

毛の成長に対する細胞内カルシウムおよび
プロテインキナーゼCの影響に関する研究

岩 本 勉

毛の成長に対する細胞内カルシウムおよび
プロテインキナーゼCの影響に関する研究

指導教官 形成外科 波利井 清紀教授

東京大学大学院医学研究科

外科学専攻

形成外科

岩本 拓

目次

頁.

はじめに・・・・・・・・・・1.

研究の目的・・・・・・・・・・5.

材料と方法・・・・・・・・・・6.

結果・・・・・・・・・・10.

考察・・・・・・・・・・17.

まとめ・・・・・・・・・・31.

謝辞・・・・・・・・・・33.

はじめに

哺乳類の体表を覆う毛は、皮膚の保温・保護、感覚器官としての機能、重金属の排出など非常に多くの役割を果たしている。また、ヒトの全身を覆う軟毛の毛包には神経叢があり、繊細な感覚器官としても重要な役割をもっている。さらにヒトの頭毛は、社会的な属性やアイデンティティを表現するという役割があり、毛の成長を制御する仕組みは、臨床的にも、社会的にも高い関心をもたれる事柄である。

こうした毛の成長に関して数多くの研究がなされてきたものの、分子生物学的並びに生理学的な機序については不明な点が多い。毛包は上皮系の毛母細胞と真皮系の毛乳頭細胞が、立体的な構造の中で、相互に作用を及ぼし合いながら毛幹を産生する器官である。このため、毛包の器官培養法が確立されるまでは、毛の成長制御を調べるためには生体での毛の成長を観察しなくてはならなかった。しかし、毛の成長は季節的な変動や免疫系の関与など生体の全身状態の影響に大きく左右されるため、*in vivo*での測定結果は観察しようとする要因と結果としての毛の成長の因果関係が不明確なものになりやすい。また、毛母細胞のみを単離して培養した場合には、その分裂能、DNA合成、ODCやtransglutaminaseなどの酵素活性や毛ケラチンの産生などを測定することはできるが、これが毛の成長にどのように関わっているかについては不明な点が多いため、実際の毛の成長にどの程度の影響がみられるのかは結論できない。よって細胞培養のような毛乳頭・毛母細胞間の相互作用のない解離培養の結果は毛の成長の仕組みを解明する目的には不十分である。

近年毛包の器官培養が行なわれるようになり、この系を用いて毛の成長のメカニズムを解明する試みが見られるようになった。毛包の器官培養にはマウス、ラットの胎仔あるいは新生仔の皮膚、毛包⁴⁰⁾、また、成人女性ヒト^{18,27)}や男性型脱毛のモデル動物であるベニガオザル⁴³⁾前頭部の毛包などが用いられることが多い。ヒトの毛包は、隣接する毛

包同士であっても毛周期の相がしばしば異っているという特徴があり、成長期毛包の割合も研究者によって75-100%とばらつきが大きい。また、face lift手術などで得られるものが大多数のため、特定の年齢および性に由来するものに限られている。常時、安定的に、多数入手することは困難である。また、ベニガオザルの飼育には霊長類を収容できる施設が必要であるために、通常の研究施設では飼育はできない。一方、実験動物として用いられる哺乳動物では、毛は波状をなして同時期に成長するので、一定部位のすべての毛包はどの時期においても毛周期上のほぼ同一相を示すことが知られている。そこで一定年齢の個体の特定の部位を選べばその中のすべての毛包は毛周期の相が一致しているため、毛周期の相の揃った毛包を多数入手することができる。そこで、新生仔期の動物で毛包採取する部位を定めておけば、常に毛周期が揃った毛包を確保できる。ヒゲ毛包(vibrissa follicle)は上口唇(whisker pad)に位置する鋭敏な触覚器として特別に発達したもので、毛包周囲に静脈洞が発達し、眼窩下神経由来の有髄神経が分枝し、Merkel細胞終末などの感覚受容器が分布している。他の部分の体毛(pelage)では毛球部の直径が50-60 μ m程度であるのに対し、100-300 μ mと非常に大きな毛包で、全体が緻密で丈夫な硝子膜に包まれている。特に新生仔ラットの毛包は周囲結合組織が柔軟なため、手術時の侵襲による損傷を受けにくく²⁰⁾ 取り扱いが容易である。さらにラットでは大脳皮質で体部位表現の再現が見られるため、whisker pad上のすべての毛包に番号によって命名および、同定がなされているため、1頭のラットから摘出される60個ほどのすべてのヒゲ毛包すべてを分別し、他のラットと比較することすら可能である。このような利点から、新生仔ラットヒゲ毛包を器官培養に用いた。

マウスのヒゲ毛包器官培養を用いた研究から毛包に直接作用して、毛の成長を促進・抑制するホルモンや成長因子、サイトカイン等が明らかになった。肝細胞増殖因子(HGF)および角化細胞増殖因子(KGF)が毛の成長に対し促進的に働くことが示され、同時に上皮細胞成長因子(EGF)や酸性、塩基性線維芽細胞成長因子(α -, β -FGF)、インスリン様成

長因子-I, II (IGF-I, II), II-1,6など多くの成長因子やサイトカインが毛の成長に対して抑制的に働くことが示された^{21,22)}。また、カリウムチャネル開口剤と分類される薬剤^{3,4,5)}や免疫抑制剤サイクロスポリンA⁴³⁾が毛包に直接作用して毛の成長を促進することが判明し、これらの生理活性物質や薬剤の細胞内での作用機序について関心が集まっている。これらの生理活性物質や薬剤の多くが細胞膜上の受容体に結合して細胞内で数多くのシグナル伝達系を介してその作用を及ぼすことが知られており、この細胞内シグナル伝達系に関しては近年研究が急速に進みつつある。

そしてこれらの成長因子やホルモンの多くが受容体に結合すると細胞内カルシウムの上昇を引き起こすことが知られている。毛の成長に促進的に作用することが示されたHGFはラット培養肝細胞内カルシウムの一過性上昇とそれに続くカルシウムの周期的な変動(振動, oscillation)を起こすことが知られている³³⁾。細胞内カルシウムはシグナル伝達物質として神経・筋のみならず、内分泌系や表皮など広範な細胞でセカンドメッセンジャーとしての重要性が知られているために、毛包における細胞内カルシウムの役割について調べることは重要であると考えた。

そして、このカルシウムの変化により制御を受ける細胞内の機構としては、プロテインキナーゼC (PKC)、Ca²⁺-カルモデュリン依存性キナーゼ(CaM-キナーゼ)、各種のチロシンキナーゼなどのプロテインキナーゼやカルシニューリンなどのプロテインフォスファターゼなどが知られている。PKCはdiacylglycerolおよび細胞内カルシウムイオンによって活性化される細胞内リニン酸化酵素である。広範な細胞で、多くの生理作用に関与していることが知られており、なかでも発癌プロモーターであるphorbol esterの細胞内の受容体であることから表皮角化細胞を用いた研究は比較的多くなされており、その増殖、分化、癌化、角質化等における役割についてはよく知られている^{6,12,13)}。毛包を構成する毛母細胞、毛根鞘細胞などは表皮角化細胞と相同な細胞と考えられるため、毛包においても細胞内カルシウム及びPKCは相応の役割を果たしているものと推察されるが、PKCの

毛の成長に対する役割については余り知られていない¹⁷⁾。

細胞内カルシウムとPKCという二つの、連携した細胞内シグナル伝達系が毛の成長に関与していることを証明するためには、以下の要件を満たす必要がある。

- 1) 細胞外から毛の成長に影響を与える物質は、細胞内カルシウムの変動を起こすこと。
- 2) 細胞内カルシウム濃度の上昇または低下が毛の成長に影響を及ぼすこと。
- 3) PKCは細胞内カルシウムにより活性を制御されている。よって毛の成長に影響する物質は毛包細胞内でPKCの活性の変化を及ぼすはずである。
- 4) PKCの活性化および阻害は毛の成長に影響をもたらすこと。
- 5) 上記1)から4)の観察結果を矛盾なく説明できること。

本研究では、細胞内リン酸化やこれを制御するカルシウムイオンの毛の成長に対する制御の仕組みを解明するために、細胞外カルシウムの濃度を調節しながら毛の成長を測定し、また、血清や発毛促進剤として知られるminoxidil^{2,20)}などを培養液に加え、毛の成長への影響を観察するとともに細胞内カルシウムイオン濃度の経時的変化を観察した。続いてPKCの活性化剤であるphorbol esterの一つ、phorbol-12,13-dibutyrate (PDBu)の効果をラットヒゲ毛包器官培養を用いて観察し、毛の成長を測定した。ついで、細胞内リン酸化を阻害する薬物などを培養液に加え、毛の成長を観察した。その結果、毛の成長にとって細胞内カルシウムイオンやPKCの活性が重要な役割を果たしていることが判明した。

研究の目的

毛包を構成する毛根鞘細胞と毛乳頭細胞を分離すると毛の産生は行なわれない。そのため、細胞レベルあるいは細胞内レベルでの解析は困難であった。このため、毛の成長を制御する細胞内のメカニズムについては解明されていない点が多い。本研究では、毛の成長に対する細胞内のメカニズムを明らかにするために、広範な細胞で多くの生理機能に関与している細胞内カルシウムとプロテインキナーゼCの毛の成長における関与を検討する目的で行なった。

材料と方法

1.材料

生後5日新生仔Wistar Rat(東京実験動物)を用いた。

35mm および60mm培養用ディッシュはNunc社製を用い、細胞内カルシウム測定に使用したカバーガラスはMicroCoverGlass (Matsunami社製、30mm×40mmおよび22mm×24mm)を高圧滅菌して用いた。ダルベッコ変法minimum essential medium 粉末培地(DMEM,GIBCO, BRL.), L-15粉末培地(Follow Laboratory, Virginia)は、各々に1% Penicillin-streptomycin混合液を加えたものをミリポアフィルタで滅菌して使用した。phorbol 12,13-dibutyrate, minoxidil, ionomycin (以上Sigma), K252a, K252b, staurosporine, H-7 (協和醗酵製)を、dimethyl sulfoxide(DMSO)に溶解して凍結保存した。使用直前に解凍し培養液で更に希釈して、培養液中でのDMSOの濃度が1%を超えないようにした。O,O'-Bis(2-aminoethyl) ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA)は200mM水溶液を作り、pH 7.34に滴定した後0.22 μ mミリポアフィルタにより滅菌し培養液中に1%を超えない量で添加した。胎仔牛血清(FCS)は器官培養および細胞内カルシウム濃度測定で同じロット(COSMO.BIO.製, Lot:60101)を使用した。コラーゲン・ゲルは、Cell Matrix type I Aコラーゲン(type I コラーゲン, low antigen, 新田ゼラチン製)を、10倍濃度Eagle MEMおよび緩衝液によりゲル化して用いた。シリコン・ウェハース(KE103およびCAT-103、信越シリコーン製)を板状に固化した後、ナイフによって切り、培養用チャンバーを自作し、これを高圧滅菌後、70%エタノールにより洗浄し、クリーンベンチ内の殺菌灯の下で20分間乾燥させてから使用した。膜透過性蛍光カルシウム指示薬fluo-3 AMおよび蛍光生存細胞染色剤calcein blue AM(Molecular Probe社製)はDMSOに1mMに溶解したものを冷凍・遮光保存し、使用直前に室温に解凍して使用した⁴⁰⁾。ethidium bromide(Polysciences社製)はHank's液で

200 $\mu\text{g/ml}$ に溶解したものを保存溶液として4°Cで遮光保存し、使用直前に室温に戻し calcein AMを50 μM 懸濁して使用した。

2. 新生仔ラットヒゲ毛包(vibrissa)器官培養

新生仔ラットヒゲ毛包の摘出および培養方法はJindoら³⁰⁾およびPhilpottら³⁶⁾の方法に従い、若干の変更を加えた。すなわち、生後5日から14日の新生仔Wistar ratの上口唇部にあるwhisker padよりヒゲ毛包(vibrissa hair follicle)を双眼実体顕微鏡下に微細鑷子および角膜光彩切開用剪刀を用いて摘出した。付着する表皮および周囲結合組織を可及的に取り除き、毛包上皮側端を皮脂腺開口部より上皮側で切断した。35mmディッシュ中に5または8個の毛包をコラーゲン・ゲル内に包埋した後、ダルベッコ変法minimum essential medium(DMEM)培養液2mlにて、無血清器官培養を行った。このDMEM培養液に薬剤溶解に用いたDMSOを1%加えたものを無処置コントロール群とした。37°C、95%airおよび5%CO₂培養条件下で培養した。培養開始後から、24時間毎に最長96時間までfollicleを位相差顕微鏡により観察し、写真撮影した。その際、毛根基底部から毛幹切断端までの距離を測定した。得られた結果を統計処理の後、グラフに表わした。

3. 新生仔ラットヒゲ毛包毛母細胞内カルシウム濃度測定

細胞内カルシウムの測定はMauroら²⁷⁾の方法に若干の変更を加えた。シリコンウエハースを加工して30mm×40mmのカバーガラス上に10mm×10mm×5mmの容量500 μl の測定用チャンバーを作製した。(Fig. 1) 摘出直後のvibrissaを1-15培地中で剃刀を用いて薄切し厚さ約200 μm のスライス標本とした後、70%アルコール滅菌したカバーガラス上測定用チャンバーにコラーゲン・ゲルにて包埋の後、無血清DMEM培養液中に置き、5 μM のfluo-3 AMを37°C 30分間インキュベーションして負荷した。その後PBSで3回洗浄の後、DMEM培地中で30分間インキュベーションした後に測定に供した。FCSおよび薬剤はシリコンウエハースに刺入した27Gツベルクリン用の注射針より投与し、余剰

な液は対側の注射針から除去した。

レーザースキャン顕微鏡ISM410(Carl Zeis Axiovert 135及び LSMシステム40)にて励起波長488nmで観察・撮影し、256階調のデジタル化蛍光画像を光磁気ディスクに保存した。これをパワーマッキントッシュ7500コンピュータ上でのNIH-Image 1.60を用いて画像処理を行なった。[U.S.National Institutes of HealthのWayne Rasband作。Internetでzippy.nimh.nih.govにanonymous ftpで入るか、NTIS(5285 Port Royal Rd.,Springfield,VA 22161,part number PB93-504868)からフロッピーディスクで入手できる。]偽カラー化による画像処理の後、撮影された視野内の目的とする領域の細胞(20から30)の蛍光強度を観察・測定し各毛包の平均蛍光強度を算出した。

この蛍光強度をもとに、以下のin vivo calibration法により細胞内カルシウム濃度算出した。

$$[Ca^{2+}]_i = Kd \times (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$$

ただし、 F: 標本の測定条件における蛍光強度
Fmax: 2 μ M ionomycin により細胞内外のカルシウムイオン濃度を等しくした時の飽和蛍光強度
Fmin: 2mM EGTAにより細胞内外のカルシウムをキレートした時の無カルシウム時の蛍光強度
Kd: 37°Cにおけるカルシウムとfluo-3の解離定数
(=0.316 μ M, Molecular Probe 社のmanualによる)

この方法を用いるとionomycinに対する反応の見られない死細胞または、細胞外マトリックスに吸着して分解して非特異的に蛍光を発しているfluo-3については細胞内カルシ

ウムイオン濃度値が0または負となるため、これを統計処理から除外した。得られた細胞内カルシウム濃度を1毛包内全毛母細胞について平均し、各毛包の毛母について細胞内カルシウム濃度の平均値±標準誤差を算出した。

4. 器官培養毛包内細胞の生存度測定

0-72時間培養した毛包内の細胞の生存度を行なうためにcalcein AMとethidium bromideによる二重染色を行なった。摘出直後および24, 48, 72時間無血清DMEM培養液中および $1-10\mu\text{M}$ のPhorbol-12,13-dibutyrateを添加した培養液中でインキュベートした。一定時間培養した毛包をHank's液で3回洗浄した後、calcein AM/ethidium bromide染色液により37℃、15分間インキュベートした。インキュベーション後にHank's液で3回洗浄した。レーザー共焦点顕微鏡LSM410下で励起波長488nmで観察し、蛍光強度を測定した。calcein AMを取り込んだ細胞より蛍光波長530nmの蛍光とethidium bromideが吸着した死細胞のDNAから630nm付近の蛍光をそれぞれ撮影・測定し、光磁気ディスクに記録した。毛根部からの各々の蛍光強度比をグラフに表した。

また、統計処理については、Student's t-test (unpaired)によるt-検定を行ない、 $p<0.05$ を有意とした。

結果

1. ラットヒゲ毛包無血清器官培養における毛の成長

ヒゲの毛包を新生仔ラットより単離してコラーゲン・ゲル中に包埋し、無血清培養液とともに37℃でインキュベートすると、毛の成長が観察される。Fig.2は特定の毛包を培養開始直後、24時間後、48時間後で観察したものである。培養開始より毛球部は上皮側に向かって退縮傾向を示し、その径を減じ、退縮期(catagen)に見られる棍毛様の変化を示した。これと同時に毛幹が活発に伸張していくのが認められた。毛包上部から峡部までは大きな変化は認められなかったが、培養開始時に毛幹下部に認められる色素沈着は培養の継続とともに毛母領域にまで拡がっていく傾向があった。95から96%が成長後期(anagen, stage V-VI)の毛包であった。4から5%ほどに成長早期(stage IV)の毛包が混在しているのが認められた。

無血清DMEM培養液での毛の成長速度はやや鈍化していく傾向が認められたが、ほぼ直線的な毛の伸張が認められた(Table 1, Fig.3)。得られた成長速度は生体での毛の成長にほぼ匹敵していた。

2. 培養液カルシウム濃度の毛の成長に対する影響

本研究で使用したDMEM培養液中には2mMのカルシウムイオン(CaCl_2)が含まれている。この濃度は表皮角化細胞初代培養においては高カルシウム培養液とされている。この培養液中のカルシウムをEGTAでキレートして、毛の成長に対する影響を観察した。その結果、細胞外カルシウム濃度の減少に応じて毛の成長が抑制されていることが認められた(Fig.3および Table 2.)。そして、この成長抑制は CaCl_2 を更に添加して、細胞外カルシウム濃度を補正することにより、正常と同様な成長速度を回復することができた。

3. 胎仔牛血清(FCS)の毛の成長に対する影響

無血清器官培養と同時にFCSを0, 5, 10, 20%添加した培養液中でのヒゲ毛包の毛

の伸張を調べた(Fig. 4)、いずれの場合にも培養の継続と共に若干の成長速度の低下が見られた。培養開始から48時間以降には10%および20%添加した培養液ではコントロールのDMEM培養液に比べ有意に抑制されているのが認められた。このとき培養液中に10%血清と共に1mM minoxidilを添加するとこの血清添加による毛の成長の抑制が打ち消されているのが認められた。

4.細胞内カルシウム濃度測定

このときの細胞内カルシウムの変動を膜透過性カルシウム指示薬を用いて測定した。fluo-3 AMを負荷したラットヒゲ毛包の共焦点レーザー顕微鏡による蛍光像を示す(Fig.5 A-H)。fluo-3 AMを負荷しFCS刺激、5分前、直後、10分、20分、30分、60分後にレーザー共焦点顕微鏡により観察・撮影を行ない、fluo-3 による蛍光を測定した。minoxidilを含まない培養液中でラットヒゲ毛包を10% FCS によって刺激すると一過性に明るい蛍光が認められる。真皮乳頭を取り囲む毛母領域が特に強い蛍光を発している(Fig.5B)。この毛母からの蛍光の急激な増強は10分以内やや低下するものの (Fig.5C)、依然として高い蛍光強度を維持している。刺激後20-30分では、毛母領域のやや上部の毛母細胞で蛍光が低下していることが明らかに認められる。毛乳頭よりの蛍光は他の部分よりも、低い強度を示している(Fig 5.D,E)。毛根部全体としては、60分経過後も依然として強い蛍光を発しているのが認められる (Fig.5F)。真皮乳頭部も、毛母での蛍光強度とほぼ同様な蛍光強度の変化を示している。60分間の観察の後、calibrationのために2 μ M ionomycinを用いて細胞膜のカルシウム透過性を上昇させたところ毛球部全体に渡って再び強い蛍光が認められる。観察した蛍光の変化は、死滅した細胞に取り込まれたfluo-3 が細胞外カルシウムによって蛍光を発していたのではなく、また細胞間マトリックスへfluo-3が漏出などによる非特異的な蛍光を生じたものではないことを確認できる(Fig.5 G)。このときに2mM EGTAを用いてカルシウムをキレートすると毛包よりの蛍光は低下している (Fig.5 H)。以後のfluo-3 AMを用いた観察では全例で観察終了後にionomycinおよび

EGTAを用いて飽和時細胞内カルシウム強度と無カルシウム時の蛍光強度を測定し、非特異的なfluo-3の蛍光の影響を除外し、細胞のviabilityを確認した。

Fig. 6に同じくDMEM培養液中での毛母領域上部での蛍光強度の変化を示す。この領域の毛母細胞は毛幹長軸方向に細長く引き伸ばされたような形態をしており、分化のやや進んだ毛母細胞としての特徴を示している。FCS刺激により一過性に上昇した蛍光強度は時間の経過と共に低下していくがやはりその低下の程度は弱く、60分経過後も細胞中央部に強い蛍光を発するスポットを残している(Fig. 6)。

次にminoxidil 100 μ Mを含む培養液中での蛍光強度の変化を示す(Fig. 7)。この標本では、FCS投与後の蛍光の上昇は小さいが、血清刺激後の一過性蛍光強度の上昇と低下が認められる。minoxidilを含まないDMEM培養液中での測定との違いは20分後も引続き、急速に蛍光強度が低下している点である(Fig. 7E,F)。毛母領域の強拡大による蛍光像を得るために、スライス標本の毛球部下半部を切除した標本を作製し²⁶⁾、minoxidilの効果を観察した(Fig. 8)。この標本でも10%FCSによる刺激により高い蛍光強度を発する点はminoxidilを含まない群と同様であるが、20分経過後も蛍光の低下し続けている(Fig. 8 D,E.)。60分経過後には刺激前の蛍光強度と同程度にまで蛍光強度は低下している(Fig. 8 F)。

minoxidilは血管平滑筋ではカリウムチャネルを開放させることが知られている。毛包に対する作用機序も同様にカリウムチャネルの開放が関与している可能性が指摘されている。そこで、細胞外カリウム濃度を60mMとした標本で細胞内カルシウム濃度変化を観察した(Fig. 9)。 蛍光の変化の様子はminoxidil 100 μ Mを含む培養液中でのそれと違いは認められない。すなわち、20分後には急速に蛍光は低下し (Fig. 9 D)、その後も低下は続いている(Fig. 9 E,F)。

FCSを作用させない場合には、minoxidilを蛍光強度には目立った変化はみられない (Fig. 10)。標本の最外層の外毛根鞘および角質化しつつある毛幹下部で時間経過と共に蛍

光の上昇が認められるが(Fig. 10 B,C,D,E,F)、毛母・真皮乳頭での蛍光には変化が認められず、弱い蛍光を認めるのみである。

10% FCSを含むDMEM培養液中および10% FCSに100 μ M minoxidilを含む培養液中で36時間インキュベートした後の毛包にfluo-3 AMを負荷し、細胞内カルシウムの蛍光像を観察・測定した(Fig.11)。10%FCSのみの培養では36時間経過後も毛根部よりの蛍光強度は、毛包によるばらつきは大きいものの、以前として高い。FCSとminoxidilを含む培養液中ではfluo-3による蛍光は低下している。

毛母領域の蛍光強度の時間経過による変化をグラフに表した(Fig. 12)。コントロールのFCSを含まない培養液中では、蛍光強度に大きな変化は認められなかった(○)。また、100 μ M minoxidilを添加した培養液中では蛍光強度が若干上昇した(▲)。しかし、その変化の幅は小さくコントロール群との間に有意差は認められなかった。しかし、10%FCSの添加を行った群では、FCSの添加直後より、蛍光強度は一過性に急速に上昇し、飽和蛍光強度近くまで達した。その後FCS添加後20分まで急速に低下したが、その後は高い蛍光強度のまま60分まで推移した(□)。これに対して、100 μ M minoxidilを含む培養液中では、刺激直後の蛍光強度の急激な一過性上昇および低下は同様であるが、20分以後も蛍光強度は低下を続け、60分経過後には刺激前の蛍光強度近くまで低下していた(◆)。また、10% FCSおよび10%FCS+100 μ Mを添加した培養液中で36時間インキュベートしたの毛包でのfluo-3による蛍光強度をグラフ左端に示す。36時間の後にも有意な蛍光強度差が認められた。

注)材料と方法の項で述べた計算式により蛍光強度から細胞内カルシウム濃度を算出することができるが、今回の研究では技術的な問題から2 μ M ionomycinによる飽和蛍光強度が正しく測定できず、これが実際よりも低い蛍光強度となった。そのため上述の式によって細胞内カルシウム濃度を算出すると、生理的な細胞内カルシウム濃度の絶対値として異常な高値となった。そのため、グラフは蛍光強度の経時変化を示すにとどまった。

5.毛根部細胞の生存度測定

摘出直後のヒゲ毛包、指示した濃度のphorbol esterの一つであるphorbol-12,13-dibutyrate(PDBu)を添加したDMEM培養液中で72時間培養したヒゲ毛包のcalceinとethidium bromideによる蛍光像を示す(Fig. 13) calcein AM負荷による蛍光は一部に色素の浸透が不十分なものを認めるものの(Fig.13上段)、全例で強い蛍光を発していることが認められる。時間経過およびPDBu添加によるcalceinによる蛍光の低下は認められない。一方ethidium bromide負荷による蛍光は、摘出直後の毛包では大変に弱く、最外層である外毛根鞘にごく弱く認めることができる。しかし、培養時間の経過と共にethidium bromide陽性の細胞は増加し、72時間後には外毛根鞘層での蛍光は摘出直後に比べ増強している。更にPDBu10および100 μ Mを含む培養液中で72時間培養後の染色では100 μ Mで培養したものでは明らかな毛乳頭からの蛍光が認められる。毛根部のethidium bromideによる蛍光強度とcalceinによる蛍光強度の比をグラフに表わした(Fig.14)。PDBu各濃度では死細胞によるethidium bromideの蛍光が時間経過と共に増強していることが認められた。しかし、PDBuの濃度を上昇させても、有意な蛍光強度の増加は認められなかった。

6.細胞内リン酸化促進剤phorbol esterの効果(Fig. 15)

この無血清器官培養系においてPDBuを投与して、毛の成長に対する効果を観察した。0.1nMから10⁴ nMのPDBuを培地中に投与したときに、毛の成長は100nM以上の濃度で用量依存的に抑制された。得られた用量反応曲線からphorbol esterによる毛の成長速度に対する50%阻害活性すなわち解離定数(Ki値)を算出した。培養開始から48時間目でのKi値は316 \pm 64.0nMと算出された。この値は培養継続時間によって変動は認められなかった。

7.毛の成長に対するプロテインキナーゼC 阻害剤の効果測定

この器官培養系を用いて、毛の成長に対するプロテインキナーゼC 阻害剤の効果測定した。プロテインキナーゼの特異的な阻害剤であるK252aを投与しPKC阻害剤単独で

の毛の成長に対する影響を観察した。K252aを0.1nMから1 μ Mまで変化させたときの毛の成長をPDBu非投与コントロール群にたいする比率として表わした(Fig.16)。24時間から72時間までのいずれの時間帯でも、K252aの投与により用量依存的に毛の成長が抑制された。この曲線よりKi値を算出した(Table 2)。

さらに、より強力なPKC阻害剤であるstaurosporineを培養液に投与してヒゲ毛包の毛の成長を観察すると、staurosporineは低い濃度(1nM)から毛の成長阻害を起している(Fig.17)。しかし培養開始から24時間まではさらに低濃度(0.01-0.1nM)においてかえって、毛の成長を促進していることも認められた。

H-7は、PKC選択的阻害剤として培養表皮角化細胞でphorbol ester作用を阻害することが知られている。これを培養液中に投与した観察でもstaurosporineと同様に用量依存的な毛の成長抑制が認められた(Fig. 18)。また、staurosporineに比較して弱いながら0.01-0.1 μ Mの濃度で毛の成長を促進していた。

K252a, staurosporine, H-7は共に培養時間の経過と共に若干Ki値が低下する蛍光にあった(Table 3)。また、各阻害剤とも十分低濃度で効果を示していることが分った。

PKCの調節領域でのphorbol esterの結合を阻害するPKC特異的阻害剤calphostin Cを培養液に加えて毛の成長を観察した。calphostin Cは単独では明らかな用量依存性のけの成長抑制を示さなかった(Fig. 19)。培養開始後24時間まではコントロール群の40-60%と毛の成長が遅れる傾向がみられたが、コントロール群との間に有意差は認められなかった。

8. Phorbol esterによる毛の成長抑制に対するPKC阻害剤の効果

PDBuを培養液中に投与することにより、毛の成長が抑制されるのを認めた。そこで前述したPKC阻害剤をPDBuと共に作用させた場合にPDBuの作用が消失するかどうかを調べた。すなわち、摘出直後のラットヒゲ毛包をPKC阻害剤により30分間ブレインキューベーションしてから、PDBuを投与した。PKC阻害剤には、これまでの実験結果から、

PKC阻害剤単独投与時の毛の成長促進作用が見られなかったK252aとcalphostin Cを選んだ。PDBuの濃度に関しては実験結果(Fig.15)から、ラットヒゲの毛の成長を有意に抑制し得る、最低限の濃度として 10^{-3} Mを培養液に加えることにした。PKC阻害剤および、PDBuともに培地中に加えたままにして、洗浄等の操作は行わず、培養開始から、24, 48, 72時間までの毛の成長を測定した。

$1\mu\text{M}$ のPDBuの存在下では、K252aによる前処理は、1から100nMの濃度ではPDBuの抑制効果に影響を及ぼさないが、 10^{-3} nMでは毛の成長が回復した。更に濃度を上げると毛の成長がやや抑制された (Fig 20.)。

Calphostin CによるブレインキューベーションにおいてもK252aのときと同様にPDBuの抑制効果を打ち消すことができた。calphostin Cは100nM以上の濃度で 10^{-3} MのPDBuの効果を打ち消すことができた(Fig. 21)。

考察

1. 実験方法の検討および結果の要旨

1) 細胞外から毛の成長に影響を与える物質が、細胞内カルシウムの変動を起こすことを示すために現在一般的になっている蛍光カルシウム指示薬による細胞内カルシウム濃度測定を行なった。蛍光カルシウム指示薬のなかで蛍光波長が530nmと可視光に近い共焦点レーザー顕微鏡で用いることのできるfluo-3 AMを用いた。fluo-3 AMは細胞膜近傍のエステラーゼによりアセトキシメチル基がはずれ、fluo-3としてカルシウム濃度に依存して蛍光波長530nmの蛍光を発する。⁴⁰⁾ レーザー共焦点顕微鏡は、本研究で用いた器官培養毛包のような通常の位相差顕微鏡あるいは微分干渉顕微鏡などで観察するのには厚すぎる標本の内部構造を観察するのに適しており、ラット毛包をの毛母細胞や毛乳頭細胞やその内部でのカルシウム濃度の変動を生きたまま観察することができた。胎仔牛血清(FCS)は、細胞培養には一般的に用いられるが、ヒゲ毛包の毛の成長に対しては5%以上の濃度では抑制的に働くことおよび報告されている^{4,41)}。そのため、毛の成長抑制物質として用いることにした。また、このFCS添加時にminoxidilは単離された毛包の毛の成長を促進すること³⁾、そしてこの毛の成長作促進作用は血清による抑制を打ち消す程度であることが知られている⁴⁾ので毛の成長促進物質としてminoxidilを用いることにした。その結果FCSはラットヒゲ毛包の毛の成長を抑制し、このとき細胞内カルシウムの上昇を起こしていることが明らかになった。また、minoxidilはFCSによる細胞内カルシウムの上昇を抑制することが明らかになった。

2) 細胞内カルシウム濃度の上昇または低下の毛の成長に対する影響

1mM以上の細胞外カルシウム濃度は、低カルシウム増殖促進培養液中で継代された表皮角化細胞で細胞内カルシウム濃度を上昇させ、細胞外カルシウム濃度を0.1mM以下にすると細胞内カルシウム濃度はこれにしたがって低下することが知られている^{23,29)}。そこで、細胞内カルシウムを上昇させる方法としては、10%FCSを添加したDMEM培養液を

用いることにした。また、カルシウムキレート剤であるEGTAを用いて培養液中のカルシウムをキレートして低カルシウム培養液を作製し、これにより細胞内に流入するカルシウムの低下を期待した。すると細胞外カルシウムの低下に伴い毛の成長は抑制されることが示された。カルシウムチャネル促進剤やカルシウムイオノフォアは血清とは異なり細胞外からのカルシウムの流入のみを引き起こすと考えられるが、今回の研究で観察・測定の対象となった毛の成長が有意に認められる時間これらの薬剤を作用させるとカルシウムの毒性による細胞死を引き起こすと予想されたため、用いなかった。一方FCS添加によって生じた毛の成長抑制は、これに含まれる上皮成長因子(EGF)等の成長因子が細胞内カルシウムの変動以外に直接にチロシinkinaseの活性化などを介して引き起こされた可能性は否定できないため、EGFや肝細胞増殖因子(HGF)などのより精製された成長因子によって今回観察された細胞内カルシウムの変動や毛の成長抑制を確認していく必要がある。また今後毛の成長・分化のマーカーを観察対象としてこれらの薬剤の影響を調べる必要もある。

3) PKCは細胞内カルシウムにより活性を制御されている。よって毛の成長に影響する物質は毛包細胞内でPKCの活性の変化を及ぼすはずである。しかしPKCの酵素活性については、実験の技術的な問題から測定することができなかった。すなわち、細胞内のプロテインinkinase活性を測定するためには多数の(通常 10^7-10^8 個)の均一な細胞を可溶化する必要がある。一つの毛包に含まれる細胞数は毛根鞘細胞と毛乳頭細胞を合計しても、 10^4 個程度であり、活性測定は量的に不可能であった。また、現在のところ毛乳頭が毛根鞘細胞に対して毛の産生能を誘導する機構が不明であり、分離培養および細胞可溶化操作の際に毛乳頭細胞と分離することは毛母が毛幹へと分化するための条件を取り除いてしまうことになり観察される酵素活性が生体内でのPKC活性を正しく反映しないと考えられた。PKCアイソフォームに特異的な抗体による染色または、PKCは、活性化に伴い自己リン酸化を起こすことから、このリン酸化は細胞を放射性リン酸で代謝標識することによ

り検出することにより間接的にPKCの活性化を測定することができるかもしれない。細胞内局在変化(translocation)や自己リン酸化に伴う分解(degradation)を用いた細胞内でのPKC活性の検出が可能であるか検討する必要がある^{1,12)}。

4) PKCの活性化および阻害が毛の成長に影響をもたらすことを示すためにphorbol esterによるPKCの活性化およびPKC阻害剤によってその抑制効果が消失するのを観察した(Fig.15-21)。phorbol esterによるPKCの活性化にはPKCの関与しないものもあることが報告されている⁴³⁾ ことと、毛の成長抑制がphorbol esterの非特異的な細胞毒性に由来する可能性もあることからPKCに特異的な阻害剤によるphorbol esterの作用の抑制実験およびcalcein AMとethidium bromideによる染色を行ない、phorbol esterによる非特異的な細胞毒性によって毛の成長が抑制されている可能性を否定した。

本研究の結果から器官培養下の毛の成長に細胞内カルシウムおよびPKCが関与していることが示された。細胞内カルシウムの持続的な上昇(plateau phase)は毛の成長を抑制し、このplateau phaseを低下させることは毛の成長の促進と関連していた(Fig. 12)。しかし、細胞外カルシウムをキレートし細胞内へのカルシウムの流入を抑制すると毛の成長は抑制された(Fig.3)。PKCをphorbol esterにより持続的に活性化すると毛の成長は抑制され、この抑制作用は特異的なPKC阻害剤により打ち消すことができた(Fig. 20,21)。PKC阻害剤には低濃度短時間作用させることにより、毛の成長を促進する作用のあることも明らかになった(Fig.17,18)。

2.毛の成長に関して

生体内では毛は3つの周期を有しており、活発な毛の成長がみられる成長期(anagen)と発毛を停止して退縮していく退行期(catagen)、発毛停止している休止期(telogen)と分類されており、休止期には毛包は表皮側に約1/3に退縮しその基底部が立毛筋付着部付近に位置している。休止期の毛包は細胞分裂能を失っている。この休止期の終わり頃毛乳頭からの活性化により"germ"と呼ばれる毛母細胞塊が基底側に向かって成長し、毛乳頭を

取り囲むように毛球部を形成し、ここで形作られた新生毛根鞘が生長期後期に上皮側に向かい伸張し次の周期の毛母を作る⁷⁾。放射性チミジンによる幹細胞の標識およびコロニー形成能から、立毛筋停止部直下の外毛根鞘の肥厚(bulge)つまり休止期に毛球部の位置する高さに次の時期のstem cellを形成する‘germ’が存在するとされている^{11, 35, 42)}。生体内ではこの‘germ’が毛乳頭周囲に移動しその刺激により分裂増殖する毛母となり、毛幹を産生している。成長期毛包はヒト頭皮では全毛包の75-100%を占め、その毛母細胞は活発な細胞増殖を行なっている。表皮角化細胞は正常な角化な角化が営まれている限り最終的には均質な角化細胞に分化するが、毛母細胞は毛幹のみならず内外毛根鞘のように形態の異なる角化組織に平行に分化する。器官培養された毛包の毛乳頭細胞周囲で活発に分裂する毛母細胞で放射性チミジンの取込みが認められている^{5, 16, 38)}。また、放射性ロイシンなどの毛幹への取込みが生体内での観察結果に匹敵すること^{18, 37)}、および生体内での平均的な毛の成長にほぼ匹敵する毛の成長が観察されていること^{4, 18, 36, 37, 38)}から、成長期における毛の成長は*in vitro*でほぼ再現できているものと考えられる。毛はヒトを除く哺乳類の体表を広く覆う表皮と一体となった器官であり、毛根を構成する毛根鞘細胞は表皮と相同な角化細胞であるとされている。よってこれに分化する毛母細胞の増殖能を測定対象として、その単離培養による細胞数の増減や放射性チミジンの取込みを観察する研究方法もある³⁰⁾。しかし、毛乳頭を取り除くと表皮角化細胞様の扁平上皮細胞に形態が変化してしまうこと²⁵⁾や、毛乳頭の失われた状態では外毛根鞘細胞は毛幹の産生を行なわないことから毛乳頭のない状態では毛の成長は観察することはできない。また培養毛乳頭細胞塊の移植により本来無毛部である足底に発毛を誘発できること⁴¹⁾、単離培養された表皮角化細胞を毛乳頭細胞と共培養することにより毛包構造と毛幹再構成が認められること⁴¹⁾などが知られている。これらのことから、毛幹の産生には、真皮成分である毛乳頭との相互作用が重要な役割を果たしていると考えられる。したがって毛の成長のメカニズムを調べるためには、細胞レベルでの実験のみでは不十分であり、毛根鞘細胞と毛乳頭細胞の相互作

用が維持されている系を用いる必要がある。

3. 新生仔ラットヒゲ毛包器官培養について

毛包器官培養を用いた最初の研究は1977年にUzuka⁴⁶⁾によるもので、約10時間の培養でごくわずかの毛の成長を認めたのみであった。その後、1989年Buhlら³⁾は新生仔マウスヒゲ毛包を用いてminoxidilの効果を測定し、Philpottら³⁶⁾はラット体毛毛包で7日間器官培養を維持し放射性チミジンの取込みとケラチンの合成が行なわれていることを確認した。その後器官培養された毛の成長を維持するための無血清波培養液が開発され、またinsulin等の添加物が明らかになり、1週間以上ラット体毛やヒト頭毛の成長を観察することが可能になった^{36,37)}。しかし、この時の培養においては培養開始後48時間までは毛頭周囲の毛母細胞に活発な放射性チミジンの取込みが認められたが、72時間以後では同部でのチミジン取込み能が低下しており、毛母細胞の増殖能の低下していることが示唆された。よって72時間以降に観察された、毛の成長は毛母細胞の増殖の結果生じた細胞群が毛幹へと分化していくことによりもたらされているのであって、新たな毛母細胞の補充は低下していくものと考えられる。

毛包の器官培養は従来から、齧歯類の胎仔あるいは新生仔の毛包³⁶⁾、成人女性ヒト前頭部の毛包³⁷⁾を用いて行なわれてきた。しかし、ヒトの毛包は、隣接する毛包同士であつても毛周期の相がしばしば異っている。このため、器官培養の結果観察される毛の成長抑制ないし促進が、投与する薬剤の影響によるものか、毛包摘出時の毛周期に由来するものなのか区別できない。この点に関して、哺乳動物では、毛頭側から尾側に向かって、一つの帯をなして同時期に成長するので、一定部位のすべての毛包はどの時期においても毛周期上のほぼ同一相を示すことが知られている。そして、特に哺乳類のヒゲ毛包は上口唇に位置する鋭敏な触覚器として特別に発達したもので、毛包周囲に静脈洞が発達し、有髄神経が分枝し、感覚受容器が分布している。この毛包のwhisker pad上の空間的な配置は三叉神経核、視床、大脳皮質で体部位表現の再現として保持されているため、特定の毛

包感覚神経からの刺激が入力する部位も同定されている。このような神経科学での研究からラットではすべての毛包に番号を付与されており、同定がしやすい。また、他の部分の毛(pelage)では毛球部の直径が大きなものでも50-60 μ m程度であるのに対し、100-300 μ mと大変に大きな毛包で、全体が緻密で丈夫な硝子膜に包まれているとともに特に新生仔では周囲結合組織が柔軟で、取り扱いが容易であり、手術時の侵襲による障害を受けにくい。また、新生仔期ではこの部に含まれる毛包の大多数が成長期毛包である。我々の観察でも摘出直後には5から10%程度の成長期中期とみられる2本の毛幹を有する毛包がみられるものの、それ以外は成長期後期の特徴を示し、根毛形成や毛母と毛乳頭の分離した退行期または休止期の毛包は認められなかった。このような利点から、本研究では、入手が容易で、手術操作等が容易な新生仔ラットのヒゲ毛包を用いた。培養液および添加する成長因子の選択によっては、3週間近くの培養が可能であり、毛の成長を調べるには大変に有用な研究材料であると考ええる。しかし、器官培養された毛包で観察された毛の成長が生体内での成長期毛包を忠実に再現しているかどうかという問題もあり、摘出され培養された毛包のviabilityに関しては注意が必要であると考えた。72時間培養後でも毛根部でのcalcein AMによる染色は低下していないことやPhilpottら^{36,37)}による放射性チミジンの取込みの結果、および植毛の際に体外で保存された毛包が48時間までは生摘可能なことから³⁵⁾、本研究において観察対象期間とした24から48時間程度では毛母が増殖能を保持していると考えられた。

4.細胞内カルシウム上昇と毛の成長

マウスヒゲ毛器官培養やラット体毛器官培養によって近年毛の成長に影響を与える薬剤や成長因子が同定されるようになった。それ以前より性ホルモンや甲状腺ホルモンが毛の成長に影響することが知られていたが、1993年Jindoら³⁸⁾はマウスヒゲ毛包無血清器官培養を用いて各種の成長因子の毛の成長に対する影響を調査し、EGFを始め、トランスフォーミング成長因子(TGF- α , β)、酸性、塩基性線維芽細胞増殖因子(a-, b-FGF)、イ

インターロイキン-1,6 (IL-1,6)などが毛の成長に対して抑制的に働くこと、そして、肝細胞増殖因子(HGF)と角化細胞増殖因子(KGF)が毛の成長を促進することを示した。毛の成長を抑制するとされた増殖因子の多くは標的細胞の受容体に結合することにより、 IP_3 を介した細胞内カルシウムの増加を引き起こすことが知られており、また毛の成長を促すHGFは、肝細胞では一過性のカルシウムの上昇とそれに続くカルシウム振動が見られることが知られている。細胞内カルシウムは細胞内の多くのシグナル伝達系の制御に深く関与していることが知られており、毛の成長抑制に細胞内カルシウムが関与していることが考えられた。

FCSは上記のような各種の成長因子を含んでいると考えられるが、器官培養の結果からはラットヒゲ毛包の毛の成長を抑制した(Fig. 3)。FCSの添加による毛の成長に関してはヒト頭毛およびラット体毛において毛の成長が抑制されることが報告されている^{34,35)}この抑制作用はFCS中に含まれるEGFやTGF- $\alpha 1, \beta 1$ などの成長因子が毛の成長に対しては抑制的に働くためと考えられている^{9,13,17,18,21)}。EGFやTGFは細胞膜上の受容体を介して、表皮角化細胞のPKC δ アイソフォームを活性化することも指摘されている^{9,13,38)}。

このとき細胞内カルシウムが上昇していることが認められた(Fig.12,13)。この時の細胞内カルシウムの上昇はFCS添加直後より始まる、急峻で高いカルシウム濃度の初期の第一相(transient peak)と、これがやや低下した後になだらかに比較的高値をとり続ける後期第二相(plateau phase)よりなっていた。このような細胞内カルシウムの二つの相をもつ変動は培養表皮角化細胞を用いても認めることができ、transient peakは細胞外を低カルシウムとした状態で、カルシウムイオノフォアionomycinを作用させた場合やカルシウムをキレートした血清によっても認められることから、細胞内のカルシウムプールからの遊離に由来するものとされる²²⁾。また、plateau phaseは細胞外を低カルシウムとすると認められないため、細胞外からの流入によるものとされる²⁰⁾。表皮角化細胞ではplateau phaseは25時間継続しうることが知られている²²⁾。また、本研究でも36時間経

過した毛包でfluo-3による蛍光強度は高値を維持していた。このdurationは毛の成長に影響を及ぼすには十分な長さであるため、細胞内カルシウムの上昇は毛の成長に対して抑制的な作用を及ぼしていたと考えられる。

本研究で観察された毛包の蛍光像には細胞質内での分布が不均一なものが認められた (Fig. 5, 6, 8, 9)。これは細胞質内でfluo-3の分布が不均一であったことによる可能性が高い。そのため、実際の細胞内カルシウムの変動よりも蛍光強度の変動が大きくなっている可能性がある。このため、Fig 12の測定には各毛包の毛母領域全体の蛍光強度の平均値を用いることとした。

5. minoxidilの作用機序

血清添加による毛の成長抑制は100 μ M minoxidilを添加することにより無血清器官培養コントロール群と同程度まで回復した。minoxidilは末梢血管の拡張をおこして血圧の下降を導く降圧剤として知られていたが、その副作用として頻繁に多毛症を起すことから男性型脱毛の軟毛化しつつある毛を終毛化する作用が認められていた。臨床的には男性型脱毛の初期(特に頭頂部に生じるもの)局所投与すると40%前後の有効率が得られることが認められている⁴³⁾。minoxidilの発毛の作用機序については、カリウムチャンネル開放剤として血管平滑筋にはたらく、局所血流量増加をもたらす間接作用^{2,45)}の他に、培養マウスヒゲまたは体表毛包に対して直接に毛の成長を促進する作用のあることが知られている^{3,5)}。その作用機序に関しては当初はカリウムチャンネル開放によると考えられていた。しかし、マウスヒゲ毛包細胞⁶⁾、ヒト頭毛包外毛根鞘細胞³⁰⁾、ベニガオザル汗腺細胞³²⁾を用いたパッチクランプ法などの電気生理学的な研究から、角化細胞上にはATP依存性カリウムチャンネルは存在せず、2種類のCa²⁺依存性カリウムチャンネルが存在するが、minoxidilおよびminoxidil sulfateによるカリウムチャンネルに対する作用は発毛とは直接関係しない可能性が指摘された。一方Xiongら⁴⁸⁾は1995年、蛍光カルシウム指示薬fura-2/AMをもちいて、minoxidilと同様に発毛促進を示すことが知られているカリウムチャンネル開放

剤、diazoxideにより培養マウス表皮角化細胞内カルシウム濃度が上昇することを示した。彼らはこの細胞内カルシウムの上昇が細胞外カリウムの上昇または特異的カリウムチャンネル阻害剤により抑制されることを示し、表皮角化細胞でカリウムイオン電流が細胞内カルシウム濃度に影響を及ぼしうること示した。本研究では、毛包角化細胞に対するこのFCSによる細胞内カルシウムのplateau phaseがminoxidilによる前処理により低下することが明らかになった。そしてこのplateau phaseの低下は細胞外カリウムによって影響を受けなかった。観察されたminoxidilによるplateau phaseの低下に関しては、plateau phaseは細胞外カルシウムの流入に由来することから、その流入を抑制しているかまたは、細胞外へのカルシウムのくみ出しが促進されていると考えられる。今後細胞外カルシウムをキレートした条件で毛の成長やplateau phaseの変動を観察していく必要がある。また、細胞膜または、小胞体上のカルシウムATPaseまたはカルシウムポンプに対するminoxidilの効果を検討していくことなどがこの薬剤の作用機序を解明するうえで重要になってくるものと考えられる。

6. 角化細胞でのカルシウム濃度の影響

細胞外のカルシウムは細胞内へのカルシウムの流入を介して、培養表皮角化細胞の増殖・分化に影響を与えることが知られている³⁹⁾。1.2-2.4mMの比較的高濃度の細胞外カルシウム濃度で培養すると、コンフルエントに達した後の継代培養で増殖能が低下し、またコンフルエントに達する以前にInvolcurinおよびtransglutaminase等の分化マーカーの合成が始まり、cornified envelopeを形成するようになる。また、細胞内のPKC α アイソフォームの活性化、およびdown-regulationが認められている^{8,12,29)}、逆に低カルシウム濃度の培養液中では分化マーカーの出現は遅れ、継代培養後の増殖は促進され¹⁰⁾、細胞内のPKC α アイソフォーム活性化は抑制されることが報告されている¹²⁾。すなわち、細胞外カルシウム濃度が高い条件では表皮角化細胞の増殖は抑制され、分化は促進される。一方細胞外カルシウム濃度の低い条件では、逆に増殖は抑制され、分化が促進され

た。また、細胞内カルシウムをキレートすることにより、角化細胞の分化は抑制されることと²⁶⁾、細胞内カルシウムの遊離を促す薬剤であるthapsigarginによって表皮角化細胞の細胞内カルシウムを上昇させたのみでは、増殖の抑制は見られるが、分化マーカーの発現は見られなかったことなどから、角化細胞の分化は細胞内カルシウムの上昇のみでは誘導することはできず、細胞の接触などによるカルシウム以外の細胞内シグナルを必要とする²³⁾とされている。

器官培養毛包では隣接する細胞との接触や毛乳頭からの分化を誘導するシグナルは確保されていると考えられる。本研究の結果により細胞外カルシウムイオン濃度をキレートするに伴い毛の成長が有意に抑制されることが認められた。この抑制はEGTAでキレートした培養液中のカルシウム濃度を2mM CaCl_2 を添加して補正することによりカルシウム濃度2mMの培養液中のコントロール群と同程度まで回復した。よって低カルシウムにより毛母細胞の増殖が促進されたとしても、その毛幹への分化が抑制されてしまうと毛の成長は総和としては抑制されることが考えられる。

細胞内カルシウム濃度測定実験の結果から、毛の成長は血清等により細胞内を高カルシウムとした時にも抑制される。すなわち、毛母細胞での増殖抑制によっても毛の成長は抑制されると考えられる。つまり、毛の成長は毛母細胞の増殖と、その結果できた新生毛母の毛幹への分化の両者が関与していると考えられ、そのどちらかでも抑制を受けると総和としての毛の成長は抑制されるものと考えられる。また、毛母細胞の活発な分裂増殖は毛球の下半部もしくは毛乳頭に接する毛母細胞で起るとされるが^{7,37)}、FCSによる刺激の後に細胞内カルシウムの低下が最も明瞭に認められたのは毛母の上皮側の毛幹への分化の進んだ部位であった(Fig.5, 6)。この高さではすでに細胞の形態が長軸方向に変形しつつあり(Fig. 6)、細胞増殖よりも毛幹への分化がより優勢に進行していると考えられる。毛幹への分化は細胞質内にケラチンを沈着しながら細胞自体はcell deathないしはより非活動的な状態に向かうものと考えられるため、この領域での細胞内カルシウムが早期に低下するこ

とはFCS刺激後の細胞内カルシウムの上昇による分化促進も早期に停止していたものと考えられる。

細胞内カルシウム濃度を生理的な値から上昇させても低下させても毛の成長は抑制された。毛の成長促進に対する細胞内カルシウム濃度には一定の至適濃度が存在すると考えられた。血清およびこれに含まれる各種成長因子には細胞内カルシウム以外のシグナル伝達系にも関与している³¹⁾。そのため、観察された細胞内カルシウムの変動とは別の系が作用し、その結果観察されたような毛の成長の修飾が見られた可能性は否定できない。しかし、プロテインキナーゼC(PKC)は細胞内カルシウムやphorbol esterにより持続的に活性化されると、酵素活性が低下することが知られている(down-regulation)³²⁾ことや、表皮角化細胞の増殖・分化にPKCと細胞内カルシウムは深く関与しており、両者の作用には類似点も多くみられることから、本研究ではこの細胞内カルシウムの毛の成長に対する効果がPKCの活性化およびdown-regulationによって制御されている可能性について更に検討を行った。

7. 毛の成長に対するPKCの役割について

プロテインキナーゼC(PKC)はカルシウム依存性プロテインキナーゼの一つであり、ATPの γ -リン酸基を蛋白質の特定のセリンまたはスレオニンのヒドロキシル基へ転位する。その活性発現にはカルシウムとともにフォスファチジルセリンなどの細胞膜を構成するリン脂質が必須である。PKCのカルシウムに対する親和性はジアシルグリセロールにより高められる。多くのホルモン、神経伝達物質、成長因子は膜に存在するフォスホリパーゼCを活性化し、ジアシルグリセロールとイノシトール1,4,5-三リン酸(IP₃)が生成される。ジアシルグリセロールはPKCを活性化し、IP₃は細胞内のカルシウムを上昇させる。また、発癌プロモーターとして知られるphorbol esterはジアシルグリセロールに代って直接PKCを活性化することが知られている^{6,33)}。最初に蛋白質レベルで同定されたconventional PKC (PKC α , β I, β II, γ)は調節領域中にカルシウム結合部位とphorbol

ester結合部位をもつ。これ以外にも調節領域の異なるアイソフォームが約11種類知られており、カルシウム結合部位をもたず、phorbol ester結合部位のみをもつnovel PKC(PKC $\delta, \epsilon, \theta, \eta$)また、phorbol ester結合部位の半分を失ったものも知られている(atypical PKC)。このように多くの変異のあることの知られている調節領域とは対照的に、触媒領域はPKCのアイソフォームでよく保存されている¹⁾。更に、他のセリン・スレオニンキナーゼとも相同性が高いことが知られている。本研究で使用したPKC阻害剤でK252a, staurosporine, H-7はPKCの触媒領域におけるATPの結合を競合的に阻害する。そのため、これらの阻害剤はサイクリックAMP依存性プロテインキナーゼやサイクリックGMP依存性プロテインキナーゼ、ミオシン軽鎖キナーゼなど他のプロテインキナーゼに対しても同程度の阻害作用を示す。しかし、プロテインキナーゼ以外の酵素に対しては阻害活性はないか、ごく弱いとされている。これに対しcalphostin Cは調節領域でphorbol esterのPKCへの結合を阻害する。よってそのPKCに対する特異性は高い。

本研究の結果からPDBuは100nM以上の濃度で用量依存的に毛の成長を阻害した。そして1 μ M PDBuによる毛の抑制は、プロテインキナーゼの特異的な阻害剤であるK252aが100nM以上の濃度より消失し(PDBu未処理コントロール群の108-119%)、PKCに特異的な阻害剤 calphostin CによってもPDBuの作用が消失した(PDBu未処理 コントロール群の82-109%)。よってPKCが毛の成長に関与していることが示された。

PKCの細胞内の作用機構は多岐に渡り、また、それぞれのアイソフォームで作用が異なると考えられている。表皮角化細胞でのphorbol esterによる急性期の作用は増殖抑制、分化促進である。マウスの表皮初代培養系ではphorbol esterはDNA合成を抑制し、分化マーカーであるinvolucrin, transglutaminaseなどの合成を促進することは先に記したが、phorbol esterにより処理すると急速にPKCのdown-regulationが起ることが知られている。すなわち、PKCは活性化を受けるとdiacylglycerol、リン脂質およびカルシウムとともに複合体を作り細胞膜近傍に移動し(translocation)、細胞膜にアンカーシプロテア

ーゼによって分解される(degradation)²⁹⁾。培養角化細胞では特に、conventional PKCである α アイソザイムがdown regulationを受けることが知られている¹²⁾。PKCに対する特異的な抗体を用いた研究からphorbol esterを作用させた培養表皮角化細胞が6時間から24時間でdown-regulationを起すことが知られている^{8,29)}。そして、phorbol esterにはヒト血小板でのP47蛋白質やT細胞CD3膜表面蛋白質のリン酸化でdown-regulationを起すが、このdown-regulationはK252a, staurosporineおよびその誘導体を用いてを抑制することができること知られている¹⁰⁾。角化細胞ではPKCのdown-regulationは急速に進行することから、今回PDBuにより持続的に活性化され、毛包を構成する毛根細胞内のPKCは24時間後にはdown-regulationにより多くが活性を失ったと考えられる。このときPKC阻害剤であるK252a, calphostin Cにより前処理することにより毛の成長が回復が認められた。K252aはPKCのATP触媒作用を競合的に阻害する薬剤であり、calphostin Cはphorbol esterによるPKCの活性化自体を競合的に阻害する薬剤である。そこで一定濃度のPDBuによる抑制作用に対してこれらの薬剤の濃度を変化させたときに、ある濃度でその抑制作用が消失したことから、PDBuによる抑制作用はPKCを介したものであると結論づけることができる。そして、毛の伸びが観察できる数十時間作用させることによりPDBuは角化細胞内のPKCのdown-regulationを起こしている可能性が非常に高いと考えられる。このdown-regulationに対しても拮抗作用を示すことが知られているK252aで毛の成長が回復したことから、phorbol esterによって生じていた毛の成長抑制はPKCのdown-regulationの結果生じていたものである可能性が高いと考えられる。しかし、この可能性については毛母細胞内でのPKCの活性またはdown-regulationを実際に観察していないために、結論を下すことはできず、今後更に検討を加える必要がある。

また、staurosporineは角化細胞でKi値の1/1000から1/100程度の濃度でPKC活性化を促進する作用をもつことが知られている¹⁴⁾ この薬剤を低濃度で24時間以内に作用させ

たときに毛の成長が促進されてることが認められた。H-7でも同様な毛の成長促進が認められた。しかし、24時間以上作用させたとき、薬剤の濃度をあげたときには毛の成長は抑制されたことから、これらの薬剤で見られた毛の成長促進にもPKCのdown-regulationが関与しているかもしれない。また、satursporineおよびH-7には他のプロテインキナーゼに対する抑制作用もあることから、PKAやPKGなどのPKC以外のプロテインキナーゼが毛の成長に関与している可能性も示唆される。

まとめ

今回毛の成長に対して、受容体刺激による細胞内カルシウムの上昇、また、細胞外カルシウムのキレートによる細胞内カルシウムの低下、そしてその細胞内カルシウムによって制御される細胞内リン酸化の毛の成長に対する役割を検討した。

その結果、このラットヒゲ器官培養における細胞内カルシウム、PKCの毛の成長に対する効果に関して以下のことが判明した。

1)ラット体毛の毛包の器官培養において、胎仔牛血清(FCS)の添加は毛の成長を抑制することが知られているが、DMEM培養液のみの毛包器官培養に、FCSを添加することにより細胞内カルシウムは、添加直後より一過性に上昇し、蛍光強度としては飽和蛍光強度近くにまで達した(第一相、transient peak)。その後10分間に急速に低下し、20分後までに刺激前蛍光強度の1.3倍程度にまで低下したが、ここで蛍光強度の低下は止まり、この蛍光強度を維持した(第二相、plateau phase)。毛の成長を抑制するFCSの毛包細胞内カルシウムに対する効果は、この特徴的な二つの相を有する細胞内カルシウムの上昇であることが判明した。

2)毛の成長を促進する薬剤であるminoxidilは、FCS添加による毛の成長抑制を打ち消し、毛の成長を促進した。このとき細胞内カルシウムを測定すると、FCSの添加により急激な細胞内カルシウムの上昇であるtransient peakが認められる点はminoxidilを含まない培養液中でインキュベートしたときと同様であるが、transient peakの急激な低下がplateau phaseに移行せずに、低下を続け30分後には刺激前の1.2倍程度の蛍光強度に、60分後には添加以前の蛍光強度にもどっていた。36時間のインキュベートの後にもminoxidilの有無による蛍光強度の差は残存した。

3)細胞外カルシウムをキレートして、低カルシウム無血清DMEM培養液中でのラットヒゲ毛包の毛の成長を測定して、細胞外カルシウムの低下は毛の成長を抑制することを示

した。毛の成長は細胞外カルシウム濃度の低下と共に抑制され、これを通常のDMEM培養液におけるカルシウム濃度である2mMに補正することで、回復した。

4) Phorbol esterの投与は毛の成長を抑制した。PKC特異的阻害剤及びプロテインキナーゼ特異的阻害剤はこのphorbol esterの抑制作用を消失させた。そこでこの器官培養における毛の成長にPKCが関与していることが結論づけることができた。また、角化細胞でのPKCのdown-regulationは急速に進行することが知られており、PKC特異的な阻害剤によりPDBuで誘発された毛の成長抑制が打ち消されたことから、このPDBuの毛の成長抑制はPKCのdown-regulationによる可能性が高いと考えられた。

5) プロテインキナーゼに特異的な阻害剤 (K252a, staurosporine, H-7)は、単独に投与すると毛の成長を阻害した。しかし、短時間これらの阻害剤を低濃度で作用させたときには毛の成長が促進されることがあった。そしてPKC特異的阻害剤(calphostin C)は単独では毛の成長阻害を示さなかったことから、down-regulationを起こさないような条件下のPKC活性化が毛の成長促進に結びつく可能性とPKC以外のプロテインキナーゼが毛の成長に関与している可能性が示唆された。

謝辞

項を終えるにあたり、本研究の実験の指導をいただきました防衛医大
生理学第一講座 福田 潤教授に深謝いたします。

また、貴重な助言をいただきました同講座助手 榊 和子先生、塚田 信吾先生
に心から感謝いたします。

图表

Table 1.

Cumulative hair growth of rat vibrissa follicles
in serum-free organ culture

Period in culture (hr)	vibrissa follicle growth rate ($\mu\text{m}/24\text{hr}$)
24	204 ± 48.9 (SEM, n=8)
48	212 ± 35.7 (SEM, n=8)
72	190 ± 30.8 (SEM, n=8)
96	176 ± 28.9 (SEM, n=8)

Table 2.

Effect of extracellular Ca^{2+} concentration on rat vibrissa follicles
in organ culture

EGTA (mM)	extracellular Ca^{2+} (mM)	hair growth ($\mu\text{m}/\text{day}$) mean \pm SEM (n=8), at 4 day culture
0	2mM	227 ± 29.5
1mM	1mM	165 ± 18.9
1.6mM	0.4mM	144 ± 45.8
1.8mM	0.2mM	55.9 ± 17.1
2.0mM	almost 0mM	16.2 ± 7.19
2.0mM	2mM (by CaCl_2)	219 ± 12.3

Table 3

Dissociation Constant (K_i , IC_{50}) of PKC-inhibitors

	Duration of Culture	K_i (IC_{50})
K252a	24	69nM
	48	56nM
	72	45nM
<hr/>		
staurosporine	24	3.9nM
	48	1.2nM
<hr/>		
H-7	24	56 μ M
	48	9.9 μ M

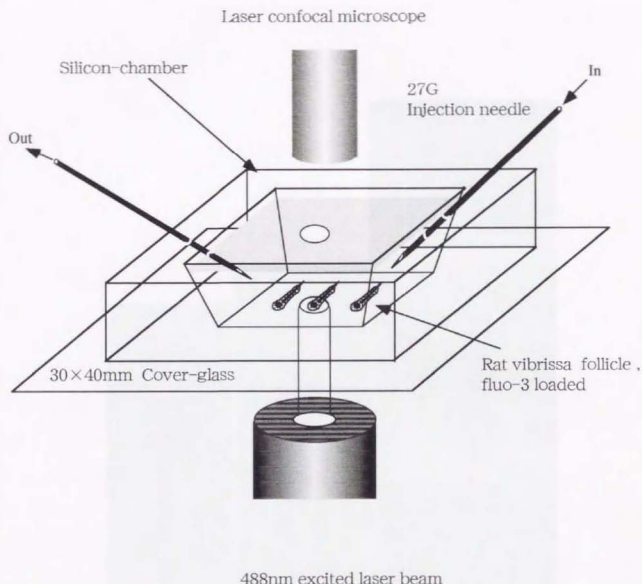


Fig. 1 : レーザー共焦点顕微鏡による細胞内 Ca^{2+} 濃度測定の様式図。

ラットヒゲ毛包は膜透過性蛍光カルシウム指示薬 fluo-3 AM (5 μM) を負荷した後、コラーゲンゲルで包埋しシリコン製測定用 chamber 内で DMEM 培養液中に静置した。レーザー共焦点顕微鏡下に励起波長 488nm で観察し、蛍光強度を測定した。測定終了後 ionomycin (2 μM) により細胞内へのカルシウムを流入させ飽和蛍光強度を測定し、続いて EGTA (2mM) でカルシウムをキレートし、無カルシウム蛍光強度を測定した。

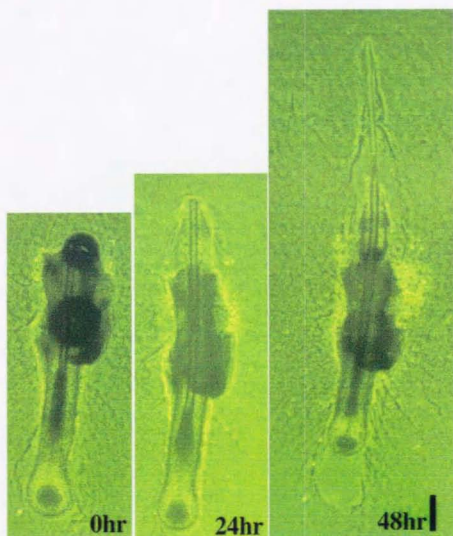


Fig. 2: ラットヒゲ毛包無血清器官培養の位相差顕微鏡像。
培養時間の経過に伴い毛の成長が認められる。毛球部の退縮および
根毛様形成を認める。Scale bar: 150 μ m

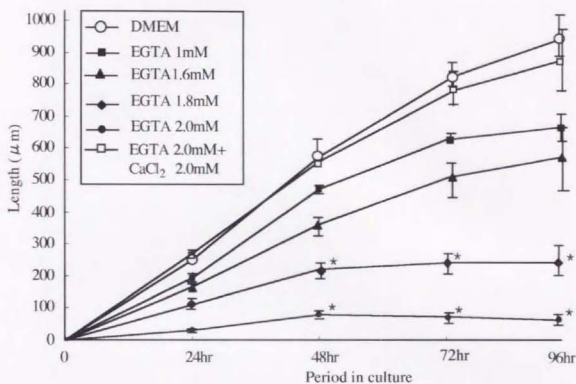


Fig. 3: ラットヒゲ毛包の毛の成長に細胞外カルシウムの対する効果。
 無血清DMEM培養液および培養液中のカルシウムをEGTAでキレートした培養液中で96時間まで毛包を培養した。コントロール群(○)に対して、細胞外カルシウム濃度をEGTAにより1mM (■), 0.4mM (▲), 0.2mM (◆), 0.1μM (●)とすると毛の成長は抑制された。
 キレートした細胞外Ca²⁺をCaCl₂により2mMに補正することにより毛の成長は回復した(□)。
 points : mean ± SEM (n=8), * : p<0.05, Student's un-paired t-test

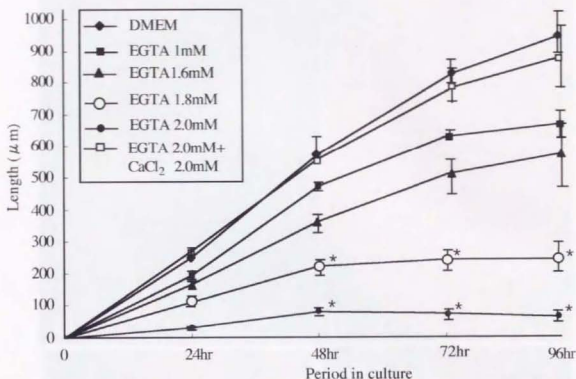


Fig. 4 : Effect of extracellular Ca^{2+} on rat vibrissa hair growth.

Chelation of Ca^{2+} in DMEM medium resulted in dose-dependent inhibition of hair growth.

Compensation of extracellular Ca^{2+} with CaCl_2 restore the hair growth completely.

points : mean \pm SEM (n=8),

* : $p < 0.05$, Student's un-paired t-test

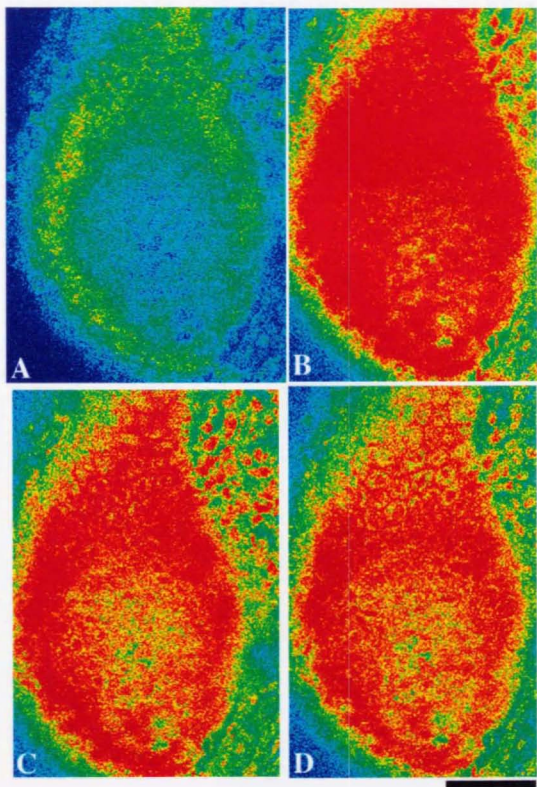


Fig. 5: fluo-3 によるラットヒゲ毛包毛根部のレーザー共焦点蛍光顕微鏡像。FCSの添加により一過性の蛍光の上昇、およびこれに引続く低下が認められる。A) FCS添加 5分前のDMEM培養液中。B) 10% FCS添加直後。毛根部全域に渡る強い蛍光が観察される。C) 10分後。毛乳頭、毛幹下部に接する毛母領域で蛍光の低下が認められる。D) 20分後。蛍光の低下は進行している。Scale bar: 100 μ m

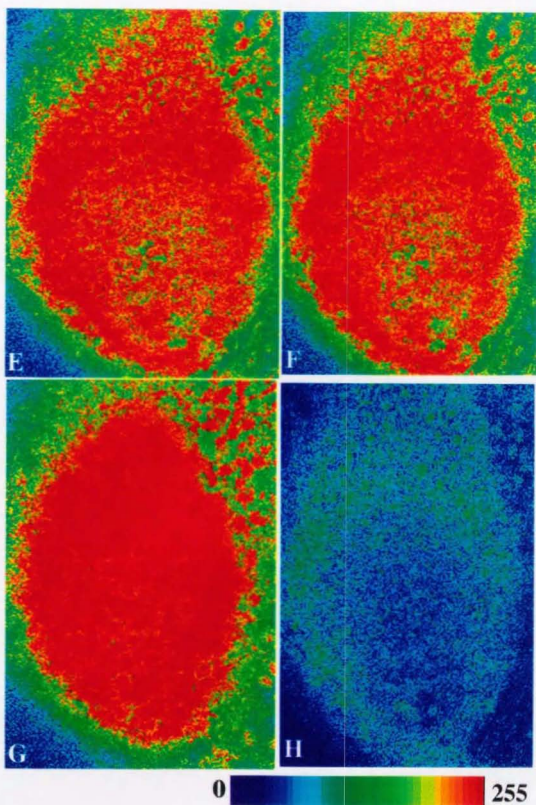


Fig. 5 :fluo-3 によるラットヒゲ毛包毛根部のレーザー共焦点蛍光顕微鏡像。(続き)
 E) 30分後。蛍光強度は20分後と差がみられない。 F) 60分後。蛍光強度は20分後、30分後と差は認められない。 G) 2 μ M ionomycinによる飽和蛍光強度。
 H) 2 μ M ionomycinおよび 2mM EGTAによる無カルシウム時の蛍光強度

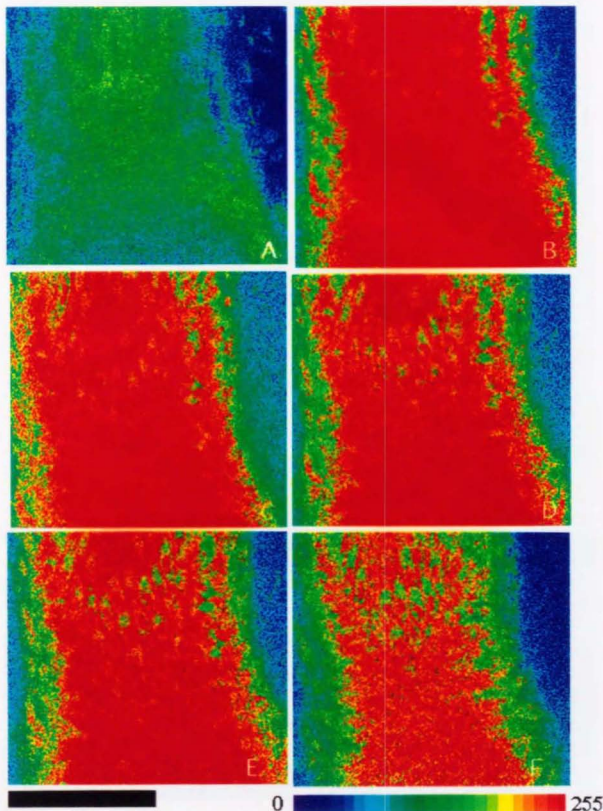


Fig. 6: fluo-3によるラットヒゲ毛包毛根上部のレーザー共焦点蛍光顕微鏡像。FCSの添加により一過性の蛍光の上昇、引続く低下が認められる。
 A) FCS添加5分前のDMEM培養液中。B) 10% FCS添加直後。C) 10分後。毛根上部での蛍光強度が低下しているのが認められる。D) 20分後。蛍光強度の低下は更に進み、長軸方向に細長く伸びた毛母細胞の外形が明瞭になっている。E) 30分後。蛍光強度は20分時のものとあきらかな差は認められない。F) 60分後。この標本では蛍光強度は若干低下したが、以前として高い蛍光強度を維持している。
 Scale bar: 50 μ m

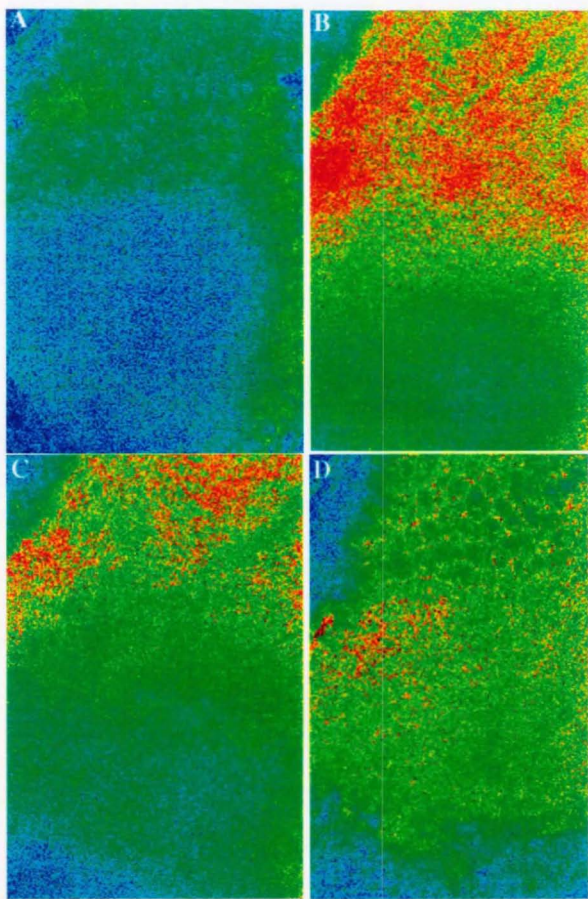


Fig. 7: fluo-3によるMXDを含む培養液中でのラットヒゲ毛包毛根部のレーザー共焦点顕微鏡像。fluo-3負荷の前に30分間 $100 \mu\text{M}$ MXDを含む培養液中でラットヒゲ毛包をインキュベートした。その後fluo-3を負荷して観察を行った。

A) FCS添加 5分前の $100 \mu\text{M}$ MXDを添加したDMEM培養液中での蛍光像。B) 10% FCS添加直後。この標本での蛍光の上昇はやや弱い。C) 10分後。D) 20分後。

Scale bar: $100 \mu\text{m}$

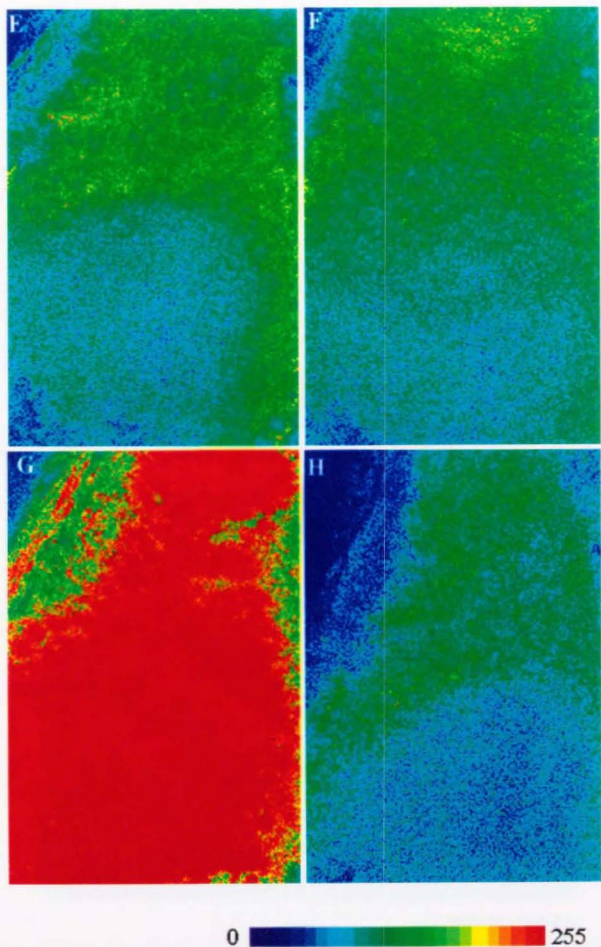


Fig. 7: fluo-3によるMXDを含む培養液中でのラットヒゲ毛根部のレーザー共焦点顕微鏡像。(つづき)
 E) 30分後。F) 60分後。G) $2\mu\text{M}$ ionomycinによる飽和蛍光強度測定。H) $2\mu\text{M}$ ionomycinおよび 2mM EGTAによる無カルシウム時の蛍光強度

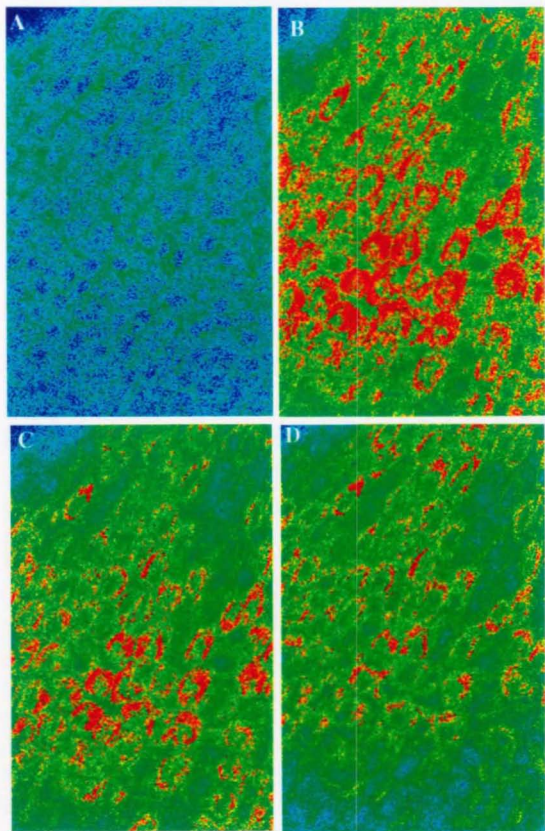


Fig. 8: fluo-3によるMXDを含む培養液中でのラットヒゲ毛包毛根上部のレーザー共焦点顕微鏡像。fluo-3負荷の前に30分間 $100 \mu\text{M}$ MXDを含む培養液中でラットヒゲ毛包をインキュベートした。その後fluo-3を負荷して観察を行なった。A) FCS添加 5分前の $100 \mu\text{M}$ MXDを添加したDMEM培養液中での蛍光像。B) 10% FCS添加直後。強い蛍光が認められる。C) 10分後。時間経過と共に蛍光は低下している。D) 20分後。 Scale bar: $50 \mu\text{m}$

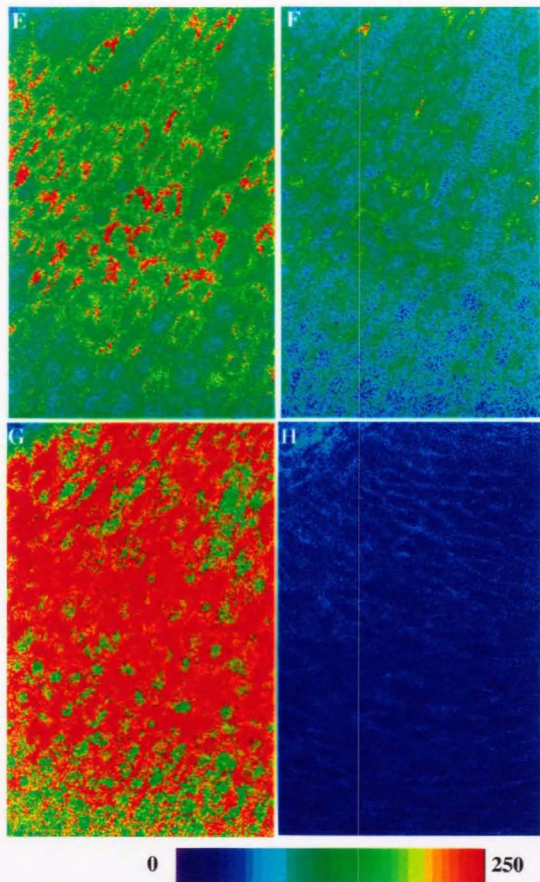


Fig. 8: fluo-3によるMXDを含む培養液中でのラットヒゲ毛包毛根上部のレーザー共焦点顕微鏡像。(つづき)

E) 30分後。時間経過と共に蛍光の低下は続いている。F) 60分後。

G) $2\mu\text{M}$ Miconomycinによる飽和蛍光強度測定。H) $2\mu\text{M}$ Ionomycinおよび 2mM EGTAによる無カルシウム時の蛍光強度。

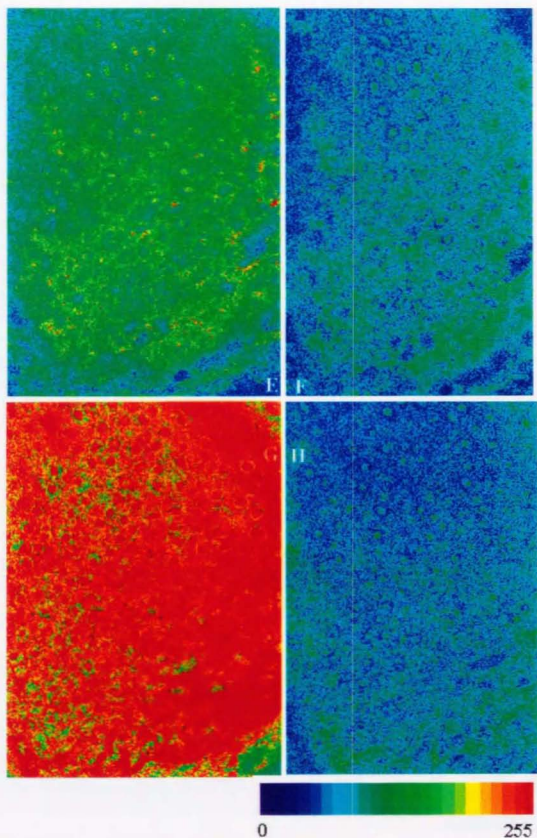


Fig. 9: fluo-3によるMXDを含む高カリウムDMEM培養液中でのラットヒゲ毛包毛根部のレーザー共焦点顕微鏡像。(つづき)

E) 30分後。F) 60分後。G) $2\mu\text{M}$ Mionomycinによる飽和蛍光強度測定。H) $2\mu\text{M}$ ionomycinおよび 2mM EGTAによる無カルシウム時の蛍光強度。

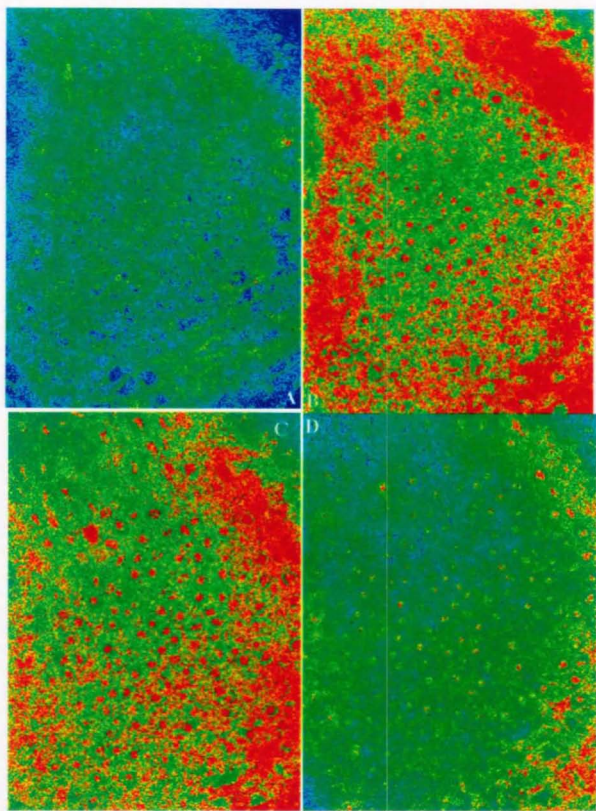


Fig. 9: fluo-3によるMXDを含む高カリウムDMEM培養液中でのラットヒゲ毛包毛根部のレーザー共焦点顕微鏡像。カリウム濃度を60mMに調整したDMEM培養液に100 μ M MXDを添加した。この中でラットヒゲ毛包を30分間インキュベートし、その後 fluo-3を負荷し、蛍光を観察した。A) FCS添加 5分前の100 μ M MXDを添加したDMEM培養液中での蛍光像。B) 10% FCS添加直後。強い蛍光が認められる。C) 10分後。時間経過と共に蛍光は低下している。D) 20分後。Scale bar: 100 μ m

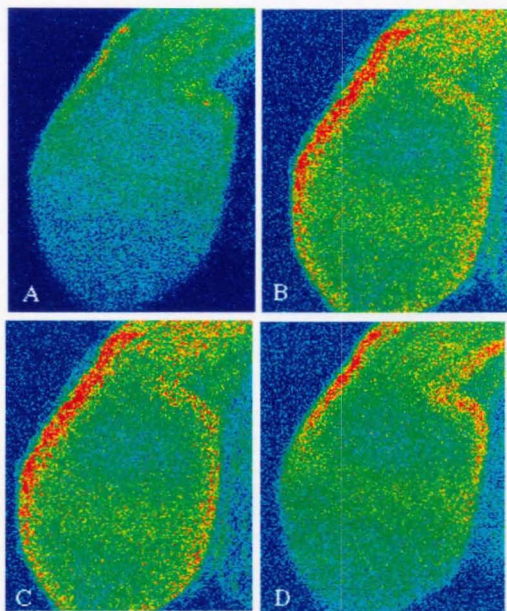


Fig. 10: fluo-3によるMXDを含む培養液中でのラットヒゲ毛包毛根部のレーザー共焦点顕微鏡像。FCSIによる刺激を行わない場合の蛍光強度の時間的変化。100 μ M MXDを添加した後の蛍光強度の経時的変化を示す。

A) MXD添加5分前のDMEM培養液中での蛍光像。B) MXD添加直後。最表層の外毛根鞘層で蛍光強度は亢進している。C) 10分後。D) 20分後。時間経過に伴う変化は認められない。

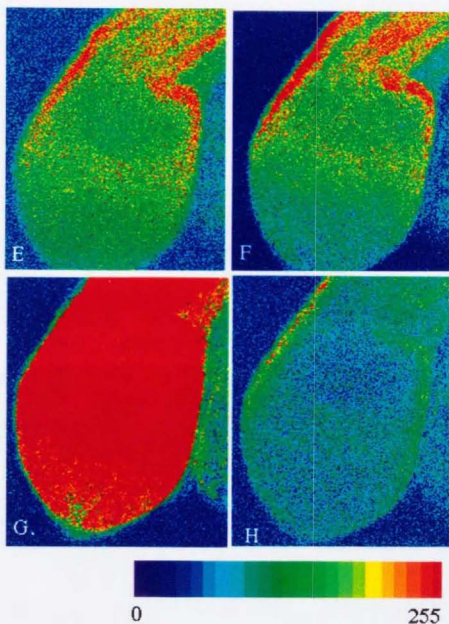
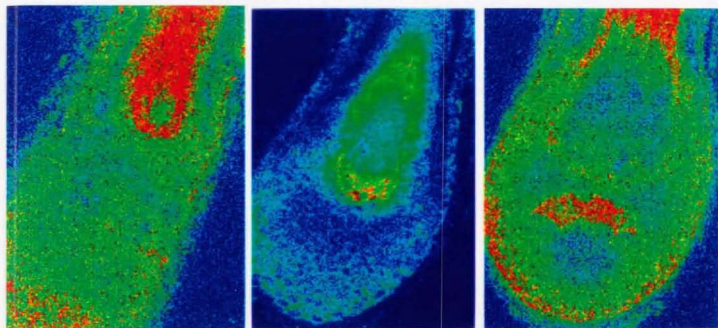


Fig. 10: fluo-3によるMXDを含む培養液中でのラットヒゲ毛包毛根部のレーザー共焦点顕微鏡像。FCSによる刺激を行わない場合の蛍光強度の時間的変化。100 μ M MXDを添加した後の蛍光強度の経時的変化を示す。(つづき)
 E) 30分後。F) 60分後。この標本では毛幹下部での蛍光強度が上昇していた。
 G) 2 μ M Miconomycinによる飽和蛍光強度測定。H) 2 μ M Miconomycinおよび2mM EGTAによる無カルシウム時の蛍光強度。

Cultured for 36hr with 10% FCS



Cultured for 36hr with 10% FCS+100 μ M MXD

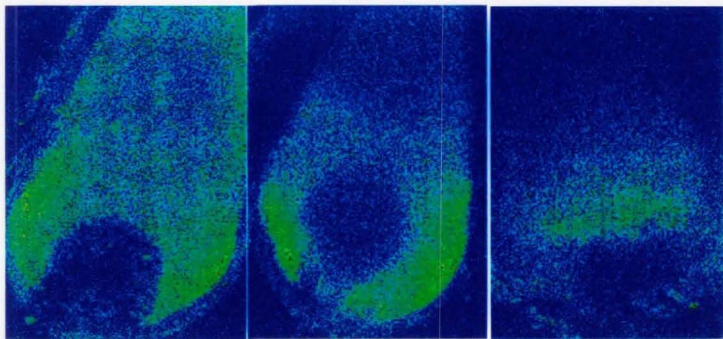


Fig. 11: 10%FCSを含むDMEMおよび100 μ M MXDを添加した10%FCSを含むDMEM培養液で36時間培養後のラットヒゲ毛包毛根部のfluo-3によるレーザー共焦点顕微鏡像。
 上列) 10% FCSを含むDMEM培養液中で 36時間培養後のラットヒゲ毛包。
 特定の3例を示す。
 下列) 100 μ M MXDを添加したDMEM培養液中で36時間培養後のラットヒゲ毛包。
 特定の3例を示す。

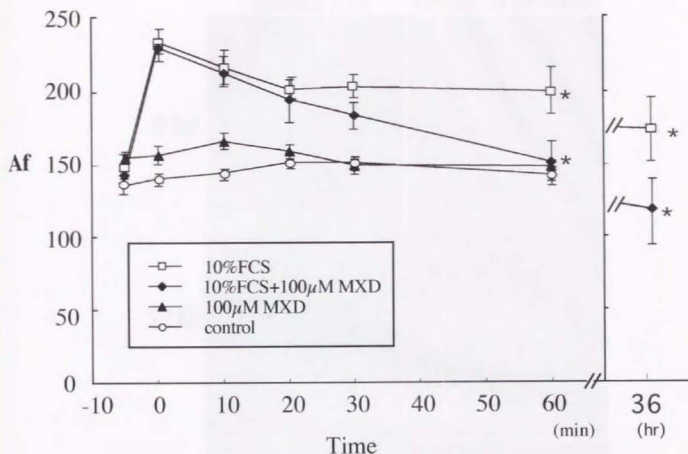


Fig. 12: ラットヒゲ毛包の細胞内カルシウムに対するFCSおよびMXDの影響

FCSによる刺激を行わなかったコントロール群(○)および100 μ M MXD添加群(▲)では細胞内カルシウムには大きな変化は認められない。

FCSの添加により細胞内カルシウムは一過性に上昇する(transient peak)が、20分後まで、急速に低下する(□, ◆)。

MXDを含まない培養液中では(□), 20分以後細胞内カルシウムは高値のまま推移する(plateau phase)。100 μ M MXDを含むDMEM培養液中(◆)では20分後も細胞内カルシウムの低下は続き、60分後には刺激前およびコントロール群との有意差は認められない。

Af:蛍光強度絶対値。points: mean \pm SD, *: $p < 0.05$, Student's un-paired t-test

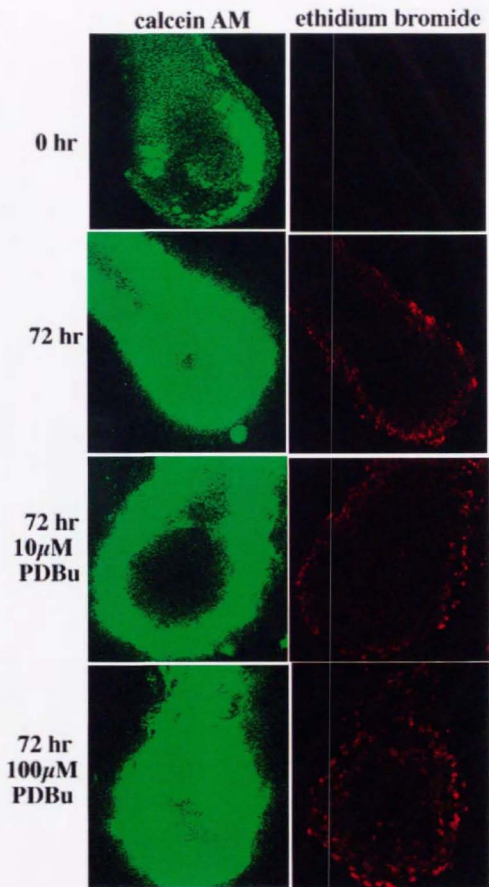


Fig. 13: calcein AMおよびethidium bromideによるラットヒゲ毛包細胞の生存度測定
 DMEM培養液および図中に示した濃度のphorbol-12,13-dibutyrateを含む培養液中で
 72時間培養したヒゲ毛包をcalcein AMおよび ethidium bromideで染色し、細胞の生存度を
 測定した。calceinによる強い蛍光が認められる。一部には浸透の不良なものが認められた。
 これに対して、ethidium bromideによる蛍光は抽出直後にはごく僅かに認められる。
 72時間の培養後にはethidium bromide陽性の細胞は増加している。

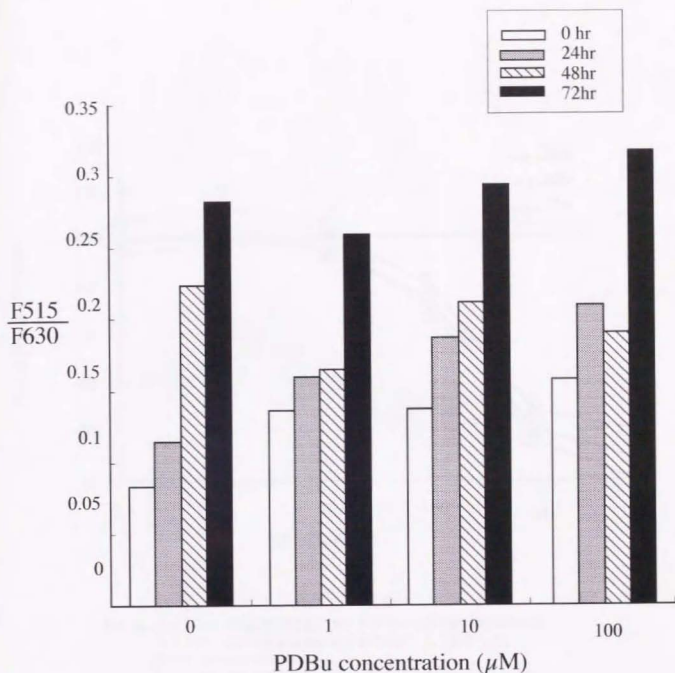


Fig 14 :培養時間経過および PDBu の濃度の細胞生存度に対する影響
 0-100 μM PDBu を含む培養液中で毛包を器官培養した後に calcein AM/ethidium bromide による染色を行ない、それぞれによる蛍光波長を 515nm, 630nm で測定し、蛍光強度の比を算出した。
 PDBu の各濃度で培養時間の経過と共に ethidium bromide による蛍光強度が上昇したが、PDBu の濃度による有意な蛍光強度の差は認められなかった。

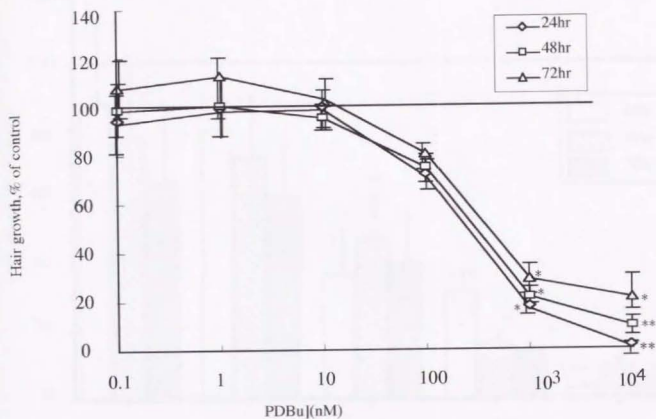


Fig. 15 : ラットヒゲ毛包の毛の成長に対するPDBuの用量依存的抑制効果
 コントロール群の毛の成長に対する百分率として表わした。
 points : mean \pm SEM (n=8) ,
 * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, Student's un-paired t-test
 片対数グラフ

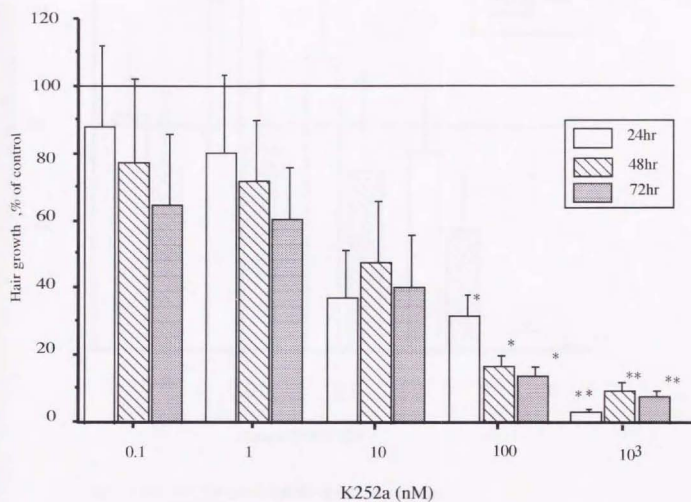


Fig. 16 :ラットヒゲ毛包の毛の成長に対するK252aの用量依存的抑制効果
コントロール群の毛の成長に対する百分率として表わした。

bars : mean \pm SEM (n=8)

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, Student's un-paired t-test, 片対数グラフ

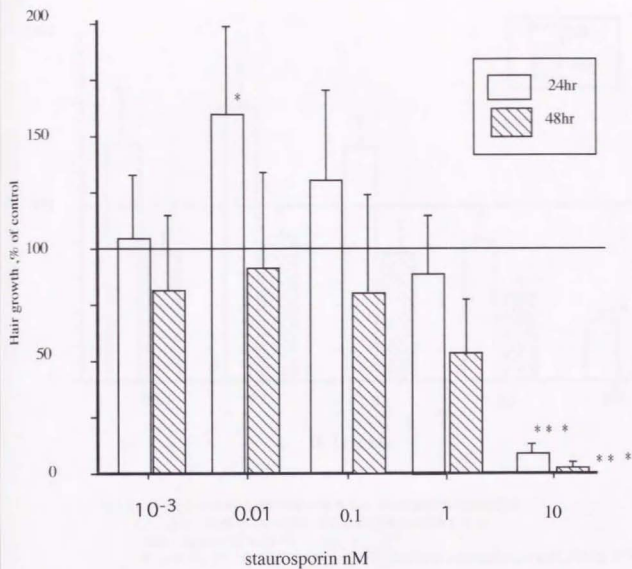


Fig. 17: ラットヒゲ毛包の毛の成長に対するstaurosporine
の用量依存的抑制効果
コントロール群の毛の成長に対する百分率として表わした。
bars: mean \pm SEM (n=6)
*: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$, Student's un-paired t-test, 片対数グラフ

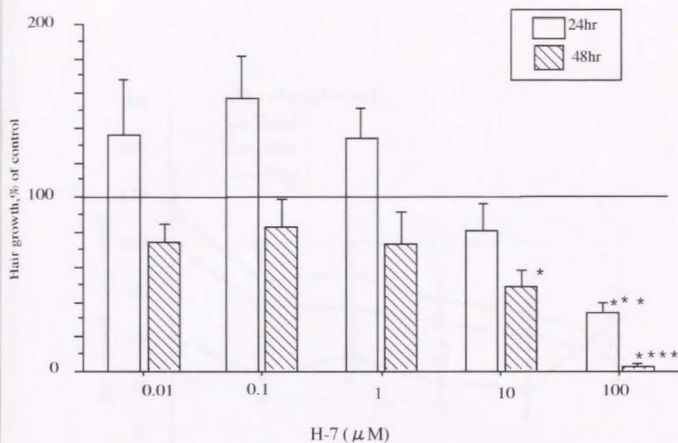


Fig.18 : ラットヒゲ毛包の毛の成長に対するH-7の用量依存的抑制効果

コントロール群の毛の成長に対する百分率として表わした。

bars : mean \pm SEM (n=6)

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$, Student's un-paired t-test, 片対数グラフ

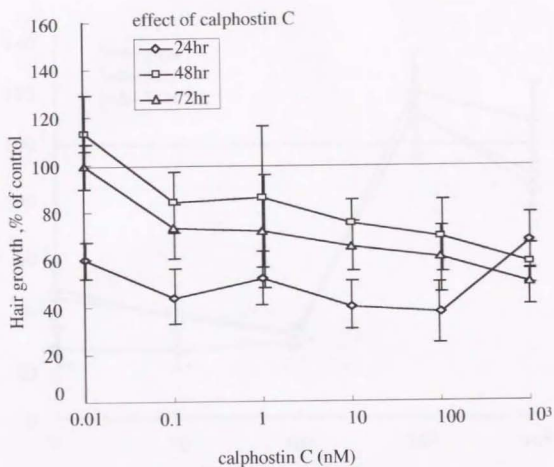


Fig. 19: ラットヒゲ毛包の毛の成長に対するcalphostin Cの抑制効果
 コントロール群の毛の成長に対する百分率として表わした。
 calphostin Cでは用量依存的な毛の成長抑制は認められなかった。
 培養開始から24時間まではコントロール群の40-60%と毛の成長は抑制されている。
 しかし、48時間から以後は有意な抑制は認められなかった。 片対数グラフ

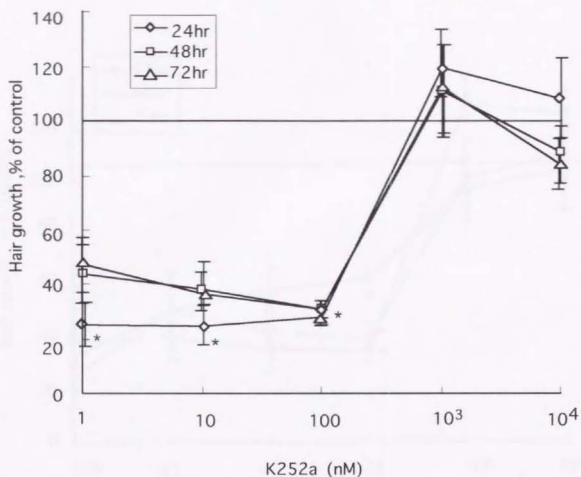


Fig. 20: K252aはPDBuによる毛の成長抑制効果を打ち消した。

ラットヒゲ毛包を $1-10^4$ nMのK252aにより前処理した後に 1μ M PDBuを投与した。 10^3 nMのK252aによりPDBuの抑制作用が打ち消されている。
points: mean \pm SEM (n=8)

*: $p < 0.05$, Student's un-paired t-test, 片対数グラフ

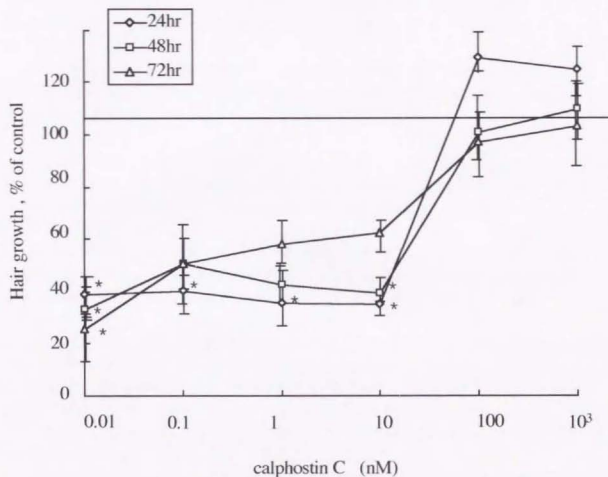


Fig. 21 :calphostin CPDBuによる毛の成長抑制効果を打ち消した。

ラットヒゲ毛包を0.01-10³nMのcalphostin Cにより前処理した後に
1 μ M PDBuを投与した。10³nMのK252aによりPDBuの抑制作用が打ち消されている。
points : mean \pm SEM (n=8)

* : p<0.05, Student's un-paired t-test, 片対数グラフ

- 1) Y. Akita , S. Ohno , Y. Yajima , and et al. : Overproduction of a $\text{Ca}(2+)$ -independent protein kinase C isozyme, nPKC epsilon, increases the secretion of prolactin from thyrotropin-releasing hormone-stimulated rat pituitary GH4C1 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 269:4653-60, 1994
- 2) P. A. Brigham, A. Capps and H. Uno : The stump-tailed macaque as a model for androgenetic alopecia: effects of topical minoxidil analyzed by use of the folliculogram. [Review]. *Clinics in Dermatology*, 6 : 177-87, 1988
- 3) A. E. Buhl, D. J. Waldon, T. T. Kawabe and et al. : Minoxidil stimulates mouse vibrissae follicles in organ culture . *Journal of Investigative Dermatology*, 92 : 315-20, 1989
- 4) A. E. Buhl, D. J. Waldon, S. J. Conrad, and et al. : Potassium channel conductance: a mechanism affecting hair growth both in vitro and in vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, 98 : 315-9, 1992
- 5) A. E. Buhl, S. J. Conrad, D. J. Waldon and et al. : Potassium channel conductance as a control mechanism in hair follicles. [Review]. *Journal of Investigative Dermatology*, 101 : 148S-152S, 1993
- 6) M. Castagna, Y. Takai, K. Kaibuchi, and et al. : Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol ester. *Journal of biological chemistry*, 257 : 7847-7851, 1982
- 7) H. B. Chase : Growth of the Hair. *Physiological Review*, 34 : 113-26, 1954
- 8) K. Chida, N. Kato and T. Kuroki : Down regulation of phorbol diester receptors by proteolytic degradation of protein kinase C in a cultured cell line of fetal rat skin keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 261 : 13013-8, 1986
- 9) R. J. Coffey, D. R. Graves, P. J. Dempsey, and et al. : Differential regulation of transforming growth factor alpha autoinduction in a nontransformed and transformed epithelial cell. *Cell Growth & Differentiation*, 3 : 347-54, 1992
- 10) P.D. Davis, C. H. Hill, E. Keech, and et al. : Potent selective inhibitors of protein kinase C. *FEBS Letters* , 259 : 61-63 ,1989
- 11) G. Cotsarelis, T.T. Sun and R. M. Lavker : Label-Retaining Cells Reside in the Bulge Area of Pilosebaceous Unit: Implications for Follicular Stem Cells, Hair Cycle, and Skin Carcinogenesis. *Cell*, 61 : 1329-1337, 1990

12) M. F. Denning, A. A. Dlugosz and E. K. Williams, and et al. : Specific protein kinase C isozymes mediate the induction of keratinocyte differentiation markers by calcium. *Cell Growth & Differentiation*, 6 : 149-57, 1995

13) M. F. Denning, A. A. Dlugosz, D. W. Threadgill, and et al. : Activation of the epidermal growth factor receptor signal transduction pathway stimulates tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta. *Journal of Biological Chemistry*, 271 : 5325-31, 1996

14) A. A. Dlugosz and S. H. Yuspa : Staurosporine Induces Protein kinase C Agonist Effects and Maturation of Normal and Neoplastic Mouse Keratinocytes in Vitro. *Cancer Research*, 51 : 4677-4684, 1991

15) G. E. Hardingham, S. Chawla, C. M. Johnson, and et al. : Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature*, 385 : 260-265, 1997

16) C. S. Harmon, D. Lutz and J. Ducote : Potassium channel openers stimulate DNA synthesis in mouse epidermal keratinocyte and whole hair follicle cultures. *Skin Pharmacology*, 6 : 170-8, 1993

17) C. S. Harmon, T. Nevins and W. Bollag : Protein kinase C inhibits human hair follicle growth and hair fibre. *British Journal of Dermatology*, 133 : 686-693, 1995

18) R. Imai, T. Jindo, Y. Miura, and et al. : Organ culture of human hair follicles in serum-free medium. *Archives of Dermatological Research*, 284 : 466-71, 1993

19) P. K. Jensen, J. O. Norgard, C. Knudsen, and et al. : Effects of extra- and intracellular calcium concentration on DNA replication, lateral growth, and differentiation of human epidermal cells in culture. *Virchows Archiv. B, Cell Pathology Including Molecular Pathology*, 59 : 17-25, 1990

20) T. Jindo, R. Imai, K. Takamori and et al. : Organ culture of mouse vibrissal hair follicles in serum-free medium. *Journal of Dermatology*, 20 : 756-62, 1993

21) T. Jindo, R. Tsuboi, K. Imai, and et al. : Hepatocyte growth factor/scatter factor stimulates hair growth of mouse vibrissae in organ culture. *Journal of Investigative Dermatology*, 103 : 306-9, 1999

22) T. Jindo, R. Imai, R. Tsuboi, and et al. : The effect of various cytokines on hair growth of mouse vibrissae in organ culture. *Journal of Dermatological Science*, 7 : S73-78, 1994

23) K. T. Jones and G. R. Sharpe : Thapsigargin raises intracellular free calcium levels in human keratinocytes and inhibits the coordinated expression of differentiation markers. *Experimental Cell Research*, 210 : 71-6, 1994

24) F. H. Kruszewski, H. Hennings, S. H. Yuspa and et al. : Regulation of intracellular free calcium in normal murine keratinocytes. *American Journal of Physiology*, 261 : c767-73, 1991

25) S. Kurata, S. Itami, H. Terashi and et al. : Successful transplantation of cultured human outer root sheath cells as epithelium. *Annals of Plastic Surgery*, 33 : 290-4, 1994

26) L. Li, R. W. Tucker, H. Hennings and et al. : Chelation of intracellular Ca^{2+} inhibits murine keratinocyte differentiation in vitro. *Journal of Cellular Physiology*, 163 : 105-14, 1995

27) T. Mauro, D. B. Dixon, K. Hanley, and et al. : Amiloride blocks a keratinocyte nonspecific cation channel and inhibits Ca^{++} -induced keratinocyte differentiation. *Journal of Investigative Dermatology*, 105 : 203-8, 1995

28) A. G. Messenger : The culture of dermal papilla cells from human hair follicles. *British Journal of Dermatology*, 110 : 685-689, 1984

29) A. Murakami, K. Chida, Y. Suzuki, and et al. : Absence of down-regulation and translocation of the ϵ isoform of protein kinase C in normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 106 : 790-4, 1996

30) Y. Nakaya, H. Hamaoka, S. Kato and et al. : Effect of minoxidil sulfate and pinacidil on single potassium channel current in cultured human outer root sheath cells and dermal papilla cells. *Journal of Dermatological Science*, 7 : S104-108, 1994

31) Y. Nishizuka : Studies and perspectives of the protein kinase C family for cellular regulation. *Cancer*, 63 : 1892-1903, 1989

- 32) M. Ohtsuyama, F. Sato, T. Toyomoto and et al. : Stimulation of Cl Conductance by Minoxidil Sulfate and K Conductance by Minoxidil in Eccrine Clear Cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 269 : 823-831, 1994
- 33) S. Osada, S. Saji, T. Nakamura, and et al.: Cytosolic calcium oscillations induced by hepatocyte growth factor (HGF) in single fura-2-loaded cultured hepatocytes: effects of extracellular calcium and protein kinase C. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1135 : 229-232, 1992
- 34) R. Paus, M. Luftl and B. M. and Czarnetzki : Nerve growth factor modulates keratinocytes proliferation in murine skin organ culture. *British Journal of Dermatology*, 130 : 174-180, 1994
- 35) R. Paus, B. M. Czarnetzki : The "bulge-activation hypothesis" does not explain hair follicle cycling but may still be valid [letter]. *American Journal of Dermatopathology*, 16 : 112-4, 1994
- 36) M. P. Philpott, M. R. Green, and T. Kealey : Rat hair follicle growth in vitro. *British Journal of Dermatology*, 127 : 600-7, 1992
- 37) M. P. Philpott, D. Sanders, G. E. Westgate and et al.: Human hair growth in vitro: a model for the study of hair follicle biology. [Review]. *Journal of Dermatological Science*, 7 : S55-72, 1994
- 38) M. P. Philpott, D. Sanders, and T. Kealey : Cultured human hair follicles and growth factors. *Journal of Investigative Dermatology*, 104 : 445-455, 1995
- 39) S. Pillai, D. D. Bikle, M. L. Mancianti, and et al. : Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium. *Journal of Cellular Physiology*, 143 : 294-302, 1990
- 40) N. J. Reynolds, H. S. Talwar, J. J. Baldassare, et al : Differential Induction of phosphatidylcholine hydrolysis, diacylglycerol formation and protein kinase C activation by epidermal growth factor and transforming growth factor- α in normal skin fibroblasts and keratinocytes. *Biochemical Journal*, 294 : 535-544, 1993

- 41) A. J. Reynolds, C. M. Lawrence , and C. A. Jahoda : Hair follicle and fiber reconstruction, *Journal of Investigative Dermatology*, 104 : 395S-405S, 1995
- 42) A. Rochat, K. Kobayashi , and Y. Barrandon : Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell*, 76 : 1063-73, 1994
- 43) R.I. Shaafi : Some effects of phorbol ester not mediated by PKC. *Biochemical Journal* ,261: 688,1989
- 44) R. Y. Tsien, J. Rink , and M. Poenie : Measurement of cytosolic free Ca^{2+} in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium*, 6 : 145-157, 1985
- 45) H. Uno and S. Kurata : Chemical agents and peptides affect hair growth. [Review]. *Journal of Investigative Dermatology*, 101: 1435S-1475S, 1993
- 46) M. Uzuka, C. Takeshita, and F. Morikawa : In vitro growth of mouse hair root. *Acta Dermatologica venereologica* , 57 : 217-219, 1997
- 47) D. J. Waldon, T. T. Kawabe, C. A. Baker, and et al. : Enhanced in vitro hair growth at the air-liquid interface : minoxidil preserves the root sheath in cultured whisker follicles. *In vitro Cellular and Developmental Biology*, 29A : 555-561 , 1993
- 48) Y. Xiong and C. Harmon : Evidence that diazoxide promotes calcium influx in mouse keratinocyte cultures by membrane hyperpolarization. *Skin Pharmacology*, 8 : 309-318, 1995

