

(別紙様式第3号)

学 位 論 文 要 旨

氏名: 相馬 勤

題目: 毛包の退縮機構の解明と育毛薬剤開発への応用
(Study of regression mechanism in hair follicles for development of new hair-growth ingredients)

毛包は成長期、退行期、休止期という毛周期を繰り返し、退行期において非常に短い期間に毛包の上皮組織が退縮する。ヒト毛包では上皮組織の退縮とアポトーシスとの関連について検証されておらず、成長期から退行期への移行に関わる因子についても未同定のものが多い。上皮組織の退縮とアポトーシスとの関連、および退行期への移行に関わる因子の同定を通して退行期の過程を解明することは、未解明の部分が多い毛周期の制御機構の一端を明らかにすることであり、基礎研究として極めて重要である。男性型脱毛では、通常2~7年の成長期間が徐々に短くなり、毛髪が十分に太く長く成長できない“うぶ毛化”という現象が起こっている。成長期から退行期への移行が正常な状態と比べて早く起こる現象が繰り返され、男性型脱毛が生じると考えられる。頭髪本数の減少ではなく、頭髪1本1本が細くなるのが男性型脱毛の特徴で、成長期を誘導して発毛を促進するよりも、退行期への移行を抑制することが男性型脱毛の改善にはより効果的と考えられる。これらのことから、退行期の過程を解明し、それを基礎とした退行期移行抑制薬剤のスクリーニング系を構築して新規な育毛剤の開発を可能とするができれば、男性型脱毛の改善を目標とした育毛剤の開発に新たな方法論を提示することになり、極めて有意義かつ創造的な展開が期待できる。

本論文では、まず退行期において毛包上皮組織が退縮する現象が、アポトーシスの関与によるものかどうかを検証した。また、器官培養系においてヒト毛包に種々の生理活性物質を作用させて毛幹の伸長と形態変化を観察した。さらに、生理活性物質の組織局在性を免疫組織染色法により同定し、退行期への移行との関連を調べた。その結果、**transforming growth factor- β 2 (TGF- β 2)**が成長期から退行期への移行に関わる主要な因子の1つであることを明らかにした。TGF- β の作用を抑制する効果を示す薬剤評価系を構築してスクリーニングを行い、アマチャエキスに最も強いTGF- β の作用抑制効果を見出した。

本論文は7章より構成されている。まず第1章では、ヒト毛包の発生機構と毛周期の制御機構について概説し、退行期の過程に関してこれまでに解明されている知見をまとめた。さらに、これらを背景として、本研究の意義と目的を明らかにした。

第2章では、本研究に用いた基本的な実験方法について記述した。すなわち、ヒト頭皮皮膚組織切片の作製法、免疫組織染色法を中心に、**in situ hybridization** 染色法、TUNEL 染色法、ならびに遺伝子工学的手法などを記述した。また、ヒト頭皮から毛包を単離して **in vitro** で培養する毛包の器官培養系の実験方法についても合わせて記述した。

第3章では、退行期において毛包の上皮組織が退縮する現象がアポトーシスによって引き起こされているかを検証するために、TUNEL 染色法により成長期と退行期の毛包を染色し、アポトーシスを起こした細胞の分布を比較した。毛包の上皮組織において、成長期では角化に伴うアポトーシスが検出されたのに対し、退行期では非常に多くのアポトーシスが広く毛包上皮に検出された。アポトーシスの実行因子カスパーゼ4種類が、成長期毛包の上皮組織に発現していた。カスパーゼ-3 前駆体タンパク質も成長期毛包の上皮組織に広く分布し、退行期毛包において活性化されていた。毛乳頭にはアポトーシスは検出せず、カスパーゼの発現も検出されなかった。アポトーシスの抑制に働く **Bcl-2** の免疫染色性は毛周期を通して

毛乳頭に認められ、初期成長期毛包の二次毛芽にも存在したことから、Bcl-2 はこれらの組織にアポトーシスの抵抗性を与えていると推察された。ヒト毛包の器官培養系において、TGF- β 2 は退行期様の形態変化を促進し、毛包におけるチミジンの取り込みも抑制したことから、成長期から退行期への移行に関わる主要な因子の1つであると考えられた。

第4章では、ヒト毛包における TGF- β の組織局在性を調べ、退行期への移行と毛包上皮組織のアポトーシスとの関係について考察した。3つの TGF- β アイソフォームは、成長期、退行期の毛包において異なる部位に局在した。成長期の毛包では、TGF- β 2 の免疫染色性は毛球部の近傍にほとんど認められず、成長期から退行期への移行に伴い TGF- β 2 の免疫染色性が毛乳頭と毛母の境界領域に出現して、退行期の進行に伴い TGF- β 2 の免疫染色性が毛乳頭内部から基底盤全域に広がる傾向が認められた。第3章でも示した通り、退行期毛包の退縮する上皮組織にはアポトーシスが数多く認められるが、TGF- β 2 やII型 TGF- β レセプターの免疫染色性の分布良くと一致していた。また、ヒト毛包器官培養系に TGF- β 中和抗体を添加すると毛包の伸長は促進され、TGF- β レセプターのアンタゴニストとして働く血清タンパク質の Fetuin によっても、濃度依存的かつ有意に毛包の伸長は促進された。以上の結果は、TGF- β の作用を抑制する因子が毛包の伸長を促進することを強く示唆した。

第5章では、マウスを用いてリン酸化 Smad2 (PS2) の免疫染色性の変化を調べ、毛周期における TGF- β の活性が検出される細胞の分布を明らかにすることで、退行期移行への TGF- β の関与について検討した。休止期から成長期の初期では、毛包の上皮組織の細胞に PS2 の免疫染色性が認められた。毛幹が形成された成長期中期において、外毛根鞘と内毛根鞘毛小皮に明瞭な PS2 の染色性が認められた。成長期後期の毛包では、一部の毛母細胞が弱い PS2 の免疫染色性を示し、退行期初期の毛包においてその細胞の割合は増加していた。免疫蛍光染色法により、退行期毛包における PS2 の免疫染色性とアポトーシス細胞の局在を比較した結果、TGF- β シグナルへの応答性を反映する PS2 の免疫染色性は毛母細胞にも認められた。しかし、PS2 の免疫染色性が認められるのはアポトーシスの開始より約5日程度早く、毛包におけるアポトーシスが TGF- β の直接的な作用によって起こるとの仮説を支持する結果ではなかった。TGF- β stimulated clone-22 (TSC-22) の mRNA は成長期の毛包の外毛根鞘と内外毛根鞘に限定して認められ、退行期では明らかに減少する傾向を示した。遺伝子組換えによりグルタチオンS-トランスフェラーゼとラット TSC-22 の融合タンパク質を作製し、ウサギに免疫して TSC-22 の抗血清を取得した。この抗血清を使用した免疫染色では、退行期初期の毛包と成長期後期の毛包で TSC-22 の組織局在性に明瞭な相違は認められなかった。退行期の毛包上皮組織では、アポトーシス細胞と TSC-22 陽性細胞が一致して検出されることはなく、TSC-22 の発現とアポトーシスは無関係である可能性が示唆された。

第6章では、plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) の産生を指標として、TGF- β の作用を抑制する効果を示す生薬エキスのスクリーニングを行い、400種類以上の生薬エキスを評価した結果、ローマカミツレエキス、シモツケソウエキス、スペアミントエキス、トルメンチラエキス、セイヨウキズタエキス、コウチャエキス、アマチャエキスなどに TGF- β の作用を抑制する効果を検出した。最も TGF- β 抑制活性の高かったアマチャエキスについて、5 μ g/ml を添加して正常の毛乳頭細胞の培養を行った場合、PAI-1 産生はコントロールの21%まで抑制された。このとき、毛乳頭細胞の生存率は72%であり、アマチャエキスが毛乳頭細胞に対して示す細胞毒性は比較的低かった。毛包器官培養系において、10 μ g/ml を添加して毛伸長を経時的に測定した結果、培養から5日目以降に毛伸長が有意に促進されたことを確認した。また、ワックス脱毛により毛周期を同調させて発毛させた C57BL/6 マウスの背部にアマチャエキスを塗布した場合、未塗布群ではステージ8の後期退行期毛包が75%以上、アマチャエキス塗布群ではステージ8の後期退行期毛包の割合は50%以下であり、アマチャ塗布群において退行期の進行が遅れた毛包が多く観察された。以上の結果から、アマチャエキスに退行期への移行を抑制する効果が示され、アマチャエキスを男性型脱毛に対する新規な育毛剤の候補として選択した。