

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461708

研究課題名(和文) 難治性脱毛に対するカンナビノイド受容体を介した新規の治療薬の開発

研究課題名(英文) The establishment of new treatment by cannabinoid receptor signaling on intractable alopecias

研究代表者

菅原 弘二 (Sugawara, Koji)

大阪市立大学・大学院医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50634078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：カンナビノイド受容体type 1 (CB1)は、近年ヒトの生体内での様々な生態反応を制御する重要な分子であることが分かってきている。今回我々は、CB1を介したシグナル伝達が毛包幹細胞の増殖および細胞死をコントロールすることをヒト毛包組織器官培養系を用いて証明した。すなわち、CB1を刺激すると、毛包幹細胞は増殖する。この事実は毛包幹細胞が損傷を受けて発症する瘢痕性脱毛症を含めた難治性脱毛症に対する新規の治療法の開発に応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Our results show that cannabinoid receptor type 1 (CB1) signaling can control human hair follicle stem cell proliferation/apoptosis. CB1 could be a new target for treating intractable alopecia including scarring alopecia.

研究分野：毛髪科学

キーワード：カンナビノイド受容体 毛包幹細胞 瘢痕性脱毛症

1. 研究開始当初の背景

毛髪は、皮膚表面の物理的保護や感覚器官としての働きだけではなく、外見を個性的に見せるといった社会的な側面でも貢献していると言える重要な臓器である。毛包は成長期、退縮期、休止期と大きく分けて3つの段階から構成される毛周期 (hair cycle) と呼ばれる周期を持ち、生涯この周期を繰り返す特異的な臓器である (Paus R and Costalieris M N Eng J)。この毛周期に合わせて毛包の長さ、形態は変化する (Mueller-Roever et al., J Invest Dermatol, 2001)。

脱毛症は毛包部における免疫バランス、ホルモンバランス、栄養状態など様々な原因で発症する疾患群である。脱毛症はその病型の多様さから治療が確立されていないものも多く、毛髪が持つ社会的な側面も含めて、脱毛症患者さんが受ける精神的苦痛は計り知れない。特に毛包の幹細胞が存在するとされる毛隆起 (バルジ領域) が炎症細胞によって破壊される癬痕性脱毛症では、毛包の再生能力が阻害されるため永久的 (非可逆的) な脱毛を生じる。毛包幹細胞が破壊されることによって生じる脱毛症に対する有効な治療法は現在までのところほとんど確立されていない。

脂質メディエーターの一つである内因性カンナビノイドは、その受容体であるカンナビノイドレセプターに結合することで様々なシグナル伝達を行っている (Di Marzo V, Pharmacol Res, 60:77-84, 2009)。ヒトの生体内にはこの内因性カンナビノイドを合成する酵素と分解する酵素の両者が存在しており、これらの酵素とカンナビノイドレセプターを合わせて endocannabinoid system (ECS) と呼ぶ (Di Marzo V, Pharmacol Res, 60:77-84, 2009)。内因性カンナビノイドは様々なヒトの疾患でその関連性が示唆されている。例えば、内因性カンナビノイドはアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞踏病や多発性硬化症に代表される脳神経内の炎症反応を抑制し (Scotter EL et al., Br J Pharmacol, 160:480-498, 2010, Basavarajappa BS et al., Mini Rev Med Chem, 9:448-462, 2009) 腸の炎症や大腸がんを抑制することが示唆され (Izzo AA and Camilleri M, Pharmacol Res, 60:117-125, 2009) 急性および慢性の肝疾患 (Huang L et al., Dig Liver Dis, 43:188-193, 2011) や心疾患 (Rosenson RS, Cardiology, 114:212-225, 2009) の機序にも関与していることが示唆されており、ヒトの生体内での様々な生態反応を制御する重要な分子であることが分かってきている。毛髪に関しては、ヒト毛包内の上皮系細胞でもカンナビノイド受容体 type I が発現しており、この受容体を介したシグナル伝達によって毛周期がコントロールされていることが報告されている (Telek A et al., FASEB J, 21:3534-3541, 2007)。さらに毛包周囲に存在する肥満細胞もカンナビノイド

受容体 type I を発現しており、これを介したシグナル伝達は同細胞の脱顆粒および分化を抑制的に制御し、ヒトの生体内で肥満細胞の活性化を抑制する内因性の機構が存在することが報告されている (Sugawara K et al., J Allergy Clin Immunol, 129:726-738, 2012)。

しかし、このカンナビノイド受容体を介したシグナル伝達が毛包幹細胞に与える影響に関しては全く分かっていない。我々はこの点に着目し、今回の研究を行った。我々の研究は、最終的には、カンナビノイド受容体 type I を修飾する物質の臨床応用まで拡大できる可能性があり、さらに脱毛症に対する毛包幹細胞を用いた新規の治療法の開発に貢献できる可能性がある。

2. 研究の目的

近年、ヒト体内の様々な細胞に発現しているカンナビノイドレセプターを介したシグナルが体の恒常性を維持するために重要な役割を果たしていることを示唆する研究結果が報告され始めている。ヒト毛包に分化する能力を持つ毛包幹細胞がこのカンナビノイドレセプターを介したシグナル伝達によってどのような影響を受けるのかを調査するため、実際のヒトより得られた毛包を用いた器官培養系を用いた研究を行ない評価した。この研究によってカンナビノイドレセプターを介したシグナル伝達が難治性脱毛に対する新規の治療法に応用できる可能性がある。

3. 研究の方法

研究は主に正常ヒトの頭部皮膚組織から分離して得られた毛包を用い、カンナビノイドレセプターに対する選択的アゴニストである ACEA およびアンタゴニストである AM251 やさらにカンナビノイドレセプター type I に対する siRNA 等を用いた器官培養の系で行った。このように我々の研究は細胞培養ではなく実際のヒト毛包の器官培養の系を用いているため、極めてヒトの生体内に近い状態で研究できる点が長所である。培養した毛包を用いて主に免疫組織化学的なアプローチでの評価/研究を行った。

4. 研究成果

まず、ヒト毛包のバルジ領域の毛包幹細胞が実際にカンナビノイド受容体 type 1 (CB1) を発現しているのかを調べるために、正常ヒト頭部皮膚を用いて、CB1 と毛包幹細胞マーカーの一つであるサイトケラチン 15 (CK15) に対する抗体を用いて2重免疫組織化学染色を行った。その結果、ヒト毛包幹細胞は CB1 を発現していることが示された (図1)。

図 1 CK15 (Green) CB1 (Red)、2重染色

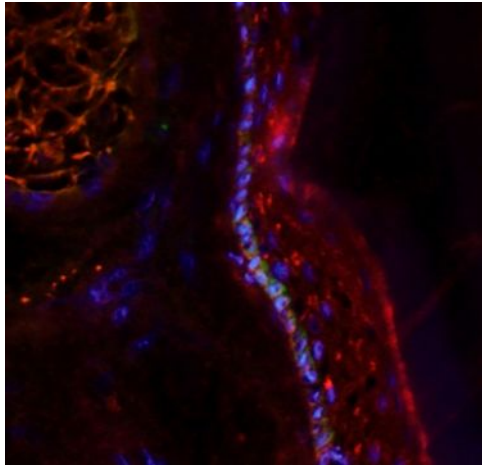
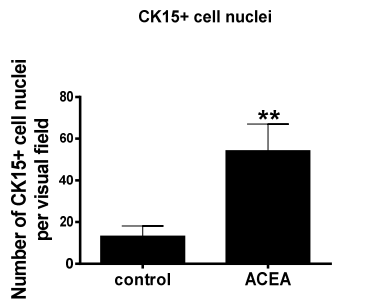


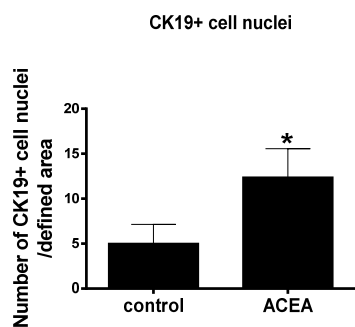
図 2 (a)



**P<0.01

Data are presented as means + SEM. Groups were compared by Mann-Whitney test for unpaired samples (GraphPad Prism, GraphPad Software, San Diego, USA).

(b)



*P<0.05

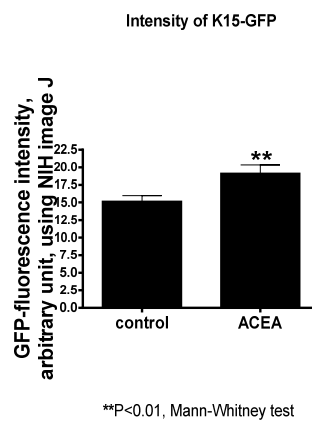
Data are presented as means + SEM. Groups were compared by Mann-Whitney test for unpaired samples (GraphPad Prism, GraphPad Software, San Diego, USA).

次に、ヒト毛包器官培養系を用いて、CB1 に対する選択的アゴニストである ACEA およびアンタゴニストである AM251 を添加培養 (24 時間) し、ヒト毛包の幹細胞 (マーカー: CK15 および 19 陽性細胞) に与える影響に関して

免疫組織化学的手法を用いて調査した。その結果、ACEA 投与群で CK15 および CK19 陽性細胞の数が対照群と比較して有意に上昇していた (図 2, a および b)。しかし、その増加はアンタゴニストである AM251 の共添加により抑制された (data not shown)。

さらに、ヒト毛包の幹細胞のマーカーである CK15 遺伝子のプロモーター領域を GFP でラベルした毛包 (Tiede S et al., Stem Cells, 27:2793-2803, 2009) に CB1 の選択的アゴニスト、アンタゴニストを添加し、培養し、毛包内の GFP の発現を対照群と比較した。その結果、ACEA は CK15 プロモーター-GFP の発現を有意に促進した (図 3)。

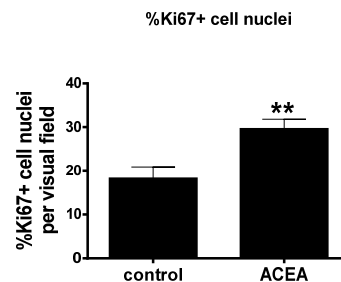
図 3



**P<0.01, Mann-Whitney test

次に、CK15 プロモーターを GFP でラベルした細胞を毛包から単離して、細胞培養を行ない、同様に ACEA を添加し、GFP 陽性細胞の増殖率、アポトーシス率を比較した。その結果、ACEA 投与群では同細胞の GFP 陽性細胞の増殖率は有意に増加していた (図 4)。一方でアポトーシスは変化していなかった (data not shown)。

図 4



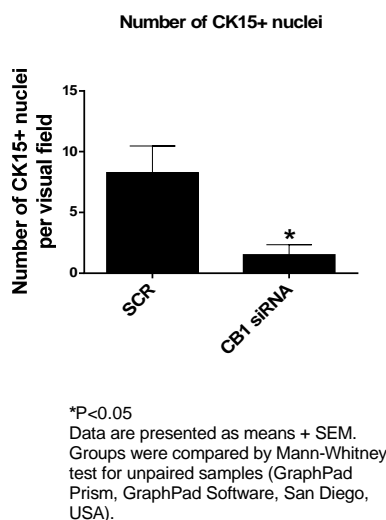
**P<0.01

Data are presented as means + SEM. Groups were compared by Mann-Whitney test for unpaired samples (GraphPad Prism, GraphPad Software, San Diego, USA).

次に、ヒト毛包器官培養系を用いて CB1 の遺伝子ノックダウン (Sugawara K et al., J Allergy Clin Immunol, 129:726-738, 2012) を行い、CB1 遺伝子ノックダウンの毛包幹細胞

胞に与える影響を調べた。その結果、CB1 ノックダウン群で CK15 陽性細胞数が対照群 (SCR) に比較して有意に減少していた(図 5)。

図 5



以上の結果から、CB1 はヒト毛包幹細胞の増殖、維持に重要であることが示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Koji Sugawara “ Human epithelial stem cells need tonic cannabinoid receptor-1 mediated signaling ” Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung 2013 年 3 月 14 日-16 日 デッサウ (ドイツ)

2. 菅原 弘二 “ カンナビノイド受容体タイプ 1 シグナルはヒト毛包幹細胞および前駆細胞の分裂を促進する ” 第 40 回皮膚かたち研究学会 2013 年 7 月 28 日 石垣記念ホール (東京都港区)

3. 菅原 弘二 “ カンナビノイド受容体タイプ 1 シグナルはヒト毛包幹細胞の増殖能をコントロールする ” 第 33 回分子病理学会 2014 年 7 月 25 日、26 日 宮城蔵王ロイヤルホテル (宮城県刈田郡)

4. 菅原 弘二 “ カンナビノイドは皮膚疾患を救うか? ” 第 46 回日本臨床分子形態学会総会 2014 年 10 月 17 日、18 日 TKP 市ヶ谷カンファレンスセンター (東京都新宿区)

5. 菅原 弘二 “ 皮膚疾患におけるカンナビノイド受容体の役割について ” 第 1 回関西若手皮膚科医の集い (大阪) 2014 年 11 月 1 日 大阪大学 銀杏会館 (大阪府吹田市)

〔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

菅原 弘二 (Sugawara, Koji)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号 : 50634078

(2) 研究分担者

鶴田 大輔 (Tsuruta, Daisuke)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号 : 90382043

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :