

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590224

研究課題名（和文） 上皮間葉相互作用を制御するシグナル経路における Sox13 の役割

研究課題名（英文） The role of Sox13 in the signaling pathway that controls epithelial-mesenchymal interaction

研究代表者

長田 真一（OSADSA SHIN-ICHI）

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：00244484

研究成果の概要（和文）：

毛は、成長期、退行期、休止期からなる周期を繰り返して成長する。本研究は、細胞の運命決定、分化関わる転写因子 Sox13 の役割を、独自に作製した Sox13 変異マウスを用いて解析した。その結果、Sox13 の発現は毛周期の間にダイナミックに変化し、Sox13 が毛周期の新たなマーカーとして有用であること明らかになった。Sox13 の周期性を制御するメカニズムの解明は、脱毛症の病因解明に役立つ可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

Hair grows through the hair cycle consisting of anagen, catagen and telogen. We investigated the role of Sox13, a member of the Sox family of transcription factors that are involved in cell fate determination and differentiation, using Sox13 mutant mice. We found that Sox13 expression in hair follicle is dynamically changed during hair cycles, indicating that Sox13 is a novel hair cycle maker. Elucidation of the mechanism underlying the Sox13 cyclic expression would be important for understanding the pathogenesis of alopecia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：細胞分化、組織形成、発生・分化、毛包形成、転写因子、Sox

1. 研究開始当初の背景

表皮は、発生過程で神経外胚葉が神経系と表皮系の系譜に分かれることから生じ、脂腺、毛といった皮膚の付属器は、表皮とそれを裏打ちする間葉との相互作用によって分化してくる。

私たちは、アフリカツメガエル胚の神経外胚葉を神経へと分化させる因子を、発現スクリーニング法により探索する過程で、転写因子 *Sox13* を単離した。*Sox* ファミリーは、神経細胞、神経堤細胞、軟骨細胞の分化や性の決定など、様々な細胞の運命決定にかかわる転写因子群で、現在までに30種類以上報告されている。また、胚性幹細胞の多能性における *Sox2* や毛包形成における *Sox9* など、*Sox* ファミリーは幹細胞研究の重要な分子としても注目を集めている。*Sox* 転写因子群はその構造から A から H のサブグループに分かれ、*Sox13* は *Sox5*、*Sox6* とともにグループ D を形成している。*Sox13* の機能についてはこれまで不明であったが、2007 年に *Sox13* 欠損マウスの解析から、*Sox13* が $\gamma\delta$ T 細胞の分化に関わっていることが明らかになった。私たちも独立に *Sox13* 欠損マウスを作製したが、単に *Sox13* 遺伝子を欠損させただけの前述のグループと違い、私たちの場合、*Sox13* の蛋白コード領域を *LacZ* 遺伝子と置換したため、 β Gal 染色により *Sox13* の発現細胞を時間経過とともに調べることができた。その結果、*Sox13* は上述のスクリーニング戦略から予想された神経細胞ばかりでなく、E14.5 日目から毛原基 (hair placode) に発現し始め、毛包の形成過程で非常に強く発現していることを見出した。

毛包は、一連の上皮間葉相互作用によって形成される。この過程には、*Wnt*、*Sonic*

hedgehog (*Shh*)、*Bone morphogenetic protein* (*BMP*)、*Notch* など様々なシグナル経路が関与している。*BMP* は神経外胚葉から表皮への分化を促進するが、間葉から *BMP* 拮抗因子である *Noggin* が表皮に作用すると (first dermal signal) 毛原基が形成される。毛原基に発現した *Wnt* は、今度は間葉に作用して間葉細胞の凝集を促し (first epithelial signal)、毛芽 (hair germ) が形成される。毛芽では *Wnt* によって *Shh* が誘導され、*Shh* は second dermal signal として毛芽の下方への伸長を促すと考えられている。一方で、*Shh* シグナル経路の異常な活性化は、基底細胞癌 (basal cell carcinoma, 以下 BCC) の発症に関わっている。

私たちは、種を超えて保存されている *Sox13* の発現調節領域の中に、*Wnt*、*Shh*、*BMP* の下流で働く転写因子の結合コンセンサスを複数見出した。実際、上記のアフリカツメガエルのアッセイ系で *Sox13* の発現は *BMP* により誘導される。また、ゲノムワイドに *Shh* シグナル経路の下流因子を検索した報告の中で、*Sox13* は候補の一つとして挙げられている。以上のことから、*Sox13* の機能を解析することを通して、上皮間葉相互作用、毛包における幹細胞システム、BCC の発症を制御するシグナル経路を解明することができると考えた。

2. 研究の目的

皮膚は、上皮間葉相互作用の優れた実験モデルである。上皮間葉相互作用には、*Wnt*、*Shh*、*BMP* など様々なシグナル経路が関与しているが、その下流で働く因子の解明が待たれている。*Sox* ファミリーは、細胞の運命決定、分化に関わる転写因子群であるが、皮膚における役割はほとんどわかっていない。私たちは、*Sox13* が皮膚の発生過程で、幹細胞の研究モデルとしても注目されている毛包に強く発現すること、*Sox13* の発現調節領域に上記シグナル経路の標的因子の結

合コンセンサスが複数存在することを見出した。Sox13 は基底細胞癌の発生に深くかわる Shh 経路の下流因子である可能性も出てきた。本研究では、独自に作製した Sox13 欠損マウスを用いて、上皮間葉相互作用や皮膚癌の発症に関わるシグナル経路における Sox13 の役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 皮膚の発生、毛包形成過程における Sox13 の発現パターンを調べる。

β gal 染色で Sox13 の発現部位を詳細に解析し、他の分化マーカーと発現部位を比較する。

(2) Sox13 の発現制御機構を調べる。

マウスとヒトの間で保存されている Sox13 の発現調節領域にある、Wnt、Bmp、Shh シグナル経路を仲介する TCF、Smad、Gli 結合部位の生理的意義を探る。

(3) Sox13 と Sox9 との機能的関連を調べる。

Sox13 の機能は他の Sox 因子により補完修飾されている可能性がある。候補因子の一つ Sox9 との関係ダブルノックアウト・マウスを用いて調べる。

(4) Sox13 欠損マウスの発癌感受性を調べる。

Sox13 欠損マウスでは、皮膚の癌免疫監視機構に関わっていると考えられる $\delta \gamma$ T 細胞が欠損する。Sox13 欠損マウスにおける皮膚腫瘍の発生率を調べる。

(5) 基底細胞癌 (BCC) における Sox13 の発現を調べる。

Sox13 は BCC に関わる Shh シグナル経路の下流因子であると考えられる。BCC における Sox13 の発現をヒト手術標本を用いて

調べ、新しい診断法の確立に役立てる。

4. 研究成果

本研究開始当初、動物実験施設で大規模なウイルス感染があったため、研究規模を縮小せざるを得ず、計画(3)、(4)は遂行することができなかった。しかし、(1)については大きな進展があったので、それについて詳述する。

(1) 毛周期における Sox13 の発現パターンを LacZ 染色で調べた結果、Sox13 の発現は毛周期の間にダイナミックに変化することがわかった。すなわち、Sox13 の発現は、生後直後に外毛根鞘にドット状に始まり、成長期にはその発現がピークに達すること、その後、退行期になると発現が一旦消失し、そして、休止期後半に再び発現することがわかった。このように、毛周期に合わせて発現が変化する因子は少なく、Sox13 が毛周期の新たなマーカーとして有用であることを意味している。これまでの成果は、現在投稿準備中である。

成長期、退行期、休止期からなる毛周期がどのように制御されているかは、まだほとんど解明されていない。脱毛症は、この毛周期の制御メカニズムの破綻と捉えることもできる。今後、Sox13 の毛包における発現調節機構を調べることにより、毛周期の周期性のメカニズムのみならず、脱毛症の発症機構が解明されることが期待される。

(2) Sox13 の発現を毛嚢バルジ幹細胞マーカーである keratin15 の発現と比較したところ、両者の発現部位が一部重複していることがわかった。これは、Sox13 陽性細胞が一部毛嚢バルジ幹細胞としての機能を担っていることを示唆している。現在、keratin15 以

外の毛嚢バルジ幹細胞マーカー (Sox9 など)との局在を検討している。

(3) 研究計画(5)の「基底細胞癌 (BCC) における Sox13 の発現の検討」については、市販の複数の Sox13 の抗体を購入して検討したが、*LacZ* 染色でみられた Sox13 発現パターンを再現できた抗体は見つかっておらず、進展しなかった。

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 1 件)

- (1) 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. 査読有 Doi:10.1016/j.jdermsci.2008.10.002

[学会発表] (計 4 件)

- (1) 能登 舞、蓮沼 直子、眞鍋 求、長田 真一、毛周期における Sox13 の発現解析、第 110 回日本皮膚科学会総会、2011 年 12 月 10 日、京都
- (2) 長田真一、秋本和憲、大野茂男、川名誠司、表皮の極性形成のメカニズム、第 110 回日本皮膚科学会総会、2011 年 4 月 10 日、横浜
- (3) 長田真一、大森慎也、稲森雅子、川名誠司、平良真規、Progranulin, a secreted tumorigenesis and dementia-related factor, is required for melanocyte development. 第 34 回日本研究皮膚科学会、2009 年 12 月 4 日、京都
- (4) Osada, S., Ohmori, S., Inamori, M., Kawana, S. and Taira, M. Progranulin, a secreted tumorigenesis and dementia-related factor, is required for neural crest formation. 15th Meeting of the European Society for Pigment Cell Research、

2009 年 9 月 22 日、ミュンスター(ドイツ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長田 真一 (OSADA SHIN-ICHI)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：00244484

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし