

機関番号：11301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790058

研究課題名 (和文) 生理活性脂質リゾホスファチジン酸の体毛形成における機能解析

研究課題名 (英文) Lysophosphatidic acid regulates hair follicle development

研究代表者

井上 飛鳥 (INOUE ASUKA)

東北大学・大学院薬学研究科・助手

研究者番号：50525813

研究成果の概要 (和文)：

近年、リゾホスファチジン酸と呼ばれる脂質の1種が細胞の機能を制御し、様々な生理現象に影響を与えることが明らかになってきている。研究代表者は遺伝子改変が可能なマウスをモデル動物として、生体内でのリゾホスファチジン酸の役割について研究を行っている。本研究を通じて、リゾホスファチジン酸の産生酵素を欠損したマウスは体毛の形成に異常が生じることを見出し、その原因を分子レベルで明らかにした。得られた知見を元にして、毛髪異常の治療薬への応用が期待される。

研究成果の概要 (英文)：

Lysophosphatidic acid has been established as an important mediator that is involved in various physiological events. Our work is to examine novel roles of lysophosphatidic acid by utilizing genetically engineered mice. Here we found that mice lacking production of lysophosphatidic acid exhibited hair defects. We further identified mechanisms underlying the lysophosphatidic acid-induced hair formation. Our work will be beneficial to development of medicine for hair disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：リゾリン脂質、毛包、受容体、GPCR

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの先天性体毛形成異常の患者の解析から、生理活性脂質であるリゾホスファチジン酸 (LPA) シグナルが体毛形成に重要な役割を果たすことが示唆されてきている。ヒトにおいて、ホスファチジン酸選択的ホスホリパーゼ  $A_1\alpha$  (PA-PLA $_1\alpha$ 、別名 LIPH) の欠損や、リガンド未知の G タンパク質共役型受容体 (GPCR) P2Y5 の欠損患者は貧毛・縮毛を示す。研究代表者の所属する研究室では、*in*

*vitro*において PA-PLA $_1\alpha$  が LPA を産生する活性があることを示してきた。さらに、研究代表者は PA-PLA $_1\alpha$  ノックアウト (KO) マウスを作製したところ、ヒトと類似した体毛形成異常を見出している。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、PA-PLA $_1\alpha$  KO マウスの解析を行い、LPA がどのようなメカニズムで体毛形成を担うかを明らかにする。さらに、

P2Y5 の活性化検出系を構築し、当研究室で保有する LPA アナログの P2Y5 アゴニスト活性を評価する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 抗マウス PA-PLA<sub>1</sub>α モノクローナル抗体の作製

PA-PLA<sub>1</sub>α は膜結合型の分泌タンパクであったため、バキュロウイルス-Sf9 昆虫細胞系を用いて発現させた細胞膜画分を免疫原に用いた。得られた膜画分をラットフットパットに免疫し、リンパ節から常法に従い、ハイブリドーマを調製した。約 3000 クローン of ハイブリドーマから、段階的なスクリーニングを行った。

#### (2) PA-PLA<sub>1</sub>α KO マウスの体毛解析

体毛形成器官である毛包の解析には、毛包成長期の背側皮膚（生後 8-14 日齢）あるいはほおひげ（生後 14 日齢）を用いた。背側皮膚は常法に従い、組織切片を作成し、HE 染色を行い形態を観察した。また、蛍光免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で目的タンパクを検出した。ほおひげは実体顕微鏡下で、外科的に毛包を単離し、生化学的な実験を行った。

#### (3) LC/MS による LPA 解析

毛包における LPA の存在量は、当研究課題を通じて構築した LC/MS 系を利用した。具体的にはメタノール中で組織片を破碎し、遠心後の上清を脂質解析サンプルとした。LC は ODS カラムを用いた逆相系を使用した。MS はトリプル四重極による SRM 分析を行った。

#### (4) P2Y5 の受容体活性化の検出

P2Y5 の受容体活性化は、アルカリホスファターゼ (AP) 標識 TGFα の切断を利用した新規 GPCR アッセイ系を利用した。具体的には HEK293 細胞に AP 標識 TGFα 発現プラスミドベクターと P2Y5 発現プラスミドベクターをトランスフェクションし、24 時間後に血清不含の培地に再懸濁し、被検化合物を添加した。1 時間静置後に上清中の AP 活性を *p*-ニトロフェニルホスフェート (*p*-NPP) の呈色反応を利用して測定した。細胞無刺激群の AP 活性を差し引いた値を縦軸に用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) 抗マウス PA-PLA<sub>1</sub>α モノクローナル抗体の樹立

研究代表者らはこれまでに、合成ペプチドを免疫原とした、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体の作製を試みていたが、内在性の PA-PLA<sub>1</sub>α を検出することはできていなかった。そこで全長 (約 60kDa) のリコンビナントタンパクを、バキュロウイルスを用いて Sf9 昆虫細胞に発現させた細胞膜画分を免疫原に使用した。約 3000 クローン of ハイブリドーマから、段階的なスクリーニングを行い、内在性の PA-PLA<sub>1</sub>α を認識可能なハイブ

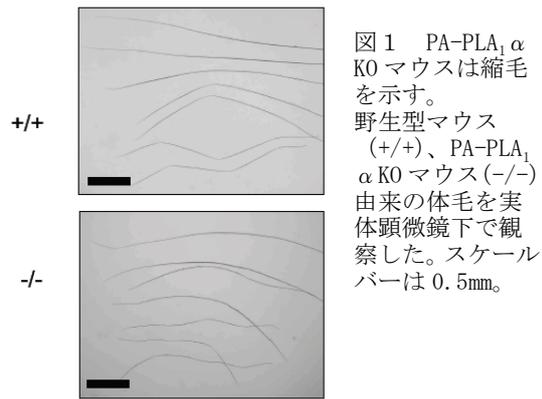


図1 PA-PLA<sub>1</sub>α KO マウスは縮毛を示す。野生型マウス (+/+), PA-PLA<sub>1</sub>α KO マウス (-/-) 由来の体毛を実体顕微鏡下で観察した。スケールバーは 0.5mm。

リドーマを樹立した。

#### (2) PA-PLA<sub>1</sub>α は生体内で LPA を産生する

研究代表者らは、*in vitro* において PA-PLA<sub>1</sub>α がホスファチジン酸 (PA) から LPA を産生する活性があることを示していたが、実際に生体内でその反応を担いうるかについては、不明であった。生体内の LPA 濃度は非常に少なかったため、研究代表者は LC/MS 系を用いたリゾリン脂質の高感度定量系を構築した。この定量系を用い、野生型 (WT) マウスと PA-PLA<sub>1</sub>α KO マウスの毛包組織中の LPA 含量を測定した。その結果、PA-PLA<sub>1</sub>α KO マウスでは、LPA が約 2 割以下であることがわかった。LPA 分子種のうち、2-アシル型 LPA と不飽和脂肪酸含有 LPA は PA-PLA<sub>1</sub>α KO ではほぼ消失していた。以上の結果より、PA-PLA<sub>1</sub>α が生体内で LPA の産生を担う酵素であることが初めてわかった。

#### (3) LPA による体毛形成のメカニズムの解明

体毛形成を担う皮膚の器官である毛包は複数の層構造からなる。このうち、PA-PLA<sub>1</sub>α がどの部位で発現して毛包の機能を制御しているかを明らかにするために、抗 PA-PLA<sub>1</sub>α 抗体と各層のマーカーを用いた二重免疫蛍光染色を行った。その結果、PA-PLA<sub>1</sub>α は内根鞘 (内毛根鞘とも呼ばれる) に発現していることがわかった。内根鞘は毛 (毛幹) が角化する際に重要な役割を果たし、さらに毛を毛包内に保持する役割がある。組織切片レベルで形態を観察したところ、PA-PLA<sub>1</sub>α KO マ

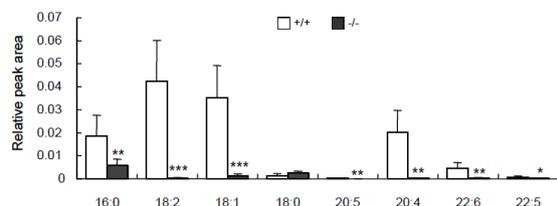


図2 PA-PLA<sub>1</sub>α KO マウスの毛包では LPA 産生はほぼ消失する。野生型マウス (+/+), PA-PLA<sub>1</sub>α KO マウス (-/-) の毛包組織の LPA 分子種を LC/MS 測定法により定量した。

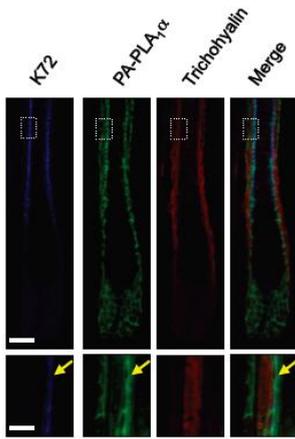


図3 PA-PLA<sub>1</sub>α は内根鞘に発現する。成長期の毛包を抗 PA-PLA<sub>1</sub>α 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。PA-PLA<sub>1</sub>α は内根鞘マーカーの K72 と共局在する (矢印)。

ウスの毛包では内根鞘の異常な角化が見られた。さらに、各層のマーカーの発現をリアルタイム PCR で定量したところ、PA-PLA<sub>1</sub>α KO の毛包では内根鞘マーカーのみが発現減少していた。このことから、毛包形成において PA-PLA<sub>1</sub>α は内根鞘に発現し、内根鞘の分化・成熟に関与することが示唆された。

LPA の体毛形成に関わる分子メカニズムとして、TACE (膜型プロテアーゼの 1 種で TGFα 切断を引き起こす)、TGFα (EGF 受容体のリガンドの 1 種) および EGF 受容体の活性化に着目した。TACE、TGFα および EGF 受容体の各変異マウスは PA-PLA<sub>1</sub>α KO マウスと非常に類似した体毛形成異常を示す。また、これまでの報告から *in vitro* で GPCR の活性化が EGF 受容体リガンド (HB-EGF など) の切断・放出を引き起こすことが報告されていた。そこで研究代表者は体毛形成時において、PA-PLA<sub>1</sub>α が LPA を産生し P2Y5 を介して、TACE、TGFα、EGF 受容体の活性化を引き起こすと想定した。始めに、毛包組織における TACE、TGFα、リン酸化 EGF 受容体 (p-EGF 受容体) の局在を検討したところ、PA-PLA<sub>1</sub>α の発現している内根鞘で共局在していた。次に、毛包における遊離 TGFα および p-EGF 受容体量を定量したところ、PA-PLA<sub>1</sub>α KO マウスにおいて、有意な減少が見られた。従って、正常な毛包形成において、PA-PLA<sub>1</sub>α が産生する LPA が TACE の活性化、TGFα の切断、EGF 受容体のリン

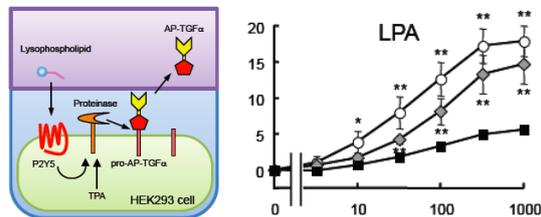


図4 P2Y5 は LPA により TGFα 切断を誘導する。(左) AP 標識 TGFα 切断アッセイの模式図。P2Y5 と AP 標識 TGFα を HEK293 細胞に発現させ、LPA で刺激する。切断された TGFα 量は上清中の AP 活性を測定することで定量できる。(右) LPA による AP 標識 TGFα 切断。マウス P2Y5 (白)、ヒト P2Y5 (灰色)、空ベクター (黒) に LPA (横軸 nM) で処理をした。

酸化を介する経路が重要な役割を担うことが示唆された。

#### (4) 培養細胞を用いた TGFα 切断メカニズムの解析

これまでの解析により、毛包組織内で PA-PLA<sub>1</sub>α が産生する LPA が P2Y5 を介して TACE の活性化と TGFα の切断を引き起こすことが示唆された。そこで、この現象を培養細胞レベルで再現できるか検討した。マウスの初代培養角化細胞あるいはヒト角化細胞株を LPA で処理すると TGFα の放出が見られた。この TGFα の放出は P2Y5 または TACE の siRNA で抑制された。

次に、培養細胞を用いて LPA-P2Y5-TACE-TGFα 切断経路の再構成を検討した。HEK293 細胞に P2Y5 受容体と AP 標識 TGFα を一過性に発現させ、LPA で刺激すると AP 標識 TGFα の切断と上清への放出が観察された。この P2Y5 と AP 標識 TGFα 発現細胞に PA-PLA<sub>1</sub>α 発現細胞と混合したところ、LPA 刺激と同様に AP 標識 TGFα の切断と上清への放出が観察された。このことは PA-PLA<sub>1</sub>α が脂質二重層の外膜の PA から LPA を産生し、P2Y5 の活性化を介して TACE による TGFα の切断を引き起こしていると考えられる。

#### (5) LPA 受容体 P2Y5 アゴニストの開発

AP 標識 TGFα の切断・放出を利用した P2Y5 の活性測定系を用い、研究代表者の所属する研究室で保有する LPA アナログの P2Y5 活性化能を評価した。約 120 種類の LPA アナログのうち、15 種類が LPA と同等かそれ以上のアゴニスト作用を示した。この構造活性相関を元に、2-アシル型かつホスファターゼ耐性な LPA アナログの有機合成を共同研究で行い、P2Y5 に対する活性を評価した。その結果、P2Y5 は 2-アシル型 LPA アナログに高い選択性を示し、ホスホチオール基 (ホスファターゼ耐性) によっても強く活性化された。従って、これらの構造を持つ LPA アナログは皮膚への投与で体毛形成の促進作用を有する可能性が期待される。

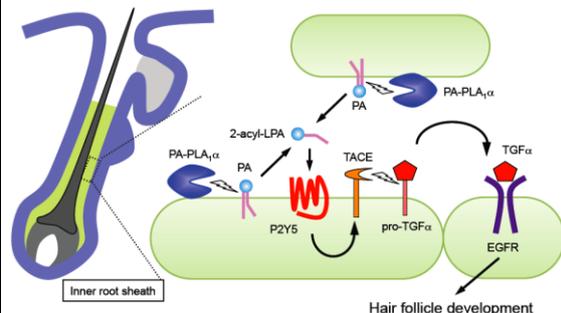


図5 体毛形成時の LPA の作用メカニズム。PA-PLA<sub>1</sub>α は細胞外膜の PA から LPA を産生し、P2Y5 に LPA を受け渡す。LPA は TACE の活性化を誘導し、TGFα の切断と EGF 受容体の活性化を引き起こす。毛包組織内の内根鞘におけるこのシグナル経路は正常な体毛形成に重要である。

(6) 日本人の PA-PLA<sub>1</sub>α 欠損患者の同定とメカニズム解析  
研究代表者は北海道大学医学部皮膚科と共同研究で、日本人の PA-PLA<sub>1</sub>α 欠損患者を新規に同定し、その分子メカニズムの解析を行った。日本の先天性貧毛症・縮毛症の 5 家系の疾患関連遺伝子のシーケンスを行ったところ、2 種類の変異 (Cys246Ser および His248Asn) を見出した。先天性貧毛症・縮毛症の 5 家系において、患者はホモ (Cys246Ser を両アレルに持つ) またはコンパウンドヘテロ (Cys246Ser と His248Asn のアレルを持つ) であった。PA-PLA<sub>1</sub>α と 36% のアミノ酸相同性を有する腓リパーゼの結晶構造解析から、PA-PLA<sub>1</sub>α の Cys246 は基質ポケットを取り囲むジスルフィド結合を形成すること、His248 は活性中心 (Ser, His, Arg) を形成する主要アミノ酸残基の 1 つであることが示唆されている。実際、培養細胞でこの 2 種類の変異体 (Cys246Ser および His248Asn) を発現させると、発現量や糖鎖修飾に変化はないが、PA を切断する活性は完全に消失していた。さらに、野生型 PA-PLA<sub>1</sub>α と 2 種類の変異体を P2Y<sub>5</sub> 発現細胞に加えたところ、野生型 PA-PLA<sub>1</sub>α は P2Y<sub>5</sub> の活性化と下流の AP 標識 TGFα の切断を引き起こしたが、2 種類の変異体は P2Y<sub>5</sub> の活性化を完全に欠損していた。以上の結果は先天性貧毛症・縮毛症の患者において、変異 PA-PLA<sub>1</sub>α が LPA 産生能と LPA 受容体活性化能を欠損していることで病態が発症することを示している。

#### 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 3 件)

1. Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators.

Nishimasu H, Okudaira S, Hama K, Mihara E, Dohmae N, Inoue A, Ishitani R, Takagi J, Aoki J, Nureki O.

Nat Struct Mol Biol. 18(2):205-212 (2011)  
査読あり

2. Prevalent LIPH founder mutations lead to loss of P2Y<sub>5</sub> activation ability of PA-PLA<sub>1</sub>α in autosomal recessive hypotrichosis.

Shinkuma S, Akiyama M, Inoue A, Aoki J, Natsuga K, Nomura T, Arita K, Abe R, Ito K, Nakamura H, Ujiie H, Shibaki A, Suga H, Tsunemi Y, Nishie W, Shimizu H.

Hum Mutat. 31(5): 602-610 (2010).  
査読あり

3. 第二世代の生理活性脂質としてのリゾリン脂質

井上飛鳥、青木淳賢

実験医学 27 (13): 2059-2067 (2009)

査読無

[学会発表] (計 11 件)

1. LC-ESI-MS/MS を用いた生理活性リゾリン脂質量系の開発

井上飛鳥

日本薬学会第 131 年会 2011/3/28 静岡

2. LC-ESI-MS/MS を用いたリゾリン脂質量系の開発

井上飛鳥

第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 2010/12/8 神戸

3. Lysophosphatidic acid plays a critical role in hair follicle formation through TGF-α release and EGFR transactivation

Asuka Inoue

The 27th Naito Conference on Membrane Dynamics and Lipid Biology [I] 2010/6/29 Sapporo, Japan

4. LC-ESI-MS/MS を用いたリゾリン脂質量系の開発

井上飛鳥

第 52 回日本脂質生化学会 2010/6/15 群馬

5. Lysophosphatidic acid plays a critical role in hair follicle formation through TGFα release and EGFR transactivation

Asuka Inoue

Keystone Symposia Bioactive Lipids: Biochemistry and Diseases (D2) 2010/6/7 Kyoto, Japan

6. Cleavage of membrane-bound TGFα as a useful readout for GPCR activation

Asuka Inoue

Satellite Symposium of the 14th International Congress of Endocrinology (ICE2010) 2010/3/30 Kyoto, Japan

7. 広範囲の GPCR シグナル検出を目的とした Gα タンパク質共発現による TGFα 切断アッセイ系の確立

井上飛鳥

第 82 回日本生化学会大会 2009/10/22 神戸

8. Lysophosphatidic acid plays a critical role in hair follicle formation through TGF $\alpha$  cleavage

Asuka Inoue

FASEB Summer Research Conference  
"Lysophospholipid Mediators in Health and Disease" 2009/6/30 Arizona, USA

9. LYSOPHOSPHATIDIC ACID PLAYS A CRITICAL ROLE IN HAIR FOLLICLE FORMATION THROUGH TGF- $\alpha$  SHEDDING

Asuka Inoue

4th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators (PLM2009) 2009/5/27 Tokyo, Japan

10. Lysophosphatidic acid is involved in hair follicle formation

Asuka Inoue

The 5th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences 2009/5/25 Tokyo, Japan

11. EGF 受容体リガンド切断アッセイを用いた新規リゾホスファチジン酸受容体 P2Y5 の機能解析

井上飛鳥

第6回GPCR研究会 2009/5/8 東京

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seika/H21/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井上 飛鳥 (INOUE ASUKA)

東北大学・大学院薬学研究科・助手

研究者番号：50525813

### (2) 研究分担者

該当なし

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

該当なし

( )

研究者番号：