

# 白髪予防・治療剤の選別に有効な加齢性白髪を自然発症するモデル動物の開発

名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学

加藤 昌志

Hair graying is a symbol for senescence in humans and one of great cosmetic problems especially for women. Therefore, development of preventive therapy for hair graying is very important in the field of cosmetology. However, available preventive therapies for hair graying are very limited at present. Experiments using humans are difficult to develop drugs for hair graying. Therefore, model mice that mimic the mechanism of hair graying in humans could be strong tools for development of the preventive therapy. Up to now, more than 10 kinds of model mice for hair graying have been reported. However, most of the mice are models for premature hair graying with limited life span. In this study, we developed a novel model mouse for hair graying with long life span. Our macroscopic analysis showed that our model mice progressively develop hair graying with senescence. Previous microscopic studies showed that loss of follicular melanocyte stem cells is a fundamental cause for hair graying in humans. Therefore, we histologically evaluated follicular melanocyte stem cells in our model mice. Our melanocyte-targeted reporter transgene analysis showed depletions of follicular melanocyte stem cell as well as the descendant melanocytes in gray hairs of our model mice. Previous study showed that melanocyte stem cells divide and produce their descendant melanocytes in every hair cycles to regenerate pigmented hairs. Previous study also showed that promotion of hair cycles accelerates hair graying. We in this study examined effect of increased hair cycle on hair graying in our model mice. Hair graying was accelerated by depilation, which is a well-established method to artificially promote hair cycles, in our model mice. These results suggest that melanocyte stem cells and descendant melanocytes are associated with hair graying in our model mice. Our findings suggested that hair graying in our model mice are partially resembles hair graying in humans, whereas further analysis to characterize hair graying in our model mice will be needed. Thus, in this study, we developed a novel model mouse line for hair graying, partially clarified mechanism of hair graying in the mice with considering the similarity of hair graying in humans and suggest that the mice could be a potential tool to develop preventive therapy for hair graying.

## 1. 緒言

50歳の約半数が50%程度の白髪を発症すると報告されている<sup>1)</sup>。このように白髪は加齢の象徴であり、特に女性にとって、美容上の大きな問題となる。美容上の解決策としては白髪染め(ヘアカラー)が、現時点では、最も現実的な選択肢である。実際に、日本における白髪関連製品は、年間1,000億円近い市場となっている。中国、インド、ブラジル等の新興国の経済発展により、美容への関心がさらに高まれば、市場規模は、今後増大すると推測できる。しかし、白髪染めは、使用にやや時間がかかるだけでなく、繰り返して使用することが求められる。白髪染めに関するアンケートでは、①自分で手間をかけずに染められること、②一度染めたら2~3週間は持続すること、③手の届きにくい部分を簡単に染められるブラシが付いていること、が求められているので、消費者が、より簡便な方法で、長期間効果の持続する製品を期待していることがわかる。もし、

白髪の発症を予防したり、さらに理想的には、既に発症してしまった白髪を改善することが、安全にできれば、 Cosmetology学上、極めて画期的であると言える。しかし、筆者が検索しえた限りでは、科学的根拠に基づいた白髪予防効果のある製品は存在しない可能性が高いと考えられる。

白髪予防・治療法の開発においては、ヒトで効果を確認するのが最善である。しかし、ヒトの白髪については、①非常に長い期間かけて進行する、②発症時期や進行速度等、個人差が大きい、③薬物の安全性等の倫理的配慮の必要性、④効果を検討できる薬物の数が限られる、といった問題もある。ゆえに、ヒトにおいて、薬物や美容関連機器等の白髪予防・改善の効果を判定することは容易ではない。ヒトの白髪発症機構に類似した白髪モデル動物が存在すれば、外用または内服で有効な白髪予防・治療効果のある薬物や食品をスクリーニングすることができる。白髪を自然発症する動物が大型動物であると、飼育場所や飼育費用が高額になるとともに、管理に関係する人手もかかるので、マウス等の小動物であることが望ましい。しかし、出生時から白髪を発症しているマウス<sup>2)</sup>や一時的に白髪を発症するマウス<sup>3)</sup>は報告されているが、10ヶ月以上の寿命を持ち、ヒトと同じように加齢とともに徐々に白髪が進行するモデル動物は世界的にも稀である。

筆者らは、メラノサイトの分化・増殖・遊走の分子機構に焦点をあてた研究を推進している<sup>4-6)</sup>。近年では、遺伝子



Establishment of novel animal models for age-related hair graying that are useful to develop preventive therapies

Masashi Kato

Department of Occupational and Environmental Health, Nagoya University Graduate School of Medicine

改変技術を用い、新規の白髪を自然発症するマウスを開発している。本モデルマウスでは、2年以上の寿命を持つ個体も珍しくないため、ヒトと同じように加齢とともに徐々に白髪を発症するモデル動物であると言える。本研究では、中間報告での成果をさらに発展させ、白髪モデルマウスを用いたより詳細かつ専門的な組織学的解析を通して、ヒトとモデルマウスにおける白髪発症機構の類似性を検証する。さらに、白髪予防・治療に有効な薬物のスクリーニング技術についても、より現実性の高いロードマップを提供する。

## 2. 実験

### 2.1. 対象

ヒト、野生型マウス、遺伝子改変マウスである白髪モデルマウスを対象とした。尚、メラノサイトを特異的かつ簡便に染色するために、メラノサイト特異抗原である dopachrometautomerase (Dct) のプロモーター下にレポーター遺伝子である lacZ 遺伝子をつないだ Dct/LacZ-トランスジェニックマウス<sup>7)</sup> と野生型マウスおよび白髪モデルマウスを交配してから解析を行った。

### 2.2. 形態解析

加齢性変化を考慮しながら、黒毛と白毛に関する肉眼的

所見を比較した。さらに、HE染色およびLacZ染色により、病理組織学的に毛胞メラノサイトを検出し、野生型マウスと白髪モデルマウスを比較した。

## 3. 結果

### 3.1. ヒトおよびモデルマウスに発症した白髪の肉眼所見

本研究では、ヒトとマウスについて、黒髪と白髪の肉眼的特徴を観察した(図1)。ヒトにおいても、モデルマウスにおいても、白髪では、メラニンが欠損しているという点で類似性が認められた。本結果より、本モデルマウスにおける白毛の毛胞では、1)毛幹(シャフト)へのメラニン供給障害、2)メラノサイトにおけるメラニン産生障害、3)メラノサイトの消失、4)メラノサイトの細胞供給源であるメラノサイト幹細胞の消失あるいは機能障害のいずれか、あるいは、上記に関する複数の障害を持つ可能性を考えた。

### 3.2. モデルマウスにおける加齢性白髪の肉眼所見

本研究では、野生型マウスとモデルマウスについて、加齢と白髪の間接関係を肉眼で観察した。野生型マウスでは、1ヶ月齢、3ヶ月齢、9ヶ月齢のいずれにおいても、白髪は肉眼的に、ほとんど観察されなかった(図2A-C)。プレパラートをを用いた白髪率の解析により、野生型マウスの白

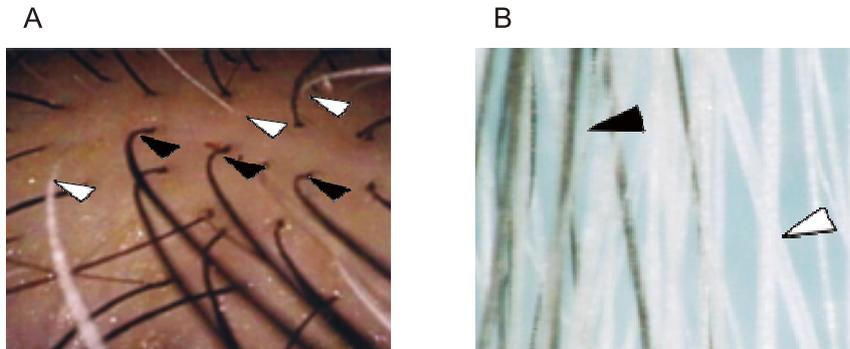


図1 毛髪の肉眼所見：ヒト(A)および白髪モデルマウス(B)における黒髪と白髪の肉眼所見を示している。黒の矢頭は黒髪を、白の矢頭は白髪を示している。

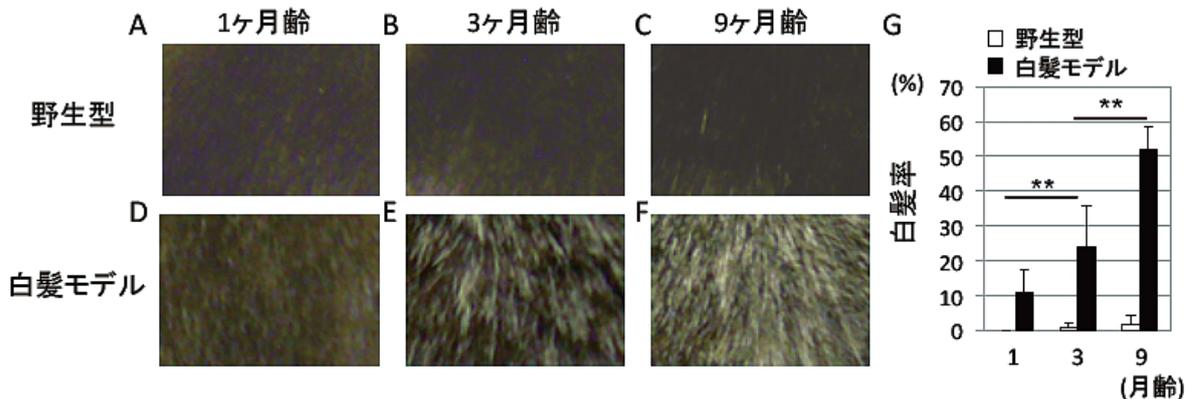


図2 マウスにおける加齢性白髪の肉眼所見と白髪率：野生型マウス(A-C)および白髪モデルマウス(D-F)における、月齢と白髪の肉眼所見(A-F)と白髪率(白髪の本数/カウントした毛髪の総本数)を示す(G)。

髪率は、1ヶ月齢で0.0%、3ヶ月齢で1.2%、9ヶ月齢でも1.7%程度であることが分かった。これは、野生型マウスにおいて、加齢性白髪の発症は極めて限られていることを、具体的な数値で示したものである。一方、モデルマウスでは、生後1ヶ月の段階で、白髪の割合は10.9%であった(図2G)。肉眼的に見ても野生型マウスに比較して多いように見える(図2A, D)。モデルマウスでは、加齢が進むにつれて、白髪率が24.1%(3ヶ月)、52.1%(9ヶ月)と増加することがわかった(図2D-G)。モデルマウスの寿命を30ヶ月、ヒトの寿命を80年(960ヶ月)と仮定し、単純計算すると、マウスの9ヶ月は288ヶ月(24年)に相当する。モデルマウスの9ヶ月齢の白髪率は52.1%(図2G)である。ヒトにおいて白髪がほとんどない25歳から24年経過し、約50歳を迎えた時、その約半数が50%程度の白髪を発症することが報告されている<sup>1)</sup>ことを考えると、本モデルマウスにおける肉眼的白髪発症のダイナミクスは、ある程度ヒトの加齢性白髪に類似していると提案できる。

### 3.3. モデルマウスにおける加齢性白髪の組織所見

野生型マウスとモデルマウスについて、黒毛と白毛におけるメラノサイトおよびメラノサイト幹細胞の分布を調べた(図3)。メラノサイトおよびメラノサイト幹細胞は

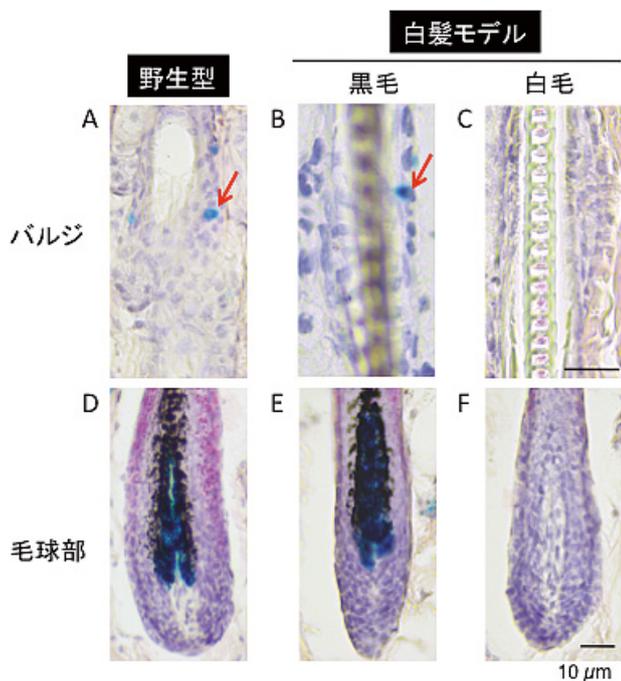


図3 マウスにおける加齢性白髪の病理組織所見：9ヶ月齢の野生型マウスのバルジ領域(A)および同腹の白髪モデルマウスの黒毛および白毛のバルジ領域(BとC)のLacZ染色像を示す。9ヶ月齢の野生型マウスの毛球部(D)および同腹の白髪モデルマウスの黒毛および白毛の毛球部(EとF)のLacZ染色像を示す。矢印は、バルジ領域のLacZ細胞を示す。

LacZ陽性細胞(青色に染色される細胞)として染色される。メラノサイト幹細胞はバルジと呼ばれる毛胞上部に存在し、メラノサイトは毛球部に存在する。

野生型マウスのバルジ領域では(図3A)、過去の報告<sup>8,9)</sup>と同様にLacZ陽性細胞が確認された。本白髪モデルマウスの黒毛のバルジ領域(図3B)でも、野生型マウスと同様にLacZ陽性細胞が観察されるのに対し、モデルマウスの白毛のバルジ(図3C)では、LacZ陽性細胞は観察されなかった。野生型マウス(図3D)およびモデルマウス(図3E)の黒毛の毛球部には、メラニンおよびメラノサイトが存在していた。一方、モデルマウスの白毛(図3F)の毛球部では組織学的にもメラニンが欠損しているだけでなく、メラノサイトも消失していた。さらに、少なくとも我々が観察した限りでは、バルジ領域にLacZ陽性細胞が存在しない毛根では、毛球部のLacZ陽性細胞も観察されなかった。これらの結果より、本モデルマウスの白毛では、メラノサイト供給源であるメラノサイト幹細胞が何らかの原因で消失し、その結果、毛球部へのメラノサイトの供給が停止し、結果としてメラニンが毛幹へ供給されなくなったと示唆される。過去の報告によると、ヒトの白髪でも、メラノサイト幹細胞および毛球部のメラノサイト消失が加齢と共に亢進することが報告されている<sup>8)</sup>。少なくともバルジ領域および毛球部のメラノサイトおよびメラニン産生に関する組織学的観点においては、モデルマウスにおける白髪発症機構とヒトの白髪発症機構は類似していると考えられる。

### 3.4. 白髪マウスの幹細胞に焦点をあてた白髪化の機序解析

図3より、白髪化の根本原因がメラノサイト幹細胞にある可能性が示唆された。メラノサイト幹細胞は毛周期の回転とともに分裂し、子孫細胞であるメラノサイトを毛母に供給することが報告されている<sup>9)</sup>。メラノサイト幹細胞が本白髪モデルマウスにおける白髪化の原因であるならば、毛周期を加速させると白髪化も影響を受けるのではないかと仮説をたてた。本モデルマウスにおいて、脱毛処理により人為的に毛周期を加速させたところ、脱毛部特異的に白髪化が促進された(図4)。これは、メラノサイト幹細胞が脱毛により影響を受けている可能性を示している。



図4 モデルマウスにおける脱毛処理による白髪化の加速：3ヶ月齢のモデルマウスにおける、脱毛処理後の毛色の肉眼所見を示す。脱毛部分に一致して、白髪が発症している。

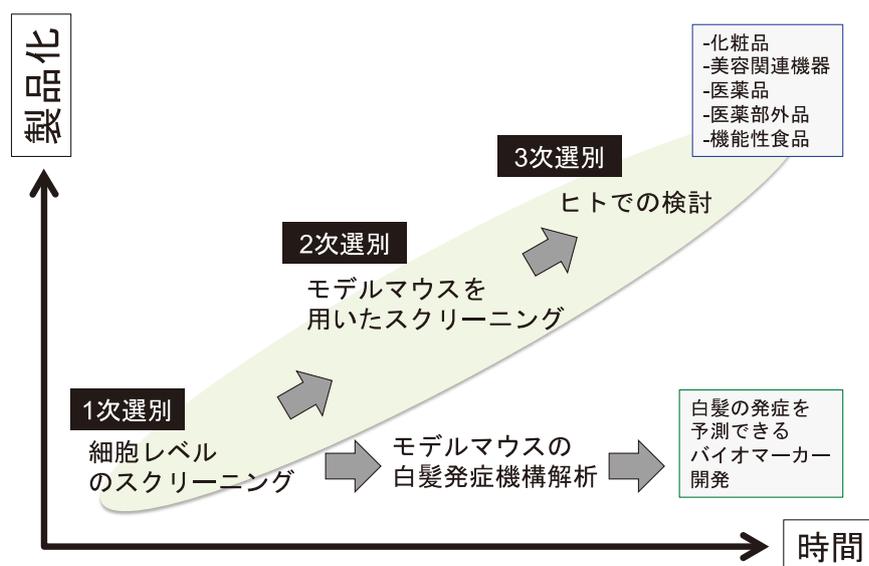


図5 白髪予防・治療剤開発の戦略：1次選別として、①細胞レベルのスクリーニング、2次選別として、②モデルマウスを用いた個体レベルでのスクリーニング、3次選別として、③ヒトにおける白髪予防・治療効果の確認、といったプロセスによる白髪予防・治療法開発のロードマップを示した。尚、モデルマウスを用いた個体レベルでのスクリーニング(2次選別)が難しい場合には、ヒトの皮膚を用いた *ex vivo* 解析等の代用の方法を検討する。

#### 4. 考察

肉眼的解析により、本モデルマウスに発症する白髪化は、ヒトの加齢性の白髪と形態的にも白髪発症期間についても非常に類似していることが示唆された。また、組織学的解析により、モデルマウスの白髪発症機構は、現時点で解明されているヒトの白髪発症機構と比較して、少なくとも「毛母メラノサイト幹細胞およびメラノサイトの消滅によるシャフトへのメラニン供給の停止」と言う点については、類似していることがわかった。今後、本モデルマウスとヒトの白髪発症の分子機構をさらに詳細に比較することにより、①ヒトにおける白髪発症機構に関する新知見、②白髪発症に関与する分子群を特定することにより、将来白髪を発症する確率を予測できるバイオマーカーの開発、が達成できる可能性がある(図5)。さらに、白髪発症機構の解明を進め、分子機構を基にした細胞レベルで、白髪の予防・治療に有用な薬物をスクリーニングするシステムを提案後、実際に薬物スクリーニングを実施し、候補薬物をしぼった後に安全性試験や安定性試験を含めた実用性をヒトで調べることにより、白髪の発症を根本から予防・治療できる薬物を提案できる可能性がある(図5)。

#### 5. 総括

例えば、成人の毛髪のほとんどは成長期毛である一方、成獣(マウス)の毛は、ほとんどの毛が休止期毛である。このように、ヒトとマウスが全く同じ機構で白髪を発症する

ことは難しい。しかし、ヒトとマウスの相違点を理解した上で、本モデルマウスとヒトで、白髪発症機構の類似点を解析することにより、白髪予防・治療に有効な薬物や美容関連機器に関するスクリーニング技術を開発する可能性がある。そのため、コスメトロジー学の発展に貢献できる可能性があると考えている。

#### 謝辞

本研究の推進を御支援いただいたコスメトロジー研究振興財団に深く感謝申し上げます。

#### (引用文献)

- 1) Keogh EV, Walsh RJ. Rate of greying of human hair. *Nature*. 207 (999) : 877-8, 1965.
- 2) Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 22; 75 (2): 229-40, 1993.
- 3) Nishikawa S, Kusakabe M, Yoshinaga K, Ogawa M, Hayashi S, Kunisada T, Era T, Sakakura T, Nishikawa S. In utero manipulation of coat color formation by a monoclonal anti-c-kit antibody: two distinct waves of c-kit-dependency during melanocyte development. *EMBO J* 10 (8) : 2111-8, 1991.
- 4) Kato M, Takahashi M, Akhand AA, Liu W, Dai Y, Shimizu S, Iwamoto T, Suzuki H, Nakashima I.

- Transgenic mouse model for skin malignant melanoma. *Oncogene* 17 (14) : 1885-8, 1998.
- 5) Kato M, Takeda K, Kawamoto Y, Tsuzuki T, Kato Y, Ohno T, Hossain K, Iftakhar-E-Khuda I, Ohgami N, Isobe K, Takahashi M, Nakashima I. Protective effect of hyperpigmented skin on UV-mediated cutaneous cancer development. *J Invest Dermatol* 127 (5) : 1244-9, 2007.
- 6) Kumasaka MY, Yajima I, Hossain K, Iida M, Tsuzuki T, Ohno T, Takahashi M, Yanagisawa M, Kato M. A novel mouse model for de novo Melanoma. *Cancer Res* 70 (1) : 24-9, 2010.
- 7) Mackenzie MA, Jordan SA, Budd PS, Jackson IJ. Activation of the receptor tyrosine kinase Kit is required for the proliferation of melanoblasts in the mouse embryo. *Dev Biol* 192 (1) : 99-107, 1997.
- 8) Emi K, Nishimura, Scott R. Granter, David E. Fisher. Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science* 307: 720-724, 2005.
- 9) Emi K, Nishimura, Siobhán A. Jordan, Hideo Oshima, Hisahiro Yoshida, Masatake Osawa, Mariko Moriyama, Ian J. Jackson, Yann Barrandonk, Yoshiki Miyachi & Shin-Ichi Nishikawa. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* 416: 854-60, 2002.