

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670772

研究課題名(和文)母斑(ほくろ)における毛髪誘導再生能の検討

研究課題名(英文)Relationship of hair growth induction with melanotic nevus

研究代表者

寺師 浩人(Terashi, Hiroto)

神戸大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80217421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：巨大色素性母斑や後天性色素性母斑では、時として剛毛を伴う。組織学的にも母斑細胞が毛包周囲に密に取り囲むように占拠していることから、母斑細胞と毛髪誘導との関連が示唆される。本研究課題においては、母斑細胞および毛包では外毛根鞘細胞においてはMelanopsinとGnaqの共発現が認められた。このことから、外毛根鞘にはバルジ領域が存在し、発毛に関与していることと合わせると、光シグナルが何らかの発毛への影響を及ぼしていることが示唆された。一方で、母斑細胞と毛包細胞は同様に同一の外部シグナルを受容するが、これらがシグナル共有をするのか、などについては今後さらに探求が必要である。

研究成果の概要(英文)：Melanocytic nevus sometimes exist with bristle. Histologically, hair follicles are surrounded by nevus cells, which indicates the relationship of hair growth induction with melanotic nevus. We found the protein, Melanopsin and Gnaq, expression that was common between an outer root sheath and nevus. This indicates that photo signal has some effect (positive or negative) for hair growth. Cells in outer root sheath and nevus receive the same outer signal, however, it is unclear that those cells share the same signal or no.

研究分野：形成外科学

キーワード：母斑 毛包 メラノサイト

## 1. 研究開始当初の背景

巨大色素性母斑や後天性色素性母斑では、時として剛毛を伴う。Shavingによる母斑切除の際には、創治癒時にすでに毛髪の生長を観察する。組織学的にも母斑細胞が毛包周囲に密に取り囲むように占拠していることから、母斑細胞と毛髪誘導との関連が示唆される。その病態はこれまでに全く研究されておらず、その誘導因子の同定は毛髪再生メカニズム解明の1つの端緒となり、また将来の新しい育毛方法の開発への期待をも膨らませる。

## 2. 研究の目的

一般に、これまでに開発されてきた薬剤は、内服薬や注射薬、外用薬のいずれも無機物または有機合成化合物であることが殆どであった。近年になり、各疾患の分子生物学的病態解析が進み、分子標的薬の開発に繋がったと同時に抗体(・・・Mab)やサイトカイン(フィブラストスプレーなど)といったタンパク質が薬剤として開発されつつある。育毛薬や発毛薬の開発では、今なお、ミノキシジル(リアップ)やフィナスチリド(プロペシア)といった有機合成化合物が内用・外用ともに主体である。一方、フィナスチリドの作用機序に見られるように、発毛は各種タンパク質により形成されるシグナルトランスダクションにより支配される事が明らかとなっている。われわれは生体内組織で腫瘍として存在し(正常組織ではない)、発毛を促進する母斑(ほくろ)に注目した。正常組織から差分される何らかの発毛に関わる因子を母斑は有していることが推測される。

今回の研究は、その解明のための一歩となるように、母斑細胞と、毛包の上皮系である外毛根鞘細胞とその間葉系である毛乳頭細胞の増殖との関連を検討することを目的とした。

一方で、現在、われわれは先行研究として皮膚の光受容に関して一定の知見を得てきた。皮膚の線維芽細胞においては青色光を照射することで、細胞増殖系シグナルトランスダクションが活性化し、MAPキナーゼ系であるERKがリン酸化することがわれわれのデータで示されてきた。これらをもとに、母斑細胞やメラノサイトにおける光受容の可能性や毛包における光受容タンパク質の発現、およびそのセカンドメッセンジャーとの共役の可能性という観点から母斑細胞、メラノサイト、毛包との関連について検討を行うこととした。

## 3. 研究の方法

### 組織の採取および細胞の単離

本研究においては主にヒト手術検体から得られた組織を利用して行なった。またヒト組織採取にあたっては神戸大学医学倫理委員会の審議を経て許可を得たのちに遂行した。

手術時に発生した余剰な皮膚組織をデイスパーゼ処理した。約24時間の静置を行なったのち、表皮と真皮とを分離した。表皮側を検体として用い、メラノサイト選択培地(MGM-4)中で培養を行った。

母斑組織については、手術時に組織採取し、ホルマリン固定を行なったのち、パラフィン切片の作成を行なった。

### 母斑組織および毛包におけるメラノプシン/Gnaqの発現の確認

パラフィン切片を用いてメラノプシンおよびそのセカンドメッセンジャーであるGnaqの蛍光二重免疫染色を行なった。

### 単離培養細胞(メラノサイト)におけるメラノプシンおよびセカンドメッセンジャーの発現の確認

メラノサイトは上記で単離されたものを用いた。これらよりtotal RNAを抽出し、メラノプシンに特異的なPCR primerを用いてNested PCRを行なった。これにより得られたPCR産物が確かにメラノプシンであることを確認するために塩基配列解析を行なった。

次にウェスタンブロッティング法によりメラノプシンおよびGnaqの発現解析を行なった。さらにこれらが共役していることを確認するため、免疫沈降実験を行なった。

### ヒトメラノサイトにおける光受容アウトカムの解析(カルシウムアッセイ)

メラノサイトは上記で得られたものを用いた。カルシウム指示薬としてFluo4-AMを用いた。メラノサイトを培養したのち、培養液にカルシウム指示薬を添加した。1時間の静置ののち、蛍光顕微鏡(B励起)を用いて蛍光観察を行なった。これはB励起光の波長(470nm)がメラノプシンの感受性波長(480nm)の近傍に位置するため、励起を行いながらカルシウムの取り込みを観察できるためである。得られた画像はビデオ撮影を行い、Image-Jを用いて定量解析を行なった。

## 4. 研究成果

### 1) 毛包におけるMelanopsinおよびGnaqの発現

抗Melanopsin抗体および抗Gnaq抗体を用いて免疫染色を行なったところ、毛包では外毛根鞘細胞においてはMelanopsinとGnaqの共発現が認められたのに対し、内毛根鞘細胞においてはMelanopsinの発現は認められず、Gnaqのみの発現が認められた。このことから、外毛根鞘にはバルジ領域が存在し、発毛に関与していることと合わせると、光シグナルが何らかの発毛への影響を及ぼ

していることが示唆された。(図1)

2) 母斑細胞における Melanopsin および Gnaq の発現

母斑細胞においては当初予測された通り、Melanopsin の強い発現を認めた。また、Gnaq の共発現も認められた。さらに母斑組織中に含まれる毛包についても同様の所見であった(図2)。以上より、光照射を受けた母斑組織では何らかのシグナル変換を行なっていることが示唆された。ただし、これらのシグナルがどのように母斑細胞と毛包との間でリンクしていくのか、増殖・発毛に対して正に作用するのか、負に作用するのか、については現時点では不明である。

3) メラノサイトにおける Melanopsin および Gnaq の発現

(1)免疫染色

培養メラノサイトを母斑細胞に近似して実験を行なった。

培養メラノサイトにおいても上記 2)と同様、Melanopsin と Gnaq の共発現が認められた。また、Melanopsin の発現は膜に集簇しているように観察された(data not shown)。(図3)

(2) PCR

メラノサイトから抽出された total RNA に対して melanopsin 特異的な primer により PCR を行なったところ、予測される塩基長での増幅が認められた。この DNA 断片の塩基配列解析を行なった結果、melanopsin をコードするものであることが確認された。(data not shown)

(3)免疫沈降による共役の確認

メラノサイトをホモジェナイズしたのち、ウェスタンブロッティングを行なった結果、Meanopsin および Gnaq のいずれの発現をも認めた。次にこれらのタンパク質が細胞内で共役していることを示すために免疫沈降実験を行なった。今回は Gnaq で免疫沈降を行い、Melanopsin でウェスタンブロッティングを行なった。その結果、確かに共役していることが確認された。(図4)

4) ヒトメラノサイトの光照射によるカルシウム取り込み

培養メラノサイトにカルシウム指示薬を添加したのち、蛍光顕微鏡を用いてレコーディングを行なった。その結果、470nm 近傍の青色光を照射することでカルシウムの取り込みが認められた。また、照射野の細胞は同期してカルシウムを取り込む様子が観察された。カルシウムの取り込みは照射より約 150 秒がピークとなり、その後、細胞内カルシウム濃度は減衰する様子も観察された。(図5)

図1

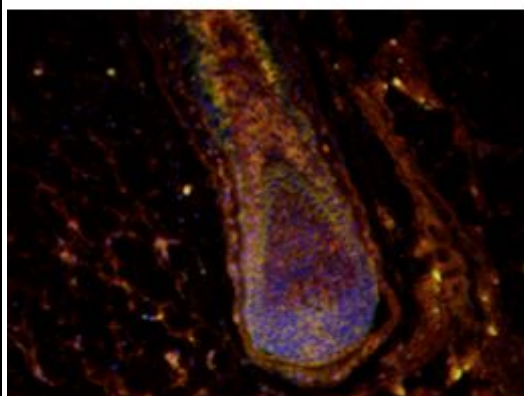
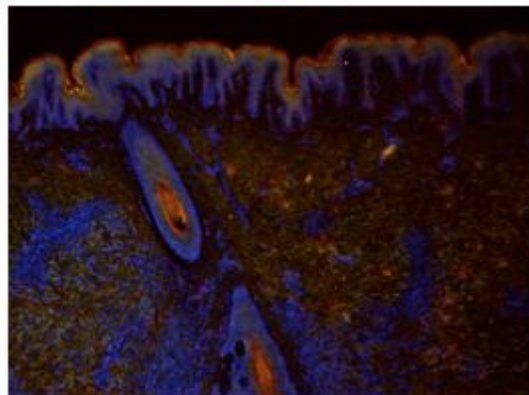
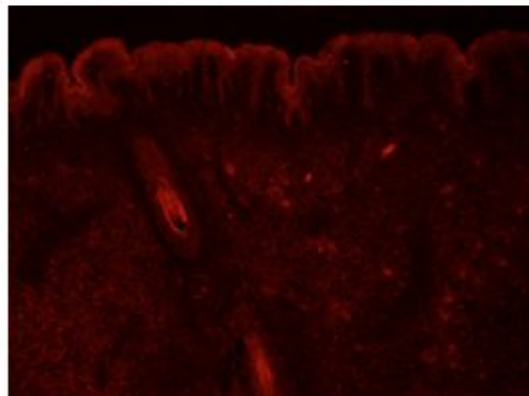
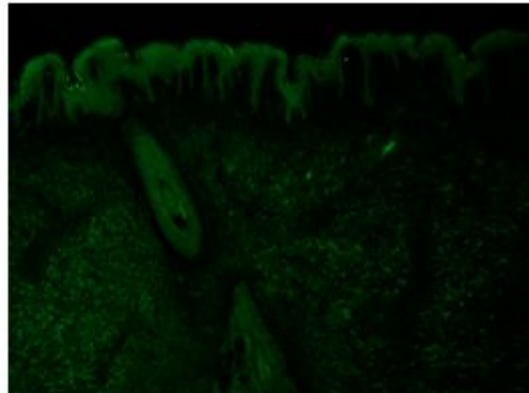


図 2

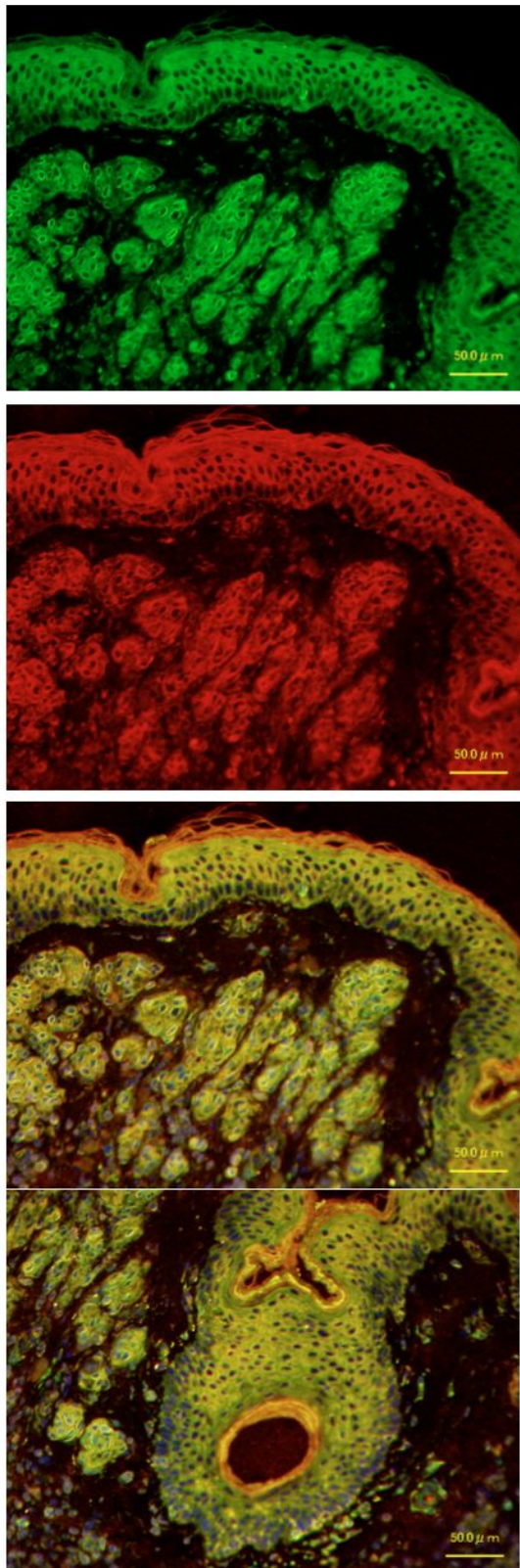


図 3

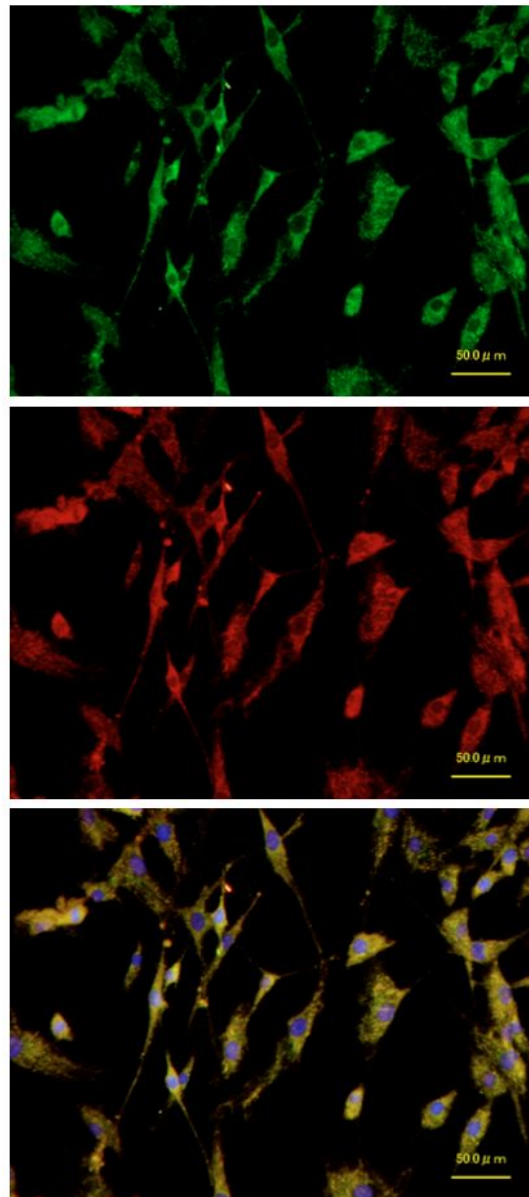


図 4

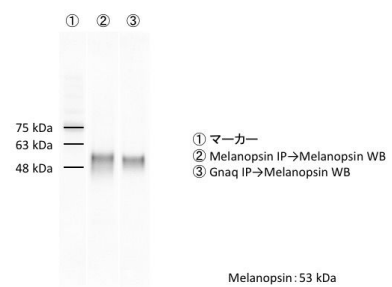
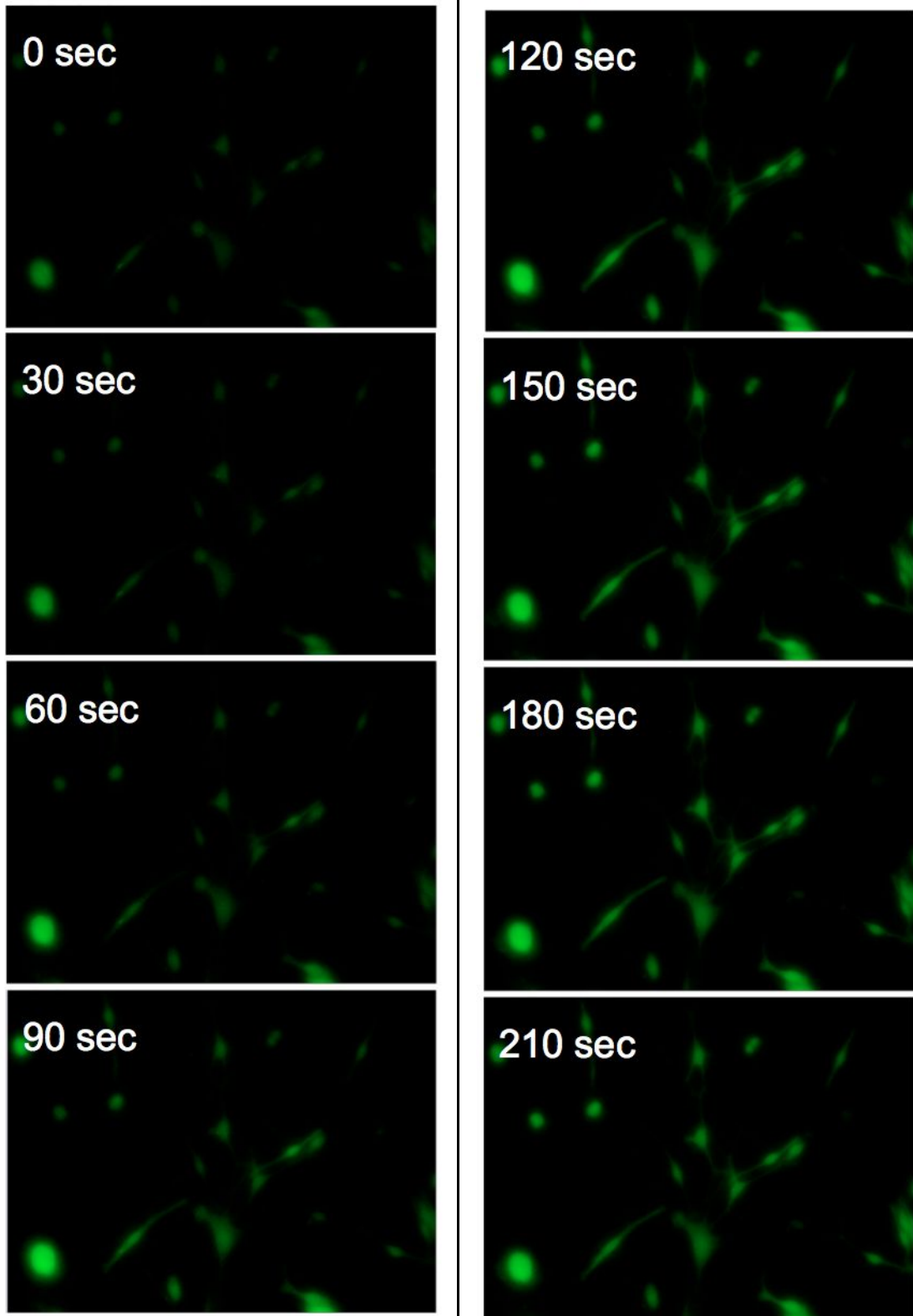


图 5



## 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 1 件)

楠元順哉、榊原俊介、橋川和信、寺師浩人  
皮膚における光受容タンパク質の発現(第2報)

第24回日本形成外科学会基礎学術集会  
2015.10.8-2015.10.9 (盛岡)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 該当なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

寺師 浩人(TERASHI HIROTO)

神戸大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80217421

### (2)研究分担者

榊原 俊介(SAKAKIBARA SHUNSUKE)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：50444592