

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：33920

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659556

研究課題名(和文)毛包の形成と維持におけるパーシカンの役割

研究課題名(英文)Roles of versican in development and maintenance of hair follicles

研究代表者

渡辺 秀人(Watanabe, Hideto)

愛知医科大学・付置研究所・教授

研究者番号：90240514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は真皮毛乳頭のパーシカン(Versican、以下Vcan)発現を特異的に欠失するコンディショナルノックアウトマウスの作製と解析を通じて同分子の毛包形成・維持における役割の解明を目指したが、Cre発現アデノウイルスは真皮毛乳頭への感染効率が悪く同分子を欠失させることができなかった。現在毛乳頭特異的にCreを発現するCor-Creマウスを利用した実験系の樹立を試みている。

研究成果の概要(英文)：Versican (Vcan) is a large chondroitin sulfate proteoglycan of the extracellular matrix, which is transiently expressed in mesenchymal condensation areas such as cartilage primordium and dermal papilla. Here, we aimed to investigate the role of Vcan in development and maintenance of hair follicles. Though we performed intradermal injection of adenovirus expressing cre into Vcan<flox/flox> mice, we could not ablate its expression in dermal papilla cells. Currently, we are planning to generate Corin-cre; Vcan<flox/flox> mice, which lack Vcan expression in dermal papillae.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：パーシカン プロテオグリカン 細胞外マトリックス ノックアウトマウス 毛包

1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックス(extracellular matrix, 以下 ECM)の巨大コンドロイチン硫酸プロテオグリカンとして知られるパーシカン(Versican, 以下 Vcan)は、組織発生・器官形成期において細胞凝集部位に一過性に高発現して細胞の増殖・分化を制御し、成人・成獣においては心血管系、真皮等の間葉系組織に存在して ECM の構造分子として細胞外微小環境の維持に働くと考えられている。

Vcan を世界で初めて発見した本研究室では、長年に亘って同分子の構造と機能に関する研究を遂行し、近年は二種類の Vcan 遺伝子改変マウスを駆使して同分子の生体内機能を検討してきた。その結果、ヒアルロン酸との結合が低下した Vcan ノックインマウス(Vcan^{3/3})は TGFβ のシグナル低下を伴う心内膜間葉転換不全(Endocardial Mesenchymal Transformation)の障害による心形態形成不全(胎生 10.5 日)を呈して胎生致死となること、同マウスから得られた胎児線維芽細胞はヒアルロン酸と CD44 を介したシグナル伝達の恒常的亢進により早老症を呈することを明らかにした(Suwan K, et al., J Biol Chem, 2009)。また、胎生期肢芽間充織において Vcan 発現を欠失するコンディショナルノックアウトマウス(Prx1-Cre/Vcan^{flox/flox})の作製(計画研究・方法欄、図)と解析から、同マウスが軽度の軟骨形成遅延と四肢指関節の形成異常を呈することを見出し、その詳細な解析結果から同分子が TGFβ の細胞外集積に重要な役割を果たしていることを明らかにした(Choocheep K, et al., J Biol Chem, 2010)。これらの結果は、間葉系細胞の凝集の際に一過性に高発現する Vcan が間葉系細胞あるいは周囲の上皮細胞の分化を誘導・促進することを in vivo で初めて証明した研究成果として高い評価を得ている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞外マトリックス(extracellular matrix, 以下 ECM)の巨大コンドロイチン硫酸プロテオグリカンとして知られるパーシカン(Versican, 以下 Vcan)の毛包形成と維持における役割を解明することである。

Vcan は皮膚毛乳頭形成期の間葉細胞に一過性に高発現し、成長後も恒常的に発現している。一過性に高発現する Vcan が生体局所において重要な細胞制御機能を発揮するという研究成果を踏まえれば、同分子が毛母細胞の分化誘導・促進に重要な役割を果たしていることは容易に推測できる。本研究では Vcan コンディショナルノックアウトマウスの毛乳頭における同分子の発現を欠失させ、皮膚組織の詳細な解析を行う。従来報告されている無毛・脱毛マウスモデルと異なり、パ

ーシカンの生体内解析にきわめて有効な遺伝子改変マウスを用いる点と糖鎖解析を含めた多面的解析手法を駆使する点が本研究の特色であり、他の研究者には達成できない独創的な点といえる。その成果は、社会的要請が高い毛髪維持法の開発に直結する。

3. 研究の方法

<当初の研究計画>

CAG-CreER/Vcan^{flox/-}:Rosa26 マウスの妊娠マウスあるいは成獣皮膚にタモキシフェンを投与して局所の Vcan 発現を欠失させ、当該部位の組織学的検討、免疫染色による ECM 分子群、生理活性分子、シグナル分子の局在の検討、これら分子群の定量を行い、これらの解析を通じて毛包の形成・維持における同分子の役割を明らかにする。

(1) CAG-CreER/Rosa26 レポーターマウス系の樹立

本研究に用いる CAG-CreER 系列、Vcan^{flox/flox} 系列はすでに樹立・維持しており、両者の交配によって得た CAG-CreER/Vcan^{flox/flox} マウスは正常に発育成長し妊性を有することをすでに確認している。本申請者らの予備実験では、CAG-CreER/Vcan^{flox/flox} マウスにタモキシフェンを投与した場合、flox 部位の切離効率が低く効果判定も難しいことが判明した。この問題を解決する目的で、β-ガラクトシダーゼレポーター遺伝子の発現により Cre 酵素の効果判定できる CAG-CreER/Vcan^{flox/-}:Rosa26 マウス系統を調製した。この CAG-CreER/Vcan^{flox/-}:Rosa26 マウスにタモキシフェンを投与し、各組織に対する X-Gal 染色ならびに抗 Cre 抗体を用いた免疫染色を施し、タモキシフェン投与の至適条件を決定する。胎生期皮膚の解析の場合は妊娠マウス(毛乳頭間葉細胞凝集期直前の妊娠 15 日)にタモキシフェンを腹腔投与し、成獣においてはタモキシフェンを塗布して X-Gal 染色を行い Cre 酵素の発現によるゲノム切り出し効果を判定し、至適条件を決定する。当該実験が順調に進めば平成 23 年 8 月にはマウス実験群の調製とタモキシフェン投与至適条件の決定が終了すると推測される。

(2) 毛包の形成過程における Vcan の機能解析

上記 1 の CAG-CreER/Vcan^{flox/-}:Rosa26 実験群の調製が完了した段階で以下の研究を開始する。

妊娠マウスの腹腔に上記の至適条件でタモキシフェンを投与し、胎生 16 日以降の胎児を採取して皮膚の解析を以下の手順で行う。

A. 肉眼的観察、

B. 組織学的検討 (H&E、マロリーアザン、鍍銀、シリウスレッド、エラスチカウニングソン、アルシャンブルー、トルイジンブルー等の染色を適用)

C. ECM 分子と生理活性分子群、リセプター、下流のシグナル分子に対する免疫染色を用いた局在検討、

D. これらの分子群についての生化学的検討 (ウェスタンブロット法、ELISA 法、Sircol アッセイによるコラーゲンの定量、Blyscan アッセイ法によるグリコサミノグリカンの定量)

を行う。

平成 24 年度)

(3) 毛包の維持における Vcan の機能解析
生後 2 週間及び 4 週間の CAG-CreER/Vcanflox/- Rosa26 マウス皮膚にタモキシフェンを塗布して皮膚における Vcan の発現を欠失させ、

(1) 全身の検査 (肉眼的観察、X-線撮影による骨変化)

(2) 組織学的観察、

(3) 免疫染色法による分子の局在の検討、

(4) ウェスタンブロット法と ELISA 法を用いた分子の定量を行う。免疫染色と生化学的解析は、Vcan を含む ECM 群 (Vcan、デコリン、パイグリカン、
、
、
型コラーゲン、エラスチン、フィブリリン-1、2、) および Vcan が深く関与する TGF- α 、BMP2/4、これらのリセプター、ならびに下流シグナル分子の Smad2/3、Smad1/5/8 を対象とする。

上記の解析実験についてタモキシフェン投与の有無で比較し、組織恒常性維持における Vcan の役割を明らかにする。なおタモキシフェン自体の影響の有無を確認する目的で、全ての実験において野生型マウスのタモキシフェン投与群、非投与群を加え、比較検討を行う。

4. 研究成果

当初予定したタモキシフェン誘導性 CAG-CreER;Vcan<flox/flox>系の Vcan パーシカンコンディショナルノックアウト (cKO) マウスを用いた実験は実験群の調製が困難であった。その理由としていわゆる Leaky な Cre 発現により Vcan 発現が胎生期にすでに欠失しているからと考えられた。Vcan のノックアウトマウスは心形成不全により胎生 9~10 日頃に死亡することがわかっており、Cre の leaky な発現によって胎生期の Vcan 発現が欠失することによって出生成長するマウス数が激減するものと推測された。

そこで Cre 発現アデノウイルス (Ad-Cre) の真皮内注入によって Vcan 発現を局所的に欠失させる実験系の樹立を試みた。Rosa26

レポーターマウスとの交配にて得られた Vcan<flox/flox>;Rosa26 マウスに Ad-Cre を真皮内注射したところ Cre 酵素の発現と Vcan 発現の欠失が確認できた (下図)。

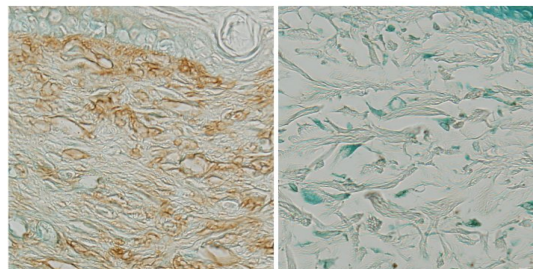


図: Vcan 免疫染色と X-gal 染色。左は Ad-GFP、右は Ad-Cre 皮内注射後 5 日後の染色像。

そこで 4-6 週齢の Vcan<flox/flox>マウス背部の毛髪を抜毛し、Ad-Cre あるいは対照群として Ad-GFP を真皮内注射し毛包形成の差異の有無を検討したが毛髪の生え方に有意差は認められなかった。条件を変える等して検討を繰り返したところ、毛髪の時期 (anagen、catagen、telogen) によって真皮の厚さが異なり telogen の時期の真皮内注射が技術的に難しいこと、anagen 期に Ad-Cre を真皮内注射しても毛乳頭細に感染させることが難しいことがわかった。

現在、毛乳頭特異的に発現する Cor-Cre マウスを導入した Cor-cre;Vcan<flox/flox>マウス系にて本研究の遂行可否かを検討している。Corin (Cor) は胎生期心臓においても発現することから同 cKO マウスが心形成異常により胎生致死となることが懸念される。心臓における発現レベルが低値か或いは発現部位が Vcan 発現部位を異なることが確認できれば同マウス系を導入し本研究を推進したい。

当該研究期間中に Vcan<flox>マウス系と種々の Cre 発現系を用いて以下の実験を行った。1) 腫瘍細胞と Ad-Cre を Vcan<flox/flox>マウスの皮下に注射して局所における Vcan 発現を欠失させ腫瘍増殖における Vcan の役割を検討した。2) Vcan<flox/flox>マウスの背部に Ad-Cre を皮内注射したのち直径 8 mm (トレパン) の皮膚全層欠損を作出し Vcan 発現欠損の有無で創傷治癒機転を解析した。これらの研究成果は現在投稿中あるいは準備中である。

また本研究に関連した研究として細胞外マトリックス構築、コンドロイチン硫酸やパーシカンの生体内機能に関する一連の研究を纏めることができた。

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)

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Ishimaru D, Sugiura N, Akiyama H, Watanabe H, Matsumoto K: Alterations in the chondroitin sulfate chain in human osteoarthritic cartilage of the knee. *Osteoarthritis Cartilage*, 2014 in press.
2. Sugiura N, Ikeda M, Shioiri T, Yoshimura M, Kobayashi M, Watanabe H: Chondroitinase from baculovirus Bombyx mori nucleopolyhedrovirus and chondroitin sulfate from silkworm Bombyx mori. *Glycobiology*, 23, 1520-30, 2013.
DOI: 10.1093/glycob/cwt082.
3. Lord MS, Day AJ, Youssef P, Zhuo L, Watanabe H, Caterson B, Whitelock JM: Sulfation of the bikunin chondroitin sulfate chain determines heavy chain-hyaluronan complex formation. *J Biol Chem*, 288, 22930-22941, 2013.
doi: 10.1074/jbc.M112.404186.
4. Nagai N, Habuchi H, Sugaya N, Nakamura M, Imamura T, Watanabe H, Kimata K: Involvement of heparan sulfate 6-O-sulfation in regulation of energy metabolism and alteration of thyroid hormone levels in male mice. *Glycobiology*, 23, 980-992, 2013.
doi: 10.1093/glycob/cwt037.
5. Sugiura N, Shioiri T, Chiba M, Sato T, Narimatsu H, Kimata K, Watanabe H: Construction of a chondroitin sulfate library with defined structures and analysis of molecular interactions. *J Biol Chem*, 287, 43390-43400, 2012.
DOI:10.1074/jbc.M112.412676.
6. Ogawa H, Hatano S, Sugiura N, Nagai N, Sato T, Shimizu K, Narimatsu H, Kimata K, Watanabe H: Chondroitin sulfate synthase-2 is necessary for chain extension of chondroitin sulfate but not critical for skeletal development. *PLoS ONE*, 7, e43806, 2012.
DOI: 10.1371/journal.pone.0043806.
7. Hatano S, Kimata K, Hiraiwa N, Kusakabe M, Isogai Z, Adachi E, Shinomura T, Watanabe H: Versican/PG-M is essential for ventricular septal formation subsequent to atrioventricular cushion development. *Glycobiology*, 22, 1268-1277, 2012.
DOI: 10.1093/glycob/cws095.
8. Kono A, Oguri A, Yokoo K, Watanabe H: YAG laser treatment causes rapid degeneration and regeneration of collagen fibers in pig skin and facilitates fibroblast growth. *J Plast Surg Hand Surg*, 46, 308-312, 2012.
DOI: 10.3109/2000656X.2012.696197
9. Imagama S, Sakamoto K, Tauchi R, Shinjo R, Ohgomori T, Ito Z, Zhang H, Nishida Y, Asami N, Takeshita S, Sugiura N, Watanabe H, Yamashita T, Ishiguro N, Matsuyama Y, Kadomatsu K: Keratan Sulfate Restricts Neural Plasticity after Spinal Cord Injury. *J Neurosci*, 31, 17091-17102, 2011.
DOI:10.1523/JNEUROSCI.5120-10.20
10. Shimokawa K, Kimura-Yoshida C, Nagai N, Mukai K, Matsubara K, Watanabe H, Matsuda Y, Mochida K, Matsuo I: Cell surface heparan sulfate chains regulate local reception of FGF signaling in the mouse embryo. *Dev Cell*, 21, 257-272, 2011.
DOI:10.1016/j.devcel.2011.06.027.
11. Sugiura N, Setoyama Y, Chiba M, Kimata K, Watanabe H: Baculovirus envelope protein ODV-66 is a novel chondroitinase with distinct substrate specificity. *J Biol Chem*, 286, 29026-29034, 2011.
DOI: 10.1074/jbc.M111.251157.

〔学会発表〕(計 11 件)

代表的なもの 3 件を記載。

- Hideto Watanabe, Hiroyasu Ogawa, Masafumi Shionyu, Nobui Sugiura, Sonoko Hatano, Naoko Nagai, Takashi Sato, Hisashi Narimatsu, Katsuji Shimizu, Koji Kimata
Chondroitin Sulfate synthase-2/chondroitin polymerizing factor: characterization and impact on chondroitin sulfate biosynthesis
2012 Joint Meeting of the Society for Glycobiology & American Society for Matrix Biology
2012 年 11 月 11-14 日 (San Diego)
- Ayuko Kono, Akiko Oguri, Kazuhisa Yokoo, Hideto Watanabe
YAG laser treatment causes rapid degeneration and regeneration of collagen fibers in pig skin and facilitates fibroblast growth
23rd FECTS and ISMB Joint Meeting

(Katowice, Poland)

2012年8月25-29日

- Hiroyasu Ogawa, Masashi Shionyu, Nobuo Sugiura, Sonoko Hatano, Naoko Nagai, Takashi Sato, Masanori Gotoh, Hisashi Narimatsu, Katsuji Shimizu, Koji Kimata, Hideto Watanabe
Chondroitin sulfate synthase-2/chondroitin polymerizing factor: characterization and impact on chondroitin sulfate biosynthesis
7th International Conference on Proteoglycans
2011年10月16-23日 (Sydney)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

愛知医科大学分子医科学研究所

<http://www.aichi-med-u.ac.jp/su10/su1009/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 秀人 (WATANABE Hideto)

愛知医科大学・分子医科学研究所・教授
研究者番号：90240514

(3)連携研究者

宇谷 厚志 (UTANI Atsushi)

長崎大学・医学部・皮膚科学講座・教授
研究者番号：10292707