

平成 21 年 1 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591328
 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
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：90296723

研究成果の概要：

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を用いて探索する実験を行った。その結果、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。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1020,000	4,420,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

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900Kb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的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。これら毛髪的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。この毛髪的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を評価・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があるまま毛髪の成長・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主軸に据えた理由は、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polII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polII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としている。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の通り、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のコモウ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）

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし