

レチノイン酸とアラキドン酸を経路を用いた育毛剤の開発

滋賀医科大学 解剖学講座 生体機能形態学部門
岡野 純子

1. 研究目的

本研究は男性型脱毛症の治療において、現在作用機序の鍵であるプロスタグランジンとレチノイン酸のin vivo（毛包）における相互作用機序を、Cyp26b1を欠損させたマウスを用いて明らかにすることを目標とする。Cyp26b1はRA分解酵素であり、これを完全に欠損させると体内でRA濃度が著しく上昇する（Okano et al., (2012)）。しかしCyp26b1ノックアウトマウスは胎生致死であるため、生後以降の毛包分化におけるプロスタグランジンとRAの解析には不向きである。また、生後の毛包を含む皮膚におけるCyp26b1の発現パターンの詳細は判っていない。そこで、まずCyp26b1を含むRA分解酵素および合成酵素の生後皮膚/皮膚付属器における発現パターンを明らかにした上でCyp26b1を皮膚あるいは毛包特異的に欠損させることで局所的にRA濃度を上昇させるマウスの作製を目指す。このマウスを用いてプロスタグランジンとレチノイン酸の相互作用機序を解明できれば、育毛剤の選択肢を増やすことにより、男性型脱毛症の治療分野に大きなインパクトを与える。

2. 方法・結果

体内RA濃度を決定するRA分解酵素(Cyp26a1, -b1, c1)および合成酵素(Raldh1, -2, -3, -4)の発現パターン解析

これらの酵素に関しては利用できる抗体が市中にはないため、ラジオアイソトープを用いたin situ hybridizationを行った。上記7つの酵素の中でCyp26b1のみが生後皮膚の真皮および毛乳頭細胞に強く発現していることが判った（図1）。この結果により、予定通りCyp26b1を真皮および毛乳頭においてのみ欠損させる戦略が有効であると考えた。

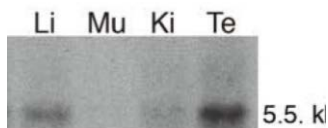


図 1

生後皮膚において、Cyp26b1は真皮および毛乳頭に強く発現している（赤い点が発現部位である）。他のRA分解酵素/合成酵素にはこのような強い発現は見られなかった。

Flox/loxPシステムを用いたCyp26b1f/fマウスの作製およびCreマウスの選択

図2のごとくtargeting vectorを用いてCyp26b1 floxマウスを作製した。

真皮および毛乳頭に発現しているCyp26b1を特異的に欠損させるため、Engrailed1 Cre (EnCre) マウスを用いた。Cyp26b1f/fマウスと2世代交配することにより、目的のEnCre; Cyp26b1f/fを得た。

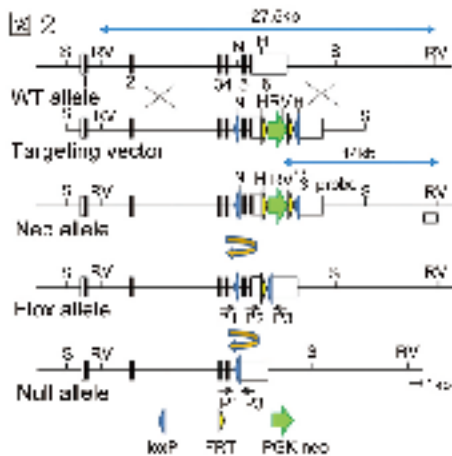


図3

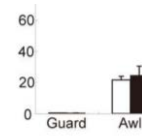
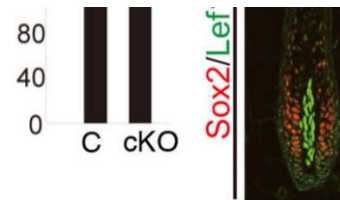


図4



EnCre; Cyp26b1f/fマウスの毛包における表現解析

Cyp26b1を特異的に欠損させたことによるEnCre; Cyp26b1f/f (cKO)の皮膚内のRA濃度の変化を評価する目的で、RAレセプターRARβの発現量をリアルタイムPCRにて評価した。その結果、このマウスは野生型とCyp26b1完全ノックアウトマウスとの間の中間のRARβ発現量を示した。続いて生後7日での毛包密度を検証したところ、有意に対照群と比べ毛包密度の低下を認めた(図3)。また、マウス毛包はGuard, Awl/Auchene, ZigZagの4種類に分けられる。この構成比を調べたところ、EnCre; Cyp26b1f/fマウスの毛包では本来大多数を占めるZigZag毛包が減少し、野生型では見られない異常毛包が観察された(図4)。しかしこの表現型はP7以降消失し、毛包密度も毛包種類の構成比も野生型と同様になってしまった。そこで、毛乳頭、毛包基底バルジ、毛包上基底バルジ、真皮、毛包間表皮、峽部それぞれのRA濃度を詳細に評価すべくフローサイトメトリーにて各部位の細胞を採取し、RARβの発現量を評価中である。同時に、より効果的にCyp26b1を欠損する目的でCol1a2Creマウスの投入を考え、開発者であるDr. P. Angelの承諾を得た。所有者である京都大学宿南先生から凍結卵を分与して頂き、本学にてCol1a2Creマウスのコロニーを確立中である。

3. 考察

RAは分子量が小さく、かつ容易に拡散する。従ってin vivoモデルで部位特異的にRA濃度を変化させることが非常に困難であるゆえ、生後の毛包分化におけるRAの役割はこれまで詳細な解析がなされてこなかった。今回RAを分解するCyp26b1に注目することで、毛包特異的にRA濃度を変化させようとする本研究の目的は、EnCre; Cyp26b1f/fの毛包が表現型を見せたことで成功したと言える。ただし、成人まで毛包のRA濃度を変化させることは研究期間内には困難であり、現在他のCreマウスのコロニーを確立中である。同時に、貴財団の助成金で援助して頂くことによって得られた成果を発表すべく、現在論文投稿中である。臨床現場では、白血病治療目的にて投与したRAが脱毛症をきたし、患者の精神的苦痛をもたらすことはよく知られた事実である。未だ明らかにな

っていないRAが成人の毛包分化に関わる役割を解明し、さらに現在男性型脱毛症の作用点であるプロスタグランジンとの関わりを調べる事は、男性型脱毛症だけでなく、二次的な脱毛症の患者に対する治療に恩恵を与えると考えている。

4. 発表、論文

Increased retinoic acid levels through ablation of Cyp26b1 determine the processes of embryonic skin barrier formation and peridermal development.

日本解剖学会 3月 28-30 日、2013、香川、口演 10am-B1-5

皮膚発生における Cyp26b1 を介した体内レチノイン酸濃度の調節の意義

第53回日本先天異常学会 7月 21- 23 日、2013、大阪、ポスターP-43

Cutaneous Retinoic acid levels determine hair follicle development and downgrowth

Journal of Biological Chemistry. *Submission.*

The roles of retinoic acid signaling in normal and abnormal development of the palate and tongue.

Congenital anomalies. *Revision.*