

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19679

研究課題名 (和文) 毛包内毛根鞘の分化におけるkeratin71の役割の解明

研究課題名 (英文) Roles of keratin71 in differentiation of hair follicle inner root sheath

研究代表者

藤本 篤 (FUJIMOTO, Atsushi)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：10571937

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 2,300,000 円

研究成果の概要 (和文) : 縮毛症は毛髪奇形の一つであり、毛髪分化異常が原因と考えられている。本研究では、縮毛症マウスのkeratin71 (Krt71) の新規変異について、変異が毛包の形態、機能に及ぼす影響を解析し、縮毛症の発症機序を明らかにすることを目的とした。走査型電子顕微鏡を用いた観察では、縮毛症マウスの毛髪は野生型に比べ細く波打った形態を示した。縮毛症マウスの皮膚を用いて行ったKrt71の免疫組織化学染色では毛包自体に波打ち像が観察された。また、毛幹を同心円状に取り囲むべき内毛根鞘の厚みに不均衡が観察された。以上より、Krt71変異により生じる毛包の形態異常が縮毛症発症において重要であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Woolly hair (WH) is an abnormal variant of tightly curled hair, which is supposed to be caused by abnormal differentiation of hair follicle. The objective of this study is to elucidate the roles of keratin71 (Krt71) in the pathogenesis of WH. Scanning electron microscopical image of plucked dorsal pelage of the mutant strain revealed that mutant hair shaft is slightly curved and finer than wild-type. In addition, immunohistochemical staining of Krt71 showed that hair follicles in the mutant mouse were markedly curved and asymmetric. Therefore, it is suggested that curvature and asymmetric deformation of hair follicles, which arise from Krt71 mutation, play an important role in the pathogenesis of WH.

研究分野：毛髪疾患

キーワード：毛髪疾患 縮毛症 乏毛症 ケラチン71 遺伝性皮膚疾患

## 1. 研究開始当初の背景

毛包は皮膚付属器のひとつであり、個々は非常に小さいが、驚くべき自己再生能力を有する魅力的な器官である。毛包は、中央に位置する毛髪を、内毛根鞘、コンパニオン層、外毛根鞘が順次取り囲んでいる。ヒトにおける毛の存在意義は他の動物に比べれば小さいかもしれないが、気温や紫外線などの外界の環境や異物からの防御、創傷治癒の促進、そして美容面で重要な役割を果たしている。近年の分子生物学の進歩によって、毛包に発現する多数の遺伝子が同定されてきた。さらに、それらの異常(変異)が、様々な先天性毛髪疾患の原因であることが判明してきている (Shimomura et al., Nat. Genet., 2008; Shimomura et al., J. Invest. Dermatol., 2009; Shimomura et al., Am. J. Hum. Genet., 2010; Shimomura et al., Nature, 2010)。

その中でも注目すべき新知見として、常染色体優性遺伝形式を示す縮毛症および乏毛症 (autosomal dominant woolly hair/hypotrichosis: 以下 ADWH/H) が、Keratin71 (KRT71) 遺伝子の変異で発症することが挙げられる (Fujimoto A et al., J. Invest. Dermatol., 2012)。

keratin71 は、毛髪の成長や毛質の決定に重要な役割を持つ毛包内毛根鞘 (inner root sheath (IRS)) に特異的に発現している上皮系ケラチンであり、タイプ II ケラチン (塩基性ケラチン) の一つである。生体内では、タイプ I ケラチン (酸性ケラチン) とヘテロ 2 量体を形成して keratin intermediate filament (KIF) を形成し、内毛根鞘を構成する細胞の形態維持に大きな役割を果たしている。先天性毛髪疾患の原因遺伝子の多くが内毛根鞘に強く発現していることから、変異型の keratin71 により内毛根鞘の形態、機能異常が生じることが縮毛症の主な発症機序であると予想される。しかしながら、

KRT71 遺伝子の変異による疾患発症の詳しい機序はほとんど明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、縮毛症を呈するマウスから得た *karatin71* (*Krt71*) の新規変異 (c.1117\_1123del7ins10 (p.L373\_T375delinsSLLS)) について、変異が毛包の形態、機能に及ぼす影響を解析し縮毛症の発症機序を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 縮毛症を呈するマウスから得た *karatin71* (*Krt71*) 遺伝子の変異 (c.1117\_1123del7ins10 (p.L373\_T375delinsSLLS)) [図 1] について、同変異により生じる毛髪の形態変化を走査型電子顕微鏡で解析した。

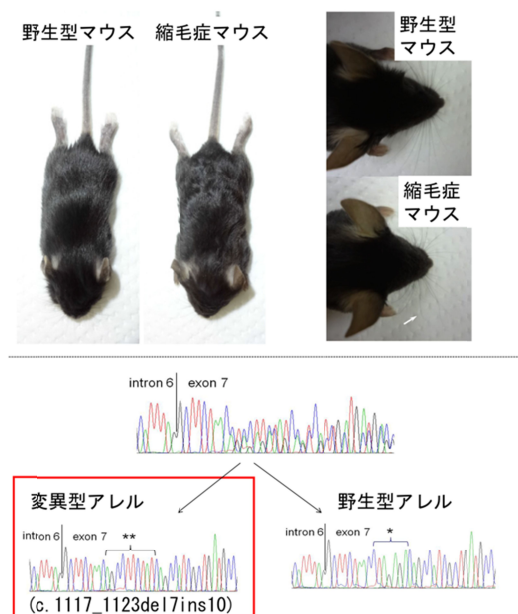


図1. *Krt71* 遺伝子に変異を持つマウス  
*Krt71* 遺伝子に変異を持つマウスは縮毛症を呈している (上段)。このマウスを解析し、新規の遺伝子変異が得られた (c.1117\_1123del7ins10) (下段)。

(2) 同マウスより皮膚を採取し、keratin71 に対する抗体を用いた免疫組織化学染色法で毛包における keratin71 の発現パターンを解析した。

(3) 同変異が、内在性のタイプ I ケラチンとヘテロ 2 量体を形成して KIF を成す際の相互作用への影響について調べる目的で、同変異のクローニングを行い、発現ベクターへの導入を行った。

#### 4. 研究成果

初年度は、縮毛症マウスから得られた *Krt71* 遺伝子の新規変異について、変異により生じる毛幹の形態学的な変化を走査型電子顕微鏡で解析した。縮毛症マウスの毛幹は野生型に比べて径が非常に細く、波打った形態を示した。〔図 2〕 また、ヒトの縮毛症患者の毛髪においては、毛幹の長軸に沿って縦溝 (longitudinal grooves) が観察されることあるが、マウスでは確認されなかった。

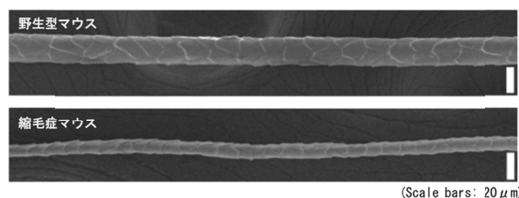


図2. 縮毛症マウスの毛髪の走査型電子顕微鏡像  
野生型に比べて細く波打った形態の毛髪が観察された。

次に、本症マウスの毛包における *keratin71* の発現パターンを詳細に解析するために、背部より皮膚を採取し、4% Paraformaldehyde で固定したパラフィン包埋切片を用いて *keratin71* に対する抗体で免疫組織化学染色を行った。本症マウス毛包においては、野生型マウスに比べ、毛包そのものに波打ち像が観察された。また、野生型では、内毛根鞘は毛幹を軸として左右対称に観察されたのに対し、本症マウスではその対称性が失われていた。〔図 3〕 これは本来、毛幹を同心円状に取り囲むべき内毛根鞘の厚みに 3 次元的な不均衡が生じたことによるものと推察した。

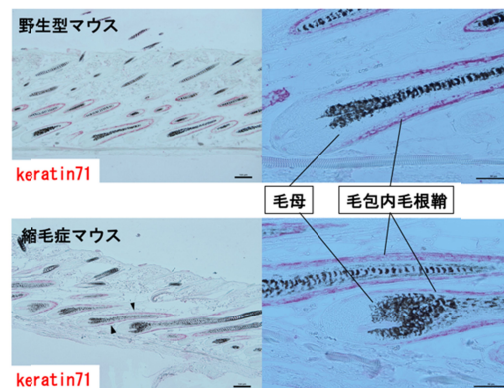


図3. 免疫組織化学染色を用いた縮毛症マウスの毛包形態の観察  
縮毛症マウスの毛包は、野生型に比べて波打っており、毛包内毛根鞘の厚みも非対称性である。

最終年度は、縮毛症マウスから得た *Krt71* 遺伝子のをクローニングし、pCXN2 ベクターへの導入を行った。

また、KRT71 の発現調節機構を解析するためのプロモーター解析を目的として、ヒトの KRT71 遺伝子のプロモーター領域を pGL4.12 ベクターにクローニングした。また、毛包内毛根鞘に発現している様々な転写因子も pCXN2 ベクターにクローニングした。

本研究により、*Krt71* の変異によって生じる毛包の形態学的異常が縮毛症の発症において重要であることが示唆された。

今後は、本研究で作成した発現ベクターを HaCaT (human keratinocyte) 細胞および Ptk2 (kangaroo rat kidney epithelial) 細胞に導入し発現させ、変異型の *keratin71* が、それぞれの細胞の内在性のタイプ I ケラチンである *keratin 14*、*keratin 18* との相互作用に及ぼす影響について、蛍光二重染色法で解析する予定である。

また、発現調節機構の解明を目指し HEK293T (human embryonic kidney) 細胞、HeLa (human cervical cell carcinoma) 細胞などの培養細胞に導入し、KRT71 遺伝子のプロモーター活性を詳細に解析する予定である。

## 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2件)

① Ansai O, Shimomura Y, Fujimoto A, Sakai A, Tsuchida Y, Hayashi R, Shigehara Y, Hama N, Abe R. Case of pemphigus herpetiformis with immunoglobulin G autoantibodies against desmocollin-3. J Dermatol. 2017 Jan;44(1):104-105. (査読あり)

② 林 良太、下村 裕、藤本 篤、伊藤 雅章、GJB6 遺伝子 c.31G>A 変異による掌蹠角化を欠く Clouston 症候群の1例、臨床皮膚科(0021-4973)69巻、6号、2015、pp. 379-383 (査読あり)

### 〔学会発表〕(計1件)

① Fujimoto A, Fujikawa H, Hayashi R, Farooq M, Shimomura Y, Ito M. Expression and Functional Studies of WNT10A. JSID the 6<sup>th</sup> Kisaragi-Juku Feb12<sup>th</sup>-15<sup>th</sup>, 2015, Hotel Nikko Alivila (Okinawa)

### 〔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：

出願年月日：

国内外の別：

## ○取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

藤本 篤 (FUJIMOTO Atsushi)  
新潟大学, 医歯学総合病院, 助教  
研究者番号：10571937

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

なし