

増殖因子による毛包休止期制御機構の解明

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所 組織再生治療研究プログラム

中山 文明

The expression of several Fibroblast growth factors (FGFs) is synchronized with the hair cycle in the skin and some FGFs play a key role in regulation of the hair cycle. In particular, the expression of FGF18 peaks in the telogen phase, and maintains the telogen phase to determine its duration. Although the expression of FGF13 also peaks in the telogen phase, the role of FGF13 in the hair cycle remains unknown. This study investigated the involvement of recombinant FGF13 in the duration of the telogen phase and produced Fgf13 hemizygous knock-out mice using CRISPR-Cas9 system to examine the physiological effects of FGF13. Recombinant FGF13 was administered intraperitoneally to three-week-old female C57BL/6 mice harboring uniform telogen phase hair follicles three times a week and the duration of the telogen phase was determined by assessing the dynamics of skin color changes in a previously shaven telogen skin. FGF13 significantly prolonged the telogen phase to delay the transition into the anagen phase. In addition, FGF13 pretreatment of eight-week-old mice harboring uniform telogen phase hair follicles suppressed the proliferation of hair follicle cells to delay the process of anagen phase induced by depilation. In contrast, Fgf13 gene knock-out using CRISPR-Cas9 system failed to produce homozygous Fgf13 knock-out mice, but produced only heterozygous knock-out mice. However, heterozygous Fgf13 knock-out mice did not significantly show the prolongation of the telogen phase. These results indicate that recombinant FGF13 prolongs the telogen phase, suggesting that FGF13 plays an essential role in maintaining the telogen phase. Assessing the fetuses from the edited embryo suggested that constitutive Fgf13 knock-out mice might be embryonic lethal. Therefore, conditional keratinocyte-specific Fgf13 knock-out mice must be generated to examine the physiological mechanism of the hair cycle regulation by FGF13.

1. 緒言

毛周期は、休止期、成長期、退行期の3つの時期からなり、種々の線維芽細胞増殖因子 (FGF) の発現変動と連動し¹⁾、FGFに制御されていることが明らかになってきた(図1)。特に、FGF18は毛包幹細胞が存在するバルジ領域で発現し²⁾、休止期で発現が増加し、成長期で低下すること¹⁾、休止期を維持していることが明らかになった³⁾。一方、FGF13もFGF18と同様に休止期で発現が多く、成長期で発現が低下している⁴⁾。しかも、X連鎖性先天性多毛症では毛包においてFGF13遺伝子の発現が著しく低下し、このFGF13発現低下が多毛症の原因と考えられていることから⁵⁾、FGF13も毛周期制御に関係し、FGF18と同様に休止期の維持に重要な役割を担っていると推定される。しかしながら、FGF13の毛周期に対する機能は未だ証明されていない(図1)。

FGF13を含むFGF11サブファミリーのFGFは、他のFGFと異なりFGF受容体と反応できない。しかも、その分泌機序も不明なことから、FGF11サブファミリーは“細胞内FGF”

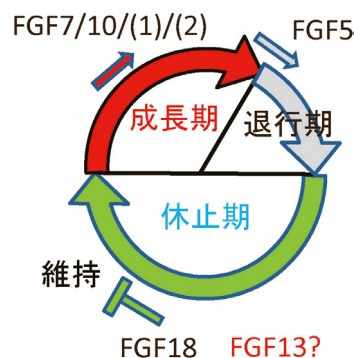
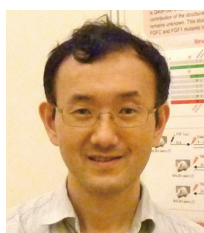


図1 毛周期とFGF。各毛周期で発現が増加するFGFを示した。多くのFGFが毛周期を前に進めるが、FGF18は抑制的に働き休止期を維持する。

とよばれ、細胞外での作用は全く知られていなかった。ところが、我々は、このFGF11サブファミリーのFGFが細胞外から細胞内に容易に移行できることを見出した⁶⁾。この発見は、何らかの機序でFGF13が細胞外に放出されれば、FGF13もFGF18と同様に細胞に作用できることを意味し、FGF13のシグナル分子としての可能性を飛躍的に広げることになった。そして、組み換え体FGF13を生体に投与することで、FGFの毛包周期への役割を探索できる可能性を示した。

FGF13の生体での役割を知るために、その遺伝子のノックアウトマウスを調べることは非常に有用である。しかしながら、FGF13は、脳神経系で発現が多いことが知られているが、そのノックアウトマウスの表現型の報告がない⁷⁾。すなわち、FGF13遺伝子の全身性ノックアウトマウスが誕生し、長く生存できるか未だ不明である。



The Regulation of Hair Cycle Resting Phase by Growth Factors

Fumiaki Nakayama

Regenerative Therapy Research Program,
National Institute of Radiological Sciences,
National Institute for Quantum and
Radiological Science and Technology

以上、他のFGFと同様に、FGF13も毛周期制御に関与している可能性が考えられた。そこで、本研究では、組み換え体FGF13を利用して、FGF13の毛周期への関与を検討した。近年、CRISPR-Cas9システムにより、ノックアウトマウスの作成が迅速、簡便化されてきたことから、CRISPR-Cas9システムにてFGF13ノックアウトマウス作成も試みた。

2. 実験

2.1. 組み換え体FGF13タンパク質の作成

ヒトFGF13には種々のsplicing variantが存在するが、本研究ではtranscript variant 3 (NM_001139501) 配列のFGF13を用いた。この遺伝子配列をGateway pDEST17 Vectorに組み込み、pET発現システムにより、大腸菌(BL21 (DE3) pLysS)内でHisタグ付きFGF13蛋白質を大量に産生させ、Ni Sepharoseカラムで精製した⁶⁾。さらに、PBSで透析した後、-80度に分注保存し、用時解凍して使用した。

2.2. FGF13投与中のマウス毛周期の測定

マウスは、日本クレアから3週齢のメスC57BL/6NJcl

を購入して使用した。マウスの毛包は、出生後しばらく毛周期が同調しており、3週齢のC57BL/6では休止期に揃っている。この3週齢のマウスを項部から背部1/3にかけて電動バリカン (Pet club ER803, Panasonic) で剃毛し、項部の皮膚の色調の変化を観察することにより、毛周期の変化を判定した。すなわち、休止期では皮膚がピンク色だが、成長期に移行するに従って毛包のメラニンが増加し、皮膚は青色に変化することで判定した。マウス1匹あたり10 μ gのFGF13を0.5mLの5%マウスserum含有生理食塩水に希釈して、マウス腹腔内に投与した。コントロールマウスには、0.5mLの5%マウスserum含有生理食塩水のみ投与した。FGF13は剃毛後2日目から週3回、計8回投与し、皮膚の写真撮影も週に3回麻酔下で実施した(図2A)。

2.3. FGF13投与による成長期誘導後の細胞分裂の検出

日本クレアから8週齢のメスC57BL/6NJclを購入して使用した。8週齢のC57BL/6は生後2サイクル目の休止期に毛包が揃っている。この8週齢のマウスの背部を抜毛すると、休止期の毛包は成長期へと誘導させる。抜毛24時間前

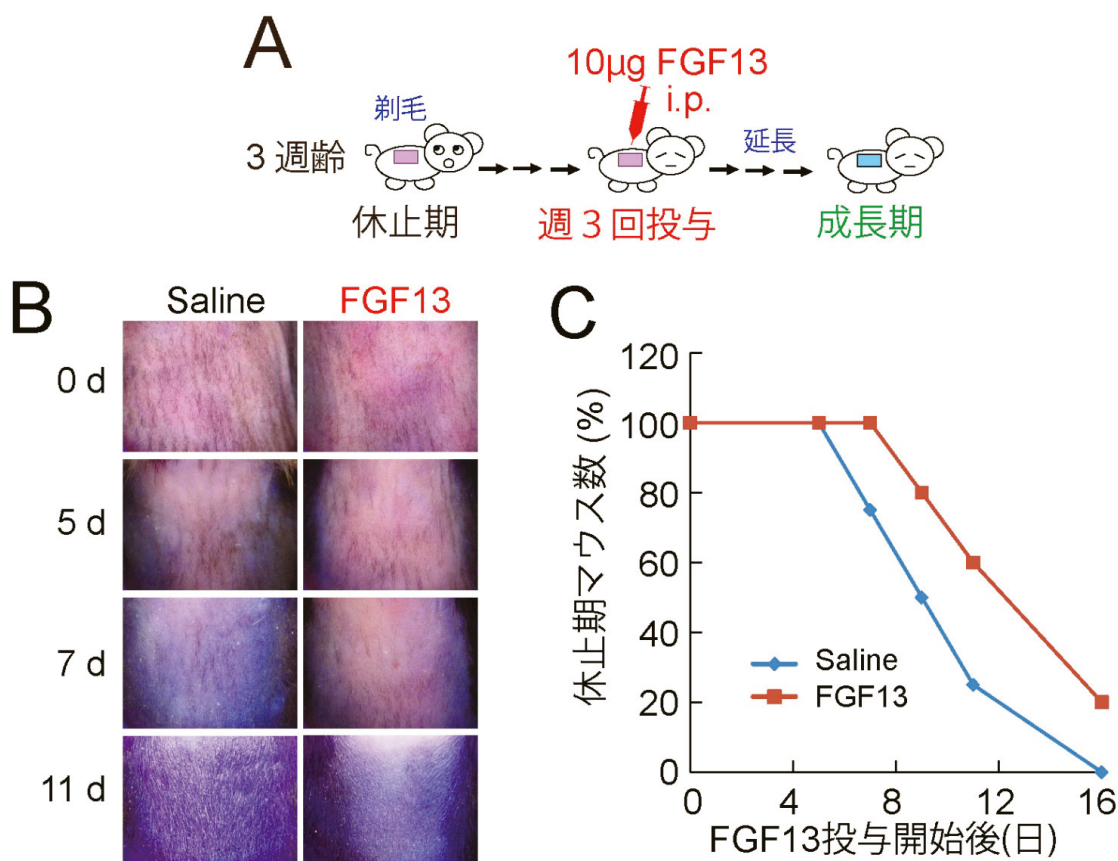


図2 FGF13投与による毛包休止期の延長。3週齢マウスの背部を剃毛し、週3回FGF13を投与しながら、項部の毛周期を皮膚色で判定した。

に100 μ gのFGF13を腹腔投与し、抜毛後24時間と72時間に皮膚を採取した。採取2時間前にもBrdUラベリング液を腹腔に注射して、分裂中の細胞核をBrdUでラベルした。パラフィン包埋切片を抗BrdU抗体で免疫組織化学染色し、分裂中の細胞を検出した(図3A)。

2. 4. CRISPR-Cas9 システムによるFGF13KOマウスの作成

Alt-R® CRISPR-Cas9 Systemを用いたゲノム編集によりFgf13遺伝子のノックアウト(KO)マウスの作成を試みた。マウスはC57BL/6NJclを用い、gRNAはFgf13のvariant 1~4の共通部分を壊すように設計した。そして、Cas9 NucleaseとgRNA Complexの複合体をマウス受精卵にエレクトロポレーションにて導入し、培養後2細胞期の受精卵を偽妊娠マウスの卵管へ移植した。19日後分娩により新生仔を得た。

3. 結果

3. 1. 組み換え体FGF13によるマウス毛包休止期の延長

3週齢のC57BL/6では、毛包は休止期に揃っており、

剃毛した皮膚の色調はすべてピンク色だった。生理食塩水を投与したコントロール群は5日目で軽度青色を呈し、成長期の開始が示された(図2B)。さらに、9日目では約半数のマウス項部が青色になり、16日目で全頭が成長期となった(図2C)。一方、10 μ gのFGF13を週3回腹腔投与した群では、7日目でもピンク色を保ち、依然として毛包休止期が持続し、9日目でも80%のマウスが休止期を維持した(図2C)。よって、FGF13投与群では、2~4日の休止期の延長が認められた。

3. 2. 組み換え体FGF13による成長期誘導の阻害

8週齢のC57BL/6の毛包も休止期に揃っており、抜毛することで一斉に毛包を成長期に誘導できる。そこで、抜毛後72時間で毛包角化細胞へのBrdUの取り込みを観察すると、BrdU陽性細胞が著明に検出できることから、角化細胞は分裂を始め、毛包は成長期に入ったことが示された(図3B)。一方、抜毛の24時間前にFGF13を腹腔注射しておく、BrdU陽性細胞が極めて少ないことから、細胞分裂が抑制されていることがわかった。さらに、毛包の形態変化からも成長期の開始がコントロールに比べて遅延していることが明らかになった(図3B)。

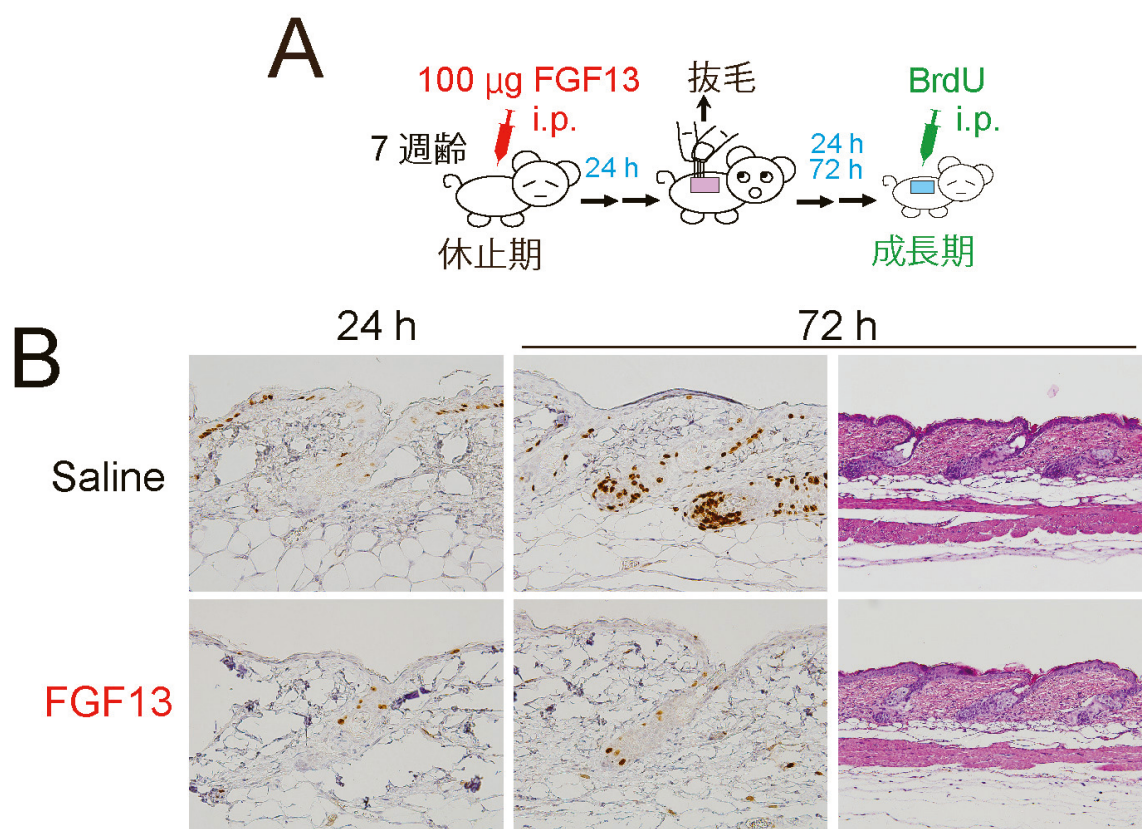


図3 FGF13投与による成長期誘導の阻害。8週齢マウスにFGF13投与後、抜毛による成長期誘導を行い、BrdUの取り込みにより細胞分裂を判定した。

3. 3. CRISPR-Cas9 システムによるFGF13 遺伝子ノックアウト

CRISPR-Cas9 システムによってFGF13 遺伝子の全身性ノックアウトを試みた。1 匹の妊娠マウスから7 匹の仔マウスが得られたが、FGF13 遺伝子がホモでノックアウトされた個体は得られず、ヘテロでノックアウトされた雌が1 匹だけ得られた。一方、別の2 匹の妊娠マウスを出産予定日前日に帝王切開したが、着床痕は20 個以上認められたものの、胎仔は計8 匹しか存在しなかった。しかも、ゲノム解析の結果これらの胎児のFGF13 遺伝子はすべて野生型で、ヘテロノックアウトマウスも得られなかった。

雌のヘテロノックアウトマウスと野生型マウスとの交配により、数匹のメスのヘテロノックアウトマウスが得られた。FGF13 遺伝子座はX 染色体上にあるため、オスのノックアウトマウスが得られれば、FGF13 の発現が完全に欠損しているはずだが、オスのノックアウトマウスは生まれてこなかった。これらのヘテロノックアウトマウスの背部を剃毛して皮膚色を観察し、休止期の長さを測定した。生後から3 周期ほどの観察では、毛包休止期の長さについてヘテロノックアウトマウスと野生型マウスとの間に有意な違いは認められなかった。

4. 考 察

マウス毛包は、3 週齢から休止期が1 週間続き、その後成長期が始まる。休止期では毛包は短縮し、毛幹の先端も毛包から分離して容易に抜ける状態となっている。この時、毛をバリカンで剃ると、皮膚にはほとんど毛幹が残らないため、皮膚色はピンク色となる。一方、成長期が始まると、毛包が下へ伸長するとともに、毛包先端から黒い毛幹が伸びてくるため、剃毛後の皮膚は青色調を呈する。したがって、実験開始から1 週間、すなわちマウスが4 週齢になると、無処置のコントロールマウスでは、皮膚色がピンク色から青色に変化する(図3)。ところが、組み替え体FGF13 を腹腔投与した群では、1 週間たってもピンク色のままで、約2~4 日ほど成長期への移行が遅延した(図3)。すなわち、FGF13 の投与が明らかに毛包休止期の期間を延長した。

休止期に抜毛することで、毛包は成長期に誘導されることが知られている。そのメカニズムは、毛幹にFGF18 などを分泌する細胞が接しているが、抜毛により毛幹とともにこの細胞が除かれ、毛包のFGF18 の濃度が低下することで、成長期に移行すると考えられている。抜毛後にはFGF13 の発現も低下することから¹⁾、FGF13 についても同様の作用が推定されたため、組み替え体FGF13 を抜毛前にマウス個体に投与してみた。驚くべきことに、FGF13 の投与により毛包の成長期への誘導は阻害された。すなわち、FGF13 の事前投与が抜毛により失われた休止期維持の機構を補ったことを意味している。これは、

FGF13 がFGF18 同様に休止期の維持に大きな役割をはたしていることを示唆している。

FGF13 の毛包周期における生理的な役割を調べるためにFGF13 のノックアウトマウスは有用である。しかしながら、FGF13 遺伝子の全身性ノックアウトマウスについて情報がなく、出生できるか不明であった。そこで、本研究では、CRISPR-Cas9 システムによりFGF13 の全身性ノックアウトマウス作成を試みた。その結果、残念ながらFGF13 遺伝子のホモ欠損マウスを得ることができず、ヘテロノックアウトの雌マウスが得られただけだった。雌のヘテロノックアウトマウスで毛包周期を観察したが、野生型マウスと有意な違いを認めなかった。毛包でFGF13 の発現が低下しているヒトのX連鎖性先天性多毛症では、男性患者ではほぼ全身に強く多毛症の症状が出現しているのに対して、変異のある遺伝子座が1 つしかない女性キャリアでは、ごくわずかに体幹に多毛傾向を示すのみである⁵⁾。よって、FGF13 遺伝子の雌のヘテロノックアウトマウスに何らかの毛の異状を見出すのは困難で、毛包においてさらなるFGF13 減少もしくは発現欠損が毛の表現型の異状を検出するために必要と考えられた。一方、FGF13 遺伝子座はX 染色体上にあるため、オスのノックアウトマウスが得られればFGF13 発現のないマウスとなるが、雌のヘテロノックアウトマウスとの交配を繰り返しても、オスのノックアウトマウスは全く得られなかった。生後の食殺の可能性も考慮し、出産直前の帝王切開も実施したが、FGF13 遺伝子ホモノックアウトの胎仔を認めなかった。胎盤着床痕の数に比べて、胎仔数が少ないことから、FGF13 遺伝子の破壊は胚性致死になる可能性が高いと考えられた。よって、FGF13 の毛包周期における生理的な役割を調べるためには、皮膚角化細胞だけFGF13 を欠損させるコンディショナルノックアウトマウスの作成が必要と結論づけられた。

5. 総 括

組み替え体FGF13 を用いたマウス実験により、FGF13 が毛包角化細胞の分裂を抑制し、毛包休止期を延長させることが明らかになり、FGF13 が毛包休止期の維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。今回、FGF13 の全身性ノックアウトマウス作成を試み、ヘテロノックアウトマウスを得られたが毛周期の異状を認めなかった。また、FGF13 全身性ノックアウトマウスは胚性致死になる可能性が高いことも示した。今後、皮膚角化細胞特異的にFGF13 を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスを作成することで、FGF13 による生理的な毛周期制御機構の解明につなげていく予定である。

(引用文献)

- 1) Kawano M, Komi-Kuramochi A, Asada M, Suzuki M, Oki J, Jiang J, Imamura T: Comprehensive analysis of FGF and FGFR expression in skin: FGF18 is highly expressed in hair follicles and capable of inducing anagen from telogen stage hair follicles, *J. Invest. Dermatol.*, 124, 877-885, 2005.
- 2) Hsu YC, Pasolli HA, Fuchs E: Dynamics between stem cells, niche, and progeny in the hair follicle, *Cell*, 144, 92-105, 2011.
- 3) Kimura-Ueki M, Oda Y, Oki J, Komi-Kuramochi A, Honda E, Asada M, Suzuki M, Imamura T: Hair cycle resting phase is regulated by cyclic epithelial FGF18 signaling, *J. Invest. Dermatol.*, 132, 1338-1345, 2012.
- 4) Kawano M, Suzuki S, Suzuki M, Oki J, Imamura T: Bulge- and basal layer-specific expression of fibroblast growth factor-13 (FGF13) in mouse skin, *J. Invest. Dermatol.*, 122, 1084-1090, 2004.
- 5) DeStefano GM, Fantauzzo KA, Petukhova L, Kurban M, Tadin-Strapps M, Levy B, Warburton D, Cirulli ET, Han Y, Sun X, Shen Y, Shirazi M, Jobanputra V, Cepeda-Valdes R, Cesar Salas-Alanis J, Christiano AM: Position effect on FGF13 associated with X-linked congenital generalized hypertrichosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110, 7790-7795, 2013.
- 6) Nakayama F, Yasuda T, Umeda S, Asada M, Imamura T, Meineke V, Akashi M: Fibroblast growth factor-12 (FGF12) translocation into intestinal epithelial cells is dependent on a novel cell-penetrating peptide domain: involvement of internalization in the in vivo role of exogenous FGF12, *J. Biol. Chem.*, 286, 25823-25834, 2011.
- 7) Itoh N, Ornitz DM: Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease, *J. Biochem.*, 149, 121-130, 2011.