

表皮および胎盤における
Phospholipase C δ 1、 δ 3 の機能解析

中村 由和

東京大学図書



0012963401

東京大学総合図書館

目次

序文

1

実験方法

4

結果

8

考察

18

引用文献

24

図の説明

31

謝辞

38

図表

39

序文

ホスホリパーゼ C (PLC) はイノシトールリン脂質代謝系においてセカンドメッセンジャー産生のトリガーとなる酵素である。活性化された PLC は、ホスファチジルイノシトール 4, 5 - ニリン酸 (PI(4,5)P₂) を分解し、二つのセカンドメッセンジャーである、イノシトール 1, 4, 5 - 三リン酸 (IP₃) とジアシルグリセロール (DAG) を産生する。前者は小胞体からカルシウムイオンの遊離を促し、後者はプロテインキナーゼ C (PKC) を活性化することで様々な細胞応答を促す (Berridge and Irvine, 1984; Nishizuka, 1988) (図 1A)。また、PIP₂ はホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) の基質としてホスファチジルイノシトール 3, 4, 5-三リン酸 (PIP₃) の前駆物質にもなり、様々な細胞機能の調節に関与する。さらに、PIP₂ 自体もアクチン調節蛋白質に結合してアクチン細胞骨格を制御することをはじめとし、エキソサイトーシスやチャネル活性を制御するなどの機能を有しており、PLC や他の酵素による PIP₂ の量の調節は正常な細胞機能の維持にあたって非常に重要であると考えられる。

今日、哺乳動物では 13 種類の PLC が同定されており、それらは構造的に 5 つの型 (β , γ , δ , ϵ , ζ , η) に大別される (Rhee and Bae, 1997)。全ての PLC は酵素活性を司る X ドメイン、Y ドメインや、プレクストリン相同 (PH) ドメイン (ζ 型を除く)、EF ハンドモチーフ、C2 ドメインといったドメインを共通して有している。また、これらの基礎的なドメイン構造に加えて γ 型 PLC は Src 相同 (SH)₂ ドメイン、SH3 ドメインを持ち、 ϵ 型 PLC は CDC25 相同ドメイン、Ras/Rap - associating (RA) ドメインを持つなど各アイソザイムに特徴的なドメイン構造も有している (図 1B)。

また、これらの各型の PLC は異なる活性制御機序を有していることが知られている。PLC β は 7 回膜貫通型受容体および三量体型 G 蛋白質とカップリングして活性化される。この経路を介する PLC の活性化には、百日咳毒素 (PT) 感受性と非感受性の経路が存在し、PT 感受性の経路では、三量体 G 蛋白質の α サブユニットが、PT 非感受性の経路では三量体 G 蛋白質の $\beta\gamma$ サブユニットが PLC β を活性化する。また、PLC β 2 や β 3 は cdc42 や Rac といった低分子量 G 蛋白質と直接結合し、活性化される。PLC γ はチロシンリン酸化された受容体に結合し、自身もチロシンリン酸化され活性化される。また、チロシンリン酸化された受容体は PI3K を活性化する事により PIP₃ を産生し PLC γ の膜へのターゲティングや活性化を引き起こす。PLC ϵ は低分子量 G 蛋白質である Ras、Rap と GTP 依存的に結合し活性化される。また PLC ϵ は Gs とカップリングした受容体刺激により、cAMP、Epac1、Rap2B を介した経路により活性化される。三量体 G 蛋白質のサブユニッ

トである $G\alpha_{12}$ や $G\beta\gamma$ も $PLC\epsilon$ を活性化する。さらに $PLC\epsilon$ は低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリー蛋白質と結合し活性化される。 $PLC\delta$ は β 型や γ 型と比べ、*in vitro* においてより低濃度のカルシウムイオン (1–10 μ M) により活性化されることが知られているが (Allen *et al.*, 1997)、膜受容体にカップリングしての活性調節機構についてはほとんど明らかにされていない。

近年、各 PLC アイソザイムの遺伝子欠損マウス作製、解析により各 PLC アイソザイムの個体レベルにおける生理機能が解明されてきた。今日までに、 $PLC\beta_1$ 、 β_2 、 β_3 、 β_4 、 γ_1 、 γ_2 、 δ_4 の遺伝子欠損マウスが作製されており、以下の様な表現型を示す事が報告されている。 $PLC\beta_1$ 遺伝子欠損マウスはてんかんを生じ、 $PLC\beta_4$ 遺伝子欠損マウスは運動失調、小脳における LTD の異常や視覚シグナル伝達の異常が観察された (Kim *et al.*, 1997)。また、 $PLC\beta$ 遺伝子欠損マウスは好中球における fMLP 刺激によるカルシウムイオン濃度上昇や、スーパーオキシド産生の抑制が観察され (Jiang *et al.*, 1997)、 $PLC\beta$ 遺伝子欠損マウスでは μ オピオイドに対する反応性が抑制され、モルヒネに対する感受性低下が観察される事が報告されている (Xie *et al.*, 1999)。 $PLC\gamma_1$ 遺伝子欠損マウスは胎生 9 日目において致死となることが報告されている (Ji *et al.*, 1997)。また $PLC\gamma_2$ 遺伝子欠損マウスでは B 細胞の分化、成熟の異常 (Hashimoto *et al.*, 2000)、コラーゲンによる血小板凝集反応の低下などが表現型として観察されている。 $PLC\delta$ 遺伝子欠損マウスは受精時の精子先体反応異常による雄性不妊となる (Fukami *et al.*, 2001)。以上の様に、13 種類という多くの PLC アイソザイムが存在するにも関わらず各 PLC アイソザイムがそれぞれ独自の異なる生理機能を有している事が明らかになっている。

δ 型の PLC は PLC のなかでも単純な構造をしており、酵母や粘菌にも存在するなど、進化的にも最も古くから保存されている PLC である。それゆえ恒常的な代謝を担うなど生命現象において必須な役割を担っていることが予測されていた。 $PLC\delta_1$ は δ 型 PLC の中で最も発現量が高く、広い組織に分布している (Suh *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1999)。しかしながら、哺乳動物における $PLC\delta_1$ の持つ生理的機能はほとんどわかっていなかった。そこで私は本研究において、哺乳動物における $PLC\delta_1$ の生理機能を明らかにすることを目的とし、 $PLC\delta_1$ 遺伝子欠損マウスの作製を行ったところ、 $PLC\delta_1$ 遺伝子欠損マウスでは顕著な体毛の顕著な減少が観察された。

皮膚は主に、表皮、真皮、毛包および毛包付属物により構成されている。このうち、表皮系部位は主に表皮角化細胞と呼ばれる細胞により構成されている。表皮は、体表に向かい基底層、有棘層、顆粒層、角質層といった層構造を構成しており、基底層から体表へ向かうにつれて、表皮角化細胞は増殖能を失い、分

化し、最終的に体表から剥がれ落ちる。また、表皮の各層には特異的な分化マーカー蛋白質が発現しており、表皮角化細胞の分化状態を示す指標として用いられている (図 2)。また、表皮、毛包および脂腺などの毛包付属物は同一の幹細胞に由来することが知られている。この幹細胞は毛包上部の bulge と呼ばれる場所に存在しており、正常な皮膚においては、幹細胞が表皮、毛包、脂腺へとバランス良く分化し、皮膚の恒常性を維持している。本研究において PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの表現型を解析した結果、PLC δ 1 が幹細胞の分化を制御することにより皮膚恒常性維持に重要な役割を担っていることが強く示唆された (Nakamura *et al.*, 2003)。しかしながら PLC δ 1 の広い組織分布にも関わらず、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスにおいて、皮膚の他に目立った表現型は観察されなかった。その原因のひとつとして、PLC δ 3 という PLC δ 1 にもっとも配列相同性の高い PLC アイソザイムが PLC δ 1 欠損を相補してしまっている可能性が考えられた。そこで、PLC δ 1 と同時に PLC δ 3 を欠損させたマウス (PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウス) を作製したところ、これらのマウスは胎生中期において致死となることが明らかになった。胎盤は母体-胎児間の栄養交換を担う組織である。そのため、胎盤における血管腔の減少は母体-胎児間の栄養交換を不十分とし、胎児を栄養不良にする可能性が考えられる。PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスの胎生致死の原因を解析したところ、これらのマウスにおいては胎盤トロホブラストの異常により、胎盤において血管腔が減少している様子が観察され、PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子が胎盤トロホブラストの正常な機能維持に必須であることが明らかになった (Nakamura *et al.*, 2005)。

実験方法

1) PLC δ 1 遺伝子のターゲティングベクター構築

129SVJ マウスゲノムライブラリー (STRATAGENE)より単離された PLC δ 1 の Xドメイン、Yドメインをコードする一連のエクソンを含むファージクローンについて、N端側、C端側のアーム領域の決定および組み換え体スクリーニング時のサザンブロットティングに用いる制限酵素とプローブを得るため、制限酵素地図の作製およびシーケンス解析を行った。ターゲティングベクターは pBluescript (STRATAGENE)を骨組みとし、ポジティブセレクションマーカーとして、ネオマイシン耐性遺伝子 (neo)を、ネガティブセレクションマーカーとしてジフテリアトキシン Aフラグメント (DTA)を導入し、neo が PLC δ 1 の Xドメイン、Yドメインをコードする一連のエクソンを含む 5.7 kbp を置換するように N端側、C端側の両アーム領域を組み込んだ。

2) ES 細胞の培養、PLC δ 1 ターゲティングベクターの ES 細胞への導入

129/Ola 胚性幹 (ES)細胞 は、15% Fetal Calf Serum、1000U/ml Lif、7 nl/ml 2-ME (ナカライ) を含む DMEM (Gibco) 培地中にて、放射線照射により増殖能を不活化したマウス初代培養胎児繊維芽細胞上で培養した。ES 細胞へのターゲティングベクターの導入は電気穿孔法により行った。ターゲティングベクターの導入後、G418 (Gibco、終濃度 400 μ g/ml) を培地に添加し、8-9 日間培養し生じてきたコロニーを採取、培養した。

3) サザンブロットティングによる PLC δ 1 ターゲティングベクター相同組み替え体クローンのスクリーニング

G418 耐性クローンを採取し、各クローンについて細胞よりゲノム DNA を精製し、サザンブロットティングにより PLC δ 1 ターゲティングベクター相同組み替え体クローンのスクリーニングを行った。ゲノム DNA の精製は、細胞を可溶化バッファー (50 mM Tris-HCl, pH8.0、0.1 M NaCl、1% SDS、20 mM EDTA、1 mg/ml Proteinase K) にて可溶化後、フェノール抽出、エタノール沈澱にて行った。サザンブロットティングは精製したゲノム DNA 5 μ g を DraI で切断し、ベクター外に設計したプローブを用いて行った。さらに、ベクター内プローブでも、同様にサザンブロットティングを行い、相同組み換えと同時に非相同組換が起こっていないことを確認した。

4) PLC δ 1 のキメラマウスの作製

サザンブロッティングにより選別された相同組み換え体 2 クローンを C57BL/6J マウスの胚盤胞に注入し、仮親の子宮内に移植した。妊娠 20 日目において、自然出産していないマウスについては帝王切開し、キメラマウスを得た。なお、マウス胚盤胞への ES 細胞のインジェクション操作は、共同研究者に依頼した。

5) PLC δ 1 のヘテロマウス、ホモマウスの作製及びその同定

2 クローンの雄キメラマウスの内、毛色から判断されるキメリズムが 80 % 以上のマウスを、C57BL/6J 雌マウス 2 匹と交配させ、PLC δ 1 ヘテロ欠損マウスを得た。遺伝子型の決定はマウスの尾より抽出したゲノム DNA を用いて、polymerase chain reaction (PCR)法にて行った。ゲノム抽出は DNeasy tissue kit (QIAGEN)を用いて行った。PCR 法によるスクリーニングの際に用いた 3 本プライマーの配列は以下の通りである。

5'-CAAGGAGGTGAAGGACTTCCTG-3'

5'-CTGGGTCAGCATCCTGTAGAAG-3'

5'-CCTGTGCTCTAGTAGCTTTACG-3'。

得られた PLC δ 1 ヘテロ欠損マウス間の交配により PLC δ 1 遺伝子欠損マウス(ホモ欠損マウス)を得た。

6) PLC δ 3 のヘテロマウス、ホモマウスの作製及びその同定

PLC δ 3 ヘテロ欠損マウスは Lexicon Genetics 社より入手した。遺伝子型の決定はマウスの尾より抽出したゲノム DNA を用いて、PCR 法にて行った。PCR 法によるスクリーニングの際に用いた 3 本プライマーの配列は以下の通りである。

5'-TTAACCTGATGCTCCTGAGG -3'

5'-GGATAAAAATGCTTGCCCTGC -3'

5'-AAAATGGCGTTACTTAAGCTTGC -3'。

PLC δ 3 ヘテロ欠損マウス間の交配により PLC δ 3 遺伝子欠損マウス(ホモ欠損マウス)を得た。

7) 組織化学および免疫組織化学

組織化学については、マウスを頸椎脱臼にて殺した後、皮膚、または胎盤を採取し、20%ホルマリン液で固定した。その後パラフィンに包埋し 10 μ m 厚に薄切した。この切片をヘマトキシリン-エオジン (HE)染色し、光学顕微鏡で観察、写真撮影を行った。

免疫組織化学については、マウスの皮膚または胎盤を採取後、ただちに OCT

コンパウンドに包埋し、液体窒素で急速凍結した。これをクリオスタットで 10 μm 厚に薄切した後、シランコートしたスライドガラスに貼付した。シランコートしたスライドガラスに貼付した切片を -80°C のアセトンで 5 分間固定した後、ドライヤーの冷風で風乾し、phosphate-buffered saline (PBS)に 0.05% tween-20 を加えた洗浄液で洗浄した。その後 1 次抗体と室温で 1 時間インキュベートし、先述の洗浄液で洗浄した。使用した一次抗体は以下の通りである。K1、K5、K6、loricrin (Babco)、NF- κ Bp50、NF- κ Bp65 (Santa Cruz Biotechnology)、AE13、AE15 (Dr. T. T. Sun, New York University Medical School より提供を受けた)、phospho-PKC (pan) (Cell Signaling)。1 次抗体とインキュベート後、二次抗体 (Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG antibody (Molecular Probes))と室温で 30 分間反応を行い、洗浄後、共焦点顕微鏡(Radiance 2000, Bio-Rad)で観察を行った。免疫蛍光染色の際のカウンター染色は BO-PRO-3 (Molecular Probes)を用いて行った。PLC δ 1 の免疫組織染色に関しては、tyramide signal amplification (TSA) immunodetection kit (Perkin Elmer)を用いて行った。

8) 5-Bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU)取り込みによる細胞増殖能検討

5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit II (Roche)のプロトコールにしたがって行った。具体的にはマウスの腹腔内に 10 mM となるように PBS に溶解した BrdU を 2 ml/100 g 体重で投与し、2 時間後にマウスより皮膚または胎盤を採取し、ただちに OCT コンパウンドに包埋し、液体窒素で急速凍結した。10 μm 厚切片を作製後、 -20°C に冷却した固定液 (70%エタノール, 15 mM グリシン, pH2.0) 中で 20 分間固定した。PBS で洗浄後、Anti-BrdU working solution を加え、 37°C で 30 分 インキュベートした。PBS で洗浄後、Anti-mouse-Ig-alkaline phosphatase(AP) working solution を加え 37°C で 30 分インキュベートし、PBS で洗浄後、光学顕微鏡で観察、写真撮影を行った。

9) 表皮角化細胞の初代培養, 分化誘導実験

出生後 24 時間以内のマウス新生児の皮膚を採取し、70%エタノールに浸した後、PBS で洗浄し、0.25%トリプシン溶液 (DIFCO)に真皮側が下になるような向きで浸し 4°C 、16 時間処理し、表皮と真皮を分離した。その後、表皮をほぐし、表皮角化細胞を単離した。採取した表皮角化細胞はタイプ I コラーゲン (新田ゼラチン)でコートしたディッシュにまき 24 時間後に培養液を交換した。その後は2日に1回培養液を交換した。培養液は、KGM bullet kit (Clonetics)を用いた。細胞分化誘導は、50%コンフルエントになった表皮角化細胞を最終濃度 1 mM になるように CaCl_2 を添加した培養液で培養することにより行った。

10) 表皮角化細胞の細胞内カルシウム濃度測定

細胞分化誘導後の表皮角化細胞を 7.5 μ M Fura-2 AM を含むバッファーA (20 mM HEPES、120 mM NaCl、5 mM KCl、1 mM MgCl₂、1 mg/ml sodium pyruvate、1 mg/ml glucose、0.05 mM CaCl₂)を用いて、細胞内への Fura-2 ロードを行った。その後、細胞を 1.6 mM の CaCl₂により刺激し、細胞からの 340 nm (F340)、380 nm (F380)の蛍光を検出した。四回の独立した初代培養により得られた細胞を用い、各回の実験では、視野中の 10 個の細胞を計測し平均値を算出した(各サンプルにつき合計 40 個の細胞について計測を行い、その平均値を算出した。)

11) 表皮角化細胞を用いたルシフェラーゼアッセイによる NFAT 活性測定

初代培養表皮角化細胞を 24 穴培養皿に 70%コンフルエントになる程度に培養し、FuGENE6 (Roche)を用いて pNFAT-Luc (STRATAGENE)プラスミドを細胞内に導入した。遺伝子導入 76 時間後に Luciferase Assay Kit (STRATAGENE)および FusionTM α (Packard)を用いてリポーター活性の計測を行った。実験は独立して、二回行い、それぞれの実験において計測は三つのウェルから行った。

12) 電子顕微鏡による皮膚、胎盤組織の観察

組織を固定液 (3%グルタルアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝液、pH7.3) 中で固定し、さらに、2%四酸化オスミウム液で後固定を行なった。その後、3%酢酸ウラニルで染色し、エポキシ樹脂に包埋し、切片作製後観察を行なった。

13) 四倍体キメラ法によるキメラマウス作製

交尾後 1.5 日目の B6C3F1 のメスマウスより二細胞期の胚を採取し、これらの胚を 0.3 M マンニトール中にて、1 mm 間隔の電極間において 5 V の交流電流下、二回の 40 μ s、150 V の直流パルスを加え細胞融合を誘導した。細胞融合を起こした胚を一晩培養し、4 細胞期まで発生させた後、透明体を除去し、*PLC δ 1*^{-/-}/*PLC δ 3*^{-/-}マウス間の交配により得られた 4 細胞期から 8 細胞期の胚とアグリゲートさせた。その後、正常に胚盤胞まで発生の進んだキメラ胚を偽妊娠マウスの子宮へと移植した。

結果

1) PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの作製

PLC δ 1 の活性部位である X ドメイン、Y ドメインをコードしているエクソンを含む一連のエクソンを欠損させるようなターゲティングベクターを作製し (図 3A)、マウスの ES 細胞に導入し、46 クローンの相同組み替え ES 細胞を得た。これらの相同組み替えクローンのうち 2 クローンを C57/BL6J マウスの胚盤胞に注入し、キメラマウスを作製した。その後、雄のキメラマウスと C57/BL6J マウスの雌との交配を行い、誕生した仔に変異が伝わっていることをサザンブロッティングおよび PCR で確認した。

PLC δ 1 ヘテロ欠損マウスは外見上、特に異常はなく、稔性であった。また、ヘテロ欠損マウス間の交配により誕生した 158 匹の子の遺伝子型を決定したところ、PLC δ 1 ホモ欠損マウス (今後、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスと表記) の割合は全体の 24.7% とメンデル律に従っており、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスは胎生致死にはならず、正常に誕生することが明らかになった (表 1)。

野生型、PLC δ 1 ヘテロ欠損および PLC δ 1 遺伝子欠損マウスのゲノム DNA を用いてサザンブロッティングを行ったところ、野生型マウスのゲノム DNA では、本来のゲノムにおいて見られる 12.5 kbp のシグナルのみが検出され、PLC δ 1 ヘテロ欠損マウスのゲノム DNA では 12.5 kbp のシグナルに加え相同組み換えが生じた時に観察される 6.5 kbp のシグナルが検出され、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスでは 6.5 kbp のシグナルのみが観察された。この結果から PLC δ 1 遺伝子欠損マウスにおいてゲノム DNA レベルにおいて正確に遺伝子欠損が成されていることが確認できた (図 3B)。また、精巢の抽出液を用いたウエスタンブロッティングにより、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスには PLC δ 1 蛋白質の全長が存在しないことを確認した (図 3C)。

2) PLC δ 1 遺伝子欠損マウス皮膚における体毛の顕著な減少

PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの解析にあたり、まず初めに、PLC δ 1 タンパク質のマウスにおける組織分布をウエスタンブロッティングにより検討した。その結果、PLC δ 1 は、皮膚の表皮、心臓、精巢、肺に特に多く発現が見られ、骨格筋や脳にも発現している事が明らかになった (図 4)。

PLC δ 1 遺伝子欠損マウスは、稔性であり、1年間以上生存するが、背側において約 60%、腹側において約 90% のマウスにおいて、生後 8 日目頃より体毛の顕著な減少が観察された (図 5A、B)。

体毛の減少は、内分泌系の乱れをはじめとし、皮膚以外の異常によっても二次的に起きることが知られている。そこで、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスにおいて観察された体毛の減少が皮膚自体の異常に由来するものであるのか否かを明らかにするために、野生型および PLC δ 1 遺伝子欠損マウス新生児皮膚片をヌードマウスへ移植し、その後 14 日間経過観察を行った。その結果、野生型マウス由来の皮膚片では多くの毛が生えてくるのに対し、PLC δ 1 遺伝子欠損マウス由来の皮膚片では毛がまばらにしか生えて来なかった(図 5C)。ヌードマウスの背中という環境においても、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの体毛減少という表現型が再現されたことから、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスにおいて観察された体毛の減少が皮膚自体の異常に由来するものであると考えられた。

3) 生後 8 日目における PLC δ 1 遺伝子欠損マウス毛包、表皮の形態異常

PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの体毛の減少は、生後 8 日目より観察されはじめるので、野生型および PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの生後 8 日目の皮膚を採取し、HE 染色により組織像の観察を行った(図 6A-D)。その結果、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚では、外根鞘の上部に有棘細胞や顆粒細胞といった分化した表皮角化細胞が存在し、これらにより毛管がふさがれ毛が体表まで出てこられず、毛および毛包が折り曲げられている様子が観察された(図 6D 矢印)。また、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの表皮は野生型マウスの表皮と比較し、厚くなっている様子が観察された(図 6C、D 両頭矢印)。

PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの表皮が肥厚していたため、次に BrdU の取り込みにより、表皮および毛包の細胞の増殖能を検討したところ、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの表皮、毛包では、野生型と比べ約 8 倍多くの細胞が BrdU を取り込んでいることが明らかになった(野生型が視野あたり 3.6 ± 1.9 細胞であるのに対し PLC δ 1 遺伝子欠損マウスでは 30 ± 3.8 細胞)(図 7A-C)。

4) 生後 8 日目における PLC δ 1 遺伝子欠損マウス毛包、表皮の分化異常

HE 染色の組織像より PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚において表皮角化細胞の異常分化が起きている可能性が考えられたため、各種の分化マーカーに対する抗体を用い、表皮および毛包の表皮角化細胞の分化状態を調べた(図 8A-H)。その結果、野生型マウスでは表皮の分化した表皮角化細胞に主に発現しているサイトケラチン 1 (K1)が PLC δ 1 遺伝子欠損マウスでは外根鞘上部の表皮角化細胞にも発現していた(図 8B 矢印)。なお PLC δ 1 遺伝子欠損マウスで K1 が発現していたこの部位は、HE 染色により観察された有棘細胞や顆粒細胞といった分化した表皮角化細胞により毛管が塞がれている部位と一致してい

た (図 6D)。さらに、本来は表皮の分化した表皮角化細胞にしか発現のみられない loricrin (lor)も PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの毛包内に発現が見られた(図 8H 矢印)。以上の結果は PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの毛包が表皮様に分化している事を強く示唆するものであると考えられた。

さらに野生型マウスでは毛包の外根鞘にしか発現していないはずのサイトケラチン 6 (K6)が PLC δ 1 遺伝子欠損マウスでは表皮にも発現していることも明らかになった (図 8E、F)。このような K6 の表皮における発現は表皮角化細胞が異常増殖、異常分化をおこしている際に観察されるという報告もあり (Porter *et al.*, 1998)、実際に PLC δ 1 遺伝子欠損マウスが表皮の肥厚や表皮角化細胞の増殖能の亢進などを示していることとよく一致していた。

5) 生後 8 日目のマウス皮膚における PLC δ 1 の発現

PLC δ 1 遺伝子欠損マウスが表皮、毛包の分化、増殖異常を示したので、次に実際に PLC δ 1 が表皮や毛包に存在するのか否かを明らかにするために、PLC δ 1 を認識するポリクローナル抗体を作製し、この抗体を用いた免疫組織染色を行った(図 9A-C)。その結果、野生型マウスの皮膚では角質層を除く表皮の全層と毛包の上部に PLC δ 1 の強い発現が認められた (図 9A)。また、ネガティブコントロールとして用いた PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚切片を用いた免疫組織染色 (図 9B)および、予め抗原により吸収を行った抗体を用いた免疫組織染色 (図 9C)においては陽性の染色像が観察されなかった事から、PLC δ 1 に対する免疫組織染色の特異性も確認された。

6) PLC δ 1 遺伝子欠損マウス由来初代培養表皮角化細胞におけるカルシウムシグナルの異常

表皮角化細胞は培養液中のカルシウム濃度を上昇させることにより細胞分化を誘導できることが知られている。そこで、PLC δ 1 が表皮角化細胞の分化のどの段階に関与しているのかを知るために、野生型マウスの表皮角化細胞をカルシウムにより分化誘導した後の PLC δ 1 の発現様式を調べてみた(図 10A)。その結果、PLC δ 1 は、分化誘導をしていない表皮角化細胞や分化誘導をかけて 24 時間以内の表皮角化細胞ではほとんど発現していないのに対し、分化誘導をかけて 48 時間以降より発現がみられるようになり、分化誘導後 72 時間で発現量が最大となることが明らかになった。また、他の PLC のアイソザイムであり、表皮角化細胞の増殖、分化において重要な役割を担っていることが既に報告されている PLC γ 1 (Punnonen *et al.*, 1993; Xie and Bikle, 1999)についても調べてみたところ、PLC γ 1 は PLC δ 1 のように細胞分化に伴って大きく発現量が増加することはな

かった。

次に PLC δ 1 の発現量が最大となる分化誘導後 72 時間の野生型および PLC δ 1 遺伝子欠損マウスから得た初代培養表皮角化細胞を用いて PLC の主な下流経路のひとつであるカルシウムシグナルの解析を試みた。表皮角化細胞では細胞外のカルシウム濃度を上げることにより、細胞膜に存在する G 蛋白質共役型受容体であるカルシウム感受性受容体やカチオンチャネルなどを介して細胞内カルシウム動員が誘導されることが知られている。そこで、野生型および PLC δ 1 遺伝子欠損マウス由来初代培養表皮角化細胞を用いて、細胞外のカルシウム濃度を上げた際の細胞内のカルシウム濃度の変化を検討した(図 10B)。その結果、PLC δ 1 遺伝子欠損マウス由来の細胞では無刺激時の細胞内カルシウム濃度が野生型マウス由来の細胞と比較し、わずかに低い様子が観察された(野生型マウス由来細胞が 158 nM であるのに対し PLC δ 1 遺伝子欠損マウス由来の細胞では 93 nM であった)。カルシウムによる刺激を加えると、PLC δ 1 遺伝子欠損マウス由来細胞の細胞内カルシウム濃度は刺激後 50 秒で最大となり (834 nM)、野生型マウス由来の細胞の細胞内カルシウム濃度は刺激後 140 秒で最大となった (1004 nM)。野生型マウス由来の細胞の細胞内カルシウム濃度が最大となる刺激後 140 秒の時点では PLC δ 1 遺伝子欠損マウス由来細胞の細胞内カルシウム濃度は既に 597 nM に低下していた。さらに、刺激後 240 秒後になると、PLC δ 1 遺伝子欠損マウス由来細胞の細胞内カルシウム濃度は 453 nM にまで低下しているのに対し、野生型マウス由来の細胞の細胞内カルシウム濃度は未だ 917 nM という高い値を示していた。以上の結果より、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスより得た表皮角化細胞では、刺激直後のカルシウム濃度上昇は野生型の細胞と同様に見られるものの、その後の持続性カルシウム濃度の上昇が見られなくなる事が明らかになった。さらに、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの細胞にアデノウイルスベクターにより PLC δ 1 を再導入した際のカルシウム刺激に対する細胞内のカルシウム濃度の変化を検討した。その結果、PLC δ 1 を再導入することにより、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの細胞においても野生型マウスの細胞と同様な持続性のカルシウム濃度上昇が観察されるようになることが確認された(図 10C)。

PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの表皮角化細胞において持続性のカルシウム濃度上昇が見られなくなっていることが明らかになったので、次に細胞内カルシウム動員の下流経路として、表皮角化細胞分化にその活性上昇が必要であり (Santini *et al.*, 2001)、持続性の細胞内のカルシウム濃度の上昇により活性化されること (Dolmetsch *et al.*, 1997)も知られている nuclear factor of activated T cells (NFAT)の活性をルシフェラーゼアッセイにより検討した(図 10D)。その結果、野生型マウスの細胞では、細胞分化に伴い大きく NFAT 活性が上昇するのに対

し (分化誘導 48 時間後では 15.2 倍、72 時間後では 12.7 倍)、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの細胞では野生型マウスの細胞ほど大きな NFAT 活性の上昇は観察されなかった (分化誘導 48 時間後では 6.7 倍、72 時間後では 4.9 倍)。また、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの細胞にアデノウイルスベクターにより PLC δ 1 を再導入することにより、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの細胞においても野生型マウスの細胞と同様に細胞分化に伴う大きな NFAT 活性上昇が観察されるようになる事も確認された。

7) 生後 8 日目の PLC δ 1 遺伝子欠損マウス皮膚における PKC および nuclear factor- κ B (NF- κ B)の活性化の抑制

次に、もう一つの PLC 下流シグナルであり、表皮角化細胞の増殖分化制御に重要であることが知られている PKC の活性化能およびその下流シグナルについて検討してみた。PKC は活性化により PKC 内に存在するある特定の配列がリン酸化を受ける事が知られているため (Keranen *et al.*, 1995)、まず、野生型および PLC δ 1 遺伝子欠損マウス皮膚において PKC の活性化状態を見る目的で、活性化によりリン酸化を受けた PKC を特異的に認識する抗体を用いた免疫組織染色を行った。その結果、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの表皮および毛包の上部ではリン酸化を受けた PKC のシグナルが顕著に減少していることが明らかになった (図 11A, B)。次に、皮膚の抽出液を用いたウエスタンブロッティングにより、活性型リン酸化 PKC および PKC 各アイソザイムの発現量を検討してみた。その結果、組織染色の結果と同様に PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚抽出液においては活性型リン酸化 PKC の量が減少していることが明らかになった。しかしながら、PKC 各アイソザイムの発現量を調べたところ、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚抽出液においては PKC 各アイソザイム自体の量も減少しており、低分子量に PKC 各アイソザイムの分解産物と思われるシグナルが検出された (図 11C)。この事から、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚において観察された活性型リン酸化 PKC の減少は、必ずしも PLC δ 1 欠損による PLC 活性低下に伴う直接的な PKC 活性化抑制のみによるものではなく、より複雑なシグナル経路が関与している事が示唆された。

次に、PKC やカルシウムにより活性が制御されていることが知られており (Hughes *et al.*, 1998; Jang *et al.*, 2001; Kanke *et al.*, 2001; Vancurova *et al.*, 2001)、表皮角化細胞の分化に重要であることが報告されている (van Hogerlinden *et al.*, 1999; Kaufman and Fuchs, 2000; Schmidt-Ullrich *et al.*, 2001) NF- κ B の活性化状態を検討してみる事にした。NF- κ B は活性化に伴い核へ移行することが知られているので (Verma *et al.*, 1995; Beg and Baltimore,

1996)、NF- κ B 抗体を用いた皮膚切片の免疫組織染色により表皮、毛包上部におけるNF- κ B の局在を調べた。その結果、野生型マウスの表皮および毛包上部ではNF- κ B の核局在が多くの細胞で観察されるのに対し(図 12A 矢印)、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの表皮および毛包上部ではNF- κ B の核局在がほとんど観察されないことが明らかになった(図 12B)。さらに、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスで見られたNF- κ B 活性低下が不十分なPKC 活性によるものであるのか否かを明らかにするために、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚をPKC の活性化剤であるPMA 処理した後のNF- κ B の局在を調べてみた。その結果、PMA 処理後は、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの表皮においても非常に多くの細胞でNF- κ B の核局在が観察された(図 12C、D)。このことから、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスで見られたNF- κ B 活性低下にはPKC 活性の低下が関与していることが強く示唆された。

8) 生後 15 日目の PLC δ 1 遺伝子欠損マウス皮膚の形態異常

生後 15 日目以降になると、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚の形態異常はより顕著となり、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚では野生型と比べ脂腺が非常に大きくなっている様子が観察された(図 13C、D 矢印)。また、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚では、空胞様の構造物(cyst)が多数存在する様子も観察された(図 13B、F)。このようなcyst の形成は野生型マウスの皮膚ではまったく観察されなかった(図 13A)。このcyst を外側から中心へ向かって観察してみると、中心に角質様の物が存在し、その外側に顆粒層様の細胞層が存在するなど、正常な表皮と非常によく似た層構造を成していることが明らかになった(図 13 E、F)。生後 25 日目になると野生型マウスの皮膚では、毛周期が二周期目に入り、成長期の毛包が多く観察されるのに対し(図 13G)、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚では毛包が原形をとどめなくなり多数の毛包由来のcyst が観察されるのみとなった(図 13H)。

9) PLC δ 1 遺伝子欠損マウス皮膚において見られる cyst と正常表皮との類似性

さらに、電子顕微鏡において、cyst と正常表皮の構造を比較してみたところ、cyst には表皮有棘層特異的に見られるデスモソームや顆粒層特異的に存在するケラトヒアリン顆粒が観察され、電子顕微鏡レベルにおいてもcyst と正常表皮は同様な層構造を成していることが明らかになった(図 13I、J)。

次に、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚において見られた毛包由来のcyst の性質をさらに詳細に調べるために、cyst における各種分化マーカー蛋白質の発現を検討した(図 14A-N)。その結果、cyst では、外側から中心に向かい、K5、K1、loricrin の順に各分化マーカーが発現している様子が観察された(図 14D、

B、H)。この様な分化マーカーの発現様式は、正常な表皮において基底層から角質層へ向かいこれらの分化マーカーが発現していく際と同様なものであり（図 14C、A、G）、分化マーカーの発現様式という観点からも PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚において見られた cyst は正常な表皮と非常によく似ていることが明らかになった（図 14M、N）。

次に、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚において生じるこれらの毛包由来の cyst が毛包としての性質を維持しているのかをヘアケラチン（AE13）および内根鞘（AE15）を特異的に認識する抗体を用いた免疫組織染色により検討してみた。その結果、野生型マウスの正常な毛包においてはこれらのマーカーの強い発現が見られるのに対し（図 14I、K）、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚に存在する cyst では毛包特異的な分化マーカーの発現がほとんど見られなくなっていた（図 14J、L）。このことから、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚において観察された cyst は表皮としての性質を有しているのみではなく、毛包としての性質を失っているということが明らかになった。

10) PLC δ 1 遺伝子欠損マウス皮膚における表皮、脂腺の性質を有する皮膚腫瘍の形成

PLC δ 1 遺伝子欠損マウスのうちの一部のマウスでは、自然発生的な皮膚良性腫瘍が観察された（図 15A-J）。この腫瘍の組織切片を作製し観察を行ったところ、この腫瘍は巨大な cyst（図 15C 矢印）と多くの脂腺や表皮に良く似た細胞により構成されている（図 15D 矢印）ことが明らかになった。また、脂腺に含まれる中性脂質を染色する色素であるオイルレッド O（図 15E、F）や表皮の分化マーカーである K1 の抗体による染色（図 15I、J）を行ったところ、腫瘍を構成する細胞の多くが染色される様子が観察された。このことから、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚において観察されたこれらの腫瘍は、表皮と脂腺の性質を有する腫瘍であることが明らかになった。

11) PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスの作製

PLC δ 1 は広い組織分布を示すにも関わらず、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスには皮膚以外に目立った表現型が観察されなかった。その原因のひとつとして、PLC δ 3 という PLC δ 1 にもっとも配列相同性が高く（図 16A）、組織分布も非常に類似している（図 16B）PLC アイソザイムが PLC δ 1 欠損を相補してしまっている可能性が考えられた。そこで、次に、PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスを作製することにした。PLC δ 3 単独の遺伝子欠損マウスは外見上、目立った異常は見られず（図 16C）、稔性であったため、PLC δ 3 遺伝子欠損マウスと PLC δ 1 遺伝子欠損マウスを用い

て PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスを作製した。PLC δ 1^{-/-}PLC δ 3^{+/-}の遺伝子型を持つマウス間の交配の結果、PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスは得られず(表 2)、このことから PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスは致死であることが明らかになった。

12) PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスは胎生 11.5 日から 13.5 日において致死となる

次に、PLC δ 1^{-/-}PLC δ 3^{+/-}の遺伝子型を持つマウス間の交配により得られた胎児の遺伝子型を発生時期をおって解析した(表 2)。その結果、PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスは胎生 10.5 日目までは、目立った異常を示す事なくメンデル律に従った比率で生存していた。しかしながら胎生 11.5 日目では 43%の PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウス胎児の死亡が観察され、胎生 12.5 日目になると死亡した PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスの割合は増加し 56%となった。さらに、胎生 13.5 日目では全てのマウスが死亡もしくは重度の貧血状態を示していた。

次に、各発生時期における野生型および PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウス胎児の外見を観察したところ、胎生 11.5 日目では PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウス胎児には心停止している胎児はいるものの、外見上、野生型および PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウス胎児の間に顕著な差は見られなかった(図 17A、B)。しかしながら、胎生 12.5 日目では、PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウス胎児では心停止している胎児の比率が増加し、野生型と比べ体の大きさの小さい胎児が多く見られるようになった(図 17C、D)。また、PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウス胎児の卵黄嚢では血管や血球の減少も観察された(図 17E、F)。

13) PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスでは血管の発生異常が観察された

胎生中期において致死となる遺伝子改変マウスにおいてしばしば血管発生異常が観察される。そこで、PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスについても血管発生に異常が見られるか否かを血管内皮細胞のマーカーである CD31 に対する抗体を用いた染色により検討してみた。その結果、胎生 12.5 日目の野生型マウスの頭部血管は、太い血管と細い血管が滑らかに繋がった形態をしているのに対し、PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスの頭部血管は全般的に太く、不自然な形態をしている様子が観察された(図 17G、H)。さらに胎生 12.5 日目における卵黄嚢についても同様な検討を行なったところ、野生型マウスの卵黄嚢では太い血管と細い血管からなる複雑なネットワーク構造が観察されるのに対し、PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスの卵黄嚢では太い血管と細い血管の差があまり見られず、比較

的単純な血管構造しか見られないことが明らかになった(図 17I、J)。しかしながら、これらの頭部、卵黄嚢における血管発生の異常は、既に心停止した PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスにおいてのみ観察された現象であったため、この表現型が胎児死亡に伴い二次的に見られるものである可能性が考えられた。

14) PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスの胎盤ラビリンス層における血管腔の減少

PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスにおいて血管発生異常の他に胎生致死の原因となりうる表現型が存在するかを調べるために、まず、ウエスタンブロッティングにより PLC δ 1 や PLC δ 3 が胎児および胎児外組織のどこに存在しているのかを検討した(図 18A)。その結果、PLC δ 1、PLC δ 3 とも胎盤に非常に多く発現していることが明らかになった。マウスの胎盤は母側部位と胎児側部位よりなる組織であり、胎児側胎盤は主にトロホブラストと呼ばれる細胞により構成されている。そこで、トロホブラストにおける PLC δ 1 と PLC δ 3 の発現をウエスタンブロッティングにより検討した(図 18B)。その結果、PLC δ 1 と PLC δ 3 とも他の細胞株と比べトロホブラストに多く発現していることが明らかになった。また、胎盤の凍結切片を用い、PLC δ 1 の存在部位を免疫組織染色で検討したところ、胎盤全体において PLC δ 1 の強い発現が観察された(図 18C)。

次に、PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスの胎児側胎盤の形態を HE 染色により検討した。マウスの胎児側胎盤は胎児側から外側に向かって、ラビリンス層、スポンジオトロホブラスト層、ジャイアントトロホブラスト層といった層構造をなしている(Simmons *et al.*, 2005)。このうちラビリンス層には胎児側血管と母側血管が入り組むように存在しており、母体-胎児間の栄養交換の場となっている(図 19A)。そこで、ラビリンス層に着目して胎盤の形態観察を行なったところ、PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスに異常の見られない胎生 10.5 日のラビリンス層では野生型、PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスとも多くの血管腔が観察されたものの(図 19B、C、F)、PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスが死亡しはじめる胎生 11.5 日の PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスラビリンス層では野生型マウスと比べ血管腔が顕著に減少していることが明らかになった(図 19D、E、F)。

15) PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスの胎盤ラビリンス層における細胞増殖、細胞死の異常

PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスの胎盤ラビリンス層において血管腔の減少が観察されたので、次に胎盤ラビリンス層における細胞増殖能を BrdU の取り込みを指標として検討した。その結果、PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスの胎盤ラビリンス層では BrdU を取り込んだ細胞が野生型と比べ、少ないことが明らかになっ

た(図 20A、B)。

次に、TUNEL 染色により胎盤ラビリンス層における細胞死を検討した。その結果、野生型マウスの胎盤ラビリンス層では TUNEL 染色陽性の細胞がほとんど検出されないのに対し、PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスの胎盤ラビリンス層では細長い形態をした細胞が TUNEL 染色陽性となっている様子が観察された(図 20C、D、E)。また、TUNEL 染色で陽性となった細胞を HE 染色により観察を行なったところ、これらの細胞は血管腔を取り囲むように存在していることが明らかになった(図 20F)。さらに、細胞死を起こしている細胞を特定するために、電子顕微鏡による観察を行なった。その結果、PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスの胎盤ラビリンス層では、血管内皮細胞は比較的正常に存在しているのに対し、その外側に位置するトロホブラストでは、核の空胞化や細胞の断片化が観察され、細胞死をおこしていた(図 20G-J)。

16)四倍体キメラ法による PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスの胎生致死回避

ここまでの解析より、PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスの胎盤ラビリンス層において細胞増殖、細胞死の異常を伴う血管腔の減少が観察されることが明らかになったが、これらの現象が胎盤自体の異常に由来するものなのか、それとも血管発生異常などの他の異常による胎児の死亡に伴って生じる二次的な現象なのかを明らかにするために、四倍体キメラ法を用いた。四倍体キメラ法とは四倍体の胚と二倍体の胚を融合させると四倍体の胚は胎児外組織に分化し、二倍体の胚は胎児自体に分化するという原理を用いた方法である(James *et al.*, 1995)。今回は四倍体の胚として野生型マウスを二倍体の胚として PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスを用いることにより、胎盤は野生型であり胎児自体でのみ PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子を欠損させたマウスを作製した(図 21A)。四倍体キメラ法を用いない場合、PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスは胎生 13.5 日までに全ての胎児が死亡もしくは重度の貧血状態を示すため、四倍体キメラ法により作製した PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウス胎児を胎生 14.5 日で採取し、その状態を観察してみた。その結果、四倍体キメラ法を用いて作製された PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスは胎生 14.5 日においても外見上目立った異常を示さず正常に生存していることが明らかになった(図 21B-D)。このことは、PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスに野生型の胎盤を供給する事で胎生 13.5 日目までの胎生致死を回避できる事を示しており、PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスの致死の原因は胎盤の異常であることを明確に示すものであると考えられる。また、胎盤ラビリンス層における血管腔減少も四倍体キメラ法を用いて作製した PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスでは観察されず、野生型マウスと同様に多くの血管腔が存在していることも確認された(図 21E)。

考察

本研究において、私は PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの表現型として、表皮の肥厚、毛管の閉塞、脂腺の肥大、表皮様 cyst の形成、表皮、脂腺の性質を有する自然発生的皮膚良性腫瘍の形成という現象を見い出した。PLC δ 1 は皮膚以外の組織にも比較的広く分布しているため (図 4)、皮膚以外の発現量の多い組織に異常が見られないかを切片作製、観察により組織学的に検討してみたが、明確な異常は見い出されなかった。皮膚のみにしか表現型が見られなかった理由として他の PLC アイソザイムによる機能相補が考えられる。実際、PLC δ 1 と非常に類似したアミノ酸配列、組織分布を有する PLC δ 3 に着目し、PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウス作製により機能相補の可能性を検討したところ、PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスは胎生致死となり、PLC δ 1 欠損が部分的に PLC δ 3 により機能相補されていることが明らかになった。

表皮は構成細胞である表皮角化細胞の増殖と分化の精密なバランス制御により、基底層、有棘層、顆粒層、角質層といった層構造を構築、維持している。PLC δ 1 遺伝子欠損マウスにおいて観察された表皮の肥厚は、主に有棘層の増加によるものであり、この層を構成する細胞は、増殖の盛んな基底層から離れ、増殖を停止し分化を開始する時期にある細胞である。この細胞層が増加しているということは、基底層から離れた細胞が増殖能を維持してしまっている事、もしくは、有棘層から顆粒層、角質層といったさらに分化の進んだ細胞への移行が上手く行えていない事を示唆するものである。表皮肥厚の原因がこのいずれ(もしくは両方)であろうとも、この表現型は PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの表皮角化細胞が増殖から分化へうまく移行できていない事を示すものであり、PLC δ 1 は本来、表皮において表皮角化細胞の増殖分化のバランス制御という生理機能を有しているものと考えられる。

表皮角化細胞においては、少なくとも 5 種類の PKC アイソザイム (PKC α 、PKC δ 、PKC ϵ 、PKC η 、PKC ζ) が存在しており、それらは表皮角化細胞の増殖分化制御において中心的な役割を果たしていることが知られている (Dlugosz and Yuspa, 1993)。PKC にはカルシウムイオンと DAG により活性化される型、カルシウムイオンには依存せず、DAG により活性化される型およびカルシウムイオン、DAG ともに依存しない型のアイソザイムが存在しており、活性制御機序より考えると、前者二つの型の PKC が PLC の下流候補となると考えられる。PLC δ 1 遺伝子欠損マウス表皮および毛包上部においては活性型リン酸化 PKC の存在はほとんど観察されなかった。表皮および毛包上部といった部位は PLC δ 1 が多く発現

している領域であることから (図 9)、活性型リン酸化 PKC の減少と PLC δ 1 欠損との間に密接な因果関係が存在することが強く示唆される。活性型リン酸化 PKC の減少は PKC 各アイソザイム自体の分解、減少によるものであると推測され、その詳細な機構は不明である。しかしながら、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚において見られたような PKC の分解、減少は、皮膚以外の PLC δ 1 に富む組織である精巣や心臓では見られなかった事から PLC δ 1 は皮膚組織特異的に何らかの機構を介して、PKC の安定化、分解を制御しているのかもしれない。

PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚では表皮や毛包上部における NF- κ B の核局在がほとんど見られない様子も観察された。NF- κ B は表皮角化細胞の増殖、分化を制御しており、表皮角化細胞では、正常な細胞分化に NF- κ B の活性化が必要であることが知られている (Seitz *et al.*, 1998)。それゆえ、NF- κ B の活性化の抑制が PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚における表皮の肥厚や毛包の形態異常の一因である可能性がある。さらに、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚における NF- κ B 核局在の抑制は PKC の活性化剤である PMA 処理により回復することから、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚における不十分な PKC 活性が NF- κ B 活性抑制を引き起こしているのかもしれない。

PLC δ 1 遺伝子欠損マウス由来初代培養表皮角化細胞においてカルシウム刺激後の持続性の細胞内カルシウム濃度上昇および持続性のカルシウム濃度上昇により活性化され得る NFAT の活性上昇が抑制されている事が観察された。表皮角化細胞はカルシウム刺激により、細胞表面に存在するカルシウム感受性受容体などを介し細胞内で PLC の活性化が引き起こされることが知られている (Hebert and Brown, 1995; Chattopadhyay *et al.*, 1996)。また、最近になり PLC アイソザイムのうちの一つである PLC γ 1 が細胞外カルシウム刺激に対する細胞内カルシウム濃度上昇に重要であることが報告された (Xie and Bikle, 1999)。PLC γ 1 が存在するにも関わらず PLC δ 1 遺伝子欠損マウス由来初代培養表皮角化細胞において細胞内カルシウム濃度上昇の抑制が観察された理由としては PLC γ 1 と PLC δ 1 では細胞内カルシウム濃度上昇の際に担っている役割が異なっているという仮説が考えられる。即ち PLC γ 1 は細胞内カルシウム上昇においてトリガーとしての役割をはたしており、刺激により、まず PLC γ 1 が活性化され、IP $_3$ 産生を介し、一過性に細胞内カルシウム濃度を上昇させる。その後、PLC γ 1 による一過性のカルシウム濃度上昇により、カルシウムに対する感受性が高く、低濃度のカルシウムによっても活性化され得る PLC δ 1 が活性化され、さらに大きな細胞内カルシウム濃度上昇や持続性の細胞内カルシウム濃度上昇が引き起こされる (Allen *et al.*, 1997; Rhee and Bae, 1997; Kim *et al.*, 1999)。実際に、PLC δ 1 遺伝子欠損マウス由来初代培養表皮角化細胞において観察された表現型はこの

仮説とよく合致するものであると考えられる。また、PLC δ 1 遺伝子欠損マウス由来初代培養表皮角化細胞ではカルシウムやその下流シグナルの異常が見られるにも関わらず、表皮分化マーカーの発現様式および細胞増殖能に関しては野生型マウス由来の細胞と明確な差は見られなかった。その理由としては、PLC δ 1 遺伝子欠損による、カルシウム動員低下や NFAT 活性上昇抑制が表皮角化細胞の分化に影響を及ぼすには不十分であるという事が考えられる。つまり、カルシウム動員や NFAT 活性化は表皮角化細胞の分化には必須であるが、これらのシグナルは非常に強く抑制されない限りは表皮角化細胞の分化には影響は及ぼさず、PLC δ 1 遺伝子の欠損では表皮角化細胞分化に影響を及ぼし得るほど強いシグナルの抑制を生じることが出来ないと推測される。実際に、シクロスポリン A により NFAT 活性を 30 %程度にまで抑制した場合でも表皮角化細胞の分化マーカーの発現抑制は見られず、分化マーカーの発現抑制には NFAT 活性をほぼ 0 %にまで抑制しなくてはならない事が報告されている (Santini *et al.*, 2001)。PLC δ 1 遺伝子欠損マウス由来初代培養表皮角化細胞では、分化、増殖能には異常は見られなかったが、分化、増殖以外の今回検討できなかった何らかの機能 (細胞死、細胞接着能、周辺細胞に対する働きかけなど) にカルシウムシグナルを介して異常が生じている可能性も考えられる。

PLC δ 1 の上流シグナルはカルシウム以外ほとんど解明されていないが、遺伝子欠損マウスの表現型の特徴よりいくつかの事が推測される。PLC δ 1 遺伝子欠損マウスで観察される体毛の減少には個体により程度の差が存在し、また背部皮膚より腹部皮膚や前後脚の付け根、目の周辺でより顕著な体毛の減少が観察された。これらの部位の共通点として考えられる事の一つは物理的刺激をより多く受ける事である。この事から、PLC δ 1 の上流シグナルとして何らかの物理的ストレス応答経路が関与している可能性も考えられる。また、皮膚は比較的、マウスの遺伝的背景による影響を受け易い組織であることが知られており、多くの遺伝子改変マウスで皮膚の表現型が遺伝的背景依存的に観察されるという現象が報告されている。そこで実際に 129 系統と C57BL/6J 系統との混血であった PLC δ 1 遺伝子欠損マウスを C57BL/6J へと戻し交配 (8 世代) を行い PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの遺伝的背景を C57BL/6J へと統一したところ、体毛の減少の程度が軽減される傾向が見られた。このことから、PLC δ 1 遺伝子欠損による皮膚の表現型はある程度、マウスの遺伝的背景に依存するものであり、マウスの表現型の程度の決定には PLC δ 1 遺伝子欠損に加えて何らかの要素が関わっているのかもしれない。

生後 15 日目以降になると PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚では脂腺の肥大、毛包由来表皮様 cyst の形成といった異常が観察された。皮膚の表皮系成分

(毛包間表皮、脂腺、毛包)はbulgeと呼ばれる部位に存在する同一の幹細胞に由来していることが知られており (Taylor *et al.*, 2000; Watt and Hogan, 2000; Oshima *et al.*, 2001)、bulge より上へ移動して行く細胞は毛包間表皮や脂腺に分化し、下へ移動して行く細胞は毛包へと分化する (図 22A)。PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚において観察された脂腺の肥大、表皮様 cyst の形成といった異常は幹細胞から毛包への分化が抑制され、幹細胞が表皮、脂腺へとより偏って分化していることを示唆するものである。さらに、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚では自然発生的な皮膚腫瘍が観察された。皮膚の表皮系成分は、幹細胞以外の細胞は増殖、分化により、速やかに入れ替わっている。腫瘍形成には細胞が複数の変異を蓄積する事が必要であると考えられており、表皮のような細胞の入れ替わりが速い組織で腫瘍形成を引き起こせる細胞は主に幹細胞である可能性が高いと考えられる (Jensen *et al.*, 1999; Taipale and Beachy, 2001)。さらに、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚で観察された腫瘍は表皮や脂腺の性質を有したものであり、このことは、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚では幹細胞から毛包への分化が抑制され、幹細胞が表皮、脂腺へとより偏って分化するという前述の仮説とよく一致したものである。以上を考えあわせると、PLC δ 1 は本来、表皮系幹細胞の分化の方向性を制御しており、PLC δ 1 存在下では幹細胞が表皮、毛包、脂腺へとバランスよく分化していくのに対し、PLC δ 1 欠損下では、毛包への分化が抑制され、表皮、脂腺への分化が促進され、脂腺の肥大、表皮様 cyst の形成、表皮や脂腺の性質を持った腫瘍の形成といった異常を引き起こす事が強く示唆される (図 22B)。

PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚で観察された毛包由来表皮様 cyst の形成という現象は、RXR α (Li *et al.*, 2000)や VDR (Li *et al.*, 1997)といった核内受容体を欠損したマウスや β -catenin 欠損マウスをはじめとした、Wnt シグナリングを抑制するような変異を有するマウスでも観察される (Huelsenken *et al.*, 2001 Merrill *et al.*, 2001; Niemann *et al.*, 2002)。これらのタンパク質と PLC δ 1 の直接的な関与は不明であるが、これらのタンパク質は、遺伝子の転写制御に関わるものであることから、PLC δ 1 も直接的、もしくは間接的に表皮系幹細胞の分化制御に関与するなんらかの遺伝子の転写を制御しているのかもしれない。

私は本研究において PLC δ 1 が表皮系幹細胞の分化制御を介し、表皮、毛包の形態維持に重要な役割を果たしているという新たな知見を得ることができた。表皮系幹細胞の分化制御のメカニズムを明らかにすることは、基礎研究にとどまらず、美容分野や医療分野における火傷治療など、多くの分野への応用、発展に繋がるものであると考えられる。それゆえ、PLC δ 1 がどのようなメカニズムによって表皮系幹細胞の分化制御を行っているのかを明らかにすることは非常に重要

な事であり、今後、取り組むべき課題である。

また、本研究により、PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスは胎盤ラビリンス層の血管腔減少により胎生 11.5 日から 13.5 日において致死となることが明らかになった。PLC δ 3 単独の遺伝子欠損マウスは外見上、顕著な異常を示さなかったが、表現型の有無の決定には、より詳細な組織学および機能的な解析が必要であると考えられる。

胎生 10.5 日目においては PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスにおいても胎盤ラビリンス層に血管腔が正常に存在しているため、PLC δ 1 と PLC δ 3 は胎生 10.5 日目までの胎盤発生には必須ではなく、胎生 11.5 日目以降の胎盤構造の形成や維持に必須であることが強く示唆された。

PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスの胎盤ラビリンス層において細胞死をおこしている細胞は主に細長い形態をした細胞であった。また、これらの細胞は血管腔に沿うように存在している様子が観察された。このことより、血管腔に沿うように存在している細胞の細胞死により、血管腔が維持できなくなり、PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスの胎盤ラビリンス層では血管腔が減少するという可能性が考えられる。また、PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスの胎盤ラビリンス層における細胞増殖能の減少は血管腔減少により栄養供給不良がおきたことによる二次的な現象なのかもしれない。

電子顕微鏡観察の結果、細胞死をおこしている細胞はトロホブラストであることが判明した。トロホブラストは血管新生因子の分泌により血管内皮細胞の増殖、生存を促進することが報告されているなど (Zhou *et al.*, 2003)、胎盤ラビリンス層の血管腔の形成、維持に必須であると考えられる。それゆえ、トロホブラストの細胞死が、胎盤ラビリンス層の構造異常の主要な原因である可能性が高いと考えられる。

PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスのうちの一部のマウスでは胎盤ラビリンス層の血管腔減少の他に胎児自体および卵黄嚢の血管発生異常も観察された。しかしながら、これらの異常は、既に心臓が停止している PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスのみにはしか見られなく、四倍体キメラ法により作製された PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスにも観察されなかったことから、胎児死亡に伴う二次的な現象であると考えられる。

胎盤ラビリンス層血管腔の減少を示すマウスの中には Rho キナーゼ 2 や RhoGAP の一つである p122RhoGAP の遺伝子欠損マウスが含まれる (Durkin *et al.*, 2005; Thumkeo *et al.*, 2003)。RhoA が PLC δ 1 の酵素活性を阻害すること (Hodson *et al.*, 1998)、また、p122RhoGAP が PLC δ 1 と直接に結合し、酵素活性を上昇させること (Homma *et al.*, 1995; Sekimata *et al.*, 1999) を考えると、

PLC δ 1 や PLC δ 3 は Rho シグナリングを介して胎盤発生の制御を行なっているのかもしれない。

本研究において、四倍体キメラ法により作製された PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスは胎生 14.5 日を超えて生存できることが明らかになったが、胎生 14.5 日目以降、どのステージまで発生が進行可能であるかは現在までのところ明らかになっていない。今後、四倍体キメラ法により作製された PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスの胎生 14.5 日目以降でのさらなる解析が必要であると考えられる。

PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスにおいて異常の見られたトロホブラストは、マウス発生上、もっとも早く分化し、機能しはじめる上皮系細胞である。また、PLC δ 1 単独の遺伝子欠損マウスでも上皮系細胞である表皮角化細胞に異常が見られたことを考えると、PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子は上皮系細胞の正常な形態、機能の維持に必須なのかもしれない。今後、他の上皮系細胞についても機能解析を進めて行く予定である。

引用文献

Allen, V., Swigart, P., Cheung, R., Cockcroft, S. and Katan, M. (1997) Regulation of inositol lipid-specific phospholipase cdelta by changes in Ca²⁺ ion concentrations. *Biochem. J.*, **327**, 545-552.

Beg, A.A. and Baltimore, D. (1996) An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science*, **274**, 782-784.

Berridge, M.J. and Irvine, R.F. (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, **312**, 315-321.

Chattopadhyay, N., Mithal, A. and Brown, E.M. (1996) The calcium-sensing receptor: a window into the physiology and pathophysiology of mineral ion metabolism. *Endocr. Rev.*, **17**, 289-307.

Dlugosz, A.A. and Yuspa, S.H. (1993) Coordinate changes in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C. *J. Cell Biol.*, **120**, 217-225.

Dolmetsch, R.E., Lewis, R.S., Goodnow, C.C. and Healy, J.I. (1997) Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature*, **386**, 855-858.

Durkin, M. E., M. R. Avner, C. G. Huh, B. Z. Yuan, S. S. Thorgeirsson, and N. C. Popescu. (2005). DLC-1, a Rho GTPase-activating protein with tumor suppressor function, is essential for embryonic development. *FEBS Lett.*, **579**, 1191-1196.

Fukami, K., Nakao, K., Inoue, T., Kataoka, Y., Kurokawa, M., Fissore, R.A., Nakamura, K., Katsuki, M., Mikoshiba, K., Yoshida, N. and Takenawa, T. (2001) Requirement of phospholipase Cdelta4 for the zona pellucida-induced acrosome reaction. *Science*, **292**, 920-923.

- Hashimoto, A., Takeda, K., Inaba, M., Sekimata, M., Kaisho, T., Ikehara, S., Homma, Y., Akira, S. and Kurosaki, T. (2001) Cutting edge: essential role of phospholipase C-gamma 2 in B cell development and function. *J. Immunol.*, **165**, 1738-1742.
- Hebert, S.C. and Brown, E.M. (1995) The extracellular calcium receptor. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**, 484-492.
- Hodson, E. A., C. C. Ashley, A. D. Hughes, and J. S. Lymn. (1998) Regulation of phospholipase C-delta by GTP-binding proteins-rhoA as an inhibitory modulator. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1403**, 97-101.
- Homma, Y., and Y. Emori. (1995) A dual functional signal mediator showing RhoGAP and phospholipase C-delta stimulating activities. *EMBO J.*, **14**, 286-291.
- Huelsken, J., Vogel, R., Erdmann, B., Cotsarelis, G. and Birchmeier, W. (2001) beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell*, **105**, 533-545.
- Hughes, K., Antonsson, A. and Grundstrom, T. (1998) Calmodulin dependence of NFkappaB activation. *FEBS Lett.*, **441**, 132-136.
- James, R. M., A. H. Klerkx, M. Keighren, J. H. Flockhart, and J. D. West. (1995) Restricted distribution of tetraploid cells in mouse tetraploid<=>diploid chimaeras. *Dev. Biol.*, **167**, 213-226.
- Jang, M.K., Goo, Y.H., Sohn, Y.C., Kim, Y.S., Lee, S.K., Kang, H., Cheong, J. and Lee, J.W. (2001) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV stimulates nuclear factor-kappa B transactivation via phosphorylation of the p65 subunit. *J. Biol. Chem.*, **276**, 20005-20010.
- Jensen, U.B., Lowell, S. and Watt, F.M. (1999) The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis. *Development*,

126, 2409-2418.

Jiang, H., Kuang, Y., Wu, Y., Xie, W., Simon, M.I., Wu, D. (1997) Roles of phospholipase C beta2 in chemoattractant-elicited responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**, 7971-7975.

Ji, Q.S., Winnier, G.E., Niswender, K.D., Horstman, D., Wisdom, R., Magnuson, M.A., Carpenter, G. (1997) Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C-gamma1 in mammalian growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**, 2999-3003.

Kanke, T., Macfarlane, S.R., Seatter, M.J., Davenport, E., Paul, A., McKenzie, R.C. and Plevin, R. (2001) Proteinase-activated receptor-2-mediated activation of stress-activated protein kinases and inhibitory kappa B kinases in NCTC 2544 keratinocytes. *J. Biol. Chem.*, **276**, 31657-31666.

Kaufman, C.K. and Fuchs, E. (2000) It's got you covered. NF-kappaB in the epidermis. *J. Cell Biol.*, **149**, 999-1004.

Keranen, L. M., Dutil, E. M., and Newton, A. C. (1995). Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr. Biol.* **5**, 1394-1403.

Kim, D., Jun, K.S., Lee, S.B., Kang, N.G., Min, D.S., Kim, Y.H., Ryu, S.H., Suh, P.G. and Shin, H.S. (1997) Phospholipase C isozymes selectively couple to specific neurotransmitter receptors. *Nature*, **389**, 290-293.

Kim, Y.H., Park, T.J., Lee, Y.H., Baek, K.J., Suh, P.G., Ryu, S.H. and Kim, K.T. (1999) Phospholipase C-delta1 is activated by capacitative calcium entry that follows phospholipase C-beta activation upon bradykinin stimulation. *J. Biol. Chem.*, **274**, 26127-26134.

Lee, W.K., Kim, J.K., Seo, M.S., Cha, J.H., Lee, K.J., Rha, H.K., Min, D.S., Jo, Y.H. and Lee, K.H. (1999) Molecular cloning and expression analysis of a

mouse phospholipase C- δ 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **261**, 393-399.

Li, M., Indra, A.K., Warot, X., Brocard, J., Messaddeq, N., Kato, S., Metzger, D. and Chambon, P. (2000) Skin abnormalities generated by temporally controlled RXR α mutations in mouse epidermis. *Nature*, **407**, 633-636.

Li, Y.C., Pirro, A.E., Amling, M., Delling, G., Baron, R., Bronson, R. and Demay, M.B. (1997) Targeted ablation of the vitamin D receptor: an animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**, 9831-9835.

Merrill, B.J., Gat, U., DasGupta, R. and Fuchs, E. (2001) Tcf3 and Lef1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin. *Genes Dev.*, **15**, 1688-1705.

Nakamura, Y., Fukami, K., Yu, H., Takenaka, K., Kataoka, Y., Shirakata, Y., Nishikawa, S.I., Hashimoto, K., Yoshida, N., and Takenawa, T. (2003) Phospholipase C δ 1 is required for skin stem cell lineage commitment. *EMBO J.*, **22**, 2981-2991.

Nakamura, Y., Hamada, Y., Fujiwara, T., Enomoto, H., Hiroe, T., Tanaka, S., Nose, M., Nakahara, M., Yoshida, N., Takenawa, T., and Fukami, K. (2005) Phospholipase C δ 1 and δ 3 Are Essential in Trophoblast for Placental Development. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 10979-10988.

Niemann, C., Owens, D.M., Hulsken, J., Birchmeier, W. and Watt, F.M. (2002) Expression of DeltaN Δ Lef1 in mouse epidermis results in differentiation of hair follicles into squamous epidermal cysts and formation of skin tumours. *Development*, **129**, 95-109.

Nishizuka, Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*, **334**, 661-665.

Oshima, H., Rochat, A., Kedzia, C., Kobayashi, K. and Barrandon, Y. (2001)

Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell*, **104**, 233-245.

Porter, R.M., Reichelt, J., Lunny, D.P., Magin, T.M. and Lane, E.B. (1998) The relationship between hyperproliferation and epidermal thickening in a mouse model for BCIE. *J. Invest. Dermatol.*, **110**, 951-957.

Punnonen, K., Denning, M., Lee, E., Li, L., Rhee, S.G. and Yuspa, S.H. (1993) Keratinocyte differentiation is associated with changes in the expression and regulation of phospholipase C isoenzymes. *J. Invest. Dermatol.*, **101**, 719-726.

Rhee, S.G. and Bae, Y.S. (1997) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.*, **272**, 15045-15048.

Santini, M.P., Talora, C., Seki, T., Bolgan, L. and Dotto, G.P. (2001) Cross talk among calcineurin, Sp1/Sp3, and NFAT in control of p21(WAF1/CIP1) expression in keratinocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **98**, 9575-9580.

Schmidt-Ullrich, R., Aebischer, T., Hulsken, J., Birchmeier, W., Klemm, U. and Scheidereit, C. (2001) Requirement of NF-kappaB/Rel for the development of hair follicles and other epidermal appendices. *Development*, **128**, 3843-3853.

Seitz, C.S., Lin, Q., Deng, H. and Khavari, P.A. (1998) Alterations in NF-kappaB function in transgenic epithelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF-kappaB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **95**, 2307-2312.

Sekimata, M., Y. Kabuyama, Y. Emori, and Y. Homma. (1999) Morphological changes and detachment of adherent cells induced by p122, a GTPase-activating protein for Rho. *J. Biol. Chem.*, **274**, 17757-17762.

Simmons, D. G., and J. C. Cross. (2005) Determinants of trophoblast lineage and cell subtype specification in the mouse placenta. *Dev. Biol.*, **284**, 12-24.

- Suh, P.G., Ryu, S.H., Choi, W.C., Lee, K.Y. and Rhee, S.G. (1988) Monoclonal antibodies to three phospholipase C isozymes from bovine brain. *J. Biol. Chem.*, **263**, 14497–14504.
- Taipale, J. and Beachy, P.A. (2001) The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature*, **411**, 349–354.
- Taylor, G., Lehrer, M.S., Jensen, P.J., Sun, T.T. and Lavker, R.M. (2000) Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell*, **102**, 451–461.
- Thumkeo, D., J. Keel, T. Ishizaki, M. Hirose, K. Nonomura, H. Oshima, M. Oshima, M. M. Taketo, and S. Narumiya. (2003) Targeted disruption of the mouse rho-associated kinase 2 gene results in intrauterine growth retardation and fetal death. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 5043–5055.
- Vancurova, I., Miskolci, V. and Davidson, D. (2001) NF-kappa B activation in tumor necrosis factor alpha-stimulated neutrophils is mediated by protein kinase Cdelta. Correlation to nuclear Ikappa Balpha. *J. Biol. Chem.*, **276**, 19746–19752.
- van Hogerlinden, M., Rozell, B.L., Ahrlund-Richter, L. and Toftgard, R. (1999) Squamous cell carcinomas and increased apoptosis in skin with inhibited Rel/nuclear factor-kappaB signaling. *Cancer Res.*, **59**, 3299–3303.
- Verma, I.M., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., Van Antwerp, D. and Miyamoto, S. (1995) Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.*, **9**, 2723–2735.
- Watt, F.M. and Hogan, B.L. (2000) Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*, **287**, 1427–1430.
- Xie, W., Samoriski, G.M., McLaughlin, J.P., Romoser, V.A., Smrcka, A., Hinkle, P.M., Bidlack, J.M., Gross, R.A., Jiang, H. and Wu, D. (1999) Genetic

alteration of phospholipase C beta3 expression modulates behavioral and cellular responses to mu opioids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **96**, 10385–10390.

Xie, Z. and Bikle, D.D. (1999) Phospholipase C-gamma1 is required for calcium-induced keratinocyte differentiation. *J. Biol. Chem.*, **274**, 20421–20424.

Zhou, Y., Bellingard, V., Feng, K. T., McMaster, M., and Fisher, S. J. (2003). Human cytotrophoblasts promote endothelial survival and vascular remodeling through secretion of Ang2, PlGF, and VEGF-C. *Dev. Biol.*, **263**,114–125.

図の説明

図 1. PLC 各アイソザイムの構造

(A). 活性化された PLC は、PIP₂ を分解し、二つのセカンドメッセンジャーである、IP₃ と DG を産生する。前者は小胞体からカルシウムイオンの遊離を促し、後者は PKC を活性化するなどし、様々な細胞応答を促す

(B) 全ての PLC は酵素活性を司る X ドメイン、Y ドメインや、PH ドメイン(ζ型を除く)、EF ハンドモチーフ、C2 ドメインといったドメインを共通して有している。この他にβ型 PLC は C 末端に PDZ ドメインを持ち、γ型 PLC は SH2 ドメイン、SH3 ドメインを持つ。またε型 PLC は RasGEF ドメイン(CDC25 相同ドメイン)、RA ドメインを持つ。

図 2. 表皮および毛包の構造

(A) 表皮の層構造および分化マーカーの発現様式。K5: サイトケラチン 5、K1: サイトケラチン 1、inv: involucrin、lor: lorierin。

(B) 毛包の構造。

図 3. PLCδ1 遺伝子欠損マウスの作製

(A) X ドメイン、Y ドメインをコードしている一連のエクソンをネオネオマイシン耐性遺伝子(neo)で置換した。組み換え体検出の際に用いる Dra I サイト (D) および 3' probe の位置が示されている。

(B) Dra I、3' probe を用いたサザンブロッティングによる PLCδ1 遺伝子欠損の確認。+/+、+/-、-/- はそれぞれ野生型、ヘテロ接合体、ホモ接合体を示す。

(C) 精巣抽出液を用いた PLCδ1 抗体によるウエスタンブロッティング。

図 4. PLCδ1 のマウスにおける組織分布

マウス各組織抽出液 20 μg を用いて PLCδ1 抗体によりウエスタンブロッティングを行った。ローディングコントロールとして actin 抗体を用いたウエスタンブロッティングも行った。

図 5. PLCδ1 遺伝子欠損マウスにおいて観察される体毛の顕著な減少

(A、B) 野生型(+/+)、PLCδ1 遺伝子欠損(-/-)マウスの背側(A)、腹側(B)の皮膚の外見。

(C) 野生型(+/+)、PLCδ1 遺伝子欠損(-/-)マウス新生児の皮膚片をヌードマウ

スの背中へ移植し 14 日後の移植片の外見。

図 6. 生後 8 日目の野生型および PLC δ 1 遺伝子欠損マウス皮膚切片の HE 染色

(D)の矢印で示されている部位に毛管の閉塞が観察される。

(C)、(D)の両頭矢印の幅は角質層を除いた表皮の幅を示している。縮尺は(A)、(B)は(A)に示されており 100 μ m。(C)、(D)は(C)に示されており 50 μ m。

図 7. 生後 8 日目のマウス皮膚における細胞増殖能の検討

野生型(A)および PLC δ 1 遺伝子欠損(B)マウス皮膚での BrdU を取り込んだ細胞の染色。矢印で示されている細胞が BrdU を取り込んだ細胞のうちのいくつかの細胞である。

(C)視野あたりの BrdU を取り込んだ細胞の数。値は、三匹の異なるマウスより作製した三つの切片から各 10 視野ずつ計測することにより算出した。

縮尺は(A)、(B)は(A)に示されており 50 μ m。

図 8. 生後 8 日目のマウス皮膚における各種分化マーカーの発現様式

緑が各分化マーカー抗体のシグナルであり赤は核のカウンター染色である。野生型(A、C、E、G)および PLC δ 1 遺伝子欠損(B、D、F、H)マウス皮膚の免疫蛍光染色。(B、H)の矢印の部位で毛包内に表皮特異的分化マーカーが発現している様子が観察される。縮尺は (A)に示されており 100 μ m。

図 9. 生後 8 日目のマウス皮膚における PLC δ 1 の発現部位の検討

生後 8 日目の野生型(A)、PLC δ 1 遺伝子欠損(B)マウス皮膚を用いた PLC δ 1 抗体による免疫組織染色。(C)では野生型マウスの皮膚に対し、予め抗原により吸収した抗体を用いて免疫組織染色を行っている。縮尺は(A)に示されており 50 μ m。

図 10. 初代培養表皮角化細胞を用いたカルシウムシグナルの解析

(A) カルシウムによる 0、24、48、72、96 時間の分化誘導に伴う PLC δ 1、PLC γ 1、involucrin (inv)、loricrin (lor)の発現量変化をウエスタンブロッティングにより検討した。actin はローディングコントロールである。

(B) 分化誘導 72 時間後の野生型 (+/+)および PLC δ 1 遺伝子欠損 (-/-)マウス由来の初代培養表皮角化細胞をカルシウムにより刺激した際の細胞内カルシウム濃度変化の解析。

(C) アデノウイルスベクターを用いて、GFP (Ad-GFP)もしくは GFP- PLC δ 1 (Ad-GFP-PLC δ 1)を導入した分化誘導 72 時間後の PLC δ 1 遺伝子欠損マウス由来初代培養表皮角化細胞をカルシウム刺激した際の細胞内カルシウム濃度変化の解析。縦軸の値は無刺激時の 340 nm の蛍光強度を 380 nm の蛍光強度で割った値を 1 として算出した。

(D) 野生型 (+/+)および PLC δ 1 遺伝子欠損 (-/-)マウス由来の初代培養表皮角化細胞、アデノウイルスベクターを用いて、GFP (Ad-GFP)もしくは GFP-PLC δ 1 (Ad-GFP-PLC δ 1)を導入した PLC δ 1 遺伝子欠損マウス由来の初代培養表皮角化細胞における細胞分化に伴う NFAT リポーター活性変化の検討。値は未分化時のそれぞれの細胞の NFAT リポーター活性を 1 として算出した。

図 11. 生後 8 日目のマウス皮膚における PKC 活性化状態の検討

(A、B) リン酸化型 PKC を特異的に認識する抗体による、野生型(A)および PLC δ 1 遺伝子欠損(B)マウス皮膚の免疫組織染色。緑が抗体のシグナルで赤が核のカウンター染色。縮尺は (A)に示されており 50 μ m。

(C) 野生型(+/+)および PLC δ 1 遺伝子欠損(-/-)マウス皮膚抽出液を用いた、リン酸化型 PKC (phosphoPKC (pan))および各 PKC アイソザイム(PKC α 、 δ 、 ζ 、 η)の発現量のウエスタンブロッティングによる解析。矢頭で示されている移動度のバンドが全長のリン酸化型 PKC および各 PKC アイソザイム。矢印で示されている移動度のバンドは分解物と推測される。actin はローディングコントロールである。

図 12. 生後 8 日目のマウス皮膚における NF- κ B 活性化状態の検討

(A、B) NF- κ B p50 サブユニット抗体による、野生型(A)および PLC δ 1 遺伝子欠損(B)マウス皮膚の免疫組織染色。(A)の矢印で示されている細胞では NF- κ B の核局在が観察される。

(C、D) 1 μ g/ml PMA で皮膚を二時間処理した後に NF- κ B p65 サブユニット抗体を用いて、野生型(C)および PLC δ 1 遺伝子欠損(D)マウス皮膚の免疫組織染色を行った。縮尺は (A)に示されており 50 μ m。

図 13. 生後 15 日目以降の PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚異常の解析

(A-F) 生後 15 日目の野生型(A、C、E) PLC δ 1 遺伝子欠損(B、D、F)マウス皮膚切片の HE 染色。(C、D)に示されている矢印は脂腺である。(E)に示されている矢印は正常な表皮の顆粒細胞層。(F)に示されている矢印は PLC δ 1 遺伝子欠損マウス皮膚の cyst において観察される顆粒細胞層とよく似た細胞層。

(G、H) 生後 25 日目の野生型(G) および PLC δ 1 遺伝子欠損(H)マウス皮膚切

片の HE 染色。

(I, J) 電子顕微鏡観察による正常表皮(I)と PLC δ 1 遺伝子欠損マウス皮膚の cyst (J)の構造の比較。(I, J)に示されている矢印はデスモゾームであり、矢頭はケラトヒアリン顆粒である。縮尺は(A, B, G, H)は(A)に示されており 100 μ m。(C, D, F)は(C)に示されており 50 μ m。(E)は 50 μ m。(I, J)は(I)に示されており 2 μ m。

図 14. PLC δ 1 遺伝子欠損マウス皮膚の cyst における分化マーカーの発現様式の検討

(A-H) 生後 15 日目の野生型(A, C, E, G)および PLC δ 1 遺伝子欠損(B, D, F, H)マウス皮膚切片の K1 (A, B)、K5 (C, D)、K6 (E, F)、loricrin (G, H)抗体を用いた免疫組織染色。緑が各抗体のシグナルで赤が核のカウンター染色である。(B, H)に示されている矢印は PLC δ 1 遺伝子欠損マウス皮膚の cyst における K1 (B)および loricrin (H)の発現を示している。

(I-L) 生後 15 日目の野生型(I, K)および PLC δ 1 遺伝子欠損(J, L)マウス皮膚切片の AE13 (I, J)、AE15 (K, L)抗体を用いた免疫組織染色。緑が各抗体のシグナルで赤が K5 抗体によるカウンター染色である。(M, N) PLC δ 1 遺伝子欠損マウス皮膚の cyst における分化マーカーの発現様式を示した模式図。

縮尺は (A-H) では (A) に示されており 100 μ m。(I-L) では (I) に示されており 50 μ m。

図 15. 一部の PLC δ 1 遺伝子欠損マウスでは自然発生的な皮膚腫瘍が観察された

(A, B) PLC δ 1 遺伝子欠損マウスの皮膚腫瘍の外見。(A, B)の矢印で示されている部分が腫瘍である。

(C, D) PLC δ 1 遺伝子欠損マウス皮膚腫瘍切片の HE 染色。(C)の矢印で示されているものが巨大な cyst である。(D)の矢印で示されている細胞が、脂腺細胞によく似た細胞である。

(E-J) PLC δ 1 遺伝子欠損マウス皮膚腫瘍切片の oil red O 染色(E, F)および、K1 抗体(G, H)、K5 抗体(I, J)による免疫組織染色。縮尺は (C)は 200 μ m。(D, H)では(D)に示されており 25 μ m。(E)は 100 μ m。(F, J)では(F)に示されており 50 μ m。(G, I)では(G)に示されており 50 μ m。

図 16. PLC δ 1 と PLC δ 3 の配列および組織分布類似性

(A)マウス PLC δ 1 と PLC δ 3 のアミノ酸配列相同性。数値は、全アミノ酸に占める

類似アミノ酸の割合(%)。

(B)マウス各組織を用いたウエスタンブロッティングによる PLC δ 1、PLC δ 3 の発現検討。

(C)野生型(PLC δ 3^{+/+})および PLC δ 3 遺伝子欠損(PLC δ 3^{-/-})マウスの外見。

図 17. PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスでは血管発生の異常が観察された

(A-F)胎児および卵黄囊の外見。胎生 11.5 日のコントロール(A)および PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損(B)マウスの胎児の外見。胎生 12.5 日のコントロール(C)および PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損(D)マウスの胎児の外見。胎生 12.5 日のコントロール(E)および PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損(F)マウスの卵黄囊の外見。

(G-J)胎生 12.5 日目の胎児の頭部および卵黄囊血管の CD31 抗体による染色。コントロールマウスの頭部血管は太い血管と細い血管からなる滑らかなネットワーク構造を示している(G 矢印)。PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウス頭部血管は全般的に太く、不規則な形態をしている(H 矢印)。コントロールマウスの卵黄囊の血管は太い血管(I 矢印)と細い血管(I 矢頭)からなる複雑な構造をしている。PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスの卵黄囊の血管は太い血管と細い血管の区別がはっきりせず、比較的単純な構造をしている(J 矢頭)。

図 18. PLC δ 1、 δ 3 は胎盤組織およびトロホプラストに多く発現していた

(A)胎児および胎児外組織を用いたウエスタンブロッティングによる PLC δ 1、 δ 3 の発現検討。

(B)トロホプラストおよび種々の細胞株を用いたウエスタンブロッティングによる PLC δ 1、 δ 3 の発現検討。

(C)胎生 11.5 日目の野生型(WT)および PLC δ 1 遺伝子欠損(PLC δ 1KO)マウス胎盤凍結切片を用いた、抗 PLC δ 1 ポリクローナル抗体による免疫組織染色。縮尺は左 2 枚の写真では一番左の写真に示されており 100 μ m。一番右の写真では 50 μ m。

図 19. PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスの胎盤における血管腔の減少

(A) マウス胎盤の構造。

(B、C)コントロール(B)および PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損(C)マウスの胎生 10.5 日目の胎盤ラビリンス層の HE 染色。矢印で示されているのが胎児側血管であり矢頭で示されているのが母側血管である。

(D、E)コントロール(D)および PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損(E)マウスの胎生 11.5 日目の胎盤ラビリンス層の HE 染色。矢印で示されているのが胎児側血管であり矢

頭で示されているのが母側血管である。縮尺は(D)に示されており 50 μm 。
(F)胎生 10.5 日と胎生 11.5 日の胎盤ラビリンス層全面積に占める、血管腔の割り合い。

図 20. PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスにおける細胞増殖、細胞死の異常

(A、B)BrdU 取り込みによるコントロール(A)および PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウス(B)の胎盤ラビリンス層の細胞増殖能の検討。

(C-F)TUNEL 染色(C-E)および HE 染色(F)によるコントロール(C)および PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウス(D-F)の胎盤ラビリンス層における細胞死の検出。(E)は(D)の四角で囲まれている部位の拡大図。(E、F)の矢印で示されている細胞が細胞死を起こした細胞である。

(G-J)コントロール(G)および PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウス(H-J)の胎盤ラビリンス層の電子顕微鏡による観察。e は胎児側血管、m は母側血管を表している。(H-J) の矢頭で示されているのが血管内皮細胞、アスタリスクで示されているのが、トロホブラストの断片化である(H、I)の矢印で示されているのがトロホブラストに観察される核の空胞化である。

縮尺は(A、B)は(A)に示されており 100 μm 。(C、D)は(C)に示されており 100 μm 。(E、F)は 50 μm 。(G、H、I)は 2 μm 。(J)は 1 μm 。

図 21. 四倍体キメラ法による PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスの致死回避

(A)四倍体キメラ法の概略。二倍体(2N)の胚を電気融合により四倍体(4N)にし、2N の胚と融合させ、キメラマウスを作製すると 4N の胚由来の細胞は胎児外組織に分化し、2N の胚由来の細胞は胎児自体に分化する性質を利用し、4N の野生型の胚と 2N の PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損胚を融合させ、胎盤は野生型で胎児自体は PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損のキメラマウスを作製した。

(B)胎生 14.5 日目における四倍体キメラ法により作製したマウスの遺伝子型。

(C、D)四倍体キメラ法により作製したコントロール (C)および PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損 (D)マウスの胎生 14.5 日目における外見。

(E) PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスと四倍体キメラ法(4N)により作製した PLC δ 1/ δ 3 両遺伝子欠損マウスにおける胎盤ラビリンス層全面積に占める、血管腔の割り合い。

図 22. PLC δ 1 遺伝子欠損マウス表現型の仮説モデル

(A) bulge より出て上へ向かって移動する細胞は、毛包間表皮や脂腺へと分化し、上へ移動する細胞は毛包へと分化する。

(B) 野生型マウスでは幹細胞が表皮、脂腺、毛包へとバランスよく分化するが、PLC δ 1 遺伝子欠損マウスでは幹細胞から毛包への分化が抑制され、種々の表現型が生じている。

謝辞

本研究を行うにあたり、常に適切なご指導を下さいました東京大学医科学研究所教授竹縄忠臣博士に深く感謝いたします。また、本研究を行うにあたり、実験手技についてのご指導をはじめとし、終始懇切丁寧なご助言をいただいた東京薬科大学教授の深見希代子博士に深く感謝いたします。また、遺伝子欠損マウスの作製において技術的な支援をいただきました東京大学医科学研究所の吉田進昭教授、片岡由紀氏、竹中圭博士に深く感謝いたします。愛媛大学橋本公二教授、白方裕司博士には表皮角化細胞の培養法についてご指導をいただきました。感謝いたします。理化学研究所発生・再生総合研究センターの西川伸一教授には皮膚の組織学的解析についてご助言をいただきました。感謝いたします。自然科学研究機構濱田義雄博士、廣江猛氏には四倍体キメラ作製において技術的な支援をいただきました。感謝いたします。愛媛大学藤原隆博士、能勢真人教授には電子顕微鏡による胎盤の組織学的解析について技術的な支援をいただきました。感謝いたします。東京大学田中智博士には培養トロホブラスト細胞サンプルを提供していただきました。感謝いたします。そして所属研究室でありました東京大学医科学研究所腫瘍分子医学研究分野の皆様および東京薬科大学生命科学部ゲノム情報学研究室の皆様には常に有益な議論および温かなご支援をいただきました。深く感謝いたします。最後に、私が研究生活を送るにあたり私の家族より日々最大限の支援をいただきました。深く感謝いたします。

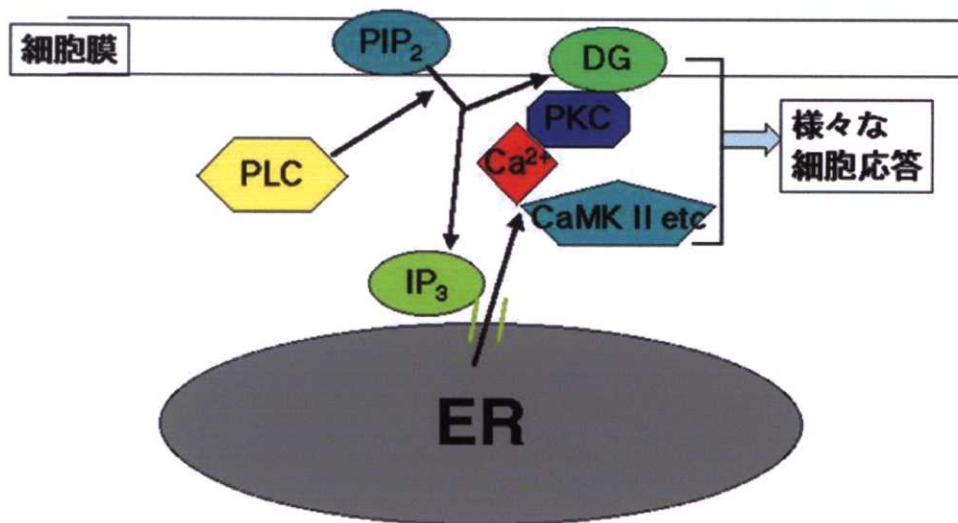
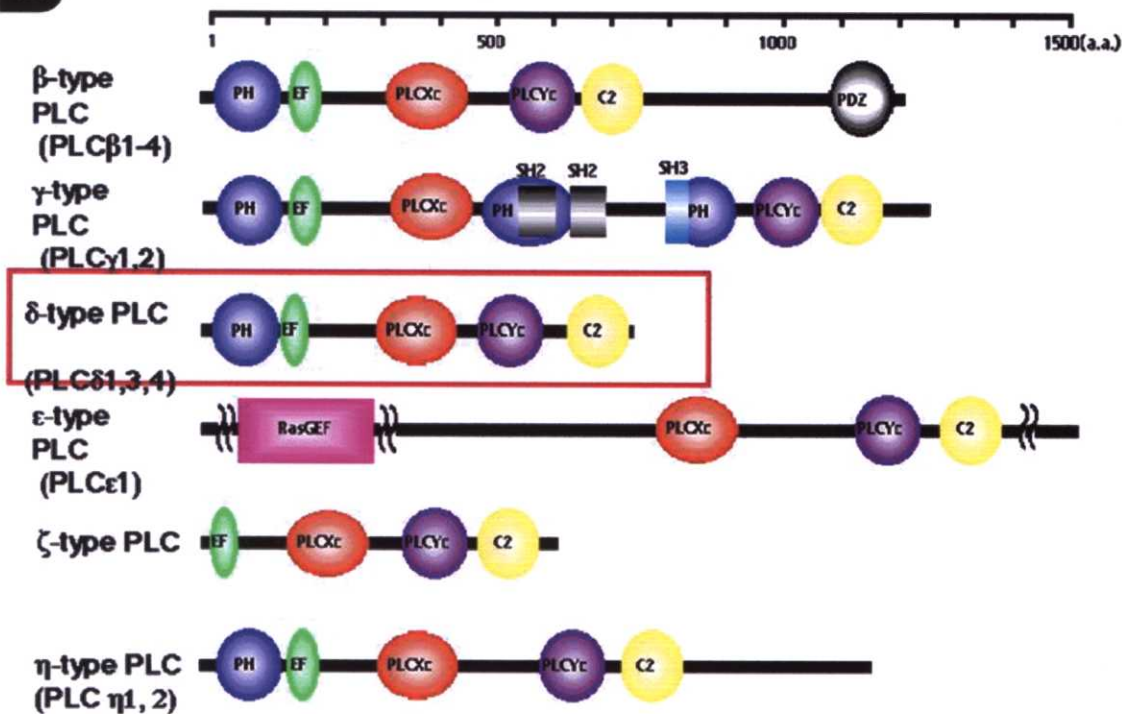
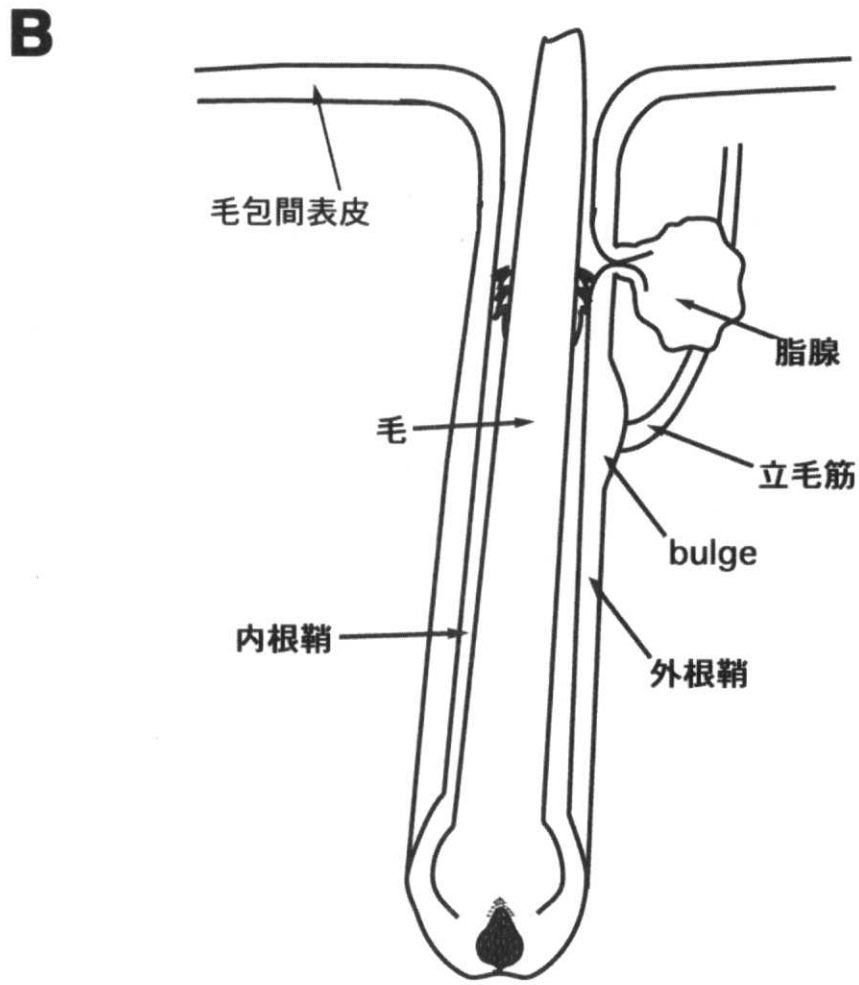
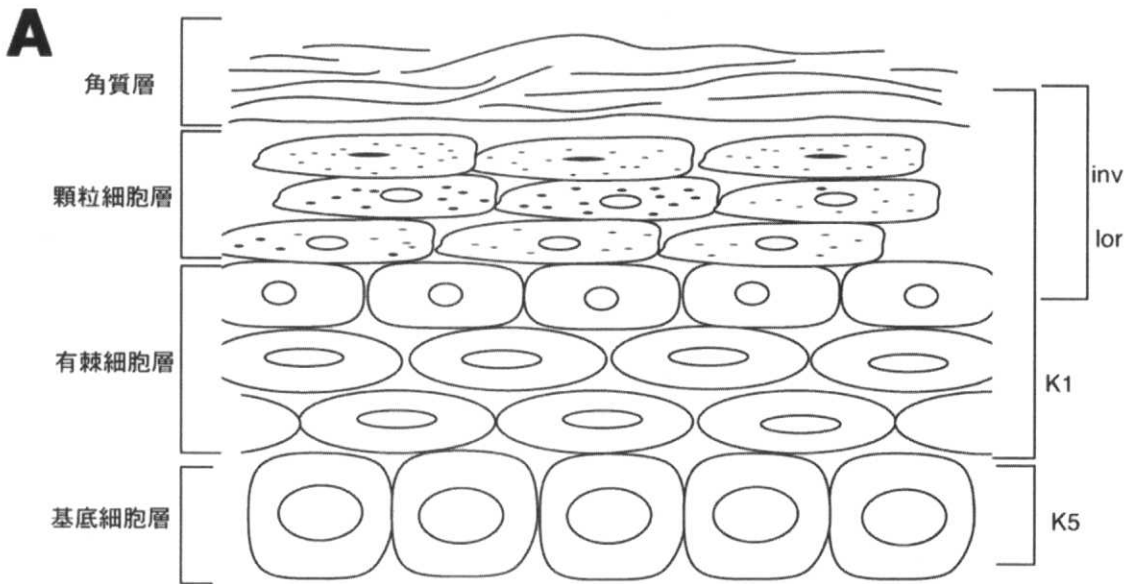
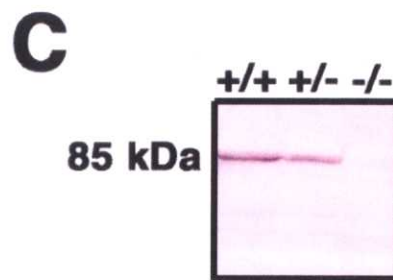
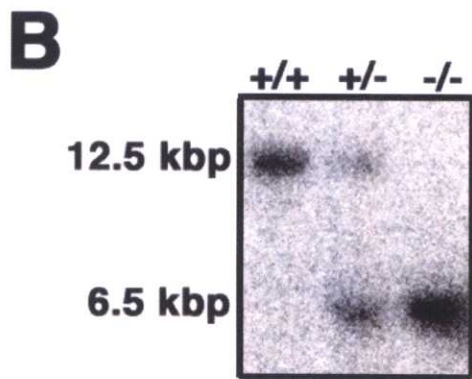
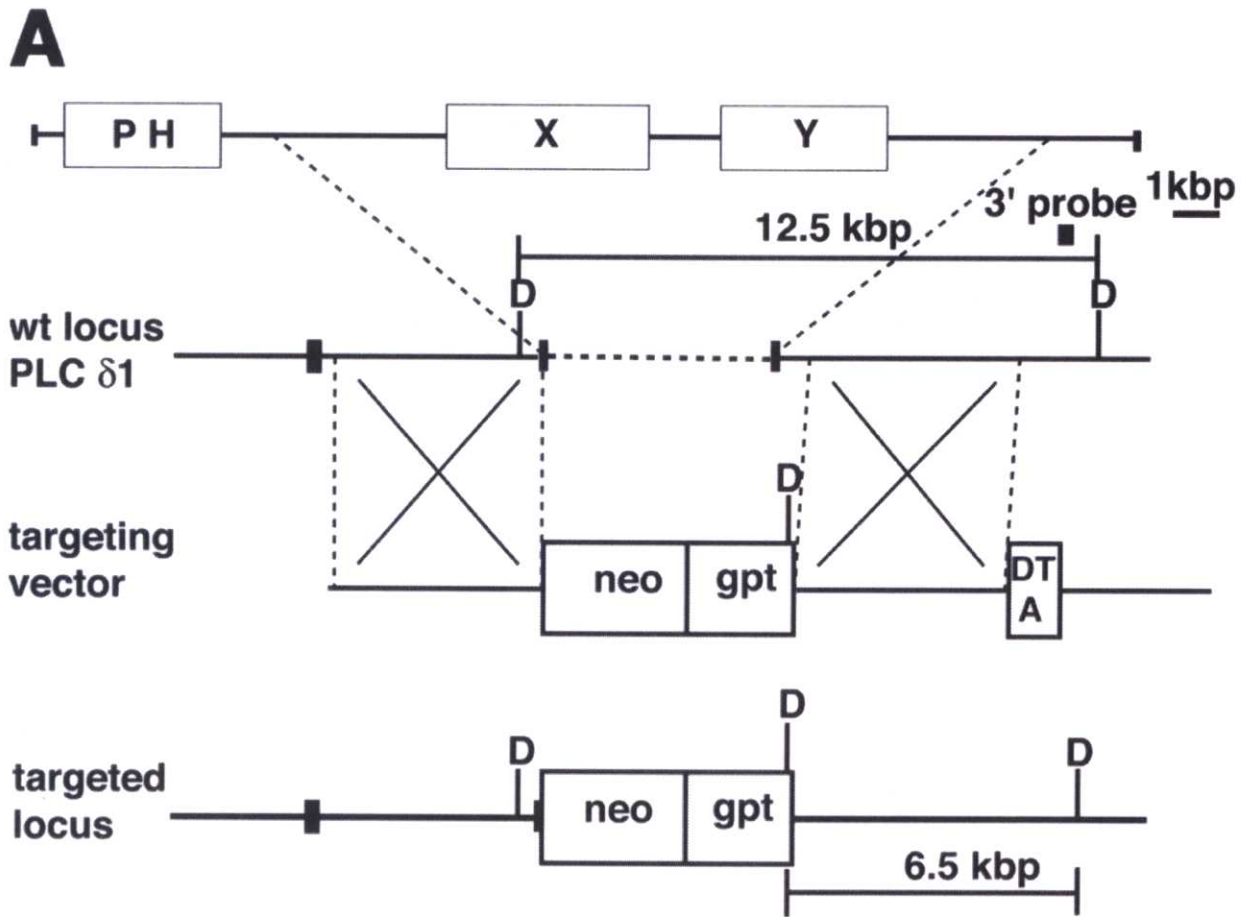
A**B**

図 1





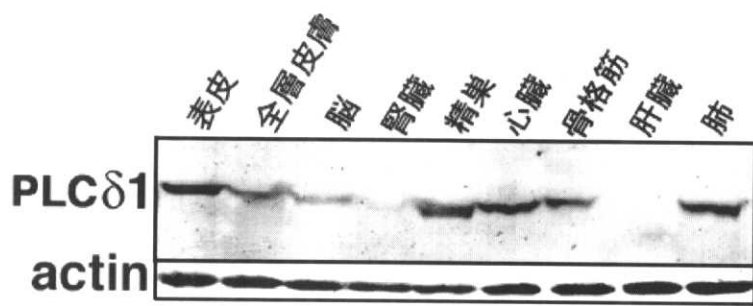
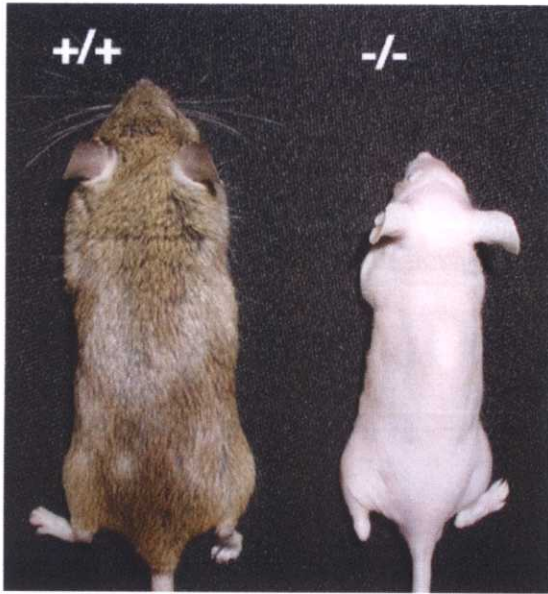
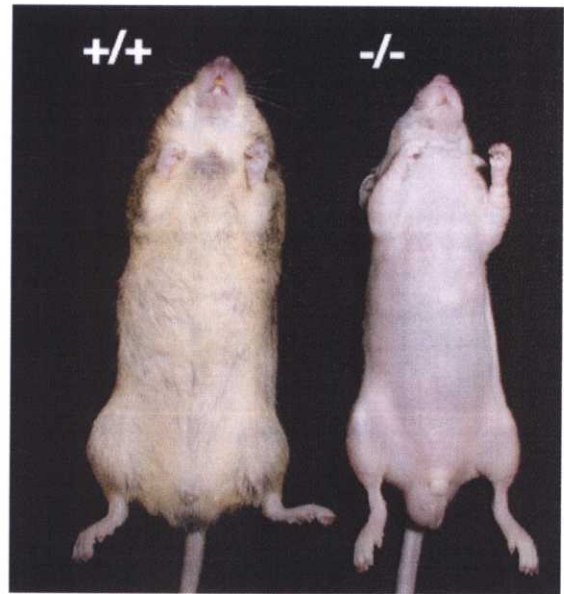
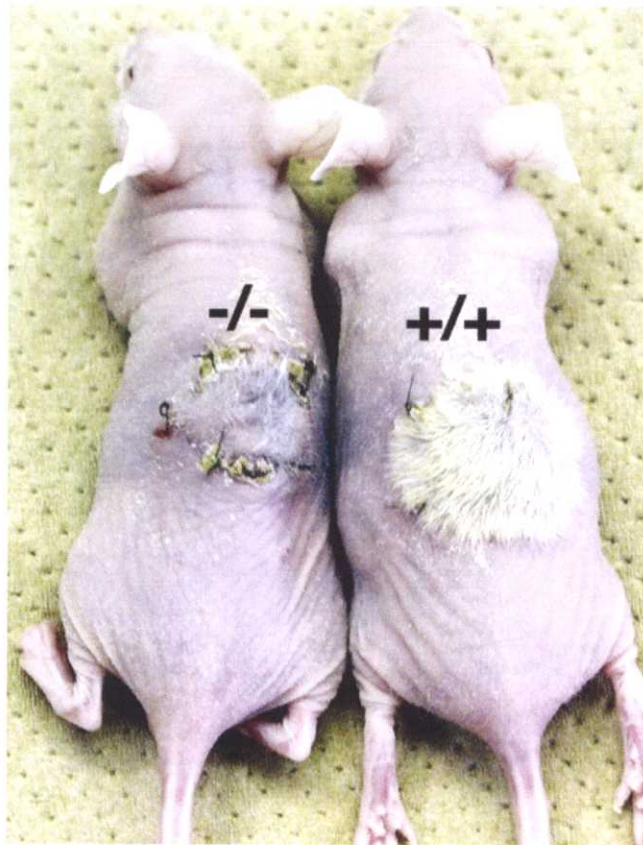


图 4

A**B****C****图 5**

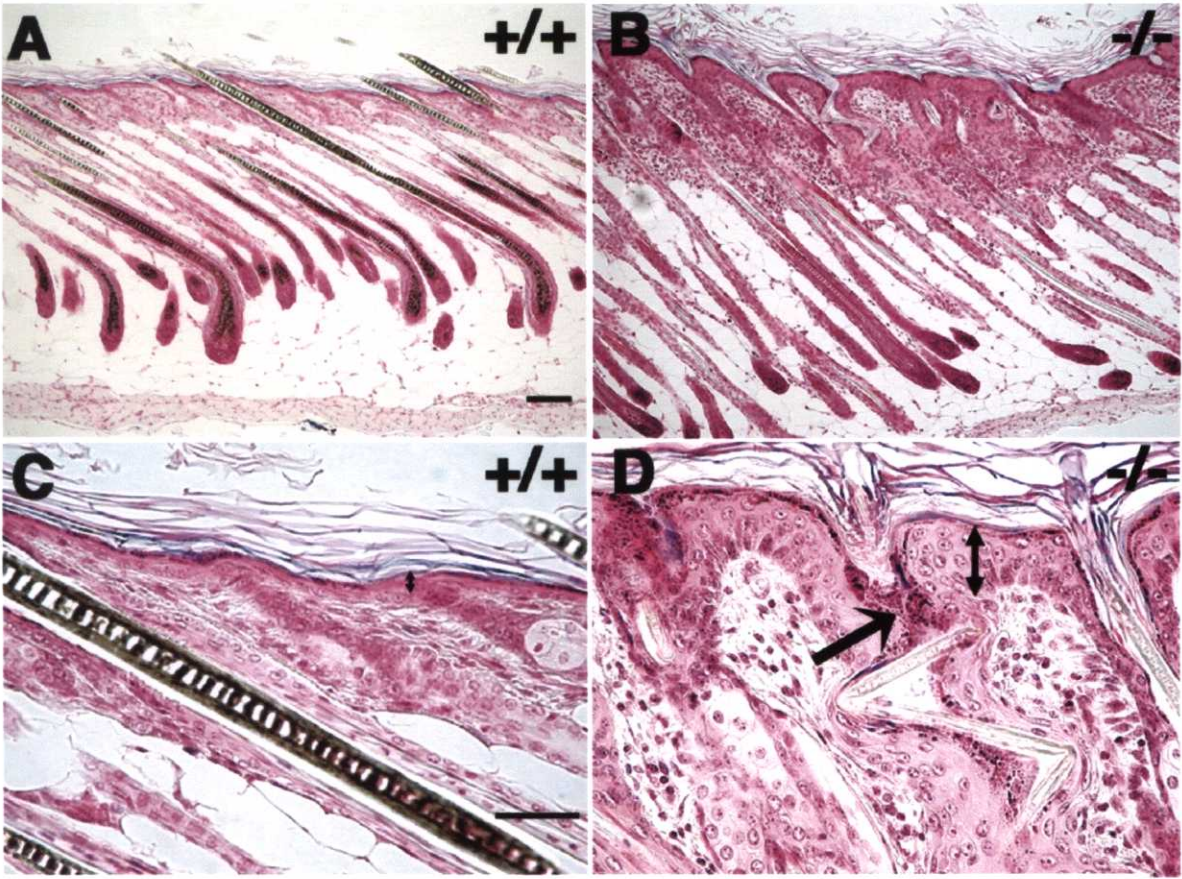
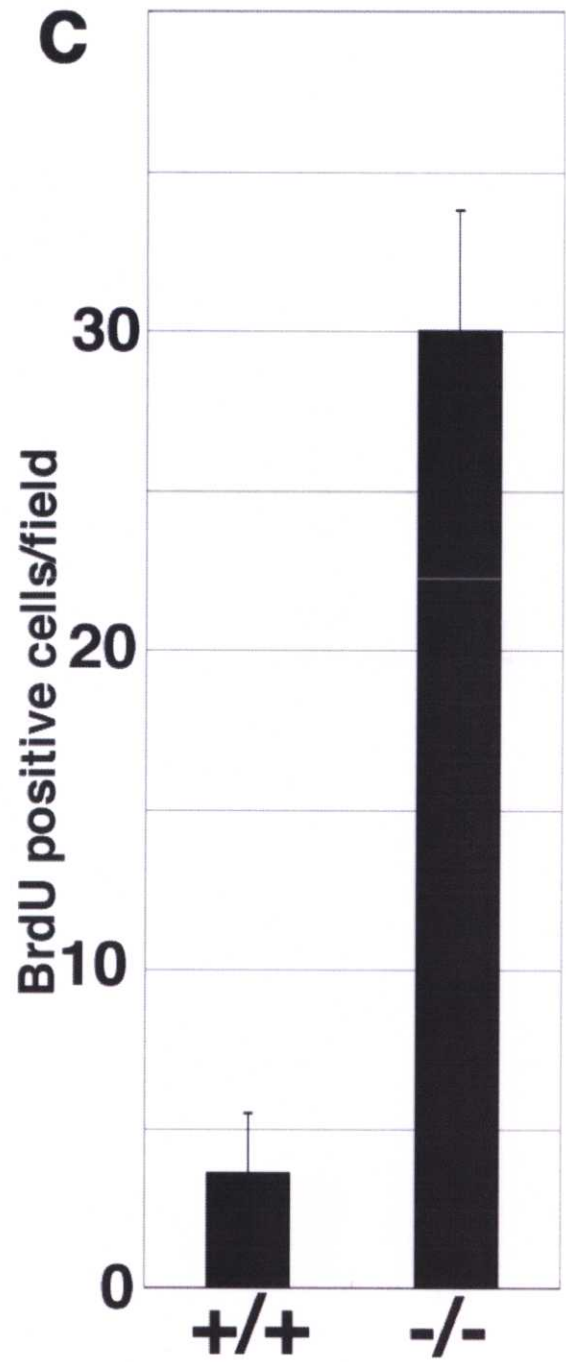
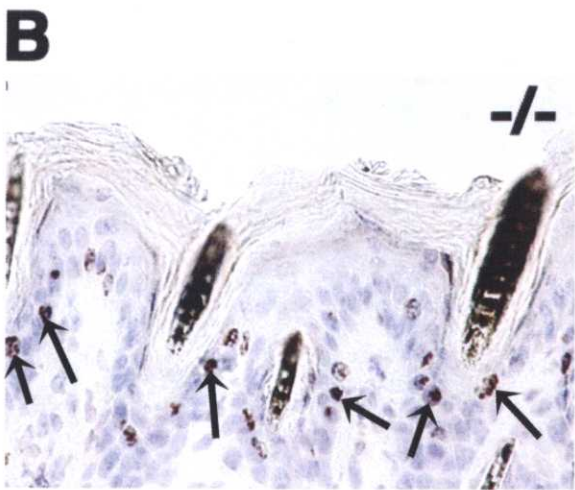
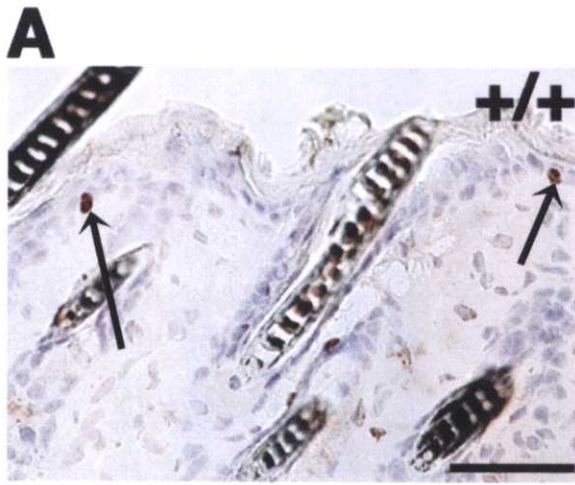


图 6



☒ 7

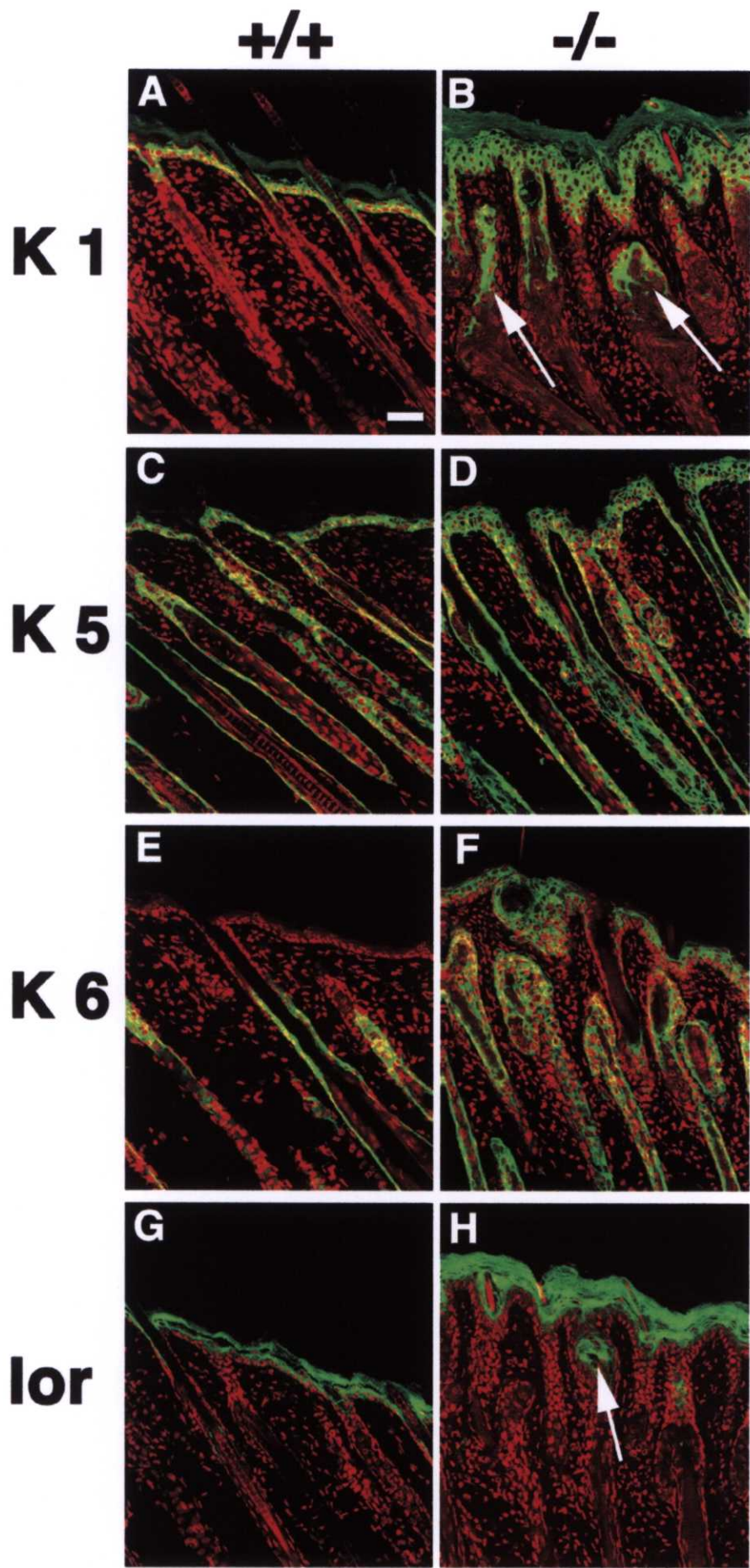
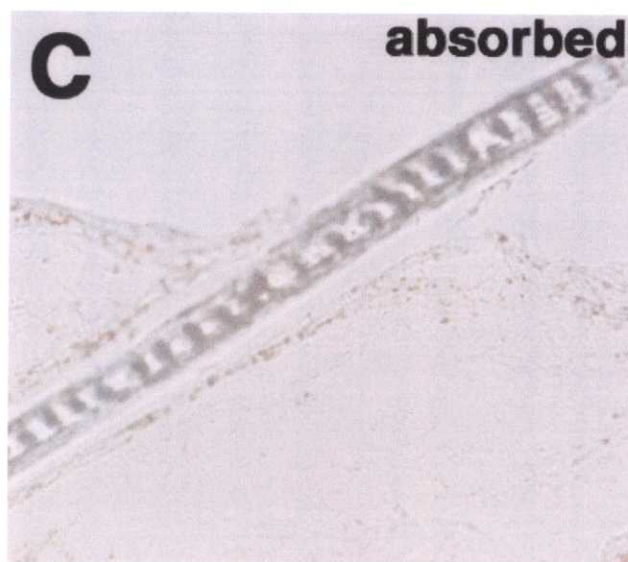
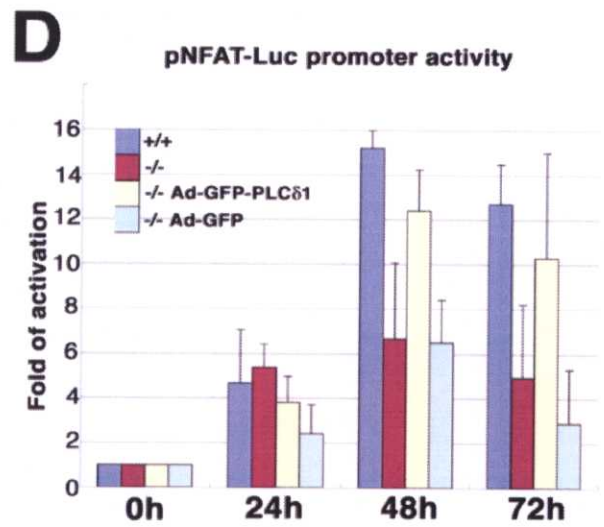
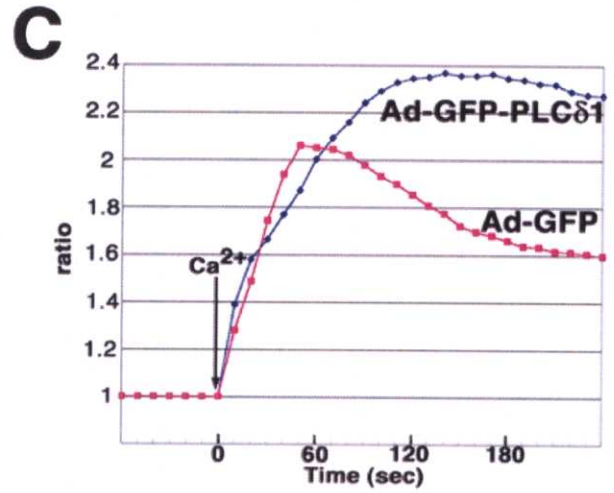
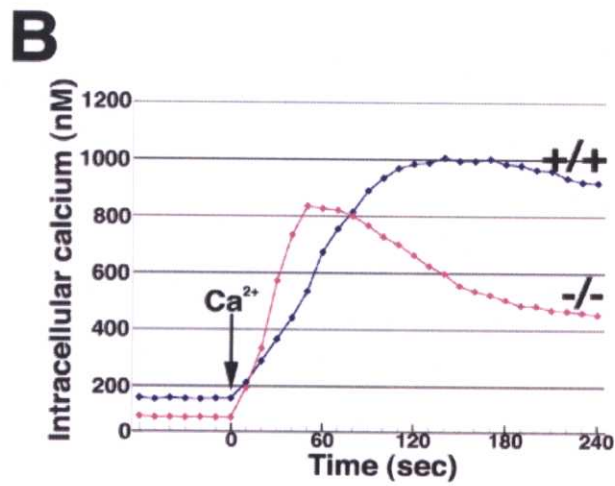
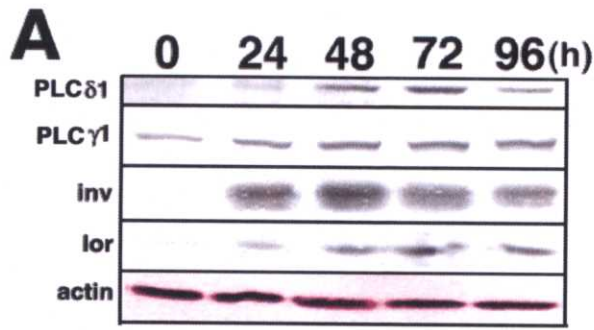


图 8





10

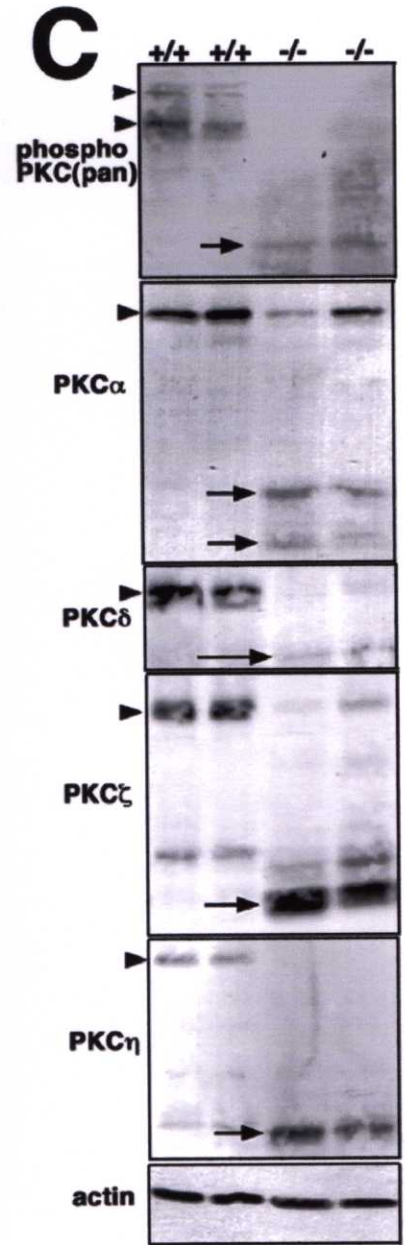
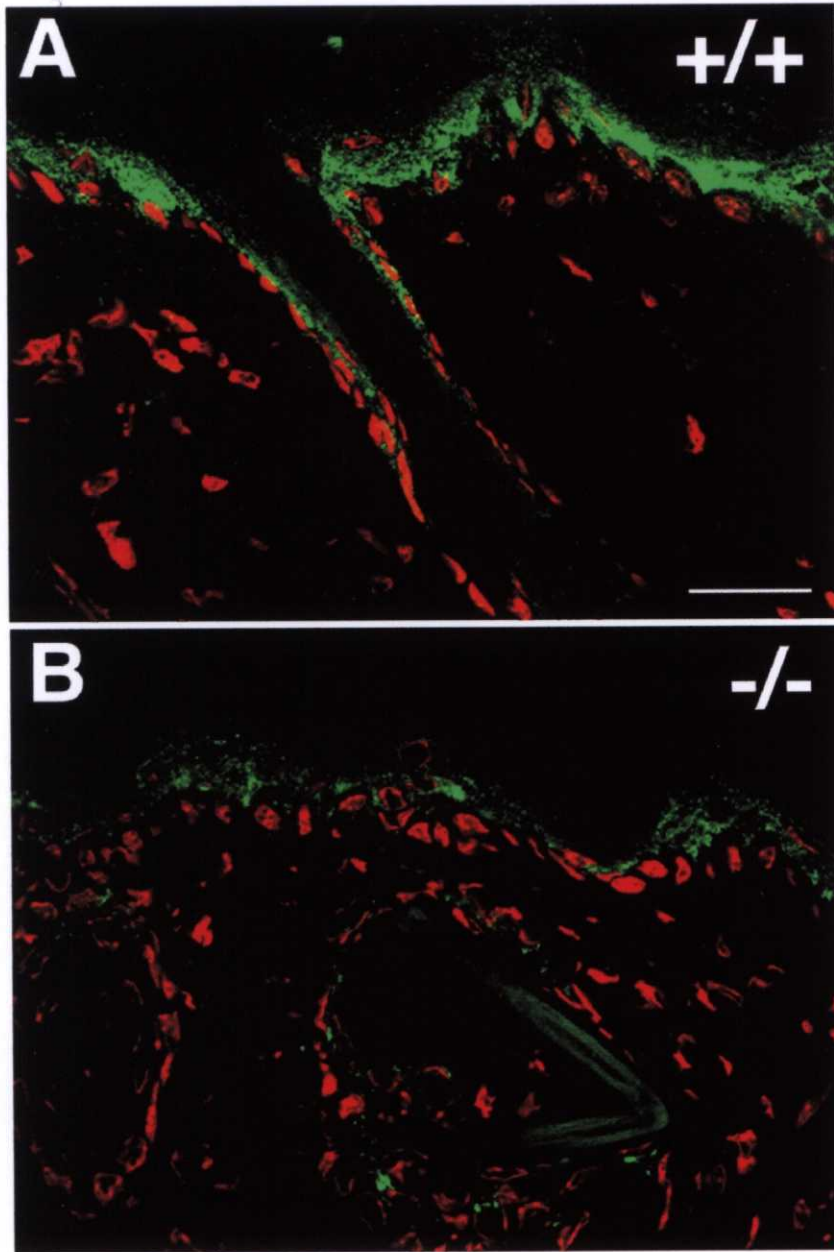


图11

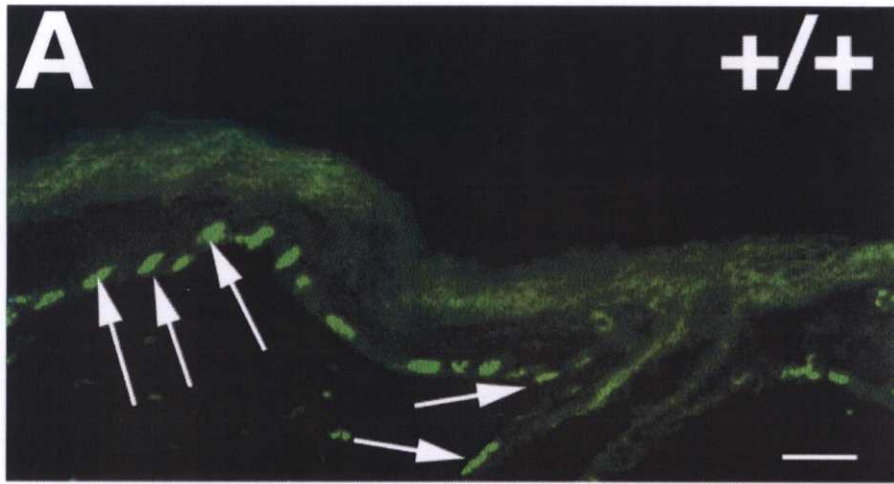


图12

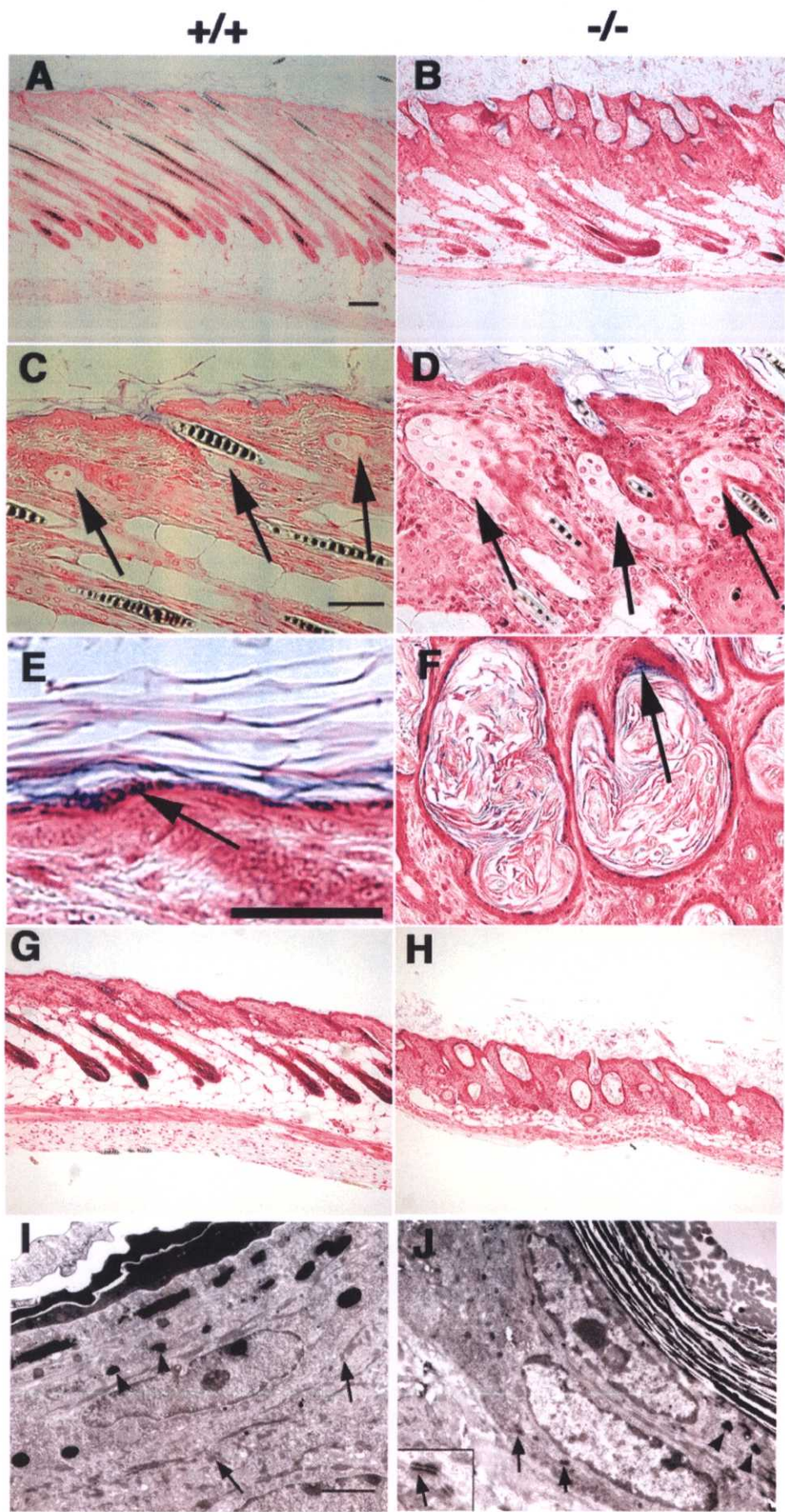
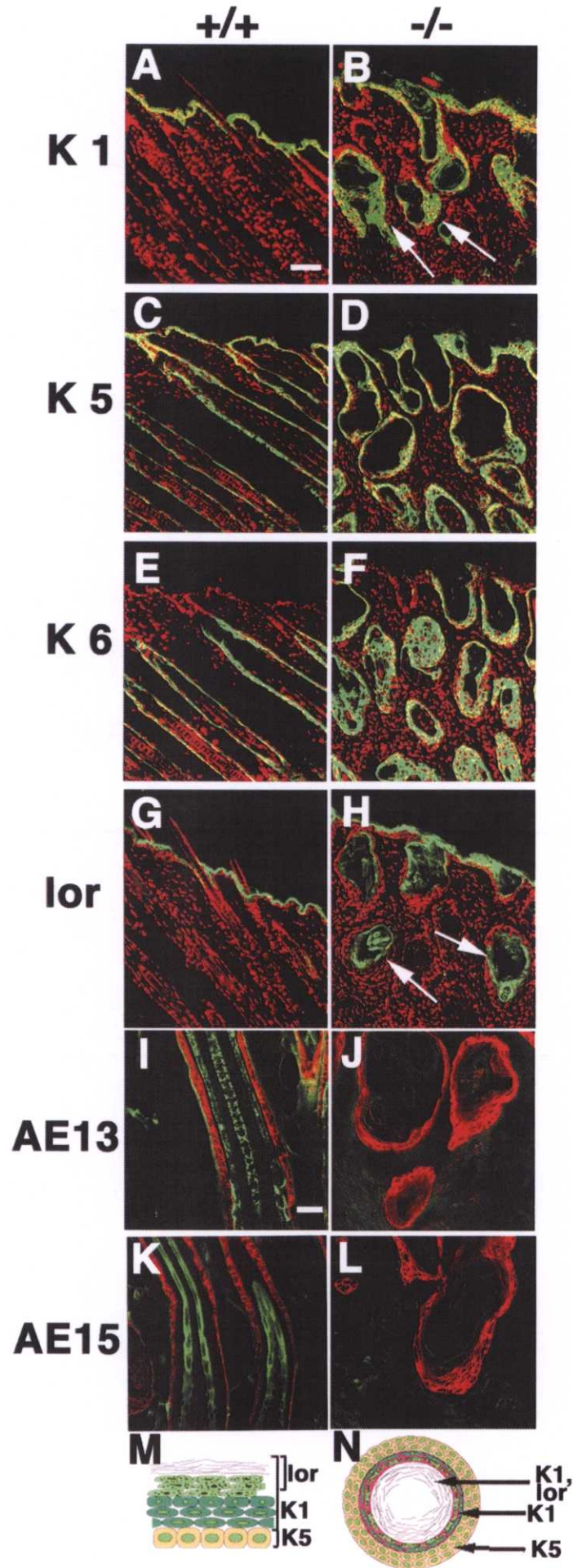


图13



⊠ 14

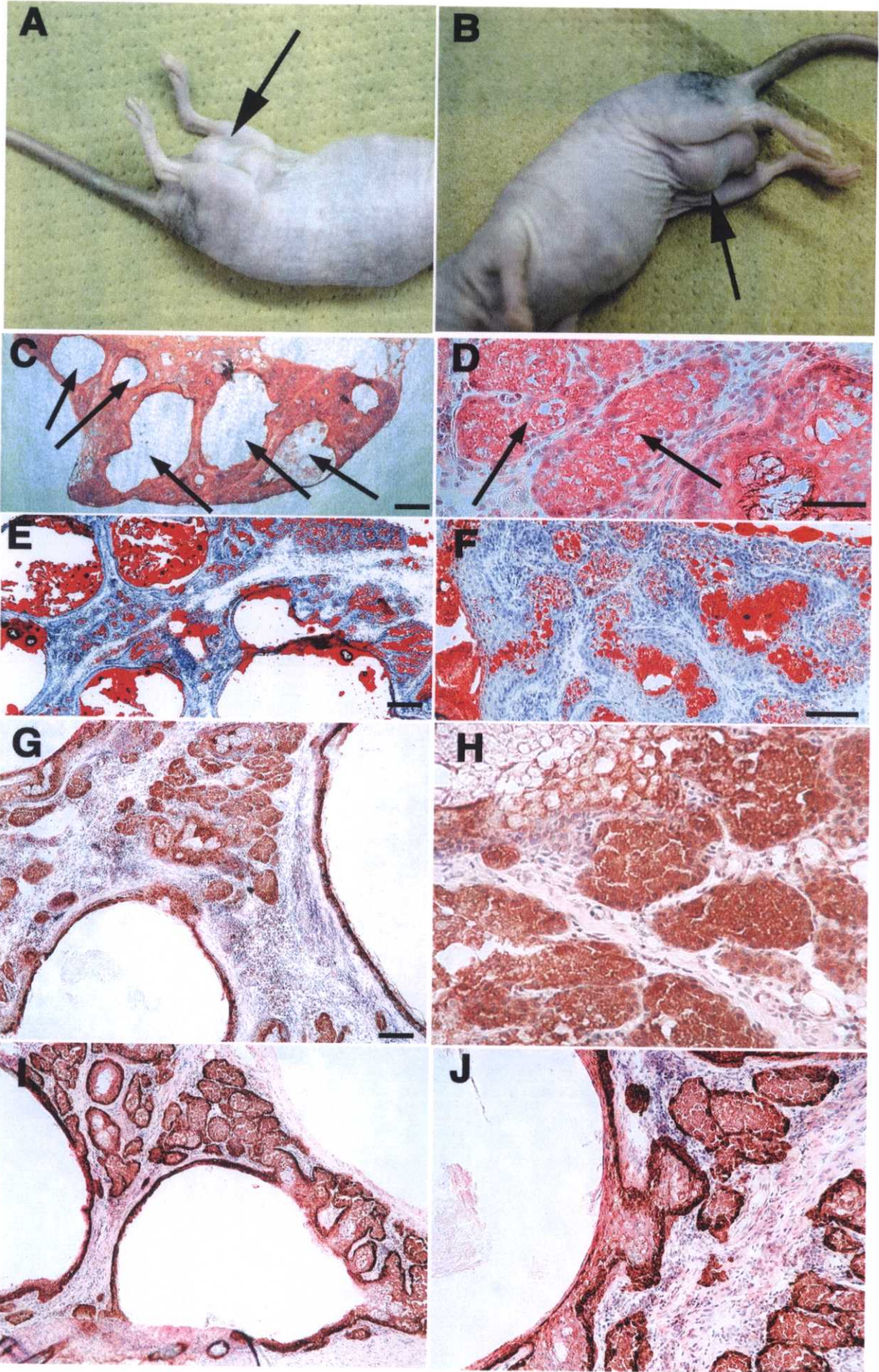
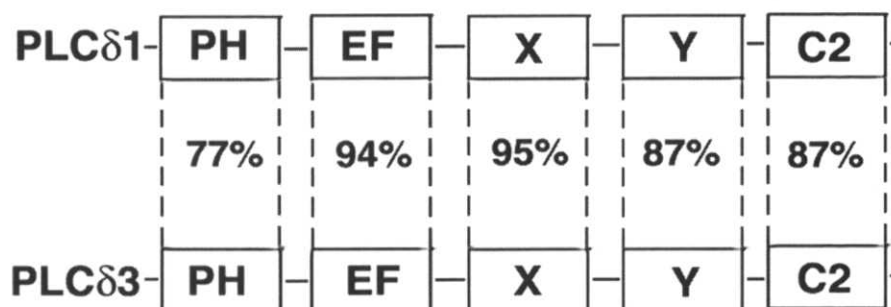
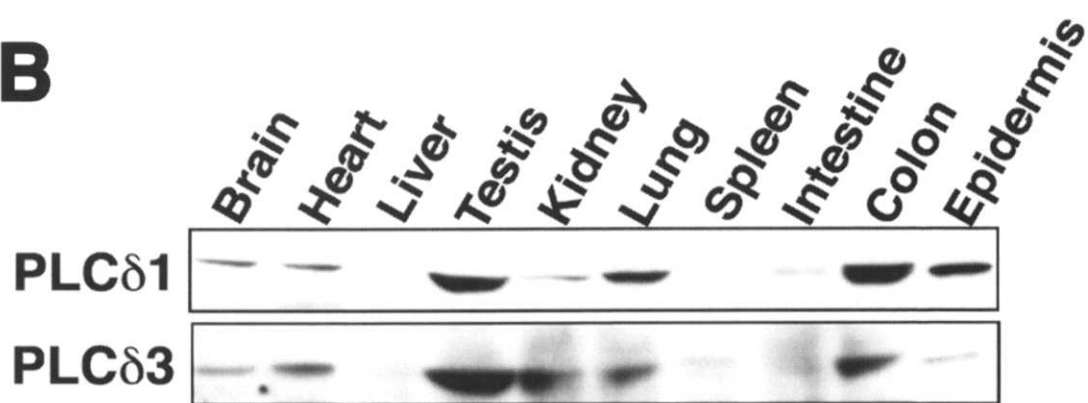
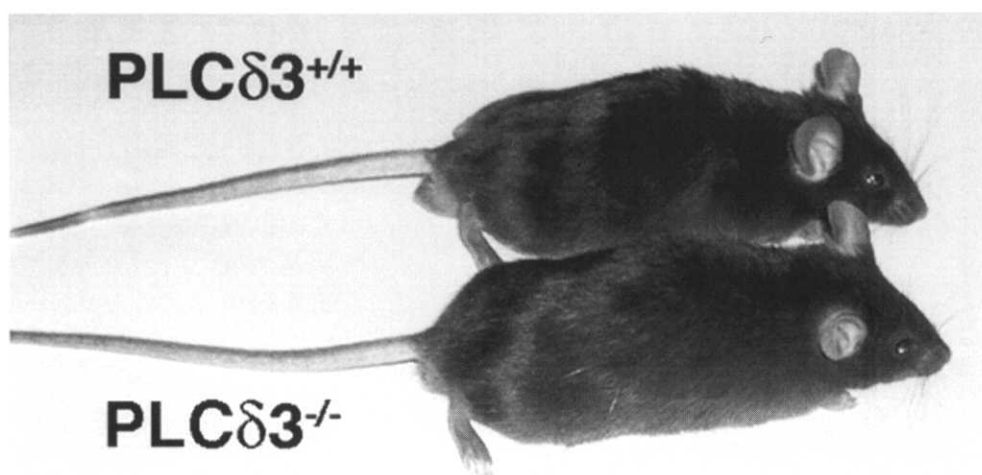


图15

A**B****C**

☒ 16

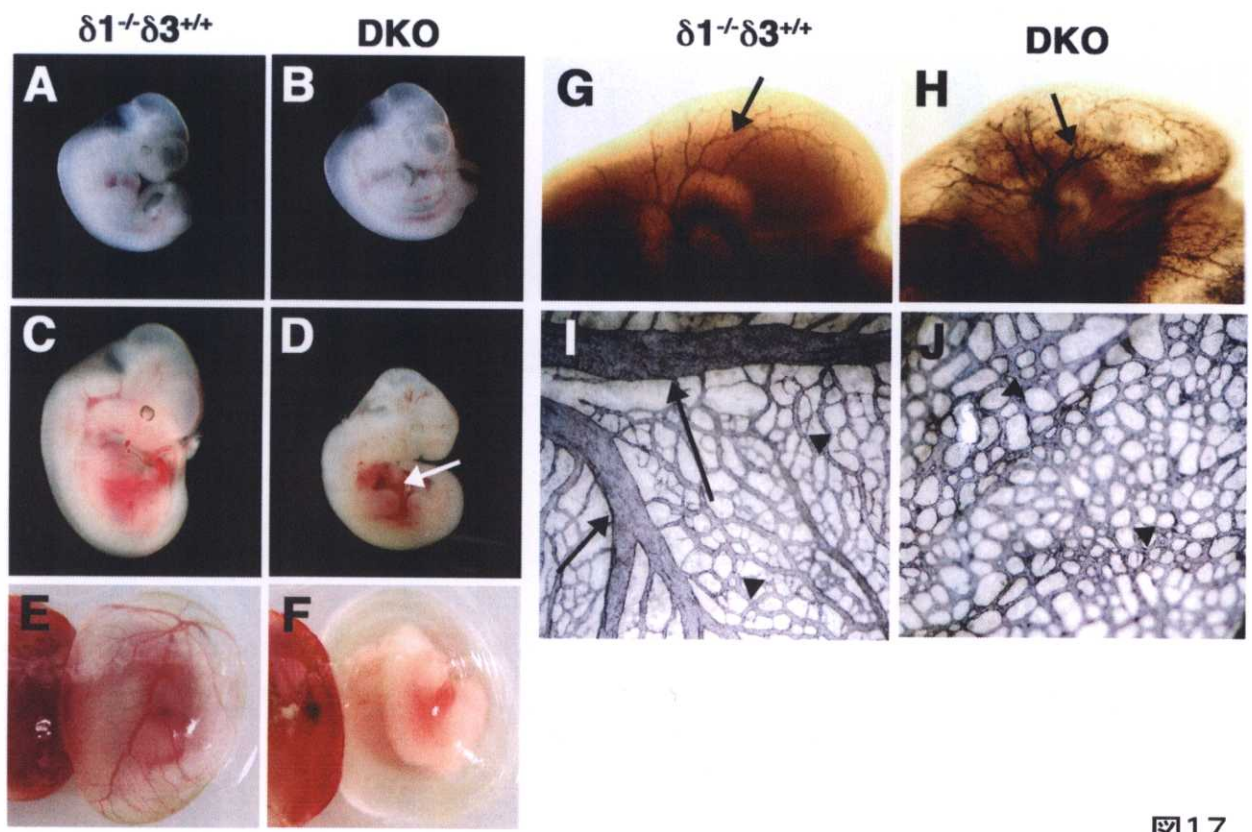
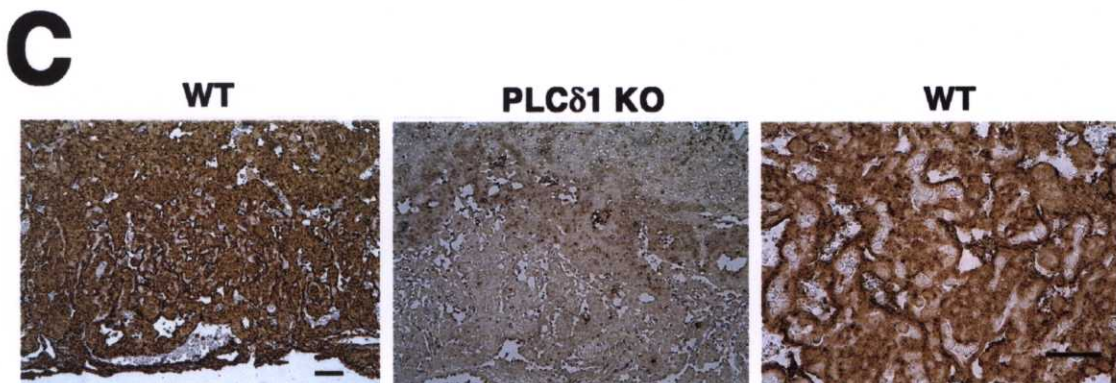
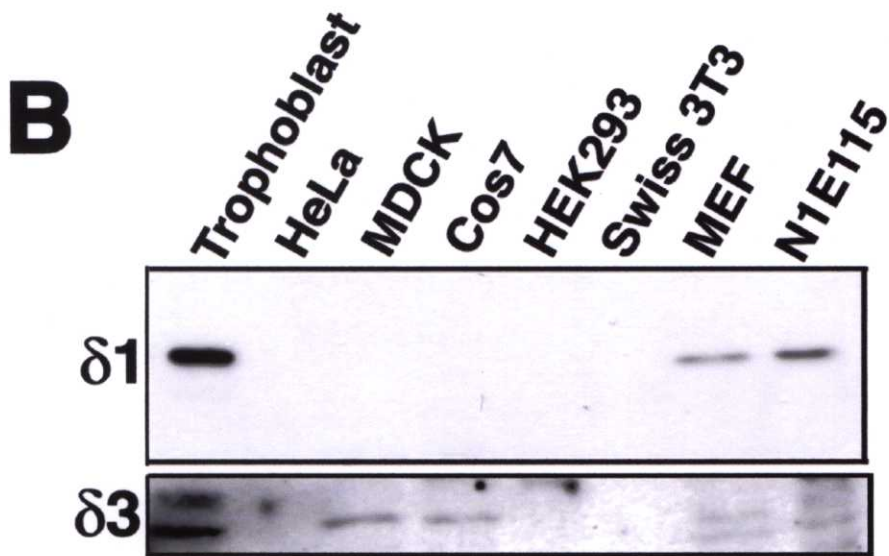
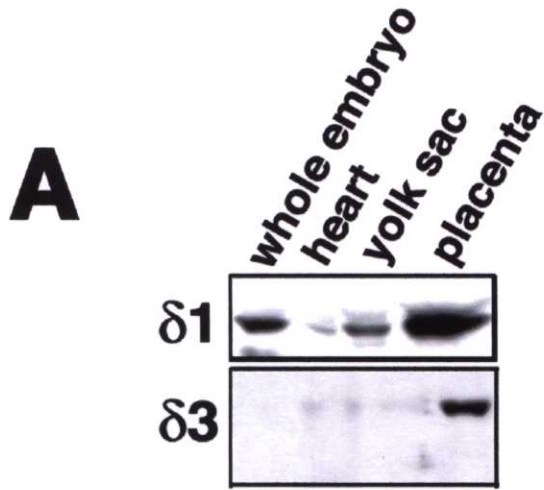
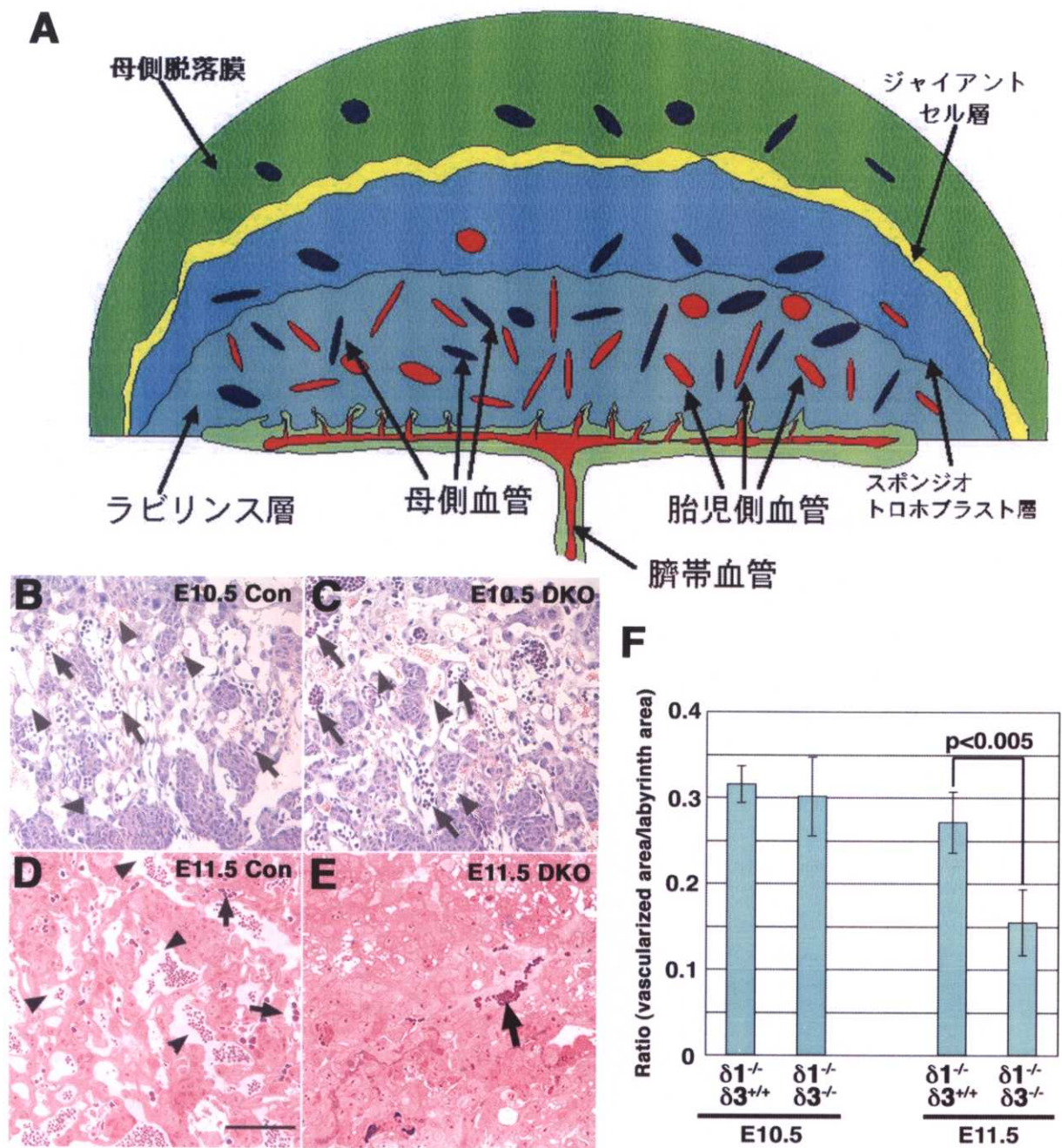
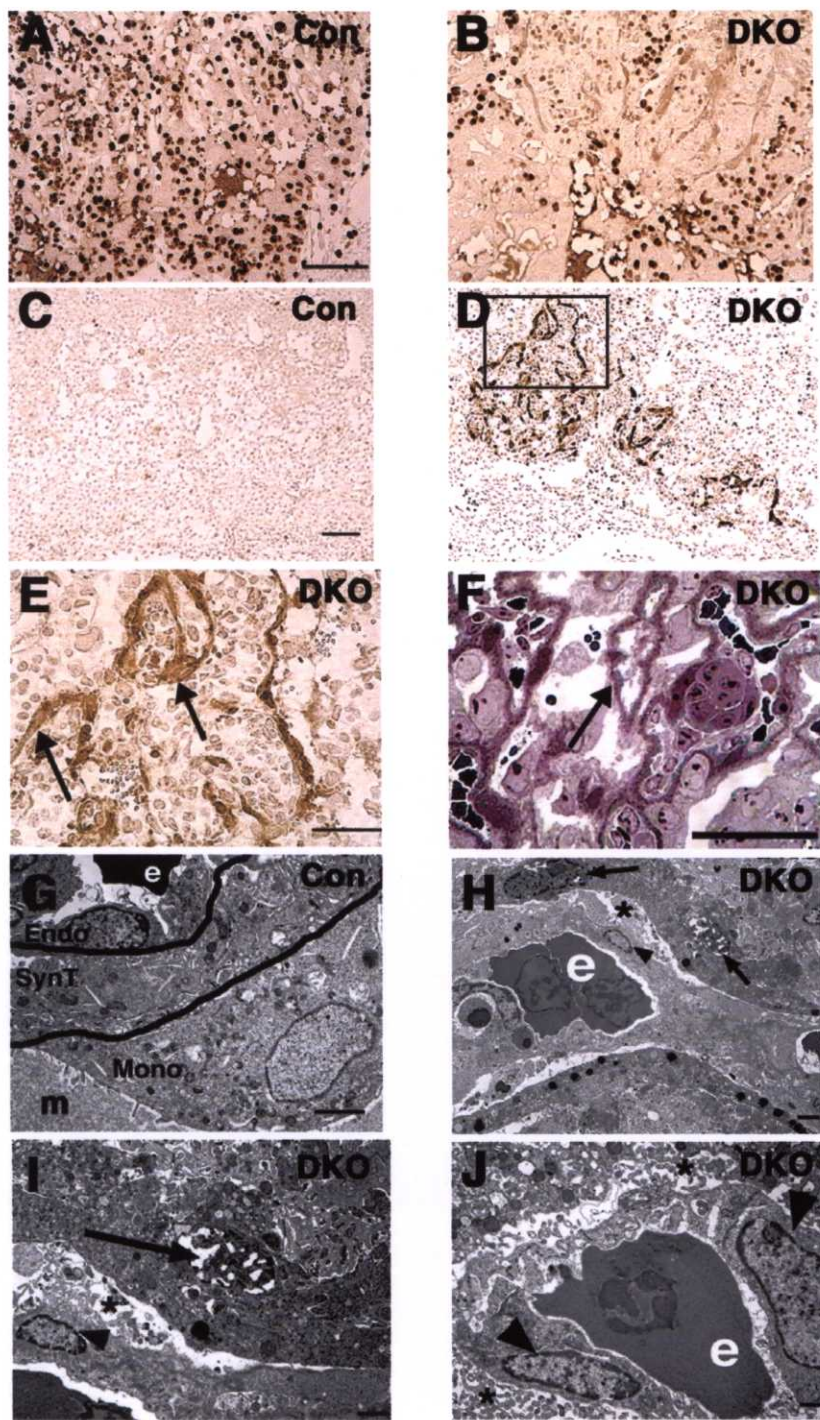


图17

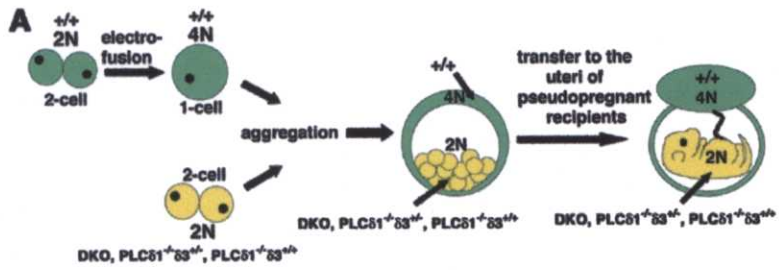


☒ 18



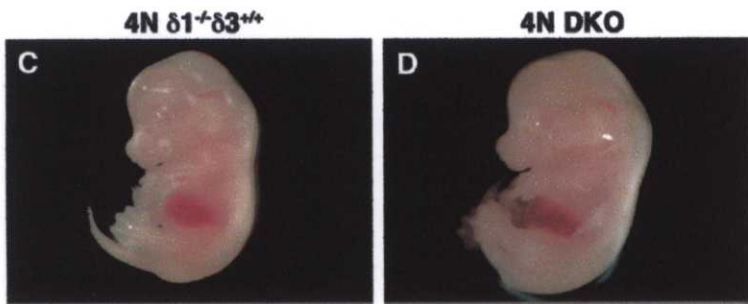


☒ 20

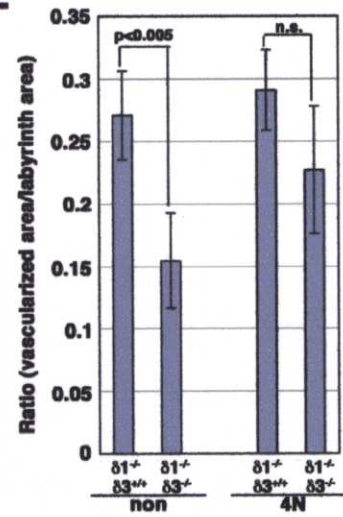


B

$\delta 1^{+/}$	$\delta 1^{+/}$	$\delta 1^{+/}$	total
$\delta 3^{+/}$	$\delta 3^{+/}$	$\delta 3^{-/}$	
8	6	2	16

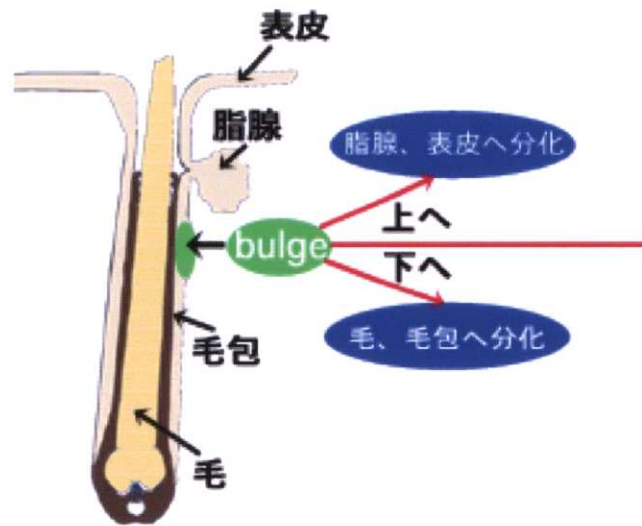


E



21

A



B

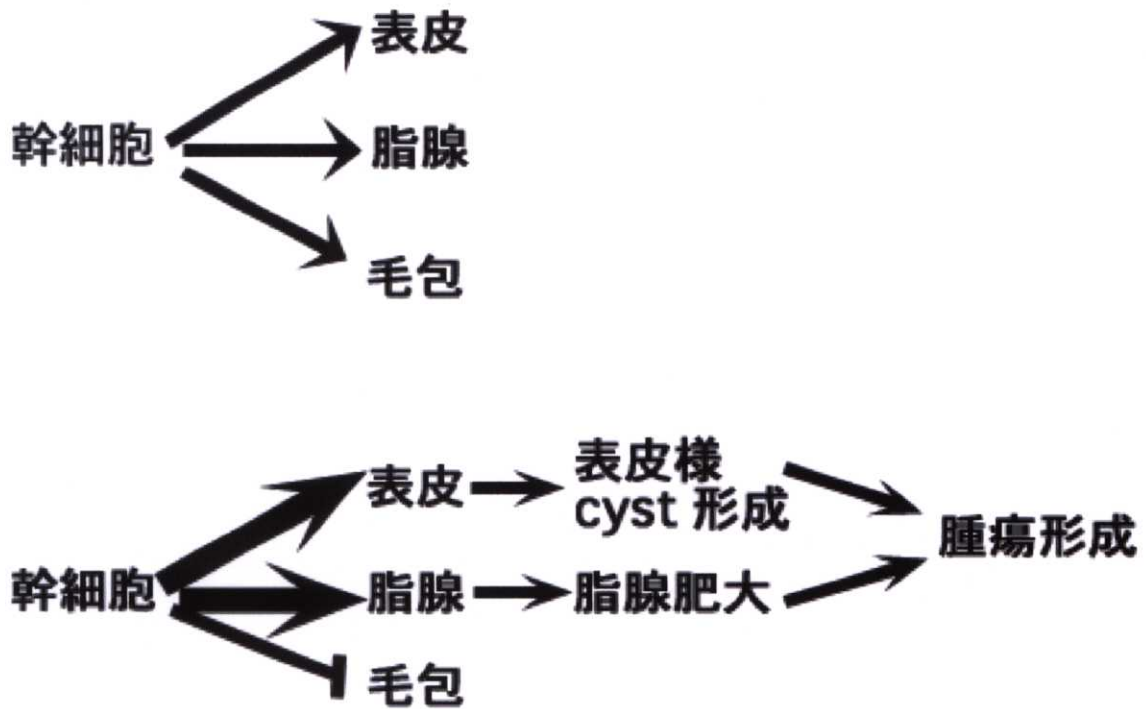


図 22

表 1 PLC δ 1 ヘテロ欠損マウス間の交配により得られたマウスの遺伝子型

+/+	+/-	-/-	計
45 匹	74 匹	39 匹	158 匹
(28.5 %)	(46.8 %)	(24.7 %)	(100 %)

表 2. $PLC\delta I^{-/-}PLC\delta 3^{+/+}$ マウス間の交配により得られたマウスの遺伝子型

Day of Analysis	$\delta I^{-/-}\delta 3^{+/+}$	$\delta I^{-/-}\delta 3^{+/-}$	$\delta I^{-/-}\delta 3^{-/-}$	total
E9.5	16	24	8	48
E10.5	14	34	23	71
E11.5	56	121	51 (22)	228
E12.5	38	73	32 (18)	143
E13.5	20	30	17 (17)	67
P0	12	21	0	33

()内の数値は外見上、心停止もしくは明らかな異常が観察された胎児の数。