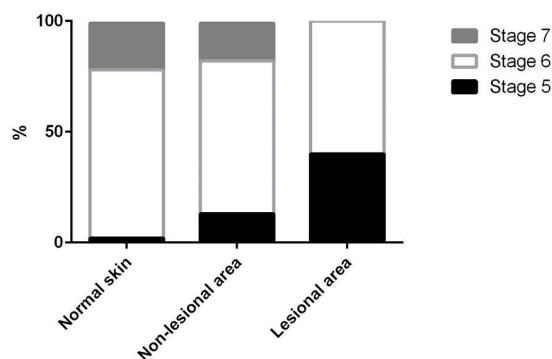


図1. 微小創傷部位における毛包の器官形成

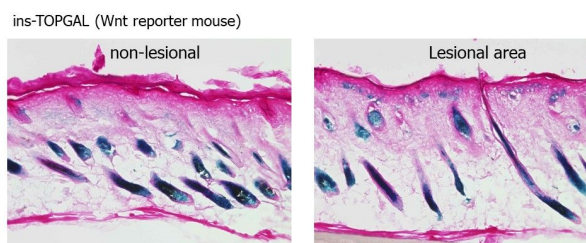


図2. 微小創傷部位のWntレポーター発現

癬痕型脱毛症は、全身性エリテマトーデスなどの膠原病や毛孔性扁平苔癬などでしばしば見られる症状である。毛包周囲には、稠密な炎症細胞が通常観察されることから、初期段階において毛包をアタックする炎症細胞浸潤を抑制するための、十分な抗炎症療法(ステロイドや免疫抑制剤)が重要であると考えられてきた。しかしながら、本研究の成果で、むしろ脱毛の初期段階では毛包上皮細胞の増殖が創傷の治癒へと傾いてしまい、十分に毛包の成長へと向けられていないことが観察されたため、抗炎症療法のみならず、上皮細胞の増殖・分化の調整が早期治療に重要である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7件)

1. Efficient gene reframing therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa using CRISPR/Cas9
Takashima S, Shinkuma S, Fujita Y, Nomura T, Ujiie H, Natsuga K, Iwata H, Nakamura H, Vorobyev A, Abe R, Shimizu H. J Invest Dermatol. 2019 Mar 1. pii: S0022-202X(19)30185-X. (査読あり)
2. The direct binding of collagen XVII and collagen IV is disrupted by pemphigoid autoantibodies.
Kamaguchi M, Iwata H, Nishie W, Toyonaga E, Ujiie H, Natsuga K, Kitagawa Y, Shimizu H. Lab Invest. 2019 Jan;99(1):48-57. doi:10.1038/s41374-018-0113-9. Epub 2018 Aug 8. (査読あり)
3. Loss of interaction between plectin and type XVII collagen results in epidermolysis

bullosa simplex.

- Natsuga K, Nishie W, Nishimura M, Shinkuma S, Watanabe M, Izumi K, Nakamura H, Hirako Y, Shimizu H. Hum Mutat. 2017 Dec;38(12):1666-1670. (査読あり)
4. A case of recessive dystrophic epidermolysis bullosa with a novel c.6885_6898del14 mutation in the COL7A1 gene.
Shinkuma S, Masunaga T, Miyawaki S, Takashima S, Natsuga K, Nomura T, Fujita Y, Nakamura H, Shimizu H. J Dermatol Sci. 2017 Oct;88(1):139-141. (査読あり)
 5. Type XVII collagen coordinates proliferation in the interfollicular epidermis.
Watanabe M, Natsuga K, Nishie W, Kobayashi Y, Donati G, Suzuki S, Fujimura Y, Tsukiyama T, Ujiie H, Shinkuma S, Nakamura H, Murakami M, Ozaki M, Nagayama M, Watt FM, Shimizu H. Elife. 2017 Jul 11;6. pii: e26635.. (査読あり)
 6. The first familial cases of epidermolysis bullosa simplex, generalized severe with p.Asn176Ser in KRT5 revealing the clinical chronology.
Sugai T, Shinkuma S, Inafuku K, Takashima S, Nomura T, Fujita Y, Nakamura H, Shimizu H. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2017 May;31(5):e251-e253. (査読あり)
 7. Epitope-dependent pathogenicity of Abs targeting a major bullous pemphigoid autoAg collagen XVII/BP180.
Wada M, Nishie W, Ujiie H, Izumi K, Iwata H, Natsuga K, Nakamura H, Kitagawa Y, Shimizu H. J Invest Dermatol. 2016 May;136(5):938-946. (査読あり)

[学会発表](計 9件)

1. Differences in collagen XVII expression between skin and oral mucosa affect the pathogenicity of pemphigoid IgG.
Kamaguchi M, Iwata H, Ujiie H, Natsuga K, Nishie W, Asaka T, Shimizu H, Kitagawa Y. 14th Biennial Congress of the European Association of Oral Medicine, 2018年9月27 - 29日, Lindholmen Conference Center, Gothenburg, Sweden (国際学会)
2. Cultured epidermal autograft from clinically revertant skin in recessive dystrophic epidermolysis bullosa.
Fujita Y, Matsumura W, Shinkuma S, Takashima S, Suzuki S, Nomura T, Nakamura H, Inoie M, Shimizu H. International Investigative Dermatology 2018. 2018年5月16 - 19日, Orlando, Florida, USA (国際学会)
3. Normal appearance of epidermal basement membrane zone in nail-patella syndrome patients.
Shinkuma S, Nakamura H, Takashima S, Nomura T, Fujita Y, Matsumura K, Shimizu H, Abe R. The 42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology 2017年12月15 - 17日, Kochi City Culture Plaza, Kochi, Japan
4. Long lasting epithelization after cultured epidermal autograft with revertant mosaicism in recessive dystrophic epidermolysis bullosa.
Matsumura W, Fujita Y, Takashima S, Nakayama C, Ujiie I, Shinkuma S, Nakamura H, Sawamura D, Inoie M, Shimizu H. DEBRA International Congress 2017年11月24 - 26日, CQ Hotel, Wellington, New Zealand (国際学会)
5. Two families of nail-patella syndrome with splice site mutations.
Shinkuma S, Nakamura H, Takashima S, Nomura T, Fujita Y, Hasegawa S, Sato-Matsumura K, Shimizu H, Abe R. The 47th Annual European Society for Dermatological Research Meeting 2017年9月27日 - 30日, Salzburg Congress Center, Salzburg, Austria (国際学会)
6. Abnormalities in laminin-332 have post-translational effects on laminin 2.
Natsuga K, Nishie W, Watanabe M, Nakamura H, Shinkuma S, Shimizu H. EB2017 - 5th World Conference of EB Research 2017年9月24 - 27日, Crowne Plaza Salzburg, Salzburg, Austria (国際学会)
7. A case of recessive dystrophic epidermolysis bullosa with a novel c.6885_6898del14 mutation.
Shinkuma S, Masunaga T, Miyawaki S, Takashima S, Natsuga K, Nomura T, Fujita Y, Nakamura H, Shimizu H. The 76th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology. 2017年4月26 - 29日, Oregon Convention Center, Oregon, USA (国際学会)
8. 皮膚基底膜構築における17型コラーゲン細胞外領域切断の生理機能の解析
西村真智子, 西江涉, 新熊悟, 夏賀健, 中村秀樹, 白藤宜紀, 岩月啓氏, 澤村大輔, 清水宏. 第407回日本皮膚科学会北海道地方会 2016年09月17日、札幌医大、札幌市
9. Defective binding of plectin and collagen XVII leads to epidermolysis bullosa simplex.
Natsuga K, Nishie W, Nishimura M, Shinkuma S, Watanabe M, Izumi K, Nakamura H, Hirako Y, Shimizu H. The 46th Annual European Society for Dermatological Research meeting.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：夏賀 健
ローマ字氏名：Natsuga Ken
所属研究機関名：北海道大学
部局名：大学病院
職名：講師
研究者番号(8桁)：70645457

研究分担者氏名：西江 渉
ローマ字氏名：Nishie Wataru
所属研究機関名：北海道大学
部局名：医学研究院
職名：准教授
研究者番号(8桁)：20443955

研究分担者氏名：清水 宏
ローマ字氏名：Shimizu Hiroshi
所属研究機関名：北海道大学
部局名：医学研究院
職名：教授
研究者番号(8桁)：00146672

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：