

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2013～2016  
課題番号：25461717  
研究課題名(和文) 幹細胞に焦点をあてた白髪発症機構の解析

研究課題名(英文) Mechanisms of hair graying

## 研究代表者

飯田 真智子 (IIDA, Machiko)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：60465515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：白髪は万人に生じる加齢現象である。しかしながら、加齢性白髪の発症メカニズムについては未だ不明な点が多い。本研究では、研究代表者らによって開発された加齢性白髪を発症するオリジナルモデルマウスを用い、加齢性白髪発症メカニズムの解析を行った。その結果、モデルマウスに発症した白髪毛根では、ヒト白髪と同様に毛根メラノサイト幹細胞が消失していることが示された。また、そのメカニズムの一端として、メラノサイト幹細胞の周囲に分布するケラチノサイト幹細胞からの分泌タンパクの加齢性変化が関与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Hair graying is a symbol of aging. However, the mechanisms underlying age-related hair graying have not yet been fully clarified. In this study, we examined the mechanisms of age-related hair graying using our novel model mice, in which progressive hair graying is observed with age. Follicular melanocyte stem cells are known to be a melanocyte reservoir in hair follicles. We observed the elimination of follicular melanocyte stem cells in hair follicles with age in our model mice. Furthermore, our results suggested that interactions between melanocyte stem cells and keratinocyte stem cells through an endocrine protein is involved in age-related hair graying in our model mice.

研究分野：皮膚科学

キーワード：メラノサイト 幹細胞 毛髪 皮膚

### 1. 研究開始当初の背景

白髪は万人に生じる加齢現象である。しかしながら、加齢性白髪の発症メカニズムについては未だ不明な点が多い。白髪化は、中年より十数年をかけて徐々に進行するため、ヒトで加齢性白髪発症メカニズム解明する事は難しい。したがって、ヒトに類した加齢性白髪発症モデルマウスを用いた解析が有効である。これまでに、様々な白髪発症モデルマウスが作製され、白髪化メカニズムに関する研究が報告されている (Nature 2002, Science 2005, Cell 2009)。しかしながら、これまでに解析された白髪モデルマウスは、生まれて数週間～数ヶ月程度で白髪を発症するいわば若白髪のモデルが多く、ヒトと同様に加齢性に白髪を発症するモデルマウスは限られている。

申請者らは、ヒトと同様に加齢性に白髪を発症するモデルマウスを作製した。このモデルマウスでは、生後3ヶ月齢までは、ほとんど白髪を発症しないが、加齢とともに白髪を発症する。マウスの寿命は、24～30ヶ月とされているが、野生型マウスでは、20ヶ月齢でも白髪は数%しか存在しないのに対し、本モデルマウスでは、約90%の体毛が白髪となる。先行研究により、ヒト白髪では、毛髪にメラニンを供給するメラノサイトの細胞供給源であるメラノサイト幹細胞 (図1) が死滅していることが報告されている (Nishimura *et al.*, Nature 416, 2002)。しかしながら、なぜ加齢性にメラノサイト幹細胞が消失するのか、その原因は未だ明らかでない点が多い。メラノサイトの生存には、周囲のケラチノサイトとの相互作用が重要である事が報告されている (Imokawa, Pigment Cell Res 17, 2004)。しかしながら、加齢性白髪における毛根メラノサイト幹細胞とその周囲に存在するケラチノサイト幹細胞 (図1) との相互作用については未だ不明な点が多い。

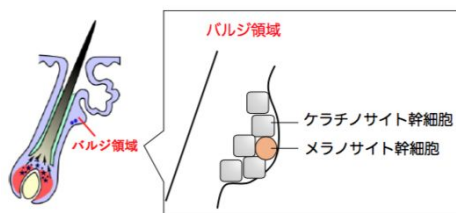


図1：毛根の模式図。毛根膨大部（バルジ領域）にメラノサイト幹細胞とケラチノサイト幹細胞が分布する。

### 2. 研究の目的

本研究では、申請者らのグループが開発した加齢性に白髪を発症するモデルマウスを用いて、メラノサイト幹細胞に焦点を当て、加齢性白髪発症メカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

(1)メラノサイト幹細胞の検出：モデルマウスにおける毛根メラノサイト幹細胞の性状

および分布を調べるために、マウスから皮膚を採取し、未固定凍結切片 (8 μm) を作製した。アセトンで後固定を行い、1次抗体 (抗Dct抗体および抗c-Kit抗体) を4℃で一晩反応させた。二次抗体は、Alexa594-donkey anti-goat IgG および Alexa488-donkey anti-Rat IgG を用いた。核はDapiにより染色した。

(2)白髪化関連分子：本研究に用いたモデルマウスでは、活性型受容体型チロシンキナーゼが導入されている。しかしながら、この分子の皮膚における詳細な発現パターンは明らかになっていない。本分子の加齢性白髪発症に及ぼす影響を調べた。4%パラフォルムアルデヒドにて固定した皮膚凍結切片を用いて、本分子に対する抗体およびリン酸化抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。発現レベルは、蛍光強度をWinROOF (三谷商事) 画像解析ソフトにより半定量的に評価した。

(3)毛周期の解析：毛根メラノサイト幹細胞からの細胞供給は、毛周期 (成長期・退行期・休止期) からなる再生周期) と連動している。そこで、モデルマウスにおける体毛の再生を肉眼的に観察するとともに、ヘマトキシリン染色により組織学的に毛周期ステージを同定した。

(4)毛根ケラチノサイトとの相互作用：毛根ケラチノサイトにおけるメラノサイト生存関連分子を探索し、加齢に伴う発現変化をリアルタイムPCR法および蛍光免疫染色により調べた。発現レベルは、蛍光強度をWinROOF (三谷商事) 画像解析ソフトにより半定量的に評価した。

(5)ヒト白髪毛根を用いた解析：本モデルマウスを用いて明らかになった点がヒト白髪化においても適応可能かどうかを、ヒト毛根を含む頭髪の組織切片を用いて蛍光免疫染色により評価した。

### 4. 研究成果

(1)メラノサイト幹細胞の検出：

マウス毛根メラノサイト幹細胞は、Dopachrometautomerase (Dct) 陽性かつ c-kit 陰性あるいは発現が低いことが報告されている。そこで、モデルマウスの皮膚組織切片を作製し、免疫組織化学法によりDctおよびc-Kitを検出した。その結果、若齢時 (1ヶ月齢) では、バルジ領域にDct陽性かつc-Kit陰性/弱陽性の細胞が検出されるが、老齢 (20ヶ月齢) に発症した白髪毛根のバルジ領域には、Dct陽性細胞も、Dct陽性かつc-Kit陰性/弱陽性の細胞も検出されなかった。一方、野生型マウスでは、20ヶ月齢になってもバルジ領域にDct陽性かつc-Kit陰性/弱陽性の細胞が認められた。これらの結果より、モデルマウスに発症した白髪毛根では、ヒト白髪毛根と同様にメラノサイト幹細胞が消失していることが示された。

(2) 活性型受容体型チロシンキナーゼの発現解析：

活性型受容体型チロシンキナーゼの加齢性白髪発症に及ぼす影響を調べるために、モデルマウスの皮膚切片を作製し、免疫組織化学法によってその発現パターンを調べた。野生型マウスにおいてもモデルマウスにおいても、毛根バルジ領域を含む毛根外毛根鞘において当該分子および活性が検出された。さらに、毛周期に伴ってその活性が変動することが明らかになった（論文投稿準備中）。

### (3) 毛周期の解析：

毛髪の再生は、毛周期と呼ばれる再生周期に伴って繰り返される。毛周期は、毛根を再生する「成長期」、アポトーシスにより毛の母細胞（毛母細胞）が消失する「退行期」、毛の形成が休止する「休止期」からなる（図2）。野生型マウスおよびモデルマウスの休止期に剃毛し、毛の生え変わりを肉眼的に観察したところ、野生型マウスと比べ、モデルマウスでは、毛の生え変わりが早いことが再現よく観察された。さらに、組織学的解析により、野生型マウスでは、毛根のほとんどが休止期の形態を示すのに対し、モデルマウスではほとんどの毛根が成長期に移行していることが分かった。肉眼的および組織学的解析により、モデルマウスでは、毛周期の進行過程に異常が生じている可能性があることが分かった。

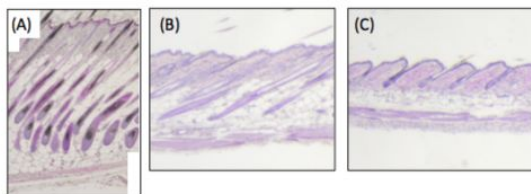


図2：野生型マウスの皮膚のヘマトキシリン-エオシン染色像。成長期（A）、退行期（B）、休止期（C）の代表像を示す。

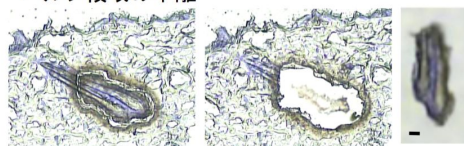
### (4) 毛根ケラチノサイトとの相互作用：

毛周期の回転数は、加齢とともに蓄積する。毛髪再生の細胞供給源であるケラチノサイト幹細胞と毛色再生の細胞供給源であるメラノサイト幹細胞は、毛周期に伴って分裂し、それぞれの子孫細胞を再生することで毛髪および毛色が生涯を通じて再生する。結果（3）より、白髪モデルマウスでは毛周期に異常が確認されたことから、各々の幹細胞の性質にも変化が生じている可能性を考えた。そこで、レーザーマイクロダイジェクション（PALM MBIV）によって単離したバルジ領域（図3）からRNAを抽出し、メラノサイト幹細胞の生存に与えることが報告されている分子の発現量を網羅的に調べた。

その結果、モデルマウスにおいて、加齢と負の相関を示す分子が明らかになった。さらに、これらの分子発現変化と白髪化との関連を明らかにするために、人為的に白髪化を促進したマウスを作製し、これらの遺伝子の発現レベルを調べた所、白髪を誘導したマウスの毛根において発現の低下が検出された。これらの結果より、この分子が白髪化と密接に

関連していることが示唆された。

### レーザーマイクロダイジェクションによるバルジ領域の単離



レーザーによるバルジ領域の切り取り    バルジ領域回収後    回収したバルジ

図3：マイクロダイジェクションにより単離されたバルジ領域を示す。

さらに、ケラチノサイト幹細胞のマーカールあるいはメラノサイト幹細胞のマーカールとともに当該分子の発現パターンを蛍光2重免疫染色により調べたところ、メラノサイト幹細胞自身ではなく、ケラチノサイト幹細胞に発現することが確認された。また、この分子はメラノサイトの生存・増殖・分化などに関与することが報告されている。そこで、ケラチノサイト幹細胞がメラノサイト幹細胞に及ぼす影響として、ケラチノサイトが分泌するタンパクをメラノサイト幹細胞が受容する可能性を考えた。そこで、老化を誘導したヒトケラチノサイト細胞株培養液中の当該分子の分泌量をELISA法により調べた。その結果、老化を誘導した正常ヒトケラチノサイト細胞株において、未処理群と比べて当該分子の分泌量が低下していることが明らかになった。これらの結果は、当該分子の発現および分泌量がケラチノサイトにおいて加齢性に減少し、それがメラノサイト幹細胞の生存に寄与している可能性があることが示された（論文投稿準備中）。

### (5) ヒト白髪毛根を用いた解析：

上記により、モデルマウスの白髪発症機構に関与する可能性が示唆された分子について、ヒト標本を用いた解析を行った。20-30歳の頭皮および70-90歳の頭皮組織における、当該分子の発現パターンおよび発現量を免疫組織化学法により調べた結果、ヒトにおいても本モデルマウスと同様の発現パターンを示すこと、および、画像解析ソフトを用いた半定量的な解析により、発現量が加齢と共に減少している可能性が示された。

以上の結果より、加齢性白髪発症メカニズムの一端をオリジナルモデルマウスを用いた解析により明らかにすることができた。さらに、ヒト白髪においても部分的ではあるが、同様の結果を得ることができた。今後、本研究により明らかになった白髪関連分子のノックアウトマウスを用いた解析などにより、白髪発症メカニズムをより明確なものとし、ヒトとの類似性を検証していくことが白髪化を始めとする幹細胞を起点とした様々な加齢性疾患の機序解明と予防治療法の開発に貢献するうえで重要である。

## 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 33 件)

(1) N. Ohgami, Y. Mitsumatsu, Ahsan Nazmul, AA. Akhand, X. Li, M. Iida, I. Yajima, M. Naito, K. Wakai, S. Ohnuma, M. Kato. Epidemiological analysis of the association between hearing and barium in humans. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 26 (2016) 488-493. 査読有

(2) Y. Kawamoto, Y. Ueno, E. Nakahashi, M. Obayashi, K. Sugihara, S. Qiao, M. Iida, MY. Kumasaka, I. Yajima, Y. Goto, N. Ohgami, M. Kato, K. Takeda. Prevention of allergic rhinitis by ginger and the molecular basis of immunosuppression by 6-gingerol through T cell inactivation. *J. Nutr. Biochem.* 27 (2016) 112-122. 査読有

(3) M. Iida, C. Nakano, M. Tamaki, M. Hasegawa, T. Tsuzuki, M. Kato. Different biological effects of a constant dose for single UVB irradiation with different intensities and exposure times. *Exp. Dermatol.* 25 (2016) 386-388. 査読有

(4) J. He, N. Nan Wang, H. Tsurui, M. Kato, M. Iida, T. Kobayashi. Noninvasive, label-free, three-dimensional imaging of melanoma with confocal photothermal microscopy: Differentiate malignant melanoma from benign tumor tissue. *Sci. Rep.* 6 (2016) 30209. 査読有

(5) N. Ohgami, I. Yajima, M. Iida, X. Li, R. Oshino, YM. Kumasaka, M. Kato. Manganese-mediated acceleration of age-related hearing loss in mice. *Sci. Rep.* 8 (2016) 36306. 査読有

(6) Y. Omata, M. Iida, I. Yajima, N. Ohgami, M. Maeda, H. Ninomiya, R. Oshino, T. Tsuzuki, M. Hori, M. Kato. Modulated expression levels of tyrosine kinases in spontaneously developed melanoma by single irradiation of non-thermal atmospheric pressure plasmas. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 9 (2016) 1061-1067. 査読有

(7) I. Yajima, MY. Kumasaka, S. Ohnuma, N. Ohgami, H. Naito, HU. Shekhar, Y. Omata, M. Kato. Arsenic-mediated promotion of anchorage-independent growth through increased level of placental growth factor. *J Invest Dermatol* 135 (2015) 1147-1156. 査読有

(8) YM. Kumasaka, I. Yajima, M. Iida, H. Takahashi, Y. Inoue, S. Fukushima, H. Ihn, K. Takeda, Y. Naito, T. Yoshikawa, M. Kato. Correlated expression levels of Endothelin receptor B and Plexin C1 in melanoma. *Am. J. Cancer Res.* 15 (2015) 1117-1123. 査読有

(9) ND. Thang, I. Yajima, M. Kumasaka, M. Iida, T. Suzuki, M. Kato. Deltex-3-like (DTX3L) stimulates metastasis of melanoma through FAK/PI3K/AKT but not MEK/ERK pathway. *Oncotarget* 6 (2015) 14290-14289. 査読有

(10) M. Iida, Y. Omata, C. Nakano, I. Yajima, T. Tsuzuki, K. Ishikawa, M. Hori, M. Kato. Decreased expression levels of cell cycle regulators and matrix metalloproteinases in melanoma from RET-transgenic mice by single irradiation of non-equilibrium atmospheric pressure plasmas. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8 (2015) 9326-9331. 査読有

(11) H. Tanaka, M. Mizuno, K. Ishikawa, H. Kondo, K. Takeda, H. Hashizume, K. Nakamura, F. Utsumi, H. Kajiyama, H. Kano, Y. Okazaki, S. Toyokuni, S. Akiyama, S. Maruyama, S. Yamada, Y. Kodera, H. Kaneko, H. Terasaki, H. Hara, T. Adachi, M. Iida, I. Yajima, M. Kato, F. Kikkawa, M. Hori. Plasma with high electron density and Plasma-Activated Medium for Cancer Treatment. *Clinical Plasma Medicine* 3 (2015) 72-76. 査読有

(12) 加藤昌志、小又尉広、飯田真智子、熊坂真由子、大神信孝、李香、鄒存超、中野千尋、加藤容子、大神恭子、大沼章子、矢嶋伊知朗。環境因子により誘発される疾患の発症機構の解明と予防法の開発。日本衛生学雑誌 70 (3):176-180, 2015. 査読有

(13) I. Yajima, MY. Kumasaka, O. Yamanoshita, C. Zou, X. Li, N. Ohgami, M. Kato. GNG2 inhibits invasion of human malignant melanoma cells with decreased FAK activity. *Am. J. Cancer Res.* 4 (2014) 182-188. 査読有

(14) M. Iida, I. Yajima, N. Ohgami, H. Tamura, K. Takeda, S. Ichihara, M. Hori, M. Kato. Effects of non-thermal atmospheric pressure plasma irradiation on expression levels of matrix metalloproteinases in benign melanocytic tumors in RET-transgenic mice. *Eur J Dermatol*, 24

(2014) 392-394. 査読有  
(15) I. Yajima, M. Iida, MY. Kumasaka, N. Ohgami, J. Chang, S. Ichihara, M. Hori, M. Kato. Non-equilibrium atmospheric pressure plasmas modulate cell cycle-related gene expression levels in melanocytic tumors of RET-transgenic mice. *Exp. Dermatol*, 23 (2014) 424-5. 査読有  
(16) T. Yanagishita, I. Yajima, M. Kumasaka, M. Iida, L. Xiang, Y. Tamada, Y. Matsumoto, D. Watanabe, M. Kato. An actin-binding protein Espin is a novel growth regulator for melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 134 (2014) 2996-2999. 査読有  
(17) Y. Omata, M. Iida, I. Yajima, K. Takeda, N. Ohgami, M. Hori, M. Kato. Non-thermal atmospheric pressure plasmas as a novel candidate for preventive therapy of melanoma. *Environ. Health. Prev. Med.* 19 (2014) 367-369. 査読有  
(18) K. Takeda, Y. Kawamoto, M. Iida, Y. Omata, C. Zou, M. Kato. Commentary to Pastore et al (2014): Epidermal growth factor receptor signalling in keratinocyte biology: implications for skin toxicity of tyrosine kinase inhibitors. *Arch Toxicol* 88 (2014) 2319-2320. 査読有  
(19) M. Kato, YM. Kumasaka, S. Ohnuma, A. Furuta, Y. Kato, HU. Shekhar, M. Kojima, Y. Koike, ND. Thang, N. Ohgami, TB. Ly, X. Jia, H. Yetti, H. Naito, G. Ichihara, I. Yajima. Comparison of barium and arsenic concentrations in well drinking water and in human body samples and a novel remediation system for these elements in well drinking water. *PLoS ONE*. 8 (2013) e66681. 査読有

〔学会発表〕(計12件)

(1) M. Iida, Y. Omata, I. Yajima, Y. Kato, M. Yoshinaga, M. Hori, M. Kato. Effect of non-equilibrium atmospheric pressure plasmas irradiation on spontaneously developed melanoma in RET-mice. 6th International Conference on Plasma Medicine (ICPM-6), September 4-9, 2016, Bratislava (Slovakia).  
(2) 飯田真智子、矢嶋伊知朗、小又尉広、中野千尋、熊坂真由子、鄒存超、李香、大神信孝、加藤昌志、モデルマウスを用いた非熱プラズマによる発癌予防効果の検討  
第85回日本衛生学会学術総会、2015年3月26日～28日、和歌山県民文化会館(和歌

山県・和歌山市)

(3) M. Iida, I. Yajima, Y. Omata, X. Li, C. Zou, C. Nakano, K. Ishikawa, M. Hori, M. Kato. NON-EQUILIBRIUM ATMOSPHERIC PRESSURE PLASMA MODULATES TRANSFORMATION-MEDIATED GENE EXPRESSION LEVELS IN MELANOCYTIC TUMORS IN VIVO. The 2nd International Workshop on Plasma for Cancer Treatment, March 16-17, 2015, Nagoya University (Aichi・Nagoya).

(4) 飯田真智子、矢嶋伊知朗、熊坂真由子、神保佳奈、田村青鳥、大神信孝、加藤昌志、モデル動物を用いたメラノーマ予防・治療法の開発、第84回日本衛生学会学術総会、2014年5月25～27日、岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)

(5) 飯田真智子、矢嶋伊知朗、大神信孝、加藤昌志、実験動物を用いた紫外線が誘発する健康リスク評価法の開発、第88回日本産業衛生学会、2014年5月13日～16日、グランフロント大阪(大阪府・大阪市)

〔図書〕(計2件)

(1) 飯田真智子(分筆) 監修 正木 仁、岩淵徳郎、平尾哲二、シーエムシー出版、化粧品技術者のための素材開発実験プロトコル集、第IV編 育毛剤実験法 第1章 2. 毛包毛乳頭のアルカリフォスファターゼ活性評価法 3. 培養毛乳頭のアルカリフォスファターゼ活性評価法 347(259-268)、2015年  
(2) 矢嶋伊知朗、大神信孝、山本博章、加藤昌志、慶應義塾大学出版会、色素細胞(第2版)第17章 皮膚以外に存在するメラノサイトの機能 328(223-235)、2015年

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

(1) 白斑毒性及び黒皮症毒性の試験方法  
発明者: 加藤昌志、飯田真智子  
権利者: 名古屋大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2016-104698  
出願年月日: 2016年5月25日  
国内外の別: 国内  
(2) メラノーマ特異的バイオマーカー及びその利用  
発明者: 加藤昌志、矢嶋伊知朗、武田湖州恵、後藤友二  
権利者: 名古屋大学(90%)と中部大学(10%)の共同出願  
種類: 特許  
番号: 特願 2015-58692  
国際出願番号: PCT/JP2016/054968  
出願年月日: 2015年3月20日  
2016年2月20日(PCT出願)  
国内外の別: 国内・国外 PCT出願  
(3) 幹細胞を標的とした薬効及び毒性の評価法

発明者：飯田真智子、加藤昌志  
権利者：名古屋大学  
種類：特許  
番号：特願 2013-131956  
出願年月日：2013 年 6 月 24 日  
国内外の別：国内

〔その他〕

名古屋大学環境労働衛生学ホームページ  
<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/hygiene/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

飯田 真智子 (IIDA, Machiko)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教  
研究者番号：60465515

### (2) 研究分担者

大神 信孝 (OHGAMI, Nobutaka)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：80424919

武田 湖洲恵 (TAKEDA, Kozue)  
中部大学・生命健康科学部・准教授  
研究者番号：80345884

### (3) 連携研究者

矢嶋 伊知朗 (YAJIMA, Ichiro)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：80469022

### (4) 研究協力者

佐藤 あをい (SATO, Awoi)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・技術補佐員