

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591666

研究課題名(和文)毛髪を成長・維持させる重要遺伝子のノックダウンマウス作製による網羅的同定

研究課題名(英文) Comprehensive identification of important genes related to growing and maintaining the hair using knock down mice.

研究代表者

渋谷 和憲 (KAZUNORI, SHIBUYA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90296723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：加齢とともに毛髪が薄くなったり、細くなるなどの悩みを抱える人が非常に多く存在する。そこで毛髪を維持・成長させる遺伝子を遺伝子改変マウス(ノックダウンマウス)を用いて探索する実験を行った。その結果、数匹の遺伝子改変マウスを作製することには成功したが期待したような毛髪に変化のある表現型は観察されなかった。

研究成果の概要(英文)：Many people hold a trouble of hair becoming thin with aging. Then, the experiment which searches for the gene which maintains and grows up hair using a genetically engineered mouse (knockdown-mouse) was conducted. As a result, the expected phenotype which has change in hair was not observed, although it succeeded in producing a genetically engineered mouse.

研究分野：分子生物学

キーワード：毛髪 成長期 ノックダウンマウス

1. 研究開始当初の背景

我々のグループはヒトゲノム計画の一環として 21 番染色体長腕の全塩基配列の決定および遺伝子の系統的探索を目指し、2000 年 5 月に日独共同プロジェクトとして 21 番染色体の真正クロマチン約 34 Mb の塩基配列を決定し報告した (*Nature* 405:311-319, 2000)。その後、さらに解析を行ったところ、当時遺伝子が発見されていなかった領域に複数の低頻度重複配列があり、実はその重複配列は毛髪ケラチン付随タンパク (KAP) 遺伝子のクラスターであることが分かった (*Am. J. Hum. Genet.*, 71:914 Suppl., 2002)。KAP 遺伝子は単一エクソンからなりアミノ酸組成が非常に偏っていることから、エクソン予測ソフトで正確に遺伝子を見つけることはほとんどできなかった。そこでこの領域約 200 Kb をドットマトリックス解析したところ、21 個の重複配列が発見された。このうち 5 個に関してはタンパクのコード領域が破壊されている偽遺伝子であることが分かった。残りの 16 個については毛根細胞から抽出した RNA に対して RT-PCR を行いその発現を確認し、機能する遺伝子であることを証明した (*Genomics*, 83:679-693, 2004)。一方、マウス 16 番染色体において KAP 遺伝子クラスターの存在が報告された (*Development*, 128:1547-1558, 2001)。この領域はヒト 21 番染色体と相同な領域であることから、我々は 21q22.11 領域の約 900 Kb についてドットマトリックス解析および相同性検索などを用いて詳細に解析を行い、新たに 32 個の遺伝子と 18 個の偽遺伝子を同定することができた (*Am. J. Hum. Genet.*, 71:914 Suppl., 2002)。さらに 11 番染色体の長腕と短腕に存在が示唆されていた (*Mamm. Genome*, 1:53-56, 1991) KAP 遺伝子クラスターの同定を試み、短腕 (11p15.5) に 6 個、長腕 (11q13.5) に 5 個の計 11 個の KAP 遺伝子と 2 個の偽遺伝子を同定することができた (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 318:655-664, 2004)。最後に残った KAP 遺伝子クラスターは 17 番染色体に存在しておりこの領域 (17q12-21) の KAP 遺伝子クラスターのゲノム構造は Rogers らによって 37 個の遺伝子と 4 個の偽遺伝子が存在すると報告された (*J. Biol. Chem.*, 276:19440-19451, 2001)。しかし我々が再度この領域の KAP 遺伝

子クラスターを解析したところ、実際には KAP 遺伝子は 34 個で偽遺伝子は 4 個であり Rogers らが報告した結果には誤りがあった。このようにして我々は 11 番、17 番、21 番染色体にそれぞれクラスターを成して存在する全 KAP 遺伝子の解明を行うことができ、最終的にヒトゲノム上には毛髪の主要構成タンパクである KAP 遺伝子が 93 個存在していることが明らかとなった。これら毛髪の主要構成タンパクである KAP 遺伝子は毛髪を形成するために必須であり、これら遺伝子の発現を制御する遺伝子は脱毛症のメカニズムを知る上できわめて重要であると考え、研究代表者は毛髪の研究に着手することとなった。

2. 研究の目的

毛髪は毛周期 (成長期 退行期 休止期) により、成長・脱毛のサイクルを繰り返す組織である。ヒト頭髪において成長期は 2~7 年、退行期が数週間、休止期は数ヶ月と言われている。毛髪は毛包と呼ばれる複雑な組織下で作られ、毛幹部分が表皮から上に出てきたものであり、毛包基部にある毛母細胞が増殖することにより上方に移動した細胞が分化し、最終的に角化することにより形成される。毛周期が正常なサイクルを刻んでいる場合には特に問題はないが、この毛周期に障害が起こると脱毛が起こる。特に男性型脱毛症はアンドロゲンの影響により毛周期の成長期部分が短縮することによって起こる疾患であることが知られている。脱毛・薄毛など毛髪に関する問題は男性ホルモンや社会的ストレス、薬物使用など様々な精神的・身体的要因が考えられ、近年では男性ばかりでなく女性においても増加傾向にある。この問題は生命の維持に直接関与する事はないものの他人に与える印象を左右し、社会生活を送る上で当事者の精神的状態に大きな影響を及ぼす案件として多くの関心が持たれている。この毛髪の主要な構成タンパクとして毛髪ケラチンと上記の KAP が知られている。毛髪ケラチンは細線維あるいは超原線維を形成し毛髪の骨格をつくり、KAP は線維の間充を満たし毛髪の強固な構造の保持に必須の構成タンパクであると考えられている。KAP は毛髪の主成分の一つであることから、当然成長期に強く発現が誘導されているはずである。そこで毛周期に伴って発現が変動する遺伝子が毛髪の成長や毛周

期の調節に関与していると考え、成長期マウスの背部皮膚と退行期・休止期マウスの背部皮膚を用いてマイクロアレイ解析を行い、成長期に強く発現する 2,480 個の遺伝子を同定した。我々の実験系と全く同じではないものの、幾つかのグループから同様の解析が行われ報告されている (Gene Expr. Patterns, 4:141-152, 2004; Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 101:15955-15960, 2004; J. Invest. Dermatol., 125:410-420, 2005)。しかし我々の結果も含めこれらの解析結果は毛周期のある時期に優位あるいは特異的に発現している遺伝子の同定にすぎず、これらの遺伝子が毛髪の成長・維持という表現型に直接関わる機能を毛包で果たしているかどうかは不明であり、またそれらを包括的に検証した報告はない。そこで本応募研究課題としてマイクロアレイ解析で得られた候補遺伝子に対して miRNA を利用したノックダウンマウスを作製し、毛髪の成長・維持という表現型に直結する機能を有する遺伝子を大規模に同定することを目指す。

すでにマイクロアレイ解析によってマウス毛周期の成長期に優位に発現する遺伝子リストの発現比において上位 600 遺伝子を 16 のカテゴリー (転写因子、受容体、増殖因子、細胞外マトリックス、細胞骨格、代謝、タンパク質分解、機能未知・もしくは分類不可など) に分類してある (TOP3 を例に挙げると、情報伝達物質; 145、分類不可; 134、代謝; 66)。本応募研究課題の研究期間内にこれらの分類のうち転写因子と受容体に分類された遺伝子にターゲットを絞りこれら遺伝子に対する miRNA をデザインし、これらを発現させるベクターに組み込み、受精卵にマイクロインジェクションしてターゲット遺伝子の発現を抑制したノックダウンマウスの作製を行い、生まれてきたマウスの表現型を評価することにより毛髪の成長・維持に直結する機能を有する遺伝子の同定を目指す。また順調にノックダウンマウスの作製が進み、予期された表現型を示すマウスが得られた場合、そのマウス毛包の形態を調べ、さらに目的遺伝子の発現が抑制されているかどうかを調べ、遺伝子型と表現型の相関関係の評価・検証することを目的として研究を行う。

マイクロアレイを用いた毛周期のある時期に優位に発現する遺伝子の網羅的な解析は我々のグループを含め世界の数グループ

でも行われているが、例えば成長期に優位に発現している遺伝子そのまま毛髪の成長・維持を直接制御しているかどうかはこの解析だけでは不明であり、新たな評価系が必要不可欠である。そこで本応募研究課題として miRNA を発現するノックダウンマウスを作製することにより、マイクロアレイ解析で得られた遺伝子の発現を抑制し毛髪の成長にどのような変化を生じさせるかその表現型を調べることにより評価できると考えた。この研究分野でこのような試みはまだ為されていない。今回ノックダウンマウスを評価系の軸に据えた理由は、ノックアウトマウスでは作製に時間が掛かり、たくさんの遺伝子を標的にするのは困難であるからである。また、この計画で作製される遺伝子組換えマウスは毛髪の表現型に影響を与えるものであるから、生後 2~3 週間という短い飼育期間で評価できることも多くの遺伝子をターゲットにする際大きな利点になると考えられる。現在ベクターを用いて siRNA、miRNA、shRNA などを発現させる場合、H1 や U6 などの PolIII 系プロモーターが多く用いられている。しかしこれらプロモーターは組織特異的な発現を誘導することが困難であることから今回毛包組織に特異性の高い polIII 系プロモーターを用いることによって、胎生致死の確率を減らし、毛髪の表現型に変化をもたらすマウスの生存率を高められる系を採用した。本応募研究課題で計画された polIII 系プロモーターを用いて多数の遺伝子の機能を抑制することによって遺伝子の機能を評価する試みはいままでほとんど為されていないと思われる。従ってこの方法が良好な結果をもたらせば、多数の遺伝子の機能を網羅的に評価できる系の確立に繋がり、世界中に大きな波及効果が及ぶと予想される。一方、この計画によって得られる具体的な結果は毛髪の発生や成長・維持のメカニズムを解明する上で貴重な情報をもたらしてくれるとともに、脱毛症の治療さらには育毛剤の創薬開発においてこの分野の発展に大きく貢献できるものと考えられ、是非とも成功させたい。

3. 研究の方法

これまでにヒト毛髪の構成タンパクの一つである KAP の遺伝子クラスター全てを解析し、その構造を明らかにしてきた (*Am. J. Hum. Genet.*, 71:914 Suppl., 2002; *Genomics*, 83:679-693, 2004; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 318:655-664, 2004)。これら KAP 遺伝子の発現調節因子の探索を目的にマウス毛周期の成長期、退行期、休止期に優位な発現を示す遺伝子群をマイクロアレイ解析により同定し、特に成長期に優位に発現する遺伝子 2,480 個のうち発現比において上位 600 個については機能別に 16 のカテゴリーに分類が済んでいる。本応募研究課題は毛髪の成長・維持に直接関与する遺伝子の同定を行

い、将来的に脱毛症の予防・治療さらには育毛剤の創薬開発における基盤情報を蓄積することを目的にしている。マイクロアレイ解析によって得られた成長期に優位に発現する遺伝子は成長期での発現が退行期、休止期に比べて高いことは判明したが、これらが毛髪の成長・維持という表現型に直接関与しているかどうかはこの段階では評価できないので、新たな評価系の確立が求められる。毛周期の研究においてマイクロアレイ解析 (*Gene Expr. Patterns*, 4:141-152, 2004; *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 101:15955-15960, 2004; *J. Invest. Dermatol.*, 125:410-420, 2005) 後、実際にこのような方法で遺伝子と表現型との相関関係を包括的に検証した例はない。そこで本応募研究課題ではmiRNAを発現するノックダウンマウスを作製することによって、マイクロアレイ解析で得られた成長期に優位に発現している遺伝子の発現を抑制することによって、その遺伝子が毛髪の成長・維持に直接関与するかどうかを評価することができると考えた。またsmall RNAを人為的に発現させる場合、H1やU6などのPolIII系プロモーターが主流に使用されているが、これらプロモーターは組織特異的な発現を誘導することが困難であり胎生致死の確率が上がってしまう可能性がある。そこで本応募研究課題では組織特異的な遺伝子発現が可能なPolIII系プロモーターを用いて毛包組織特異的なmiRNA発現ベクターを構築し、遺伝子組換えマウスの作製を行う。その後生まれたマウスの表現型を解析し、毛髪の成長・維持に直接関与する遺伝子の同定を目指す。具体的には以下のように進める。

毛包組織は分化ステージの異なった様々な組織(細胞)の集合体でありそれぞれの組織(毛髄、毛皮、毛小皮、バルジ、内毛根鞘、外毛根鞘、表皮基底層、重層上皮、毛母細胞、毛乳頭、皮脂腺など)で特異的な発現を可能とするプロモーターを利用することが望ましい。プロモーターについては現在までに、生体毛包内の細胞分化に伴う遺伝子発現における知見が集積されており、中でもケラチンファミリーはその分化段階を認識するためのマーカーとしても認知されている (*Int. Rev. Cytol.*, 243:1-78, 2005)。よって本応募研究課題においては毛包組織特異的に発現する主要なマーカーとなるケラチン遺伝子調節領域を主軸に候補プロモーターの選別を行い、その調節領域をPCRによりクローニングする。マイクロアレイ解析によって得られた成長期に優位に発現する遺伝子のうち、転写因子および受容体に分類されたターゲットに対するmiRNAをデザインする。1遺伝子に対して3つのmiRNAをデザインする予定である。次にクローニングした各プロモーターの下流にmiRNAを発現させるためのDNA断片をつないで毛包細胞特異的なmiRNA発現ベクターを構築する。以下一般

的なトランスジェニックマウスの作製手順にのっとり、受精卵にベクターDNAをマイクロインジェクションし、仮親に戻して出産させる。生まれたマウスのトランスジーン率のキメラ率は各組織から採取したゲノムDNAに対してPCRを行うことによってその詳細が判断できるが、このベクターには蛍光タンパク(GFP)を発現させるユニットを組み込んであるので、PCRを行う前に簡易スクリーニングを行うことにより、迅速な判断ができる。その後、毛の表現型に異常(毛が生えない、毛が生える時期が遅れる、毛が生えても毛自体に異常が見られるなど)があるかどうかを判定する。マウスの毛の場合、生後2~3週間の飼育期間でおおまかに判断できると思われる。これらを繰り返してマイクロアレイ解析で得られた成長期に優位に発現している毛の成長・維持に直接機能を果たす遺伝子(転写因子、受容体に分類されたもの)の同定を行っていく。

4. 研究成果

本応募研究課題ではmiRNAを発現するノックダウンマウスを作製することによって、マイクロアレイ解析で得られた成長期に優位に発現している遺伝子の発現を抑制することによって、その遺伝子が毛髪の成長・維持に直接関与するかどうかを評価する系の確立を目指している。まず、毛包組織で特異的に発現する遺伝子のプロモーター領域を5ヶ所選別し、PCR法によりDNA断片を増幅しクローニングを行った。3ヶ所はクローニングに成功したが、2ヶ所はクローニング出来なかった。また、塩基配列が確認されたプロモーターの下流にmiRNAを発現させるためのDNA断片をつないで毛包細胞特異的なmiRNA発現ベクターの構築を行い実際に数種のトランスジェニックマウスの作出に成功したが、これらのマウスの毛に関する目立った表現型の変化は見られなかった(図1)。しかし、本研究において本実験をさらに推し進めるための材料・方法という基盤を確立することができた。



図1 作出されたノックダウンマウス

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0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渋谷 和憲 (KAZUNORI SHIBUYA)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：90296723