Mini Review

フォリスタチンの毛包の発生における役割と毛包の再生への応用の可能性

中村元信, 宮地良樹

京都大学大学院医学研究科皮膚科学

Hair growth control by follistatin

Members of the TGF- β /BMP family such as BMP-4 and TGF- β -1,2 are involved in the control of hair follicle morphogenesis. This prompted us to explore the role of TGF- β /BMP family member activin and its antagonist follistatin in pelage hair follicle development. Here, we show that during hair follicle development, follistatin mRNA is prominently expressed by hair matrix and outer root sheath keratinocytes as well as by interfollicular epidermis, whereas activin A-mRNA is mainly expressed in dermal papilla cells. Compared to age-matched wild-type controls, both follistatin knockout mice and activin A transgenic mice show a significant retardation of hair follicle morphogenesis. Treatment of wild-type, embryonic skin explants with follistatin protein stimulates hair follicle development. This effect is inhibited by the addition of recombinant activinA protein. These observations suggest that follistatin and activin interaction plays an important role both in hair follicle development and may be exploited as a regenerative treatment for patients with alopecia.

Rec.3/31/2004, Acc.4/30/2004, pp573-577

Motonobu Nakamura, Yoshiki Miyachi

Department of Dermatology, Graduate School of Medicine, Kyoto University

Key words hair follicle, alopecia, follistatin, activin, TGF-

はじめに

毛包は表皮細胞と間葉由来の真皮細胞, 毛乳頭細胞との相互作用により形成される。各種のノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを使い, β -カテニン, Wnt10b, ソニックヘッジホッグ, Lef-1, Notch などの分子が, 正常な表皮細胞と間葉由来の真皮細胞による毛包発生に不可欠であることが近年次々と明らかとされてきた^{1,2)}。我々は, これまでに BMP/TGF- β スーパーファミリーに属する BMP-2 と BMP-4 が毛包の発生を抑制し, BMPの阻害分子のノギンが毛包の発生を促進することを示したが³⁾, 今回 BMP/TGF- β スーパーファミリーの別の分子であるアクチビンと, その阻害分子であるフォリスタチンの毛包の発生における働きについて検討を行った。

アクチビンは, 1986 年 Ling らによって脳下垂体から FSHが分泌されるのを促進させる蛋白として単離された⁴⁾。

アクチビンは構造的には TGF- β と類似しており, TGF- β / BMP スーパーファミリーの一つである。一方, フォリスタチンは1987年脳下垂体からのFSHの分泌を抑制する蛋白として報告されたが⁵⁾, 1990年フォリスタチンがアクチビンと結合し, アクチビンの作用を阻害していることが明らかとなった⁶⁾。

現在では, アクチビンとフォリスタチンの系は単に脳下垂体からのFSHの分泌に関わっているのみならず, 胚の初期発生, 指や歯や腸の発生など, 様々な器官の発生や分化に重要な役割を果たしていることが明らかとされている⁷⁻⁹⁾。また, フォリスタチンを鳥の胚皮膚に投与すると異所性に羽毛が生じることから, 毛包の発生にも何らかの役割をしていることが示唆された¹⁰⁾。

図1 フォリスタチン,アクチビンの局在

フォリスタチン mRNA は hair matrix 細胞に最も強く発現し, 外毛根鞘細胞, 毛包間の表皮にも発現している (A, B, D). 一方, アクチビン mRNA は mesenchyme 由来の真皮乳頭細胞に最も強く発現している (C, D).

アクチビンとフォリスタチンの毛包発生時における局在

アクチビンとフォリスタチンの毛包の発生における役割を知るため, まず in situ hybridization 法と免疫組織化学法を用いて毛包の発生時のフォリスタチンとアクチビンおよびアクチビン受容体の発現部位を検討した¹¹⁾. 図1に示すようにフォリスタチン mRNA は, 表皮が真皮側に陥入していったステージ2の毛包では陥入していく表皮の先端に発現している. さらにステージの進んだ毛包では, hair bulb 内の hair matrix 細胞に最も強く発現し, 外毛根鞘細胞, 毛包間の表皮にも発現している. 一方, アクチビン

mRNA は間葉由来の真皮乳頭細胞に最も強く発現している. アクチビン受容体は, 免疫組織化学法では毛包内ではいずれも真皮乳頭細胞にはほとんど発現せず, hair matrix 細胞に最も強く発現していた.

フォリスタチンノックアウトマウスにおける毛包の発生の遅れ

1995年 Matzuk らにより, フォリスタチンノックアウトマウスの表現型が報告された¹²⁾. フォリスタチンノック

アウトマウスは生後数時間で呼吸不全によって死亡する. 横隔膜の発達異常が見つかり, さらに歯や硬口蓋の異常を伴った. 生後数時間で死亡することから, 胎生 18.5 日で組織学的に毛包の発生の異常についてワイルドタイプマウスと比較検討を行い, フォリスタチンの毛包の発生における機能的役割を検討した.

図2に示すようにワイルドタイプマウスと比較してフォリスタチンノックアウトマウスではステージの早い, まだあまり発達していない毛包が多い (図2A, C, D). ステージ数の平均である staging score ではフォリスタチンノックアウトマウスはワイルドタイプマウスより有意に staging score が低く, フォリスタチンがないと毛包の発生が遅れることが示された (図2B).

アクチビントランスジェニックマウスにおける毛包の発生の遅れ

次にアクチビンの毛包の発生における働きを明らかにするため, ケラチン14プロモーターの下流にアクチビン

A の cDNA をつなぎ, 毛包の外毛根鞘細胞と表皮の基底層でアクチビン A を発現させたトランスジェニックマ

図2 フォリスタチンノックアウトマウスにおける毛包の発生の遅れ

フォリスタチンノックアウトマウスでは stage の早い、まだあまり発達していない毛包が多い (A, C, D)。stage 数の平均である staging score ではフォリスタチンノックアウトマウスはワイルドタイプマウスより有意に staging score が低い (B)。

図3 アクチビン A トランスジェニックマウスにおける毛包の発生の遅れ

アクチビン A トランスジェニックマウスでは stage の早い、まだあまり発達していない毛包が多い (A, C, D)。staging score でもアクチビン A トランスジェニックマウスは staging score が有意に低い (B)。

図4 *In vitro* 培養実験における毛包発生促進

フォリスタチンはコントロールに比べ、培養胎仔皮膚の毛包の個数を有意に増加させ、毛包の発生を促進したが、アクチビンAを加えることによって毛包の発生の促進効果は阻害された。

図5 毛包発生におけるアクチビンとフォリスタチンの役割

フォリスタチンはアクチビンの毛包の発生の抑制効果を阻害し、毛包の発生を促進する。

ウスの解析を行った¹³⁾。胎生18日のアクチビンAトランスジェニックマウスをワイルドタイプマウスと比較すると、図3に示すように、ワイルドタイプマウスと比較してアクチビンAトランスジェニックマウスでは、stageの早い、まだあまり発達していない毛包が多く、staging scoreも低く毛包の発生が遅れていた。

フォリスタチンの*in vitro*での毛包の発生の促進効果

フォリスタチンとアクチビンの毛包の発生における働きをより明らかにするため、さらにマウス皮膚の*in vitro*の培養実験を行った。正常胎仔マウスの背部皮膚をフォリスタチンの存在下、あるいはフォリスタチンとアクチ

ビンAの共存下で48時間培養した後、組織をアルカリフォスファターゼ染色し、胎仔皮膚の毛包の個数を比較検討した。図4に示すように、フォリスタチンは何も加えていないコントロールに比べて毛包の発生を促進した。このフォリスタチンの毛包の発生の促進効果はアクチビンAを加えることによって阻害され、フォリスタチンとアクチビンの相互作用が毛包の発生に重要な役割をはたしていることが明らかとなった(図5)。

おわりに

既存の治療で軽快しない円形脱毛症、男性型脱毛症、瘢痕性脱毛症などの種々の脱毛症患者は非常に多い。このような難治性の脱毛症治療への臨床応用を考え、TGF-

スーパーファミリーに属するアクチピンとその阻害因子であるフォリスタチンに着目し研究を行った。以上に示したようにフォリスタチンがアクチピンの毛包の発生の抑制効果を脱抑制することによって毛包の発生を促進していることを解明した。この結果を踏まえ、現在これらの分子を使って幹細胞を用いた毛包の再生に向けた実験を行っている。

現在、重度熱傷患者などに用いられている表皮シートは汗腺や毛包などの皮膚付属器を有しておらず、フォリスタチンや様々な幹細胞を用いて、皮膚付属器を伴った植皮片を作り、患者のQOLの向上に役立つ再生治療が期待される。

謝 辞

以上の研究成果は多くの方々との共同研究によってなされたものであり、ここに深謝の意を表したい。

文 献

- 1) Millar SE: Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *J Invest Dermatol*, 118: 216-225, 2002.
- 2) Nakamura M, Sundberg JP, Paus R: Mutant laboratory mice with abnormalities in hair follicle morphogenesis, cycling, and/or structure: annotated tables. *Exp Dermatol*, 10: 369-390, 2001.
- 3) Botchkarev VA, Botchkareva NV, Roth W, Nakamura M, Chen LH, Herzog W, Lindner G, McMahon JA, Peters C, Lauster R, McMahon AP, Paus R: Noggin is a mesenchymally derived stimulator of hair follicle induction. *Nat Cell Biol*, 1: 158-164, 1999.
- 4) Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, Guillemin R: Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature*, 321: 779-782, 1986.
- 5) Ueno N, Ling N, Ying SY, Esch F, Shimasaki S, Guillemin R: Isolation and partial characterization of follistatin: A single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 8282-8286, 1987.
- 6) Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Titani K, Sugino H: Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science*, 247: 836-838, 1990.
- 7) Merino R, Macias D, Ganan Y, Rodriguez-Leon J, Economides AN, Rodriguez-Esteban C, Izpisua-Belmonte JC, Hurler JM: Control of digit formation by activin signaling. *Development*, 126: 2161-2170, 1999.
- 8) Kim SK, Hebrok M, Li E, Oh SP, Schrewe H, Harmon EB, Lee JS, Melton DA: Activin receptor patterning of foregut organogenesis. *Genes Dev*, 14: 1866-1871, 2000.
- 9) Miralles F, Czernichow P, Scharfmann R: Follistatin regulates the relative proportions of endocrine versus exocrine tissue during pancreatic development. *Development*, 125: 1017-1024, 1998.
- 10) Patel K, Makarenkova H, Jung H-S: The role of long range, local and direct signalling molecules during chick feather bud development involving the BMPs, Follistatin and the Eph receptor tyrosine kinase Eph-A4. *Mech Dev*, 86: 51-62, 1999.
- 11) Nakamura M, Matzuk MM, Gerstmayr B, Bosio A, Lauster R, Miyachi Y, Werner S, Paus R: Control of pelage hair follicle development and cycling by complex interactions between follistatin and activin. *FASEB J*, 17: 497-499, 2003.
- 12) Matzuk MM, Lu N, Vogel H, Sellheyer K, Roop DR, Bradley A: Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature*, 374: 360-363, 1995.
- 13) Munz B, Smola H, Engelhardt F, Bleuel K, Brauchle M, Lein I, Evans LW, Huylebroeck D, Balling R, Werner S: Overexpression of activin A in the skin of transgenic mice reveals new activities of activin in epidermal morphogenesis, dermal fibrosis and wound repair. *EMBO J*, 18: 5205-5215, 1999.