

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591345

研究課題名(和文) 皮膚再生機構の解明-毛包細胞内シグナル伝達機構の解析-

研究課題名(英文) Skin regeneration - Signal transduction in hair follicles -

研究代表者

板見 智 (ITAMI SATOSHI)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：30136791

研究成果の概要(和文)：1回膜貫通型蛋白である LRIG1 は毛隆起の直上に局在する角化幹細胞に発現しており、Wnt -  $\beta$ -catenin 経路を恒常的に抑制して幹細胞の維持に働いていることが明らかにできた。また、その細胞外ドメインは酵素的に切断され、パラクライン機構で細胞増殖を制御していることも明らかにした。

ARA55/hic-5 がケロイドの線維芽細胞で強発現していることを見出し、TGF- $\beta$  - Smad 経路を活性化しコラーゲン合成を促進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Lrig1 expressing keratinocytes localize the hair follicle junctional zone. Loss of Lrig1 causes a selective increase in  $\beta$ -catenin-induced ectopic hair follicle formation in the interfollicular epidermis. Lrig1 expressing keratinocytes constitutively shed LRIG1 ectodomains in vitro by ADAM17, and the ectodomains regulate cell proliferation and EGF signaling in a paracrine manner.

ARA55/hic-5 was strongly expressed in keloid tissues and fibroblasts. ARA55/hic-5 overexpression stimulated the collagen production through TGF- $\beta$  - Smad pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：毛包、幹細胞、LRIG1、再生、ARA55/hic-5、ケロイド、線維芽細胞、TGF- $\beta$ -Smad

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 成長期への移行や創傷治癒には毛隆起に存在する幹細胞が間葉系の毛乳頭細胞や真皮繊維芽細胞(いわゆる幹細胞のニッチ)からのシグナルにより活性化され再生に必要な娘細胞を供給すると考えられている。この活性化には Wnt -  $\beta$ -catenin 経路が中心的な役割を果たすことが

知られている。しかしながら過剰な供給は組織過形成となり時には病変を生じる。一方で、幹細胞の活性化を抑制し、組織の恒常性を維持する機構は毛包を含め未だ多くの組織で未解明である。また毛包や表皮には複数の幹細胞の存在が推定されているが、適切な分子マーカーが乏しいためその詳細は不明である。

(2)ケロイドは過剰なコラーゲン産生が病態であり、TGF- $\beta$ -Smad 経路の活性化によりコラーゲン産生が亢進していることが知られている。しかしながら TGF- $\beta$ -Smad 経路の活性化の詳細な機序は未だ明らかになっていない。ARA55/hic-5 は TGF- $\beta$ によって誘導される LIM domain 蛋白ファミリーに属し、Paxillin に類似した機能を有することが知られているが、核内ではステロイドレセプターの共役因子として働く。最近 ARA55/hic-5 が TGF- $\beta$ の機能を促進することが報告されたが、ケロイド病変形成への関与は不明である。

## 2. 研究の目的

(1)LRIG1 発現細胞の皮膚における詳細な局在を明らかにし、そのノックアウトマウスを用いて機能を調べる。

(2)ケロイドにおける TGF- $\beta$ -Smad-コラーゲン形成過程における ARA55/hic-5 の関与を検討する。

## 3. 研究の方法

(1)LRIG1 の解析

①マウス皮膚におけるLRIG1 発現細胞の局在を他の幹細胞マーカー (CD34, Lgr5, 6, Sca1, Blimp1 など)と免疫組織染色、FACS 解析で比較する。

②LRIG1 強発現細胞をソーティングし、新生児マウスの真皮細胞とともに移植する皮膚再構成実験を行う。

③LRIG1 による cMyc の調節機構を LRIG1 ノックアウトマウスを用いて検討する。

④LRIG1 ノックアウトマウスにおける Wnt -  $\beta$ -catenin 経路の活性化状態を  $\beta$ -catenin を恒常的に活性化したトランスゲニックマウスを用いて検討する。

⑤培養角化細胞における LRIG1 の細胞外領域の切断について、メタプロテアーゼ阻害剤である TAPI-2 などを用いて検討する。

⑥LRIG1 の細胞外領域のみを発現するベクターを作成し、角化細胞などに過剰発現させ細胞増殖に影響するか検討する。

(2)ケロイドにおける ARA55/hic-5 の解析

①ケロイド病変における発現を免疫組織染色で検討する。TGF- $\beta$ の下流に存在する smad2/3 のリン酸化抗体を用いて免疫組織染色を行う。

②ケロイド病変由来の線維芽細胞と正常細胞に ARA55/hic-5 を過剰発現させ、コラーゲン合成への影響を検討するとともに siRNA で ARA55/hic-5 をノックダウンし smad2/3 のリン酸化状態を調べる。

## 4. 研究成果

(1)LRIG1 の解析

①LRIG1 は毛隆起に存在する CD34 陽性の角化幹細胞と異なり、直上にある junctional zone に局在する角化幹細胞に特異的に発現しているこ

とを明らかにした。

②LRIG1 強発現細胞は皮膚再構成実験により効率的に毛包、脂腺と表皮を再生した。

③LRIG1 は cMyc を抑制し、cMyc は LRIG1 を誘導した。

④LRIG1 ノックアウトマウスでは Wnt -  $\beta$ -catenin 経路の活性化が生じており、cMyc による毛包新生を増強した。

⑤LRIG1 の細胞外ドメインは ADAM プロテアーゼにより切断された。

⑥細胞外ドメインはパラクライン機構で細胞増殖を抑制した。

以上の結果より、皮膚には毛隆起に存在する CD34 陽性の毛包幹細胞とは異なる LRIG1 陽性角化幹細胞が junctional zone に存在し、恒常的には表皮、脂腺を維持するために役割を担っており、創傷などの外的刺激を受けた場合には表皮のみならず毛包再生にも寄与することが明らかとなった。さらにはその細胞外領域は酵素的に切断され cMyc などの活性化を抑制することで幹細胞の維持に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

(2)ケロイドにおける ARA55/hic-5 の解析

①ケロイド病変では線維芽細胞核内で ARA55/hic-5 が強発現していた。また核内で smad2/3 のリン酸化を認めた。

②線維芽細胞における ARA55/hic-5 の過剰発現は1型、3型のコラーゲン合成を促進した。また、ARA55/hic-5 の siRNA により線維芽細胞内の smad2/3 のリン酸化は抑制された。この効果は smad7 を介さないことが明らかになった。

以上の結果より、ケロイドの治療戦略として ARA55/hic-5 の抑制をターゲットとした薬剤の開発が期待される。

## 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 27 件)

① Yi W, Holmlund C, Nilsson J, Inui S, Lei T, Itami S, Henriksson R, Hedman H. Paracrine regulation of growth factor signaling by shed leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1. *Exp Cell Res*. 317: 504-512, 2011.

② Inui S, Shono F, Noguchi F, Nakajima T, Hosokawa K, Itami S. In vitro and in vivo evidence of pathogenic roles of Hic-5/ARA55 in keloids through Smad pathway and profibrotic transcription. *J Dermatol Sci*. 58: 152-154, 2010

③ 板見 智: 毛髪医学、1. 毛の細胞生物学、日皮協ジャーナル、32巻、2号、24-31、2010.

④ Jensen KB, Collins CA, Nascimento E, Tan DW, Frye M, Itami S, Watt FM. Lrig1 expression defines a distinct multipotent stem cell population in mammalian epidermis. *Cell*

Stem Cell. 4: 427-439, 2009.

⑤ Kitagawa T, Matsuda KI, Inui S, Takenaka H, Katoh N, Itami S, Kishimoto S, Kawata M. Keratinocyte growth inhibition through the modification of Wnt signaling by androgen in balding dermal papilla cells. J Clin Endocrinol Metab. 94: 1288-1294, 2009.

⑥ 板見 智: 男性型脱毛症の病態と治療、日本皮膚科学会雑誌、119巻、2966-2968、2009.

⑦ Tsuda M, Inoue-Narita T, Suzuki A, Itami S, Blumenberg M, Manabe M. Induction of gene encoding FABP4 in Pten-null keratinocytes. FEBS Lett. 583: 1319-1322, 2009.

⑧ Kato M, Hasunuma N, Nakayama R, Takeda J, Itami S, Taira M, Manabe M, Osada S. Progranulin, a secreted tumorigenesis and dementia-related factor, regulates mouse hair growth. J Dermatol Sci. 53: 234-236, 2009.

⑨ 板見 智: 毛髪の再生、日本臨床、66巻、892-896、2008.

⑩ 板見 智: 毛周期と幹細胞、遺伝子医学MOOK別冊、進みつづける細胞移植治療の実際、下巻、50-53、2008.

〔学会発表〕(計12件)

① Inui S, Nakao T, Nakajima T, Itami S. Molecular mechanism of TGF- $\beta$ 1 promoter activation by androgen in balding dermal papilla cells. 6<sup>th</sup> World Congress of Hair Research, Cairns, Australia, 2010, 6, 16.

② Nakajima T, Inui S, Fushimi T, Noguchi F, Itami S. PPAR binding protein is involved in signaling for quiescence of hair follicle stem cells. 6<sup>th</sup> World Congress of Hair Research, Cairns, Australia, 2010, 6, 16.

③ Inui S. Leptin is a paracrine regulator of hair cycle. JSID-Asia-Oceania-Forum, Hakata, Japan, 2009, 12, 6.

④ 板見 智: 毛髪再生はどこまで可能か、再生医療とアンチエイジング、第9回抗加齢医療学会総会、東京、5月29日、2009.

⑤ Sumikawa Y, Inui S, Itami S. Leptin is a paracrine regulator of hair cycle. International Investigative Dermatology, Kyoto, Japan, 2008, 5, 17.

〔図書〕(計12件)

① 板見 智: 男性型脱毛症、ガイドライン外来診療 2011、泉孝英編、日経メディカル開発、東京、330-334、2011.

② Itami S, Inui S. Hair diseases (Alopecia Areata and Androgenetic Alopecia) in Therapy of Skin Diseases, Krieg T, Bickers DR, Miyachi Y (eds), Springer - Verlag, Berlin,

Heidelberg, 499-507, 2010.

③ 板見 智: 脱毛症診療ガイドライン(円形脱毛症について)、What's New in 皮膚科学、宮地良樹編、メディカルレビュー社、東京、142-143、2010.

④ 板見 智: 男性型脱毛症(AGA)、皮膚疾患診療実践ガイド、宮地良樹、古川福実編、文光堂、東京、737-738、2009.

⑤ 板見 智: 2. 正常皮膚の正常値-毛包系、Advanced Cosmetic Dermatology3、スキんケアを科学する、今山修平、宮地良樹、松永佳世子、宇津木龍一編、南江堂、東京、95-99、2008.

〔その他〕

日本皮膚科学会脱毛症診療ガイドライン作成委員

① 坪井良治、板見智、乾重樹、植木理恵、勝岡憲生、倉田荘太郎、幸野健、齊藤典充、真鍋求、山崎正視、男性型脱毛症診療ガイドライン(2010年版)、日皮会誌:120(5), 977-986, 2010.

② 荒瀬誠二、坪井良治、山崎正視、板見智、乾重樹、勝岡憲生、齊藤典充、真鍋求、伊藤雅章、橋本剛、刈谷直之、成澤寛、秋山真志、植木理恵、伊藤泰介、中村元信、幸野健、円形脱毛症診療ガイドライン 2010、日皮会誌: 120(9), 1841-1859, 2010.

〔一般向け図書〕

板見 智: 専門医が語る毛髪科学最前線、集英社新書、集英社、東京、1-173、2009.

〔報道機関向け情報〕

① 円形脱毛症、ステロイド注射は推奨-学会が治療法評価、朝日新聞、8月21日、2010

② 前立腺癌、薄毛と関連?、読売新聞、2月21日、2011

③ ののちゃんの Do 科学-なぜ髪がうすくなるの?、朝日新聞、4月25日、2011

④ 育毛剤 毎日新聞記者が体験...生える場所は選べず、毎日新聞、5月12日、2011

ホームページ

<http://www.r-derma.med.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板見 智 (ITAMI SATOSHI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座  
教授  
研究者番号：30136791

(2) 研究分担者

乾 重樹 (INUI SHIGEKI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座  
准教授  
研究者番号：30324750