

論文の内容の要旨

論文題目 「毛成長に関するマウス *in vitro* および *in vivo* モデル系の構築と化合物の作用」

氏名 白井章雄

本研究では、男性型脱毛と抗癌剤脱毛という機序が異なる2つの毛成長障害に着目し、それぞれに関する基礎知見を得ることと治療剤の探索を行う目的で、マウスを用いたモデル系を構築した。男性型脱毛モデルとしては、4週齢体毛組織の培養系を確立し、合成化合物のランダムスクリーニングにより新規毛成長促進物質 **KF19418** を見出した。また、抗癌剤脱毛モデルとしては、抗癌剤により障害を受けた毛包の組織修復による毛成長再開という新規なメカニズムを示唆する *in vivo* 系を確立した。

in vitro 男性型脱毛モデル

真に有効な育毛剤は、現代もっとも希求されている薬剤のひとつであるが、期待通りの効果を示すものはほとんどないのが現状である。これまでも毛成長に関わる機序を解析するためのいくつかの培養系が報告されているが、我々は以下のような特徴を有する独自のマウス体毛組織培養系を確立した。

- ①複数の構成細胞を有する毛包を器官の状態で培養するため、細胞培養系と比較してより *in vivo* (個体) を反映した培養系であると考えられる。
- ②スキンスライサーという道具を用いて比較的均質な組織を大量に調製することが出来るため、特定の物質に関する機能評価のみならず、ランダムスクリーニング等の用途にも利用できる。
- ③画像解析装置を用いて毛包成長を反映した組織面積変化率を測定することにより、定量的な解析が可能である。

ヒトを含めた多くの哺乳動物において、毛包は、成長期 (anagen 1~6) ・退縮期 (catagen) ・休止期 (telogen) と呼ばれる3つのステージの周期変化 (毛周期) を伴うが、我々の培養系では、マウスの第1毛成長期である6日齢前後、および第2毛成長期である4週齢の個体より調製した

組織を用いた。このうち 4 週齢体毛組織では、男性型脱毛症の治療に実際に用いられている minoxidil (MXD) による濃度依存的な毛成長促進が認められ、ヒト男性型脱毛の *in vitro* モデルとなり得る可能性が示唆された。

そこで、この 4 週齢体毛組織培養系を用い、協和発酵工業株式会社の所有する合成化合物のうち約 1600 種についてランダムスクリーニングを実施した。その結果、MXD と同等以上の毛成長促進活性を有する化合物の一つとして KF19418 を見出した。KF19418 には免疫抑制作用・気管支拡張作用・抗炎症作用等が知られていたが、育毛作用に関しては新規知見であった。

次に、毛休止期にある 8 週齢マウスの体毛を除毛後、KF19418 の 1%懸濁液を 2 週間塗布したところ毛再生の促進が観察された。このことから、KF19418 が経皮吸収され、実際に生体に対しても育毛作用を示すことが確認された。

さらに KF19418 の作用メカニズムを解析するため、新生児マウス体毛組織からディスパーゼ・コラゲナーゼ等の酵素処理により調製した毛包細胞の培養系において、KF19418 の細胞増殖に対する影響を調べた。本培養系の毛包細胞には毛のもととなる毛母細胞が多く含まれており、KF19418 は濃度依存的に細胞増殖を促進したことから、KF19418 が毛母細胞に直接作用して毛成長を促進することが示唆された。

以上の結果から、本研究におけるマウス 4 週齢体毛組織培養系が育毛作用物質の *in vitro* 探索に相当であることが示された。また、本研究で見出された KF19418 と MXD では化学構造が全く異なる上、KF19418 には MXD では報告されていない上述の様々な薬理活性を有している。これらの薬理活性が育毛活性に関与しているかどうか未だ明らかではないが、KF19418 の作用メカニズムをより詳細に解析することにより、男性型脱毛治療剤の新たな候補の発見に繋がることが期待される。

in vivo 抗癌剤脱毛モデル

癌化学療法における副作用の一つとして、抗癌剤による脱毛が挙げられる。抗癌剤脱毛は脱毛機序が男性型脱毛と異なるため、その治療剤の探索には通常の育毛剤の探索とは異なったアプローチが必要と考えられる。

ヒトでは通常約 90%以上の毛包が毛成長期の anagen 6 にあり、抗癌剤による障害を受けるのは主としてこの anagen 6 の毛包であると言われている。ラットやマウスを用いた抗癌剤脱毛モデルとしてこれまで報告されているものの中には、臨床を反映するような毛周期 (anagen 6) をデザインしている系もある。しかしながら、ヒトの毛成長期が約 5~6 年継続するのに対してマウスでは約 2 週間であり、形態的に同じであってもヒトとマウスでは anagen 6 の毛包の毛成長ポテンシャルは大きく異なることが予想される。そこで、マウスを用いて、毛包が完成された段階の anagen 6 と完成前の段階である anagen 4 における抗癌剤 cyclophosphamide (CPM) による毛包の障害と障害毛包に対する MXD と cyclosporin A (CSA : 著明な免疫抑制剤であるが副作用として育毛作用が知られている) の外用での作用について解析を行った。

anagen 6 では、CPM 投与後 3 日目ぐらいまで発毛が維持されたが、その後脱毛が始まり、投

予後1週間以内には薬液塗布群・溶媒塗布群共に完全に脱毛した。CPM投与後14日目には、溶媒塗布群でも若干の発毛が観察されたが、0.5% CSA 塗布群および1% MXD 塗布群では発毛面積や毛の長さの点において発毛促進が観察された。MXD および CSA は毛休止期を短縮する作用を有することが知られているので、CPM により障害を受けて休止期へと移行した毛包へ作用した結果、次の成長期への移行を早めたと考えられた。

一方、anagen 4 では、CPM 投与後 21 日目までにおいて、溶媒塗布群および 1% MXD 塗布群では極めて粗な短い毛が観察されたに過ぎなかったが、0.5% CSA 塗布群では、密度・長さとも通常の個体に近い程度の発毛が観察された。組織学的解析の結果、CPM により障害を受けた成長期毛包は、退縮期に類似した様相を呈したのち休止期へと移行するが、退縮期の段階において CSA が作用すると、速やかに再び成長期へと移行し、毛成長が再開することが明らかとなった。

一旦休止期へ入った毛包は通常一定期間を経過しないと再び成長期へは入らないということ考えると、CSA 塗布したマウスの毛包は退縮期から休止期を経て次の成長期に入ったと考えるより、退縮期から直接成長期へ移行したと考えた方が合理的であるように思われた。これは、成長期の残存期間が比較的短い場合 (anagen6) には、抗癌剤により障害を受けた毛包は一旦休止期へ移行して新たな毛成長のために充電をする必要がある一方で、成長期の残存期間が比較的長い場合 (anagen4) には、障害を受けた毛包が組織修復を行うことで成長期を再開することができるというメカニズムの存在を示唆するものと考えられた。

また、CSA と同様に peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase) 阻害作用を有し育毛作用が知られている FK506 を用いて実験を行ったところ、FK506 塗布群でも CSA の場合と同様の結果が得られた。一方、同じく PPIase 阻害作用を有する ascomycin は、CSA や FK506 とは異なり通常の育毛作用は認められないことが報告されているが、本実験では有効性を示したことから、本作用は通常の育毛作用とは分離されかつ PPIase 阻害が関与している可能性が示唆された。

本研究により、抗癌剤による毛包の障害と障害からの回復メカニズムを考察する上で、基礎的な興味深い知見が得られたものと考えられる。さらに、抗癌剤脱毛治療薬として、通常考えられている脱毛後の発毛を促進するというメカニズムではなく、障害毛包の組織修復促進という新しいコンセプトを示すことが出来たと思われる。