

脂質ヒドロペルオキシドによる発毛阻害のメカニズムの解析と保護化合物の*In vivo*評価系の構築

北里大学薬学部衛生化学

今井 浩 孝

Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) is an important antioxidant enzyme that could directly reduce phospholipid hydroperoxide in biomembrane induced by oxidative stress. In this study we found that disruption of PHGPx by treatment of tamoxifen in skin of tamoxifen-inducible PHGPx KO mice could induce loss of hair follicle morphogenesis without damage of skin tissue. And co-treatment of vitamin E with tamoxifen could suppress the delay of hair follicle morphogenesis, indicating that generation of phospholipid hydroperoxide in skin might affect the hair follicle formation in adult mice.

1. 緒 言

リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ (PHGPx) は、酸化ストレスなどによる活性酸素により酸化された生体膜リン脂質の1次生成物であるリン脂質ヒドロペルオキシドをグルタチオン依存的に直接還元できる主要な抗酸化酵素である¹⁾。申請者はこれまでPHGPxの個体及び細胞レベルでの機能の解析を一貫して行っており、全ノックアウトマウスが初期発生過程で致死となること²⁾、精巣特異的及び網膜特異的PHGPx欠損マウスが不妊及び失明となること^{3, 4)}、肝臓特異的PHGPx欠損マウスは肝細胞死をひきおこし出生直後死となること、ビタミンEの餌への投与により個体死がレスキューできること⁵⁾などを明らかにしてきた。またMEF細胞でもPHGPxを欠損させると約3日後に細胞死が誘導され、その細胞死のメカニズムはこれまで報告のある細胞死とは異なることを見出している⁶⁾。このMEF細胞死もビタミンEの添加により抑制される⁷⁾。このように様々な細胞においてPHGPxを欠損させると内在性にリン脂質ヒドロペルオキシドが蓄積し細胞死が誘導される。

皮膚は紫外線などにより最も脂質酸化が起きる組織のひとつであるが、PHGPxの皮膚組織での発現部位やその機能についてはほとんど明らかになっていなかった。PHGPxは活性中心に微量元素セレンを含むセレノシステインを有するが、ヒトの遺伝病でこのセレノシステインを導入できなくなった患者では、PHGPxを含む25種類のセレン蛋白質の発現量が減少し、紫外線に対する感受性が増大することが報告されている⁸⁾。



Analysis of mechanism of inhibition of hair growth by depletion of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mice and rescue effects of vitamin E.

Hirotaka Imai

School of pharmaceutical Sciences, Kitasato University

我々は最近、全身性タモキシフェン誘導型PHGPx欠損マウス(図1)の作製に成功し、時間及び部位特異的にPHGPxを欠損させられるマウスを得た。このマウスを用いて剃毛後、皮膚に直接タモキシフェンを塗布し、皮膚でPHGPxの遺伝子を破壊した際、どのようなフェノタイプが出るのかを検討したところ、外見上、皮膚細胞に異常はみられなかったが、発毛に異常が見られることを見いだした。このことは内在性に生じる脂質ヒドロペルオキシドが毛包細胞等に作用し、発毛を阻害していると考えられた。そこで本研究では、このPHGPx欠損による内在性に生じた脂質酸化による発毛阻害の詳細を明らかにすることを目的に研究を行った。また脂質の酸化を抑えるビタミンEがこの発毛の阻害に対して効果を有するのかについて、*In vivo*で検証することにより、*In vivo*における脂質ヒドロペルオキシドによる発毛阻害保護作用のある化合物のスクリーニング系の構築を目指した。

2. 実 験

2.1 全身性タモキシフェン誘導型PHGPx欠損マウスの交配と産出

図1に示す様に、全身性タモキシフェン誘導型PHGPx欠損マウス(Cre TG KOマウス; Cre+/-:TG+/-:PHGPx-/-)は、申請者が作成した内在性PHGPx欠損マウス(PHGPx-/-)が胚発生致死となること¹⁾、LoxP遺伝子で挟んだマウスPHGPxトランスジェニックTG遺伝子(PHGPx-F-Lox)によりトランスジェニックレスキュー法によって作成したコントロールマウス(TG+/+, PHGPx-/-)^{3, 7)}とβアクチンプロモーターによって制御されたCreER遺伝子がトランスジェニックされたマウス(Cre+/-, PHGPx+/+)とPHGPxヘテロマウス(PHGPx+/-)を交配して得られたW-Creヘテロマウス(Cre+/+, PHGPx+/-)を交配することで得られた。この交配で生まれてくる子供のジェノタイプは、CRE TG KO (Cre+/-:TG+/-:PHGPx-/-)、CRE TGヘテロ (Cre+/-:TG+/-:PHGPx+/-)の2種類である。CRE TGヘテロマウスは内在性のPHGPx

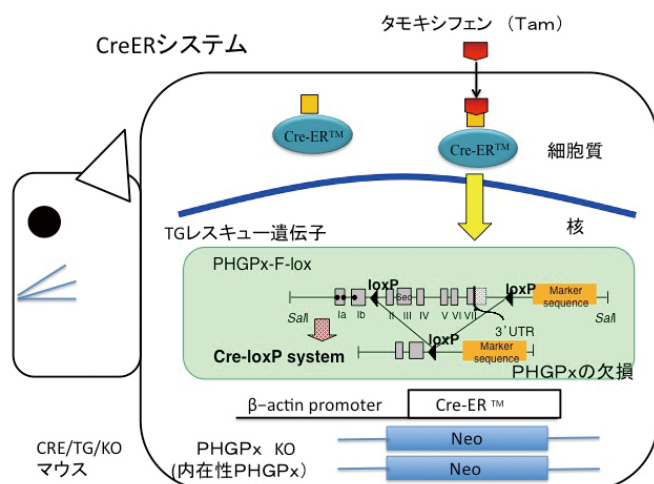


図1 全身性タモキシフェン誘導型 PHGPx 欠損マウス (CRE/TG/KO) におけるタモキシフェン添加による PHGPx 欠損のしくみ

ゲノム遺伝子を1本持つため、タモキシフェン投与により PHGPx は欠損されない。本実験では、CRE TGヘテロマウスをコントロールマウスとして用いた。

2.2 マウスのジェノタイプの判定

離乳時期 (3~4週齢) のマウスの尾0.5~1 cm を切断し、1.5 mL チューブに入れ50 mM NaOH 180 μ l 加え、95 $^{\circ}$ C で10分間インキュベートした。その後、1 M Tris-HCl (pH8.0) を20 μ l 加え、12000 rpm、10分間、室温で遠心した。上清をサンプル DNA とし KOD-FX DNA Polymerase (TOYOBO) を用いて PCR を行った。Cre 遺伝子、内在性 PHGPx 遺伝子の WT は WT 用プライマーセットを用い 1.4 kbp のバンドが増幅される。KO は KO 用プライマーセットを用い 1.6 kbp のバンドが増幅される。TG 遺伝子は内在性の PHGPx と内部配列は全く同じなので、3' 側のマーカー配列を利用して TG 用プライマーセットを用いで増幅し、1.7 kbp のバンドで判定した。Cre 遺伝子は Cre 用プライマーセットを用いて約 600 bp のバンドを増幅した。論文³⁾を参照。

2.3 タモキシフェンの調製と皮膚への塗布方法の検討

タモキシフェン 10 mg を 99.5% エタノール 10 mL に完全に溶解し、軟膏 10 g と混ぜ合わせ作成した。タモキシフェン 5 mg/g 軟膏を1回に 0.01 g 相当を塗布した。コーン油の場合では直接タモキシフェンを 1 mg/ml となるように溶かして 50 μ l 相当を塗布した。マウスはメスの全身性タモキシフェン誘導型 PHGPx 欠損マウス、Cre/TG/KO (Cre+/- TG+/- PHGPx -/-) とコントロールマウス、CreTGヘテロ (Cre+/- TG+/- PHGPx +/-) を用意した。マウスにジエチルエーテルを用いて麻酔をかけ、バリカン

によって毛を刈り取り、次にシェービングクリームとシェーバーを用いて皮膚を傷つけないように剃毛した。完全に剃ったのち、翌日完全に剃毛した皮膚に右2ヶ所左2ヶ所の計4ヶ所ずつ塗布した。塗布の回数の検討としては、3日連続 (上) あるいは1日のみ (下) 1回軟膏を塗布した。毎日マウスを麻酔し、写真を撮影した。ビタミンEの添加の条件としてはビタミンE (VE) 500 μ M (mol/w) + 5 mg タモキシフェン/g 軟膏となるように調整し、タモキシフェンと同条件で塗布した。

2.4 HE染色、抗体組織染色、TUNEL染色

タモキシフェンを塗布した初日を1日目とし、3日後、4日後と14日後にマウスを解剖し皮膚を凍結切片にし、各染色を行った。マウスを頸椎脱臼した後、脱血後、皮膚のみをはぎ取った。はぎ取った皮膚を、PBSに30分浸したのち、PBSでよく洗い流し、10 mL チューブの中に4% PFA を満たし、その中に切片を入れ24時間4 $^{\circ}$ C で保存した。翌日15% スクロース溶液に浸し、さらに翌日15% スクロース溶液に再度浸し、4 $^{\circ}$ C で保存した。置換が終了した切片をOTCコンパウンドに浸し、30分程度なじませたのち、ドライアイスの上で凍結させた。この凍結させた皮膚を10 μ m の厚さで切片とした。抗体染色は切片のスライドガラスを室温で1~2時間風乾させた後、次の操作を行った。T-PBS (0.3% TritonX-100/PBS) で3回洗浄を行ったあと、ブロッキング液を加え室温で1時間反応させた。次に目的の1次抗体 (PHGPx 6F10 500倍希釈⁹⁾, HNE : 4倍希釈, AIF : 100倍希釈) を室温で4時間反応させた。次にT-PBSで洗浄し、2次抗体 (FLUORESCWIN 200倍希釈, Cy3 200倍希釈) をつけ、アルミホイルで遮光しながら室温で3時間反応させた。プレパレートはオールインワンの蛍光顕微鏡にて撮影した。HE染色、TUNEL染色は常法に従って行った。

3. 結果

3.1 PHGPx欠損によって毛包が減少し発毛が遅延する

図1に示した様に、全身性タモキシフェン誘導型 PHGPx 欠損マウス (CRE/TG/KO) マウスでは、タモキシフェンをマウスに塗布あるいは投与するとタモキシフェンを取りこんだ細胞ではタモキシフェンがエストロゲン受容体 (ER 部分) に結合し、核移行シグナルが露出することにより、細胞質にあったCreERが核に移行し、PHGPx-F-Lox 遺伝子を破壊することにより、PHGPx 遺伝子が欠損する。コントロールマウス (CRE/TG/ヘテロ) では内在性 PHGPx ゲノム遺伝子が1本残っているため PHGPx-F-Lox 遺伝子が破壊されても PHGPx は欠損しない。この2つのマウスの背中を剃毛した後、翌日に皮膚にタモキシフェンを塗布することにより、どのようなフェノタイプ

がみられるのかについて、毎日観察した。本実験では、図2に示すようにタモキシフェンの塗布の方法および回数についても同時に検討した。背中右側には軟膏に溶かしたタモキシフェンを塗布した。一方、左側にはコーン油に溶かしたタモキシフェン (Tam) を塗布した。コーン油は液体状であるため非常に塗布しにくいことがわかり、本実験以降は軟膏に溶かしたタモキシフェンを用いることとした。図2に示す様に、6日目まではコントロールマウスもKOマウスも剃毛した部分に変化はみられなかった(コントロールマウスの背中の一部はすでに発毛がはじまっているのでこの部分は除外している)。10日目頃からコントロールマウスの背中が皮下が黒くなり13日目ではすでに発毛の回復状態が見られた。また16日後にはコントロールマウ

スではほぼ正常に戻った。一方、KOマウスではタモキシフェンを塗布した場合、13日目ぐらいまでは発毛が見られず、15、16日後に皮下が黒くなり、以後22日以降ではほぼ正常に戻った。タモキシフェンの塗布回数は3日連続塗布と1日のみの塗布では特に違いがみられなかった。またコーン油と軟膏入りのタモキシフェンでもどちらでも効果はみられたが、コーン油は液体であるために塗布時に表面から流れるなどするために均一性、再現性には適していないと考えられたため、以後は軟膏に溶かしたタモキシフェンで塗布実験を行った。

次にタモキシフェン塗布後、3日目と14日目の皮膚組織のHE染色像を比較した。図3に示すように、タモキシフェン塗布後3日目では、コントロールマウスとPHGPx

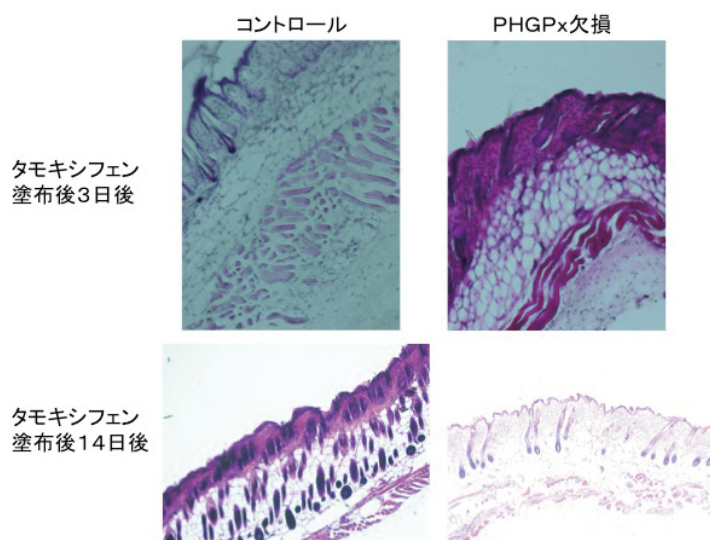
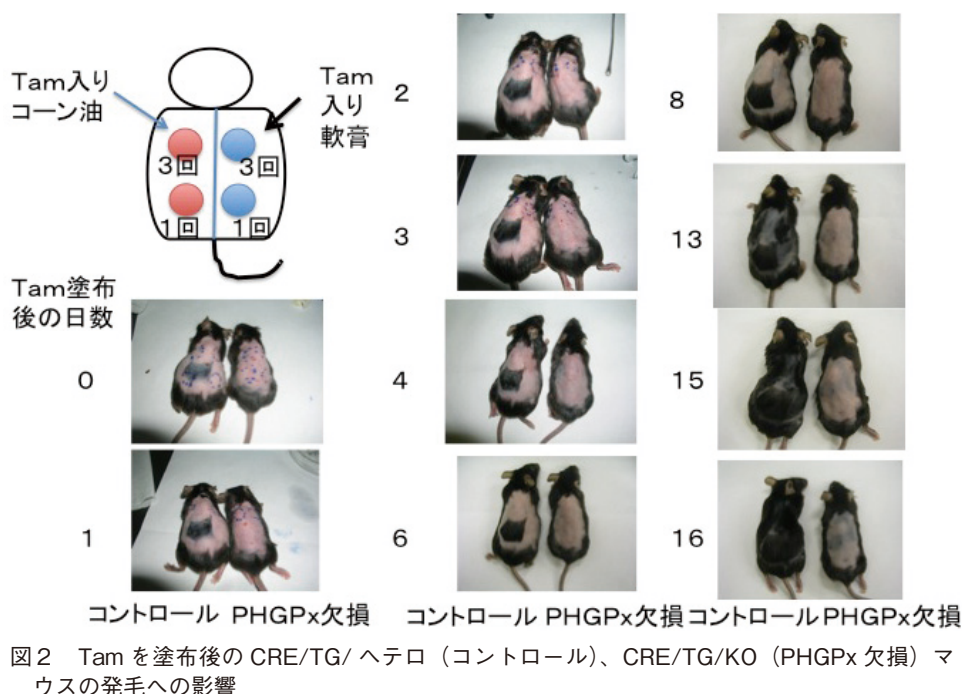


図3 タモキシフェン塗布後の毛包形成の変化 (HE 染色)

欠損マウスでは大きな違いは見られなかったが、14日目では、PHGPx欠損マウスにおいて、コントロールマウスに比べ著しい毛包細胞の数の減少が見られることが明らかとなった。このことから、皮膚へのタモキシフェンの塗布によるPHGPxの発現低下は毛包形成に異常をひきおこし、発毛が遅れると考えられた。

3.2 PHGPxの減少により毛包での内在性脂質酸化が亢進する

次に抗PHGPx抗体を用いて皮膚の組織染色を行った。図4に示すようにコントロールマウスの皮膚では毛包の部位にPHGPxの比較的強い染色がみられたが、タモキシフェン塗布4日後のPHGPx欠損マウスでは毛包でのPHGPxの発現がみられなくなっていた。PHGPxは生体膜脂質の酸化により生成したリン脂質ヒドロペルオキシドを還元する。

そこで、PHGPx欠損により酸化脂質の蓄積がみられるのかについて、酸化脂肪酸の分解物である4-ヒドロキシノネナール(4-HNE)に対する抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、図5に示すようにタモキシフェン添加により、コントロールマウスの皮膚に比べ、PHGPx欠損マウスの皮膚組織における4-HNEの染色強度の増加が観察された。特に毛包において強いシグナルが観察された。このことからPHGPx欠損により内在性の脂質酸化反応が亢進していることが示された。一方、TUNEL染色ではPHGPx欠損マウスにおいて細かいドット状の染色像の増加が観察された。毛包組織部位にも観察されたが、コントロールマウスの毛包組織にもみられたため、この染色像の特異性については明らかとはならなかった。以上の結果から、毛包におけるPHGPxの欠損により生じるリン脂質の酸化が毛包形成阻害のひとつの要因であると考えられた。

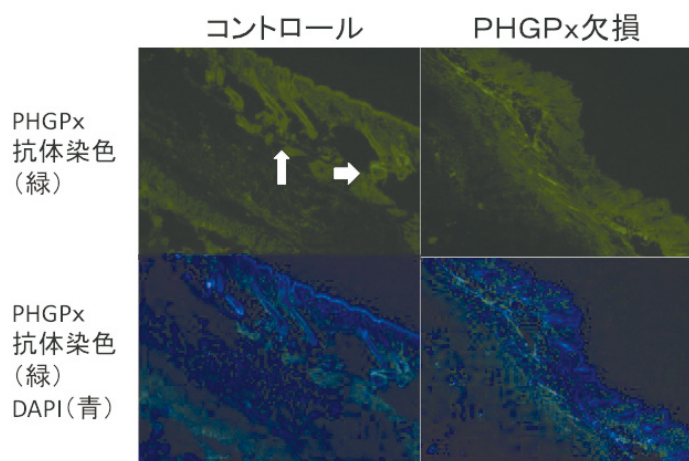


図4 タモキシフェン塗布4日後の毛包でのPHGPxの発現変化(抗体染色)

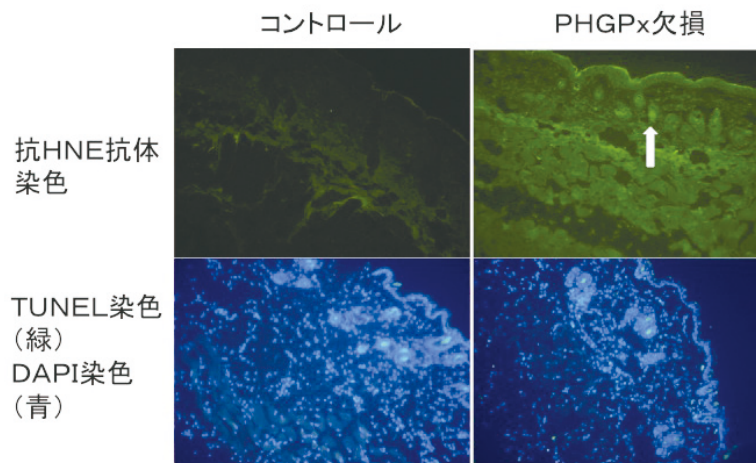


図5 タモキシフェン塗布後4日後の毛包皮膚組織における抗HNE抗体染色およびTUNEL染色

3.3 ビタミンE添加はPHGPx欠損による発毛の遅延を回復する

そこで次に、脂質ヒドロペルオキシドの生成を抑制できると考えられるビタミンEをタモキシフェンを塗布する際に軟膏に同時に混入し、PHGPx欠損による発毛遅延を抑制できるのかについて検討を行った。図6に示した様に、ビタミンEを加えたタモキシフェンでは投与回数に関わらず、12日目には皮下に発毛がみられ16日目には正常に戻り、図1のコントロールマウスと同様な時期に発毛がみられた。このことからビタミンEはタモキシフェン添加によるPHGPx欠損による内在性の脂質ヒドロペルオキシド由来の発毛阻害を抑制出来ることが明らかとなった。

本方法は、今後*In vivo*における脂質ヒドロペルオキシド依存的な発毛阻害を抑制する化合物のスクリーニング系として有効であると考えられた。

4. 考 察

本研究では、全身性タモキシフェン誘導型PHGPx欠損マウスを用いて、酸化リン脂質の還元酵素であるPHGPxを欠損させることによりおきる発毛阻害のメカニズムについて解析した。これまでに我々はMEF細胞を用いてPHGPx欠損による細胞死のメカニズムについて詳細に検討してきた。PHGPxをMEF細胞で欠損させると内在性のリン脂質ヒドロペルオキシドが24時間後に生成し、2日後から3日後にカスパーゼ非依存的な新規細胞死を誘導することを見出している。本実験においてもタモキシフェン塗布後4日目の皮膚組織において酸化脂質の生成を4-HNE抗体を用いて検出できた。データは示していない

が、活性化カスパーゼ抗体を用いた組織染色ではコントロールマウスとPHGPx欠損マウスでは違いが見られなかった。このことから毛包細胞においてもカスパーゼ非依存的な細胞死が起きていると考えられた。MEF細胞ではドット状のTUNEL染色像が得られたが、毛包ではタモキシフェンを塗布しなくても染色像が観察されたことから非特異的な染色像をみている可能性が考えられた。この点については今後の課題である。ビタミンE添加によりPHGPx欠損による発毛の遅延を抑制できたことから、この発毛遅延が脂質ヒドロペルオキシド依存的であることを強く示唆している。今回、LC-ESI-MS/MSによる酸化脂質の解析はできなかったが、毛包をマイクロダイジェスション法により抽出してどのような酸化脂質が蓄積しているかの解析を行うことが重要であろう。最近、ケラチノサイト特異的PHGPx欠損マウス¹⁰⁾が報告され、興味深いことに、出生後3週齢までは毛包形成が遅延するがその後は回復することが報告された。本実験においては、胎児ではなく大人のマウスで起きる現象をみている。タモキシフェン塗布による成体でのPHGPx欠損による毛包形成遅延がケラチノサイトを介したものなのか、それとも直接的な毛包障害によるものなのかは今後慎重に検討する必要があると考えられる。しかしながら、我々のマウスではケラチノサイトを含む皮膚の細胞の大きなダメージはみられていない。なぜ皮膚の細胞はPHGPxが欠損しても細胞死が誘導されないのか、また毛包細胞が特に内在性で生じる脂質ヒドロペルオキシドに弱いのかの解明できれば、新たな脱毛のメカニズムを明らかにできる可能性も秘めていると考えている。

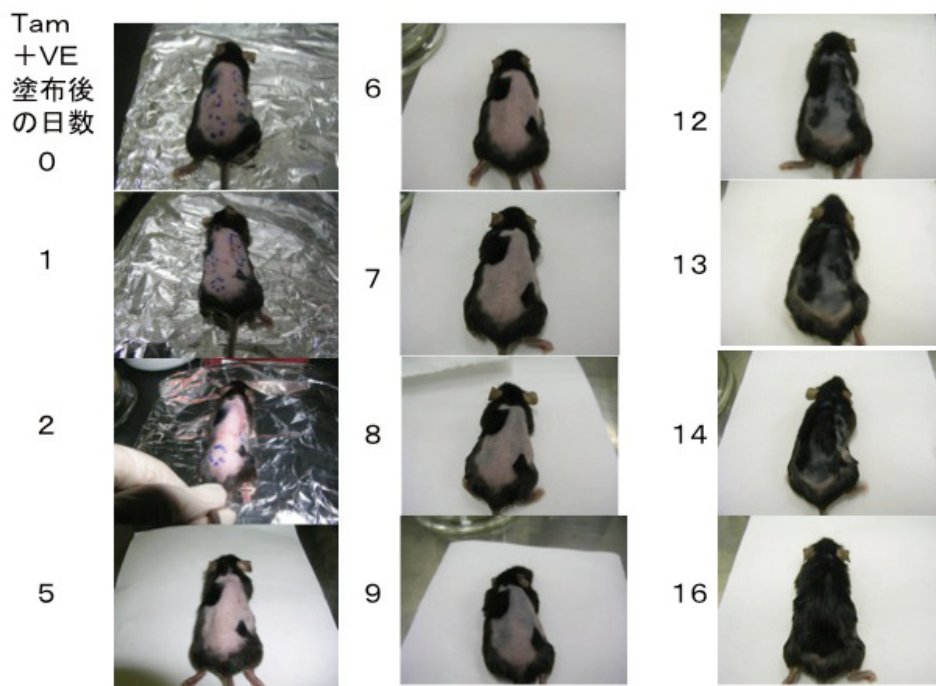


図6 ビタミンE添加によるPHGPx欠損マウスにおける発毛阻害の抑制効果

5. 総 括

本研究では成体の皮膚および毛包での内在性の脂質ヒドロペルオキシド生成が毛包形成に遅延を引き起こすこと、ビタミンEは強い抑制効果を示すことを明らかにした。また本実験系は、*In vivo*における新たな治療薬のスクリーニング系にも利用できると考えられる。

謝 辞

本研究の遂行にあたりコスメトロジー研究振興財団よりご援助いただきましたことを深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Imai H, Nakagawa Y, : Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells, *Free Radic Biol Med.*, 34 (2), 145-169, 2003.
- 2) Imai H, Hirao F, Sakamoto T, Sekine K, Mizukura Y, Saito M, Kitamoto T, Hayasaka K, Nakagawa Y, : Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305 (2), 278-286, 2003.
- 3) Imai H, Hakkaku N, Iwamoto R, Suzuki T, Tajima Y, Konishi K, Minami S, Ichinose S, Ishizaka K, Shioda S, Arata S, Nishimura M, Naito S, Nakagawa Y, : Depletion of selenoprotein GPx4 in spermatogenesis causes male infertility in mice, *J. Biol. Chem.*, 284, 32522-32532, 2009.
- 4) Ueta T, Inoue T, Furukawa T, Tamaki Y, Nakagawa Y, Imai H, Yanagi Y, : Glutathione peroxidase 4 is required for maturation of photoreceptor cells, *J. Biol. Chem.*, 287, 7675-7682, 2012.
- 5) 今井浩孝, 松岡正城, 中西広樹, 田口良, 石田規子, 七里元督, 吉田康一, 二本悦雄, 清水孝彦, 新井洋由, 中川靖一, : ビタミンEは肝臓特異的PHGPx欠損マウスの出生直後死をレスキューする, ビタミンE研究の進歩, XV, 68-72, 2012.
- 6) 今井浩孝, : 生体膜脂質酸化ホメオスタシスの破綻による新規細胞死と疾患, *オレオサイエンス*, 11, 15-23, 2011.
- 7) Imai H, : New strategy of functional analysis of PHGPx knockout mice model using transgenic rescue method and Cre-loxP system., *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 46, 1-13, 2010.
- 8) Schoenmakers E, Agostini M, Mitchell C, Schoenmakers N, Papp L, Rajanayagam O, Padidela R, Ceron-Gutierrez L, Doffinger R, Prevosto C, Luan J, Montano S, Lu J, Castanet M, Clemons N, Groeneveld M, Castets P, Karbaschi M, Aitken S, Dixon A, Williams J, Campi I, Blount M, Burton H, Muntoni F, O'Donovan D, Dean A, Warren A, Brierley C, Baguley D, Guicheney P, Fitzgerald R, Coles A, Gaston H, Todd P, Holmgren A, Khanna KK, Cooke M, Semple R, Halsall D, Wareham N, Schwabe J, Grasso L, Beck-Peccoz P, Ogunko A, Dattani M, Gurnell M, Chatterjee K.: Mutations in the selenocystein insertion sequence-binding protein 2 gene lead to a multisystem selenoprotein deficiency disorder in humans, *J. Clin. Invest.*, 120, 4220-4235, 2010.
- 9) Imai H, Suzuki K, Ishizaka K, Ichinose S, Oshima H, Okayasu I, Emoto K, Umeda M, Nakagawa Y, : Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) in the spermatozoa of human infertile males, *Biol. Reprod.*, 64, 674-683, 2001.
- 10) Sengupta A, Lichti UF, Carlson BA, Cataisson C, Ryscavage AO, Mikulec C, Conrad M, Fischer SM, Hatfield DL, Yuspa SH, : Targeted disruption of glutathione peroxidase 4 in mouse skin epithelial cells impairs postnatal hair follicle morphogenesis that is partially rescued through inhibition of COX-2., *J Invest Dermatol*, 133(7), 1731-1741, 2013.