

機関番号：11401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791058
 研究課題名（和文）白髪化に対する抵抗性獲得の分子基盤：
 PI3K経路とStat3経路の動的役割
 研究課題名（英文）Molecular Basis of Intolerance Against Hair Graying:
 Active Roles of PI3K and Stat3 Pathways
 研究代表者 河村 七美（KAWAMURA NANAMI）
 秋田大学・医学部・助教
 研究者番号：70323152

研究成果の概要（和文）：

我々は本課題において、白髪化の発生・進展におけるPI3KとStat3の生物学的役割を検討するため、メラノサイト特異的に*Stat3*、*Pten*、*PI3K γ* を欠失したマウスに、放射線照射を加えて、表現型の変化を観察した。その結果、*Stat3*と*PI3K γ* が欠失するとメラノサイト幹細胞の放射線照射に対する感受性が高まることが判明した。この所見はSTAT3とPI3K γ がメラノサイト幹細胞の維持に重要な役割を果たしていることを示唆するものと思われる。

研究成果の概要（英文）：

In this grant program, we attempted to elucidate the biological roles of STAT3 and PI3K γ during hair graying. The transgenic mouse studies showed that the genetic defect of both *Stat3* and *Pi3k γ* genes enhance the radiosensitivity of melanocyte stem cells. These findings suggested that these molecules may play important roles in the maintenance of melanocyte stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：白髪化・PTEN・PI3K・STAT3

1. 研究開始当初の背景

メラノサイト幹細胞が枯渇するため白髪化が起こる

最近、白髪化に関わる分子病態として、(1) マウスでは*Mitf*や*Notch*、及びその標的遺伝子産物である*Bcl-2*がアポトーシスを抑制することにより、毛隆起に存在す

る色素幹細胞の維持に貢献している。また、(2) これらの分子を欠失するマウスでは、色素幹細胞が生後早期に細胞死を起こして減少するため白髪化する。さらに、(3) ヒトの白髪化に際して色素幹細胞が減少する、などが報告されている。

2. 研究の目的

(1) 我々の研究室では、癌抑制遺伝子であるPTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) のメラノサイトにおける生物学的役割を検討するため、メラノサイト特異的PTEN欠失マウスを作成した。この遺伝子改変マウスの生物学的特性を細胞生物学・分子生物学的手法より解析したところ、メラノサイトにおけるPTENの欠失は、PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase)-Akt下流分子の活性化により、細胞増殖能亢進やアポトーシス抵抗性の獲得などを生じさせることが判明した (Inoue-Narita-T et. al: Cancer Res 68: 5760-5768, 2008)。

(2) さらに興味深いことに、体毛を抜去すると、野生型マウスでは白髪化するのに対して、PTEN欠失マウスではこれに抵抗した。免疫組織化学的にもPTEN欠失マウスでは、抜毛処理を加えた後にも毛隆起部に色素幹細胞が維持されていた。以上の所見は、PI3K-Akt下流分子が色素幹細胞の維持に貢献し、白髪化を抑制していることを示唆するものであり、その分子動態を制御することにより、白髪化に対する新規治療法を創生できることが予想される。

(3) 前述のPI3Kはその基質特異性からクラスI、II、IIIに分類される。クラスI PI3K (IA, IB) は細胞内のPI(3,4,5)P₃産生の主要経路であり、触媒サブユニット (p100 α 、p100 β 、p100 γ 、p100 δ) と調節サブユニット (p85 α 、p85 β 、p55 α 、p55 γ 、p50 α) で構成されている。これらの各触媒サブユニットと調節サブユニット間の結合の優先的な組み合わせや、それに起因する酵素活性の相違に関しては未だ不明な点が多いが、各々のPI3Kアイソフォームは下流分子のAktを介して、アポトーシス・細胞増殖、細胞周期、血管新生などの多くの生物学的現象に関与している。

(4) 上記のPI3Kとクロストークする分子の一つであるStat3 (signal transducer and activator of transcription 3) は、Jak チロシン・キナーゼなどによりリン酸化を受け活性化される転写因子である。多くのヒト腫瘍で恒常的に活性化されていることから、細胞の増殖に大きな役割を果たしている。さらにStat3はメラノサイトにおいて、Mitfを介して、Bcl-2を制御しアポトーシスを抑制すると考えられている。

(5) 今回の研究課題においては、白髪化お

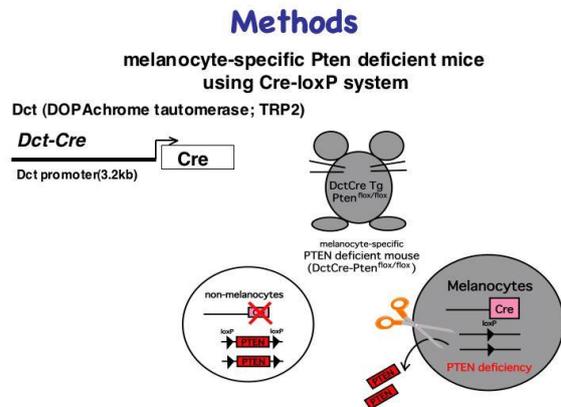
よびその分子基盤であるメラノサイト幹細胞維持機構におけるPI3KアイソフォームとStat3の役割を解明するため、様々なPI3Kアイソフォーム欠失マウスとメラノサイト特異的Stat3欠失マウスを用いて、加齢、抜毛、放射線照射などの負荷による表現型の変化を観察する。もしこれらの処理により毛包バルジ領域に存在するメラノサイトの幹細胞が選択的に枯渇し、白髪化が進展するという結果が得られたとしたら、この所見は特定のPI3KアイソフォームとSTAT3がメラノサイト幹細胞の維持に大きな役割を果たしていることを示唆するものであろう。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変マウスの作成 (下図参照)

目的の遺伝子をloxP配列ではさみこんだ遺伝子(flox allele)は、組換え酵素Creの存在下で除去することができる。このCre-loxPシステムを利用して、Dctプロモーター下にCreを発現させたDct-CreトランスジェニックマウスとStat3遺伝子にloxP配列を導入したStat3 flox/floxマウスを交配して、メラノサイト特異的にStat3がホモ欠失になったDct-Cre; Stat3 flox/floxマウスを作成する。

また佐々木雄彦先生 (秋田大学) より供与されたPI3K γ ホモ欠失マウスを繁殖させる。



(2) PI3K γ とStat3の欠失の解析

前述の遺伝子の欠失を確認するため、個々の遺伝子改変マウスより分離したメラノサイトを培養し、ゲノムDNAと全タンパク質を抽出した後、PCRとサザンブロットを施行する。

(3) 肉眼的表現系の検討

肉眼的表現系を解析するため、加齢、抜毛、放射線照射などの負荷を加えた後における体毛の色調変化を経時的に長期観察する。

4. 研究成果

(1) 生後8—10週のマウスでは体毛は休止期の状態にある。この時期の体毛を抜去すると、成長期が誘導され、体毛の成長を同調することができる。この時期の体毛に、さらに5 Gyの放射線を照射すると色素細胞の幹細胞が枯渇し、体毛が白髪化することが知られている。

そこで、この方法を詳細に検討するため、放射線を照射1日後に脱毛し、さらに3週後に脱毛した。

その結果、野生型では3 Gy照射すると灰白色調を呈し、また5 Gy照射すると白髪化した。

照射前



3 Gy 照射



5 Gy 照射



(2) そこで、*Stat3* が欠失した場合の、メラノサイト幹細胞の動態を解析するため、*Dct-Cre; Stat3 flox/flox* マウスに放射線3 Gyを照射、1日後に脱毛し、さらに3週後に脱毛した。

その結果、*Dct-Cre; Stat3 flox/flox* マウスでは9週後に、大半の体毛が白髪化した。



(3) 同様に、PI3K 触媒サブユニット p110 γ が欠失した場合の、メラノサイト幹細胞の動態を解析するため、*PI3K γ* ホモ欠失マウスに放射線 3 Gy ないし 5 Gy を照射、1 日後に脱毛し、さらに 3 週後に脱毛した。

その結果、*PI3K γ* ホモ欠失マウスでは 9 週後に、3 Gy および 5 Gy を照射すると、両者ともに、大半の体毛が白髪化した。

3 Gy 照射



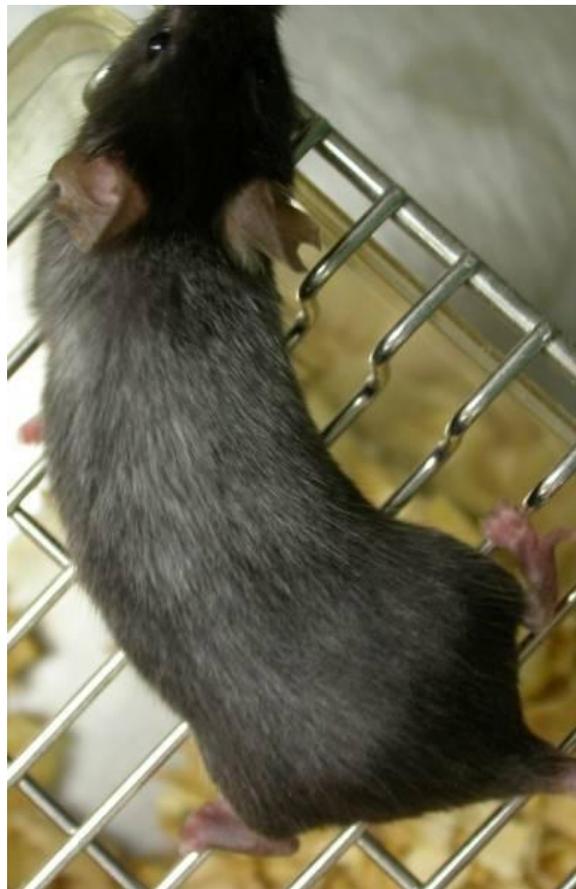
5 Gy 照射



(4) これらの所見は、野生型マウスと比べて、*PI3K γ* 欠失マウスと *Dct-Cre; Stat3 flox/flox* マウスは放射線に対して感受性が高いことを示唆している。よって、STAT3 と PI3K γ は両者ともにメラノサイト幹細胞の維持に重要な役割を果たしているものと思われる。

そこで、STAT3 と PI3K γ を負に制御する PTEN の生物学的役割を解明するため、*Dct-Cre; Pten flox/flox* マウスに放射線 5 Gy を照射、1 日後に脱毛し、さらに 3 週後に脱毛した。

事前の予想では、*Pten* が欠損すると STAT3 と PI3K γ の機能が亢進し、アポトーシスが抑制され、メラノサイト幹細胞が放射線照射に対し抵抗性を示すものと思われた。しかし、予想に反して、*Dct-Cre; Pten flox/flox* マウスでは 6 週後に、5 Gy を照射すると大半の体毛が白髪化した。

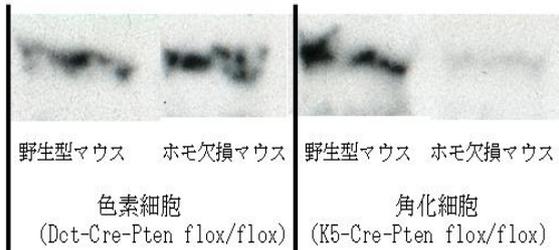


(5) この所見は、導入された *Dct* プロモーターが何らかの理由で十分に働かず、*Pten* を完全に欠失させることが出来ていないのではないかと推察された。

そこで、蛋白レベルで発現を検索したところ、*K5-Cre; Pten flox/flox* マウス由来の培養ケラチノサイトでは PTEN が欠損していたが、*Dct-Cre; Pten flox/flox* マウス由来の

培養メラノサイトでは、PTENが発現していることが判明した。

Stat3の免疫プロット所見



これらの結果を踏まえて、*Dct* プロモーターに替えて、同様にメラノサイト特異的に作用する *Tyrosinase* プロモーターを持つ *Tyr-Cre* マウスと *Pten flox/flox* マウスを交配し、*Tyr-Cre; Pten flox/flox* マウスを作成し、同様の解析を遂行中である。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者 河村 七美
(秋田大学・医学部・助教)

研究者番号：70323152

(2) 研究分担者 なし

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし

研究者番号：