毛形成におけるホスフォリパーゼ Col の機能解析

東京薬科大学生命科学部

深 見 希代子

Nude mice exhibit athymia and hairlessness by a loss-of-function mutation in the transcription factor *Foxn1* gene. Although the immunologic functions of Foxn1 have been studied intensively, there have been relatively few studies of its functions in skin. Foxn1 regulates expression of hair keratins, which is essential for normal hair structure; however, it was largely unknown how Foxn1 regulates hair keratin expression and hair formation. In the present study, we found that mice lacking phospholipase C (PLC)-δ1, a key molecule in the phosphoinositide signaling pathway, and nude mice show similar hair abnormalities, such as lack of cuticle and bending. We also found that expression of hair keratins was remarkably decreased in skin of PLCδ1 knockout mice. Furthermore, expression of PLCδ1 was induced in Foxn1-transfected U2OS cells. In addition, we showed that PLCδ1 expression was remarkably decreased in skin of nude mice. In skin and keratinocytes of nude mice, activation of PLC downstream effectors, such as PKC and NFAT, was impaired as well as those of PLCδ1 KO mice. These results indicate that PLCδ1 is an essential molecule downstream of Foxn1 in normal hair formation, and strongly suggest that hairlessness in nude mice is caused by insufficient expression of PLCδ1.

1. 緒 言

毛は美容の対象として、非常に多くの人々に関心を持たれている器官でありながら、毛の形成についての詳細なメカニズムは未解明な部分が多い。申請者らは、イノシトールリン脂質代謝系の要となる酵素、ホスフォリパーゼC(PLC)の一つであるPLCδ1のノックアウト(KO)マウスを作製し、このマウスが顕著な体毛減少を示すことを報告している。最近、PLCδ1KOマウスの体毛減少のメカニズムを詳細に検討したところ、ヌードマウスと外見のみならず、毛の詳細な形状等がよく似ていることが判明してきている。ヌードマウスは転写因子Foxn1が先天的に変異し、その結果、毛の形成に必要なヘアケラチンであるmHa3が減少することが無毛の原因と考えられている。

そこで本研究では、ヌードマウスと PLC81KO マウスの類似性と相違点を種々の解析法により検討し、ヌードマウスと PLC81KO マウス間のシグナル伝達の共通性を明らかにすることにした。

2. 実験

2-1. PLC δ 1KO マウスの作製および抗体等

PLC81KOマウス作製についてはすでに報告している (EMBO J.2003)。PLC81 抗 体 (BD Pharmingen, USA), Foxn1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, USA), β-actin 抗



The roles of phospholipase Øl in the formation of hair follicles

Kiyoko Fukami

Laboratory of Genome and Biosignal, Tokyo University of Pharmacy and Life Science 体 (Chemicon, USA) は市販品を使用した。

2-2. in situ ハイブリダイゼーション

皮膚を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、8-mm の厚さの切片を作製した。PLC81、Foxn1、mHa3 の検出はジゴキシゲンラベルのリボプローブを用いて行なった。

2-3. ノザンブロット解析

RNA は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて皮膚から調整した。mHa3 および GAPDH は DIG Northern Starter kit (Roche, Germany) によるジゴキシゲンラベルのリボプローブを用いて行なった。

3. 結果

3-1. PLCδIKO マウスはヌードマウスと非常に類似した表現型を示す

PLC δ 1KO マウスはヌードマウスと同様に無毛となる(図 1 B, C)が、電子顕微鏡で皮膚構造を観察した場合にも、コントロールマウスでは毛が存在しているのに対し、両マウスではほとんど毛が見られないこと(図 1 D, E, F)、また存在している毛も折れ曲がっている(図 1 H, I)など、非常に類似していることが判明した。更にコントロールマウスの毛で観察されるキューティクルが両マウスでは見られないなどの事実が判明した(図 1 G, H, I)。

3-2. ヌードマウス同様、PLColKO マウスは皮膚 でのヘアケラチンが減少している

ヌードマウスでは転写因子Foxnl が先天的に変異し、 毛の形成に必要なヘアケラチンである mHa3 が減少して いる。そこで PLC 811 KO マウスの皮膚における mHa3 の mRNA 量をノザンブロットで検討した所、ヌードマウス と同様に mHa3 の mRNA 量が顕著に減少していた (図 2)。

3 - 3. PLCδ1、Foxn1、mHa3 は毛包において同 局在する

PLC81KOマウスとヌードマウスの類似性が観察されたことから、ヌードマウスの原因遺伝子である Foxn1 と PLC81 の関連性を検討することにした。

Foxnl は毛包に発現が多いことが報告されている。そこで、*in situ* hybridization により、Foxnl、PLC81、及び mHa3 の発現を検討した。図 3 に示す様に、Foxnl、PLC81、及び mHa3 の mRNA はいずれも、毛包におい

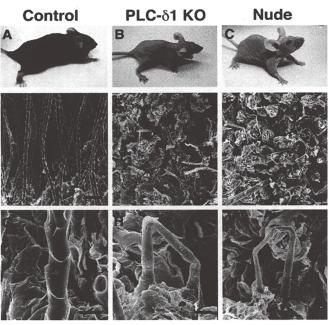


図 1. A-C: PLCo1KO マウスとヌードマウスの外観、D-I: マウス皮膚の走査香型電子顕微鏡像。コントロールマウスでは多くの毛が存在するのに対し、PLCo1KO マウスとヌードでは毛がほとんど観察されず (D-F)、折れ曲がっている (G-I)。

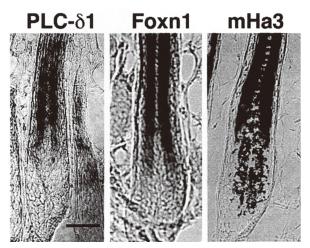


図3. *in situ* hybridization による毛包における Foxn1、PLCδ1、 及び mHa3 の mRNA の発現。毛の形成に重要な precortex 部位に、これらの mRNA がいずれも発現している。

て、毛の形成や毛を保持するために重要な部位である precortex 部分に発現していることが判明した (図3)。

3-4 Foxn1 の過剰発現は PLC の発現を誘導する

PLC81 及び mHa3 の mRNA が毛包において同じ部位に発現していることが明らかになり、これらのタンパク質が機能的に関連している可能性が強く示唆された。またヌードマウスおよび PLC81KO マウスの両マウスで mHa3 の mRNA の発現量が減少していることから、シグナル伝達において、Foxn1 と PLC81 は mHa3 の上流にあると考えられた。そこで Foxn1 と PLC81 のシグナルの伝達経路での関連性を次に検討することにした。

骨肉腫細胞である USOS 細胞に Foxnl を強制発現した場合には、PLC δ l の発現が mRNA およびタンパク質の両方で誘導されることが判明した(図4)。逆に PLC δ l をUSOS 細胞に強制発現した場合には、Foxnl の発現は誘導されなかった。このことから、Foxnl は PLC δ l の上流に

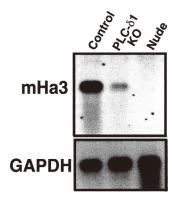


図2. ノザンブロットによる PLCδ1KO マウス皮膚での mHa3の mRNA の発現。 PLCδ1KO マウス皮膚ではヘアケラチンの mHa3の mRNA 量がヌードマウスと同様に減少している。

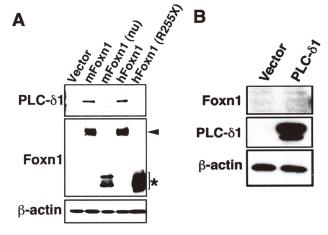


図4. Foxn1 の強制発現は PLCδ1 の発現を誘導する。USOS 細胞に Foxn1 を強制発現した場合、PLCδ1 タンパク質の発現が誘導される(A)。一方、PLCδ1 を USOS 細胞に強制発現した場合には、Foxn1 の発現は誘導されなかった(B)。

位置し、PLC81 の発現を調節していると考えられた。

3-5. ヌードマウス毛包では PLCM の発現が低下している

毛包の形成においては、Foxn1 → PLC81 → mHa3 というシグナルの流れが存在することが示唆されたので、ヌードマウスにおいて PLC81 の発現が低下しているかを調べてみることにした。

第一に毛包での PLC δ 1 の発現を *in situ* hybridization により検討した。図 5 A、Bに示す様に、野生型のコントロールマウスの毛包では PLC δ 1 の発現が強く観察されるのに対し、ヌードマウスの毛包では、PLC δ 1 の発現がほとんど見られなかった。またウエスタンブロット法により、皮膚における PLC δ 1 タンパク質の発現を比較した所、ヌードマウス皮膚において PLC δ 1 タンパク質の発現量が著しく減少していることが判明した(図 δ C)。同様に PLC δ 1mRNA の減少も RT-PCR により明らかになった(データ示さず)。これらの事実は、Foxn1 \rightarrow PLC δ 1 \rightarrow mHa3 というシグナルの流れが毛包において存在していることを示している。

3-6. 「ヌードマウスの体毛減少は PLC が 欠損が原因である」ことの検証

ヌードマウスの体毛減少が PLC 81 の発現低下のみで説明できるのであれば、ヌードマウスに PLC 81 を発現させることにより、体毛が正常に形成されるようになることが期待される。そこで、ヌードマウスの原因遺伝子である Foxn1 プロモーター制御下で PLC 81cDNA を発現する TG マウスを作製した。第一に、Foxn1 の発現部位での PLC 81 発現の影響を検討するため、PLC 81 KO マウス

でTGマウスを作製した(Foxnl:: PLCδ1TG/PLCδ1KOマウス)。PLCδ1KOマウスでは、表皮の肥厚、皮膚の炎症、cystの形成、毛包形成異常、ヘアケラチンの減少が観察されるが、これらの異常はFoxnl:: PLCδ1TG/PLCδ1マウスではすべて回復した。このことからPLCδ1がこうした組織ではFoxnl下流分子として生体内で機能していることが強く示唆された。一方脂腺では、このトランスジーンで脂腺拡大が回復しないことから、脂腺ではPLCδ1はFoxnlと独立したシグナルを経由していると考えられる(図6)。

次に、ヌードマウスでTGマウスを作製(Foxnl:: PLC81TG/nudeマウス)した所、外見上は毛の形成が回復しなかった。またヌードマウスの無胸腺、表皮の肥厚は全く回復しなかったので、これらの組織ではFoxnlとPLC81の関連性は薄いと考えられる。しかしながら、毛包形成やヘアケラチンの発現は部分的ではあるものの回復し、cystの形成も激減した。こうした事実は、PLC81が毛の形成においてはFoxnlの下流分子として重要な役割を担っていることを示している(図7)。

4. 考 察

今回我々は、PLC δ 1KOマウスが、転写因子Foxnlの変異が原因であるヌードマウスと形態的に酷似していること、ヌードマウスでPLC δ 1の発現が低下し、Foxnl \rightarrow PLC δ 1 \rightarrow mHa δ 2 というシグナルの流れが存在することを明らかにした。また Foxnl の欠損による無毛というヌードマウスの表現型を PLC δ 1 の強制発現で補完することができるのかを明らかにするために、TGマウスを作製した。現在、回復する異常と回復しにくい異常が判明しつつあり、Foxnl と PLC δ 1 の関連性がわかってきている。

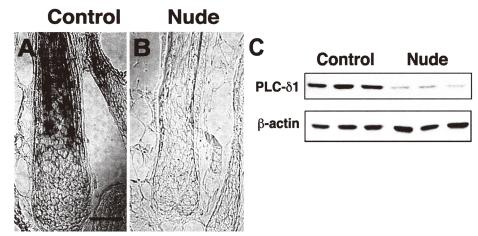


図5. ヌードマウスでは PLC δ 1 の発現が低下している。A、B; *in situ* hybridization による毛包における PLC δ 1 mRNA の発現。コントロールマウスでは強い PLC δ 1 mRNA のシグナルが見られるのに対し(A)、ヌードマウス毛包では、PLC δ 1 の発現がほとんど見られない(B)。C; ウエスタンブロット法による皮膚における PLC δ 1 タンパク質の発現比較。ヌードマウス皮膚で PLC δ 1 の発現が激減している。

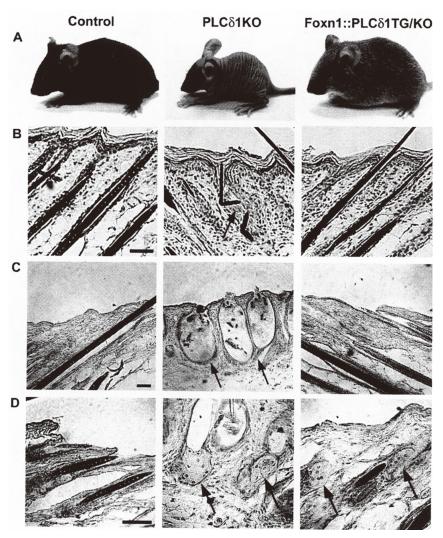


図 6. Foxn1::PLCδ1TG/PLCδ1KO マウスでの皮膚構造。Foxn1::PLCδ1TG/PLCδ1KO マウスでは、PLCδ1KO マウスで観察される無毛の回復(A)、毛包形成の回復(B)、Cyst の形成(矢印)の正常化(C)が確認できる。一方、脂腺の拡大は回復しない(D、矢印)。

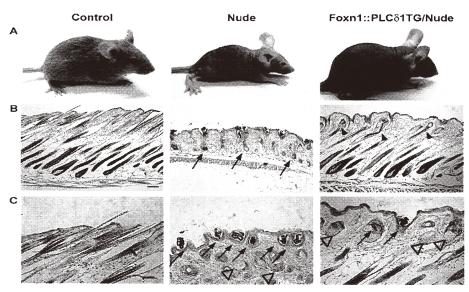


図 7. Foxn1::PLCδ1TG/ヌードマウスでの皮膚構造。Foxn1::PLCδ1TG/ヌードマウスでは、PLCδ1KOマウスで観察される無毛は回復しない(A)。一方、毛包形成(B) や Cyst の異常形成(C) は部分的であるが回復した。

今後、より詳細にマウスの表現型を解析し、毛包形成のメカニズムを明らかにしていきたい。毛の形成メカニズムは不明な点が多く PLC&I が関与するという事実は興味深い。育毛、脱毛など毛の形成に関わる研究は一般社会の関心も高いので今後は応用的な点からも解析する必要があると思われる。

また最近、Foxnl がメラニン色素の表皮細胞への輸送にも関与していることが明らかになってきている。今後皮膚において PLCδl が Foxnl と同様に美白などに応用できる可能性についても検討していきたい。

謝辞

以上の研究は、東京薬科大学生命科学部ゲノム情報学研究室の中村由和助教をはじめとして、大学院生の一戸学、平田真之、松浦宏和らとの共同研究によるものです。また電子顕微鏡像の解析は愛媛大学の藤原隆先生との共同研究

によるものです。コスメトロジー研究振興財団からは多大 な研究資金の御支援をいただきました。心よりお礼申し上 げます。

(文献)

- 1) Ichinohe M., Nakamura Y., Sai K., Nakahara M., Yamaguchi H., and Fukami K.: Lack of phospholipase C-81 induces skin inflammation. Biochem. Biophys. Res. Comm., 356: 912-8, 2007.
- 2) Nakamura Y., Ichinohe M., Hirata M., Matsuura H., Fujiwara T., Igarashi T., Nakahara M., Yamaguchi H., Yasugi S., Takenawa T. and Fukami K.: Phospholipase C-δ1 is an essential molecule downstream of *Foxn1*, the gene responsible for the nude mutation, in normal hair development. FASEB J. 22, 841-849,2008.