

## 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 6 月 1 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770119

研究課題名（和文）表皮および毛包形成における Hair keratin の新規機能の解明

研究課題名（英文）Analysis of new function of Hair keratin in epidermis and hair follicle morphogenesis

研究代表者

七島 直樹（NANASHIMA NAOKI）

弘前大学・大学院保健学研究科・講師

研究者番号：80333730

研究成果の概要（和文）： Hair keratin欠損ラットHHRでは毛包の形成異常が認められるため、Hair keratinの表皮や毛包の形成における機能を解析した。HHRではKeratin associated protein (KRTAP)の発現が著減していた。Hair keratin遺伝子はKRTAPの遺伝子発現を制御する可能性が示唆されたとともに、これらの遺伝子発現の低下がHHRの毛包の形成に異常を与えることが考えられた。

研究成果の概要（英文）： We used hair keratin-deficient rats (Hirosaki hairless rats, HHRs) that have abnormal hair follicle morphogenesis to determine the function of hair keratin in the epidermis and hair follicle morphogenesis. In transcriptome analysis, expression of the keratin-associated protein (*KRTAP*) gene critically decreased in HHRs. Thus, we believe that hair keratin functions as a regulator of *KRTAP* gene expression and decreases expression of genes that cause abnormal hair follicle morphogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞骨格

## 1. 研究開始当初の背景

Keratinは細胞骨格を構成するタンパク質である。Keratinには上皮細胞の中間径フィラメントであるCytokeratinと毛、爪、羽毛などを構成するHair keratinが存在する。Cytokeratinは約20種類報告され、その発現している細胞（組織）が知られており、ガンのマーカーとしても活用されている。Hair keratinについては約15種類知られているが、

単なる爪や毛の構成成分でしかないと考えられており、その研究もあまり進んでいなかった。Hirosaki hairless rat (HHR)はSprague-Dawley rat (SDR)から突然変異で生じ、弘前大学動物実験施設において発見された乏毛を呈するラットである。HHRの表現型は常染色体性劣性遺伝するがその責任遺伝子は不明だった。最近になって、HHRには第7染色体の長腕(7q36)にKb21、Kb23、Kb26

などの塩基性 Hair keratin 遺伝子を含む約 80-kb の欠失があり、これら遺伝子の欠失が HHR の責任遺伝子群であることが明らかになった。HHR の皮膚の異常としては乏毛の他に、表皮、特に角質層が肥厚していること、毛包は存在するが毛乳頭部分が膨らみ、形がいびつで方向が一定でないことが明らかになっている (Akita et al. Hirosaki Med. J., 60:1-11, 2009)。申請者は、HHR での毛包形成と乳腺の異常は Hair keratin の欠失によると考えている。しかし、これまで、Hair keratin は単なる毛や爪の構造タンパクでしかないと考えられてきた。そこで、「Hair keratin はこれまで知られていなかった表皮や毛包の形成に機能を有しているのでは？」という発想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、Hair keratin が欠失することで HHR の表皮と毛包がどのような形成経過をたどり、どのような異常をきたすのか病理学的に調べ、形成の過程における遺伝子の発現や Hair keratin と相互作用するタンパク質を検索し、Hair keratin の表皮と毛包形成における機能を探索した。

## 3. 研究の方法

表皮と毛包の形成における Hair keratin の機能を解明するために、HHR をネガティブコントロールとして SD ラット胎児期の表皮と毛包の発達度合を経時的に観察し、どのタイプの Hair keratin がどの場所に発現するのか免疫染色で解析。また、HHR の皮膚での遺伝子発現異常をマイクロアレイで網羅的に解析。Hair keratin 以外の細胞骨格に質的・量的に異常はないか検討し、以上をまとめ表皮と毛包形成に Hair keratin がどのように関与しているのか、Hair keratin の新規機能を中心に解析。

## 4. 研究成果

(1)胎生 16 日、20 日、生後 1 日目、7 日目のラット表皮の組織を HE 染色後、観察したところ、胎生 16 日か生後 1 日目では毛包の向きは SDR と HHR で差異は認められず、表皮の肥厚もなかったが、生後 7 日目になると HHR の表皮は SDR よりも肥厚し、毛包の形も異常に変形していることが明らかになった。走査型電子顕微鏡や実体顕微鏡で皮膚表面を観察したが、生後 1 日目では変化はなかった。各時期の胎児を抗 Hair keratin Kb21 抗体で免疫染色すると、表皮や毛包はわずかに染色されたが、生後 1 日目では強く発現していた。よって、Hair keratin は生後急激に発現し始め、表皮や毛包形成に関与していることが示唆された。また、表皮以外に Hair keratin が発現している組織は認められなかった。

(2) ラットの皮膚より RNA を抽出し、エクソンマイクロアレイ解析によって、遺伝子の発現を検討するとともに、サブライジングバリエーションの異常を検索した。SDR に対し HHR ラットについて、t 検定を行い、2 群間に有意差のある ( $p$  値  $< 0.05$ ) 遺伝子を抽出したところ、HHR で発現が低下した遺伝子は 43、亢進した遺伝子は 234 検出された。その中でも数種類の Keratin associated protein (KRTAP) の発現が大幅に低下していた。これらのタンパクは Hair keratin と相互作用することが考えられており、Hair keratin の欠失により KRTAP の発現も低下することが毛包の形成に異常をきたす原因であると示唆された。また、マトリックスメタロプロテアーゼの発現が大幅に亢進しており、HHR では毛包が移動しやすい環境下にあることも形態の異常に関与していることが考えられた。以上の結果より、Hair keratin は KRTAP の遺伝子発現に大きく影響を与える可能性が示唆された。しかし、KRTAP に関しては不明な点が多いため、Hair keratin との直接的な相互作用は解析中である。

以上の結果より、Hair keratin が欠失することで KRTAP の遺伝子発現までなぜ低下するのか今後検討する必要がある。Hair keratin はこれまで、単なる構造タンパク質という位置付けをされてきていたので、Hair keratin 遺伝子が KRTAP の遺伝子発現に影響を与えているとすればそのインパクトは大きい。

## 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 6 件)

1. Nanashima N, Ito K, Ishikawa K, Nakano M, Nakamura T. Damage of hair follicle stem cells and alteration of keratin expression in external radiation-induced acute alopecia. International Journal of Molecular Medicine, in press.
2. 清水 武史、七島 直樹、山田 俊幸、土田 成紀 ベルオキシソーム増殖剤によるラット肝発がん過程における CD34 陽性前駆細胞の出現 日本分子腫瘍マーカー研究会誌、Vol. 27、p17-18 2012
3. Miura T, Kimura N, Yamada T, Shimizu T, Nanashima N, Yamana D, Hakamada K, Tsuchida S. Sustained repression and translocation of Ntcp and expression of Mrp4 for cholestasis after rat 90% partial hepatectomy. J Hepatol, 55, 407-414, 2011.
4. Yamana D, Shimizu T, Fan Y, Miura T,

Nanashima N, Yamada T, Hakamada K, Tsuchida S. Decrease of hepatic stellate cells in rats with enhanced sensitivity to clofibrate-induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Sci.*, 102, 735-741, 2011.

5. 清水 武史、七島 直樹、山田 俊幸、三浦 卓也、山名 大輔、土田 成紀 ペルオキシソーム増殖剤によるラット肝発がん過程は多段階で進行する 日本分子腫瘍マーカー研究会誌、Vol. 26、p24-25 2011
6. Shimizu T, Fan Y, Yamana D, Miura T, Nanashima N, Yamada T, Tsuchida S. Glutathione S-transferase A4 is a positive marker for rat hepatic foci induced by clofibrate and genotoxic carcinogens. *Cancer Sci.*, 101, 1093-1098, 2010.

[学会発表] (計 17 件)

1. 七島直樹、山田俊幸、清水武史、土田成紀 Phospholipase A2 group IVc の欠失による乳がん細胞増殖の抑制、第 84 回日本生化学学会大会、京都国際会館 2011 年
2. 土田成紀、清水武史、七島直樹、山田俊幸 ペルオキシソーム増殖剤による肝発がん抵抗性のラットでの phospholipase A2 group IVc と Ly49 遺伝子の欠失、第 84 回日本生化学学会大会、京都国際会館 2011 年
3. 山田俊幸、七島直樹、清水武史、土田成紀 Th 細胞の分化異常を示す弘前ヘアレスラットは胸腺内 T 細胞と樹状細胞に発現する *Ly49* ファミリー遺伝子を欠失している、第 84 回日本生化学学会大会、京都国際会館 2011 年
4. 清水武史、七島直樹、山田俊幸、土田成紀 ペルオキシソーム増殖剤によるラット肝での前駆細胞の活性化と肝発がんとの関連性、第 84 回日本生化学学会大会、京都国際会館 2011 年
5. 黒田喜幸、葛西宏介、須藤晋一郎、後藤昌史、七島直樹、石川孝、米田雅彦、中村敏也 ヒアルロン酸合成酵素 2 (HAS2) の活性調節に関与するアミノ酸残基の検討、第 84 回日本生化学学会大会、京都国際会館 2011 年
6. 七島直樹、山田俊幸、清水武史、土田成紀 Phospholipase A2 group IVc はラット乳がん細胞の増殖に寄与する、第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場 2011 年
7. 清水武史、七島直樹、山田俊幸、土田成紀 ペルオキシソーム増殖剤によるラット肝発がん過程における肝前駆細胞の活性化、第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場 2011 年
8. 土田成紀、清水武史、七島直樹、山田俊幸 ペルオキシソーム増殖剤による肝発がん耐性の SD ラットでは phospholipase A2 と Ly49 遺伝子が欠失している 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場、2011 年
9. Naoki Nanashima, Koichi Ito, Hiroyuki Nozaka, Takashi Ishikawa, Manabu Nakano, Asako Ishizawa, Honami Narita and Toshiya Nakamura Analysis of the profile and mechanism of radiation-induced hair loss through examination of protein derived from the hair of patients with acute alopecia caused by external radiation exposure. The 3rd International Symposium on Radiation Emergency Medicine, 2011, Hirosaki University
10. 七島直樹、山田俊幸、清水武史、三浦卓也、山名大輔、土田成紀 Decrease in mammary tumor cell proliferation in *phospholipase A2 group IVc* gene deleted rat 第 69 回 日本癌学会学術総会 2010 年 大阪国際会議場
11. 清水武史、山名大輔、七島直樹、山田俊幸、三浦卓也、土田成紀 ペルオキシソーム増殖剤によるラット肝発がん過程は多段階で進行する 第 69 回 日本癌学会学術総会 2010 年 大阪国際会議場
12. 土田成紀、三浦卓也、清水武史、山名大輔、七島直樹、山田俊幸 クロフィブレート体制ラット肝とヒト肝では PPAR  $\alpha$  の内因性リガンドを産生する酵素の発現は低下している 第 69 回 日本癌学会学術総会 2010 年 大阪国際会議場
13. 七島直樹、山田俊幸、清水武史、三浦卓也、山名大輔、土田成紀 Deletion of the *phospholipase A2 group IVc* gene and its effects on development of breast cancer in Hirosaki hairless 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学学会大会 合同大会 2010 年 神戸国際展示場
14. 土田成紀、三浦卓也、清水武史、山名大

輔、七島直樹、山田俊幸 クロフィブレートに低感受性のラット肝とヒト肝でのPPARalphaの内因性リガンド産生酵素の発現低下 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会 2010年 神戸国際展示場

15. 山田俊幸、七島直樹、清水武史、三浦卓也、山名大輔、土田成紀 ヘルパーT細胞Th2の分化不全を示すラットでの抗原提示細胞に存在する抑制性遺伝子 *SKINT4*、*SKINT7*の発現上昇 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会 2010年 神戸国際展示場
16. 清水武史、山名大輔、七島直樹、山田俊幸、三浦卓也、土田成紀 ベルオキシソーム増殖剤によるラット肝発がん過程の早期病変であるBE陰性巢の増殖能の評価 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会 2010年 神戸国際展示場
17. 七島直樹、井村美穂、福島奈緒、葛西宏介、中野学、石川孝、中村敏也 乏毛と乳腺発達異常を示すラットHHRにおけるゲノム異常の解析 第5回日本臨床検査学教育学術大会 2010年 弘前大学大学院保健学研究科

〔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

七島 直樹 (NANASHIMA NAOKI)  
弘前大学・大学院保健学研究科・講師  
研究者番号：80333730

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：