

## 論文の内容の要旨

論文題目 成長ホルモン欠乏ミニラットの皮膚の組織学的性状と毛周期の解析  
氏名 梅田 あや

ミニラット (Jcl: WistarTGN(ARGHGEN)1Nts) (MR) は成長ホルモン(GH)遺伝子の発現をアンチセンス RNA の導入により抑えたトランスジェニック動物で、由来系統である Wistar rat (WR) と比べて血中の GH は約 40~60%に抑えられており、体重は約半分である。MR は日本で開発された GH 欠乏のモデル動物として、骨の成長、加齢あるいは肝障害に及ぼす GH の作用機序の検索などに活用されている。GH は生体の正常な成長や加齢に極めて重大な影響を及ぼす下垂体前葉ホルモンのひとつで、GH/インスリン様成長因子-1 (IGF-1) 軸は肝臓をはじめとする様々な組織細胞でその代謝、増殖、成長あるいは分化の刺激因子として機能することが知られている。

ところで、ヒトの GH 異常症の病態解析から、皮膚の成長や表皮、真皮、毛包および皮膚付属器などの組織構造もまた GH および IGF-1 の影響を受けることが報告されている。しかし、MR はもとより他の多くの GH 分泌不全症の病態モデル動物においても、それらの皮膚性状についての検索報告はない。そこで、本研究では WR を比較対照に、GH 欠乏 MR の皮膚の組織学的性状と毛周期の特徴を明らかにし、それを基に、皮膚科学領域における MR のモデル動物としての有用性について検討を加えた。得られた結果は下記の通りである。

## 1. ミニラットの背部皮膚の組織学的性状と毛周期

GH 欠乏が皮膚の組織学的性状にどのような影響を及ぼすかを明らかにするため、無処置の雄性 MR の皮膚の加齢に伴う組織学的性状の推移を、由来系統である WR のそれと比較・検討した。その結果、MR と WR で皮膚の組織構造には基本的な違いは認められなかったものの、MR では真皮が薄く、逆に皮下組織の脂肪層が厚く、また、皮脂腺が小さいなど、ヒトの GH 分泌不全症患者と同様の所見が確認された。MR の皮膚性状の最大の特徴はその毛周期にあり、生後 8 週齢以降は毛周期が長期に亘って telogen 期で停滞した。すなわち、MR は WR と同様、生後 1 サイクル 4 週間からなる毛周期 (anagen-catagen-telogen) が 2 サイクル見られたが、それ以降、WR では、部位差や個体差があるものの、引き続き 3 サイクル目以降の毛周期が継続したのに対し、MR では長期に亘って telogen 期のまま推移した。

なお、GH の主要な標的臓器である肝臓における IGF-1mRNA の発現量および血中の IGF-1 濃度は、WR と比べて MR で有意に低かったが、皮膚の IGF-1mRNA の発現量には両系統間に差は認められなかった。このことから、MR では、GH 欠乏に加え、肝臓由来の血中 IGF-1 の減少が上記のような MR の皮膚の組織性状に影響を与えている可能性を示唆するものと考えられた。

## 2. ミニラットの急性皮膚傷害に対する反応性

急性皮膚傷害に対する皮膚の反応性に及ぼす GH 欠乏の影響を検討した。すなわち、環境中の酸化ストレス因子の一つである 20%過酸化水素溶液 (HPO) を毛周期が telogen 期にある 8 週齢の MR と WR の背部皮膚に局所的に単回暴露し、皮膚の病理組織学的変化の推移を両系統間で比較した。その結果、MR では WR に比較して、急性皮膚傷害後の肉芽組織の形成、表皮の再生および毛包の成長が遅延し、GH 欠乏は MR の皮膚の創傷治癒を遅らせることが示された。さらに、背部皮膚への HPO の局所暴露後には新たな anagen 期が確認され、telogen 期にある GH 欠乏 MR の背部皮膚の毛包が外部からの化学的な刺激によって anagen 期に移行できることが示された。

## 3. 人為的脱毛によるミニラット背部皮膚毛包における成長期の誘導

8 週齢以降 telogen 期に停滞している MR の背部皮膚の毛包に、非傷害性刺激によって anagen 期を誘導できるか否かを検討する目的で、telogen 期下の 11 週齢の MR の背部皮膚を非侵襲的に脱毛し、その後の毛包の反応を組織学的に検索した。その結果、すべて

の動物で、個体差もなくまた脱毛部位の全域に均一な、一過性（1 サイクル）の新たな毛周期が誘導された。このことから、8 週齢以降の MR の背部皮膚の毛包は anagen 期に移行するための内的刺激に欠けているが、脱毛という外的刺激によって新たな anagen 期を誘導できることが明らかになった。

#### 4. 人為的脱毛によりミニラット背部皮膚に誘導した毛周期進展過程に伴う毛周期関連遺伝子の発現プロファイル

上記の検索で、MR の背部皮膚では脱毛によって部位特異性なく同調した毛周期を誘導することができることが明らかになった。こうした MR の特徴を利用し、脱毛により誘導した毛周期進展過程に伴う背部皮膚の遺伝子発現の変化を、DNA Microarray 法で網羅的に解析した。その結果、脱毛後には、脱毛前（telogen 期）と比較して、1215 プローブで3倍以上の発現の変化がみられ、そのうちの 1171 プローブは毛周期に連動した変化を示した。特に、毛周期進展に伴う毛包の分化・増殖の制御に重要な役割を担っていることが明らかである Lef1、Padi3、Msx2、S100a3 などの遺伝子は、誘導毛周期中に 30 倍以上の非常に強い発現増加が連続して認められた後、telogen 期に至って脱毛前の値に復帰したが、同様の発現変動は今まで毛周期に関連することが報告されていない遺伝子においても認められた。

この結果は、ラットの毛周期に関連する遺伝子の発現の変化の全体像を示すとともに、毛周期の制御に寄与している候補遺伝子を提示しうる非常に有用なデータであると考えられた。

皮膚は毛周期に伴ってその生物学的性状が大きく変化する臓器である。従って、皮膚、特に毛包に関する動物実験では、毛周期をコントロールすることが非常に重要である。こうしたことから、従来、皮膚の地肌色で telogen 期を肉眼的に判定出来る C57BL/6 系マウスが用いられてきた。しかし、マウスやラットの毛周期は、生後 8 週齢までの 2 サイクル間は synchronized waves として起こるが、それ以降は hair growth pattern の複雑さが増し、実験対象部位で均一かつ同調した毛周期を得るのは非常に困難となるため、毛周期に関連した実験には成熟動物ではなくもっぱら幼若動物が用いられているのが現状である。この点、本研究で明らかにしたように、MR は 8 週齢以降であれば背部皮膚の全ての毛包が一様に telogen 期であるため、特別な配慮をせずとも、皮膚傷害性のない人為的脱毛によって個体差および部位差のない均一な毛周期が容易に誘導できる。さらに、

成熟動物での毛周期の検索は、幼若期の皮膚における活発な発育に伴う毛周期以外の諸要因を排除できる利点があるため、成熟動物において同調した毛周期を誘導できる MR は、毛周期の実験・研究を実施する上で非常に有用なモデル動物であると考えられる。本研究ではさらに、こうした MR の皮膚・毛包の特徴を利用して、成熟ラットの毛周期の進展過程に伴う遺伝子の発現の変化の網羅的な解析に初めて成功した。

上述した本研究で得られた検索成績から、MR は GH 欠乏患者の dermatopathy の動物モデルとして有用であるとともに、毛周期に関する所謂“hair cycle clock”の機構や分子生物学的特性の研究、さらには anagen 誘発薬剤開発のための強力な手段を提供するモデル動物のひとつとしても有用であると考えられる。