

令和 2 年 10 月 5 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2019 年度

受付番号 201960601

氏名 山賀 康右

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地 (派遣先国名) 用務地: アーバイン (国名: アメリカ)

2. 研究課題名 (和文) ※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

乳頭が、組織レベルのペースメーカーとして、毛包を再生するしくみの解明3. 派遣期間: 令和 元 年 11 月 21 日 ~ 令和 2 年 9 月 30 日

4. 受入機関名及び部局名

Department of Developmental & Cell Biology, University of California Irvine5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

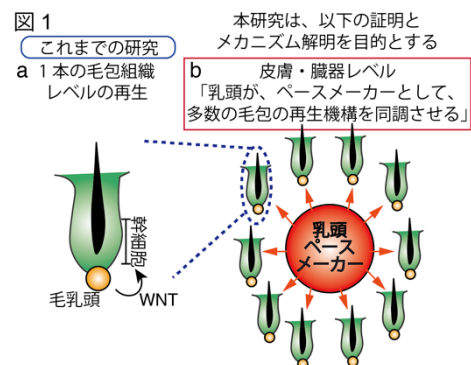
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

【背景】

生体組織の形成・維持機構は、幹細胞が保たれて、適切に分化することで、はじめて達成できる。各毛包組織には、幹細胞の集団があり、それらが増殖・分化する事で1本の毛包組織を周期的に再生する(図 1a)。一方で皮膚は大きな臓器であり、哺乳類が全身の皮膚を毛で覆うためには、何千もの毛包組織とそれらの幹細胞集団が同調しあって、毛包を再生する必要がある(図 1b)。この毛包組織間の同調は、Wnt シグナルの活性化と bone morphogenetic protein (BMP) シグナルの不活化を介して行われる(Plikus MV et al. Nature 2008, 451:340-344. Plikus MV et al. Science 2011, 332:586-589)。以前から、多数の毛包が再生する際の起点となるペースメーカーの存在は指摘されていた(Suzuki N et al. Proc Natl Acad Sci 2003, 100:9680-9685)が、その実体は明らかにされていない。

日本では、男性の約 30%(約 2000 万人)が男性型脱毛症を患っており(坪井良治ら. 男性型脱毛症診療ガイドライン. 日皮会誌 2010, 120:977-986)、ヘアケア製品の市場規模は 2017 年で 4422 億円と予測されている(矢野経済研究所)。その一方で有効な治療法は限られており、さらに治療効果が乏しいケースが多く、新規治療の開発を多くの人々が期待している。こうした背景から、エビデンスの乏しい民間療法が多数存在することも問題となっている。ヒトの円形脱毛症が治癒する過程において、多数の毛包がまとまって再生することが複数報告されている(Mrowietz U et al. Acta Dermato-Venereologica 2017, 97, 283-284. Craiglow BG et al. J Am Acad Dermatol 2017, 76, 29-32)。こうした背景から、多数の毛包をまとめて再生させるペースメーカーの存在を証明し、そのメカニズムを解明することは、脱毛症の新規治療確立につながると考える。



【1. 何千もの毛包が再生する際の起点となる、ペースメーカーの実体の解明】

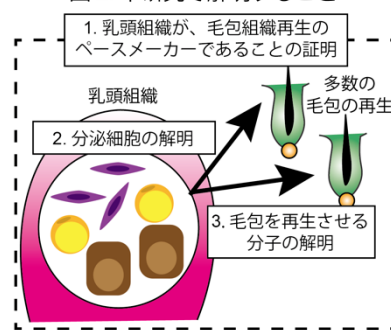
野生型マウス(C57BL/6J)を剃毛して、毛包が再生する経過を観察したところ、乳頭を起点として、その周囲で多数の毛包が再生していた。New Zealand ウサギでは、早い再生/休眠周期を反映して、乳頭を起点に複数の黒い毛包再生領域が同心円状に見られ、乳頭から離れた部位ではそれらが癒合して線状になっていた。皮膚ケラチノサイトで副甲状腺ホルモン関連タンパク質 PTHrP を過剰発現させたマウス(K14-PTHrPマウス)では、腹側の皮膚全体が乳頭様の組織となる(Foley J et al. Development 2001, 128:513-525)。K14-PTHrP マウスにおいても、巨大乳頭様組織を起点として、その辺縁から多数の毛包が再生していた。野生型マウスの皮膚ホールマウント標本では、乳頭を起点として、多数の毛包が、辺縁に向けて順々に再生することを確認した。

分子学的に、毛包の再生には Wnt シグナルの活性化が必要である。そこで、Lef1-RFP マウスを用いて Wnt 活性を確認したところ、乳頭の間葉組織を中心に強い RFP 標識が見られ、Wnt シグナルが活性化していることを確認した。

機能獲得実験として、ウサギの乳頭組織とコントロール群としての腹側皮膚を、SCID マウスの背側皮膚に外科的に移植した。移植後 160 日程度経過を観察し続けたところ、移植した乳頭を起点として、その周囲で毛包が再生し始め、結果として皮膚の広範囲で毛包再生が見られるようになった。このような移植乳頭を起点とした毛包再生は、160 日の観察期間の中で 3-4 回周期的に認められた。一方で、コントロール群の移植部位を起点とする毛包再生は認められなかった。

以上の研究結果から、独自の再生能をもつ各毛包の再生機構を、乳頭組織が同調させていると考え、これを組織再生のペースメーカーとした。そこで申請者は、「乳頭組織が、強力に毛包再生を誘導することで、組織再生のペースメーカーとなる」と結論づけた。

図 2. 本研究で解明すること



【2. 乳頭組織内の、毛包再生を誘導する分子の分泌細胞を解明する】

乳頭・間葉組織を中心に見られた、Wnt シグナル活性の高い LEF1-RFP 陽性組織に、分泌細胞が存在すると思われるので、その同定を進めた。具体的には、Lef1-RFP マウスの乳頭組織標本に対して、各細胞のマーカーの抗体を用いて、免疫組織化学染色を行った。各細胞のマーカーとしては、Keratin 14(ケラチノサイト)、PDGFRA 及び ER-TR7(線維芽細胞)、Perilipin(脂肪細胞)、CD31(血管内皮細胞)、Smooth Muscle Actin(平滑筋細胞)、CD45(免疫細胞)、TRP2 (メラノサイト)を用いた。結果としては、Lef1 陽性細胞の大半は線維芽細胞であり、血管内皮細胞にも一部陽性のものが確認できた。

網羅的な解析から分泌細胞を同定するために、野生型マウスにおいて、乳頭を起点とする毛包再生の開始時期である生後 63 日目に、乳頭組織とコントロール群としての腹側皮膚を採取して、10x Genomics Chromium システムを用い、シングルセル RNA シークエンスを行った。乳頭組織から 2,050 の細胞の回収に成功し、その中には線維芽細胞、ケラチノサイト、血管内皮細胞、リンパ管細胞、リンパ球系免疫細胞、骨髄球系免疫細胞、平滑筋細胞など多種多様な細胞が含まれていた。また、それぞれの細胞について、1500-2000 種もの遺伝子の発現を解析することができた。その中でも特に乳頭の線維芽細胞において、組織再生に関わる成長因子や転写因子の発現が優位に確認できた。

これらの結果を踏まえて、乳頭の線維芽細胞が毛包再生を誘導する分子の分泌細胞であることが示唆された。これを証明するために、乳頭の線維芽細胞を回収して、SCID マウスの背側皮膚に皮下移植して、注入部位周辺の毛包再生の有無を検証する細胞移植実験を立ち上げている。すでにフローサイトメトリー法を用いた乳頭の線維芽細胞の回収に成功しており、今後細胞移植実験を進めていく予定である。

【3. 毛包再生を誘導する分子を解明する】

毛包再生を誘導する分子の候補を選出するため、RNA シークエンスを用いて、網羅的な遺伝子解析を行った。前述のシングルセル RNA シークエンスでは、1 細胞ごとの遺伝子解析ができる反面、解析可能な遺伝子数が 2×10^3 種程度と限定的であった。そこで、マウス乳頭組織そのものと腹側皮膚組織に対する RNA シークエンスを行い、 10^4 種以上の遺伝子の解析に成功した。これに加えて、ウサギの乳頭組織に対しても同様の RNA シークエンスを行った。そして、マウスとウサギの乳頭組織で発現が亢進していたシグナル分子の中から、これまでの知見と照らし合わせて、8 種類の候補を絞り込んだ。これら 8 種類は、既知の毛包再生因子を除外したものであり、いずれも新規の分子である。またヒト乳頭組織についても 1 検体ではあるが、既に RNA シークエンスを行っており、今後検体数を増やして解析を進める予定である。

RNA シークエンスを通して絞り込んだ 8 種類の候補が、毛包再生を誘導するかを検証する目的で、皮下タンパク投与実験を実施した。具体的には、候補分子とコントロール群としての牛血清アルブミンをそれぞれアガロースビーズに染み込ませた上で、野生型マウスの背側皮膚にビーズを皮下投与し、13 日後に毛包再生がみられるか検証した。検証を繰り返す中で、有望な結果を示す分子が複数種あったが、今後さらなる検証が必要である。また同時に、複数種の候補分子を同時に投与することで、より強力に毛包再生を誘導する組み合わせの検証も進めている。タンパク投与実験を通して毛包再生分子の同定が完了すれば、その分子に対する遺伝子改変マウスを作製して、乳頭を起点とする毛包再生への影響を検証していく予定である。

本研究を通して、乳頭組織が毛包再生を誘導するメカニズムを解明できれば、新規の毛包再生を誘導する分子の薬剤化や乳頭細胞の自家移植など、脱毛症の新規治療の確立につながると考える。今後も派遣先の Maksim Plikus 教授と連携して研究成果をまとめ上げ、国際誌に発表したいと考えている。