慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	versican代謝産物：DPEAAE分子の毛周期・発生における機能解析
Sub Title	The analysis of DPEAAE in hair cycles
Author	高田, 圭以子(Takada, Keiko) 荒牧, 典子(Aramaki, Noriko)
Publisher	
Publication year	2015
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2014.)
JaLC DOI	
Abstract	Versicanの分解産物であるversikine(DPEAAE)は, 免疫染色においてanagen期の毛乳頭に発現を認め, catagen期には発現が見られなかった。また毛乳頭細胞でAdamts-1,4,5のmRNAの発現を認め, versikineを培養細胞に添加すると細胞増殖能が促進された。 これらの結果から, versikineが毛乳頭細胞の増殖促進作用を持ち, 毛周期に関与していることが示唆された。 Versikine was detected in anagen of dermal papilla, but not in catagen by immunohistochemistry. Adamts-1,4,5 were shown in dermal papilla cells by RT-PCR. Versikine was produced in dermal papilla from cleavage of versican by ADAMTSs. From our data, versikine has an effect to promote dermal papilla cells and play an important role in hair cycles.
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2013～2014 課題番号：25861705 研究分野：皮膚創傷治癒
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25861705seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ６ 月　 １ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2013～2014
課題番号：２５８６１７０５

研究課題名（和文）versican代謝産物―DPEAAE分子の毛周期・発生における機能解析

研究課題名（英文）The analysis of DPEAAE in hair cycles

研究代表者
高田　圭以子（Takada, Keiko）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：８０６２４４６０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,700,000円

研究成果の概要（和文）：Versicanの分解産物であるversikine(DPEAAE)は、免疫染色においてanagen期の毛乳頭に発現を認め、catagen期には発現が見られなかった。また毛乳頭細胞でAdamts-1,4,5のmRNAの発現を認め、versikineを培養細胞に添加すると細胞増殖能が促進された。
これらの結果から、versikineが毛乳頭細胞の増殖促進作用を持ち、毛周期に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Versikine was detected in anagen of dermal papilla, but not in catagen by immunohistochemistry. Adamts-1,4,5 were shown in dermal papilla cells by RT-PCR.
Versikine was produced in dermal papilla from cleavage of versican by ADAMTSs.
From our data, versikine has an effect to promote dermal papilla cells and play an important role in hair cycles.

研究分野：皮膚創傷治癒

キーワード：細胞外マトリックス　毛　versican

１．研究開始当初の背景

1999 年に細胞外マトリックスの versican がマウスの毛における間葉凝集や毛髪誘導に重要な役割を果たすことが報告され(Kishimoto et al., PNAS)、その後人でも同様の報告がなされた(Kishimoto et. al. JID,2005)。2008 年にも人の毛における versican の発現パターンの重要性が報告され（Malgouries et. al. Br. J. Dermatol.）ヒト毛乳頭細胞の versican をノックダウンするとその凝集能が落ちることが報告される(Feng et.al. Clin Exp Dermatol. 2011)などその重要性が注目されている分子である。

しかし、具体的な機能発現などを解明した論文はなく、versican の分解産物に着目した我々の研究は、独創的で可能性を秘める研究として、研究の着手に至った。

２．研究の目的

１．で述べた背景をもとに本研究は、毛周期での versican の分解を検討することで、versican がどのような作用機序で毛周期・毛髪誘導に機能発現をもたらすのかを解明することを目的とした。Versican は Adamts (a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin motifs)というメタロプロテアーゼにより分解され、その分解産物である versikine(G1-DPEAAE)は、発生期に趾間の apoptosis に関与しているという報告があり(McCulloch DR et al. Dev. Cell. 2009)、この versikine が毛周期に関与している可能性を検討した。

３．研究の方法

(1) 各毛周期における versican の分解についての検討

① Adamts ノックアウトマウスを用いた検討

Versican の分解酵素である Adamts の毛周囲における局在を検討するために、Adamts-1 及び-9 ノックアウトを用い、生後 1 日目の新生仔マウス背部皮膚のパラフィン切片を作成した。作成した切片を使用し、LacZ 染色を行い、局在を検討した。

② マウス毛周期における versican の分解産物-versikine の局在検討

成獣マウス BL6 の髭の凍結切片を作成した。作成した切片を用い versican の分解産物である versikine の蛍光免疫染色を行った。

(2) マウス毛乳頭細胞における Adamts の発現の検討

① 成獣マウスの髭を explant 法で培養、3 継代目の細胞をフローサイトメトリー法で分析した。

② ①で得られた 3 継代目の細胞から、mRNA の抽出を行い、RT-PCR 法にて *Adamts-1,4,5,9* の発現を検討した。

(3) Versikine の毛乳頭細胞に与える影響

① versikine 過剰発現細胞を培養し、その細胞上清を回収した。ウェスタンブロット法にて培養上清中の versikine の発現を確認した。

② ①で得られた培養上清を毛乳頭細胞に添加し、xCELLigence を用い細胞増殖能をコントロールと比較検討した。

４．研究成果

(1) 各毛周期における versican の分解についての検討

① Adamts ノックアウトマウスを用いた検討

LacZ 染色で、ADAMTS-1,9 ともに毛乳頭細胞に陽性像が認められ、その発現が確認された(Fig 1.)。

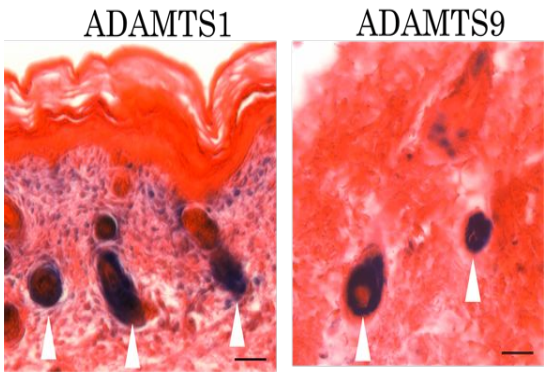


Fig 1. Adamts-1,9 ノックアウトマウスを用いた LacZ 染色像

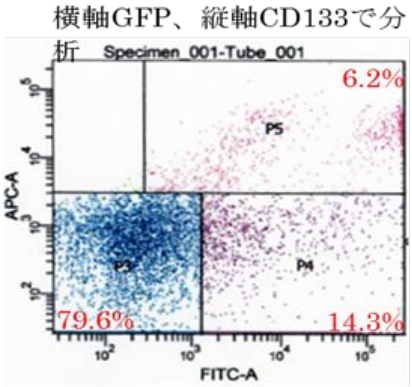
② マウス毛周期における versican の分解産物-versikine の局在検討

Versikine の免疫染色では、anagen 期の毛乳頭で陽性像が認められ、catagen 期では発現が認められなかった。この結果は、これまでの versican の発現報告と一致していた。

(2) マウス毛乳頭細胞における Adamts の発現の検討

① 成獣マウスの髭を explant 法で培養、3 継代目の細胞をフローサイトメトリー法で分析したところ、CD133 陽性の毛乳頭細胞の存在が示された(Fig 2.)。

Fig 2.
右上の枠内が CD133 陽性の毛乳頭細胞である。



② 3 継代目の細胞を用い、RT-PCR 法にて *Adamts-1,4,5,9* の発現を検討したところ、培養毛乳頭細胞で、*Adamts-1,4,5* の発現が認められた(Fig 3.)。

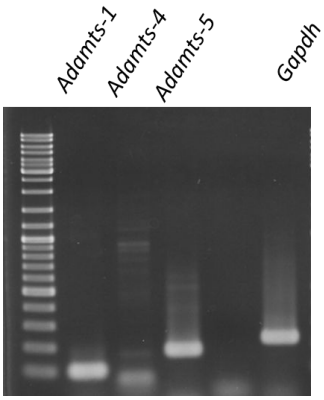


Fig 3. 培養毛乳頭細胞で、*Adamts-1,4,5* の発現が認められた。

(4) Versikine の毛乳頭細胞に与える影響

① ウェスタンブロット法にて versikine 過剰発現細胞の培養上清中には versikine の発現を確認できたが、コントロールの vector 細胞の培養上清では versikine の発現は認められなかった(Fig 4.)。

Fig 4. 培養上清に Versikine(G1-DPEAAE) の発現が認められている。

② ①で得られた培養上清を毛乳頭細胞に添加し、xCELLigence を用い細胞増殖能をコントロールと比較検討したところ、有意に versikine 含有培養上清添加群で細胞増殖能が促進された。

Versican が ADMATS というメタロプロテアーゼにより分解された分解産物である versikine は、発生期に趾間の apoptosis に関与しているという報告があり(McCulloch DR et al. Dev. Cell. 2009)、この versikine が毛周期に関与している可能性を検討した。

我々の得られた結果では、versikine は、免疫染色において、anagen 期の毛乳頭に発現を認め、catagen 期には発現がほとんど見られなかったことは、これまでの報告の versican の発現パターンに類似していた。また Adamts-1,9 ノックアウトを用いた LacZ 染色像では、versican の局在に一致して、Adamts-1,9 の発現が認められた。BL6 成獣マウスの髭から分離した細胞が CD133 陽性細胞の毛乳頭細胞の存在することを確認し、毛乳頭細胞での Adamts-1,4,5 の mRNA の発現を確認することができた。これら、一連の結果から、毛乳頭における versican を ADAMTS が分解し、versikine を産生していることが示された。versikine を培養細胞に添加すると、細胞増殖能が促進された。これらの結果から、versikine が毛乳頭細胞の増殖促進作用を持ち、毛周期に関与していることが示唆された。

今後、in vivo での versikine の影響を検討するために、versican や ADAMTS ノックアウトマウスを用い、その凝集能や毛関連のマーカーの免疫染色などを行うことで、毛の発生や毛周期を検討する予定である。毛の発生や毛周期における versican の機能解析が進めば、育毛剤や毛髪再生などの臨床応用に役立つ可能性があると考えられる。

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 0 件）

〔学会発表〕（計 1 件）

(1)荒牧典子、<u>高田圭以子</u>、毛乳頭細胞における Adamts 発現と versikine の産生、第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会、2014 年 10 月 9 日、キッセイ文化ホール（長野県、松本市）

〔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 なし

６．研究組織

(1)研究代表者
高田圭以子（Keiko Takada ）
慶應義塾大学・形成外科・助教
研究者番号：80624460

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
荒牧典子（Noriko Aramaki）
慶應義塾大学・形成外科・講師
研究者番号：80365311