

リポキシゲナーゼおよびシクロオキシゲナーゼの毛周期に及ぼす影響

松崎 貴, 地阪光生

目 的

毛周期の進行メカニズムの解明は、生理的再生における幹細胞動態や周期的リズムの発生と調節といった生物学的な興味のみならず、脱毛症の診断や治療にも関連する重要なテーマであるが、in vitro での研究の難しさなどからあまり進んでいない。例えば毛周期に深く関連するとされるマスト細胞は、リポキシゲナーゼの反応生成物であるロイコトリエン類を数多く放出することが知られているが、それらの毛周期における役割についてはほとんど解析されていない。そこで本研究では、アラキドン酸代謝系に関わるリポキシゲナーゼ (LOX) とシクロオキシゲナーゼ (COX) に注目し、遺伝子発現パターンの毛周期変動を明らかにするとともに、それぞれの阻害剤を器官培養系に添加する実験を行い、両酵素が毛周期に及ぼす影響を解き明かす糸口を見つけることを目的とした。

方 法

< 頬器官培養での LOX および COX の阻害実験 >

マウスの頬部皮膚から頬髭毛包を単離し、実体顕微鏡下で伸長している毛と残存している前周期の毛 (休止期毛) の毛長比率および毛球部の形態を観察して、1本ずつ毛周期ステージを見分けた。成長期毛包を選び、毛包上端で毛を切断してから 48 穴プレートの各ウェルに 1本ずつ入れ、LOX 阻害剤 (NDGA)、COX1 阻害剤 (SC560)、または COX2 阻害剤 (NS398) を添加した Willium's E 培地を加えた。各群 7~21 本の毛包を使用し、毎日デジタルカメラで撮影した画像から NIH image 1.62 を用いて毛の長さを計測した。

< 毛周期に伴う遺伝子発現変動の解析 >

休止期にある B57BL/6 マウスの背部皮膚被毛を脱毛ワックスで除去し、成長期を誘導することで毛周期を同調させ、脱毛後 3 日 (初期成長期)、7 日 (中期成長期)、12 日 (終期成長期)、18 日 (退行期)、25 日 (休止期) の皮膚標本を得た。頬髭毛包は上述のように単離して毛周期ステージを判定した。皮膚サンプルは液体窒素で凍結したのちクライオプレスで破碎して、AGPC 法で RNA 抽出を行った。頬髭毛包は 1本ずつマイクロチューブ用の電動ホモジナイザーを用いて破碎しながら溶解し、RNA を抽出した。ゲノム DNA の混入を防ぐため、RNA 溶液を DNase で処理したのち、ランダムプライマーを用いて cDNA を合成した。マウスで知られている 7 種類の LOX 遺伝子

と 2 種類の COX 遺伝子に特異的なプライマーと各毛周期ステージの cDNA を用い、Gene Amp 5700 (ABI) を使用して SYBR Green 法で real time reverse transcription-PCR (Q-PCR) を行った。内部標準に GAPDH 遺伝子を用い、プラスミドにクローニングした遺伝子の希釈系列をテンプレートにして得た標準曲線をもとに、各サンプルを標準化して定量した。

< 毛包組織内での遺伝子発現部位の解析 >

LOX および COX の遺伝子をクローニングして、DIG 標識 RNA プローブを作製し、毛周期のステージごとに作製した頬髭および背部皮膚のパラフィン切片に対し in situ hybridization (ISH) を行った。コントロールにはセンス鎖 RNA プローブを用いた。遺伝子の発現部位は AP 標識抗 DIG 抗体を用いた発色法または HRP 標識抗 DIG 抗体と Biotinyl-Tyramide, Streptavidin-Texas red を用いた蛍光法によって視覚化した。

結 果

マウス頬髭毛包の器官培養系に、LOX 阻害剤 (NDGA) または COX2 阻害剤 (NS398) を添加したところ、10 μ M で毛の伸長がコントロールの半分程度に抑制された (図 1)。40 μ M ではさらに阻害され、より高濃度の NDGA を用いた場合には毛の伸長が完全に止まった。しかし COX1 阻害剤は 40 μ M でも毛の伸長に対する阻害効果を示さなかった (図 1)。次に、ワックス脱毛法で毛周期をそろえた背部皮膚サンプルから得た RNA を用いて、LOX、COX 遺伝子の毛周期に伴う発現変動を Q-PCR 法で調べた (図 2)。LOX 遺伝子はほぼ同程度の発現量であったが、5-LOX は非常に低い発現しかみられなかった。COX2 は COX1 や LOX 群に比べ 10 倍以上高い発現を示した。毛周期との関

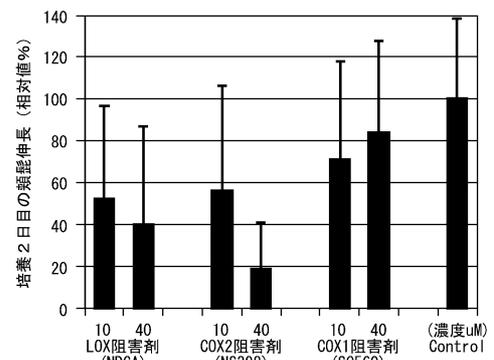


図 1 LOX および COX 阻害剤の頬髭伸長阻害効果

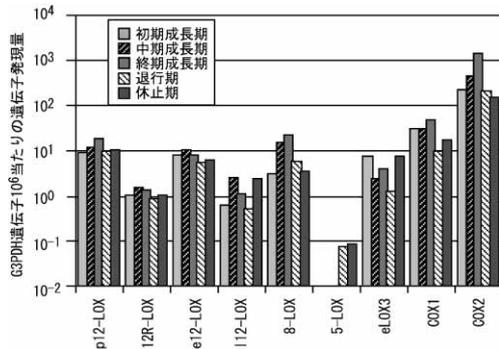


図2 LOX および COX 遺伝子の毛周期に伴う発現変動

連を見てみると、p12-LOX、12R-LOX、e12-LOXとCOX1では顕著な発現変動はみられなかった。一方、8-LOXとCOX2は成長期に発現が上昇し、eLOX3は初期成長期と休止期に高く、中～終期成長期に低い傾向がみられた。5-LOXは発現自体は少なかったが、退行期と休止期に発現が上昇するユニークなパターンを示した。毛周期変動を示した8-LOXの発現部位と発現量を確認するため、背部皮膚体毛毛包と頬髭毛包に対してISHを行った。体毛毛包では、初期成長期の角化し始めた毛母細胞（precortex cell）すなわち毛皮質に分化し始めた細胞に強いシグナルが確認されたが、そのほかの毛包組織に発現はみられなかった。中期成長期から後期成長期にかけて角化中の毛母および毛皮質において8-LOXの発現量が増し、退行期になると急速に発現が消失した。同様に頬髭毛包でも、成長期の角化毛母細胞と下部毛皮質細胞においてのみ発現が見られ、退行期から休止期にかけて発現が低下することが分かった（図3）。発現パターンは発色法でも蛍光法でも同様であった。

考 察

マウス頬髭の伸長はLOX阻害剤とCOX2阻害剤によって阻害された。COX2は炎症などにより皮膚に誘導され、表皮に強制発現させると毛包の数が減ったり脱毛を引き起こしたりすることが知られている（Lee *et al.* (2003)）。Q-PCRの結果においてCOX2 mRNAの発現が終期成長期に最も高かったことは、COX2が退行期を誘導する因子であるという仮説（Muller-Decker *et al.* (2003)）に合致する。一方、LOXと毛の成長の関係についてはほとんど報告がないことから、今回LOX阻害剤によって頬髭の伸長が阻害されたことは興味深い。Funk *et al.* (1996)はe12-LOXが表皮と尾の毛包の毛球部および頬髭毛包の峽部に発現することを報告しているが、今回のQ-PCRでは発現の毛周期変動はみられなかった。地阪ら（未発表）は、

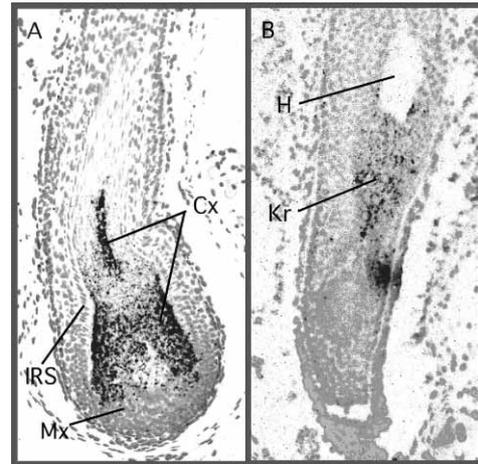


図3 頬髭毛包における8-LOX遺伝子の発現部位

A：成長期毛包。B：退行期毛包。プローブをTexas-Redで、核をDAPIで視覚化した（画像は階調を反転させモノクロ化）Cx；角化中の毛皮質，IRS；内毛根鞘，Mx；毛母，H；休止期毛の基部，Kr；角化中の上皮細胞

RI標識プローブを用いて、8-LOXの発現が尾の表皮層と毛包基部の角化領域にみられることを明らかにした。本研究でも体毛毛包および頬髭毛包の角化領域での発現がみられたものの、表皮での発現は確認できなかった。これは表皮の部位による発現の違いを反映しているのかも知れない。ISHのシグナル強度の毛周期に伴う変動は、Q-PCRの結果とほぼ一致していること、およびLOX阻害剤であるNDGAにより毛の伸長が抑制されてことと考え合わせると、成長期に発現する8-LOXが毛の角化速度を調節することにより毛の伸長をコントロールしている可能性が示唆される。今回の実験のみでは8-LOX以外のLOXの関与も否定できないが、今後8-LOXによって産生される15-HETE等の代謝産物の投与実験を行うことなどにより、毛包における8-LOXの役割が解明できると期待する。

参考文献

- Funk, C.D., Keeney, D.S., Oliw, E.H., Boeglin, W.E. and Brash, A.R. (1996) *Journal of Biological Chemistry* 271: 23338-23344.
- Lee, J.L., Mukhtar, H., Bickers, DR., Kopelovich, L. and Athar, M. (2003) *Toxicology and Applied Pharmacology* 192: 294-306.
- Muller-Decker, M., Leder, C., Neumann, M., Neufang, G., Bayerl, C., Schweizer, J., Marks, F. and Furstemberger, G. (2003) *Journal of Investigative Dermatology* 121: 661-668.