

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 1日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591427

研究課題名（和文） 真皮線維芽細胞からアプローチする毛髪異常疾患の原因究明

研究課題名（英文） Exploration of pathogenetic mechanism for hair diseases through dermal fibroblasts.

研究代表者

中野 創（NAKANO HAJIME）

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：90281922

研究成果の概要（和文）：ヒロサキヘアレスラット由来皮膚線維芽細胞（HHR-DF）は初代培養で胞体の大きい多核の線維芽細胞が現れ、増殖能が低い。そこで HHR-DF に対する各種増殖刺激因子の影響を調べたところ、使用したいずれの因子によっても細胞数の有意な増加が認められなかった。また、HHR 背部皮膚に直径 10mm の皮膚欠損を作成し、再生治癒速度を解析したところ、創傷治癒の遅延が認められた。HHR-DF はある種の細胞増殖刺激に対する反応性が低下していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Primary culture of the dermal fibroblasts derived from Hirosaki hairless rat (HHR-DF) develops multinuclear large fibroblasts after multiple culture passages. These cells have low proliferation ability. Several growth stimuli including calf serum, TGF-beta, and bFGF failed to promote cell proliferation of HHR-DF. Artificial skin defect on the dorsal skin of HHR showed retarded wound healing. These results suggest that HHR-DF has an impaired sensitivity to growth stimuli.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：ヒロサキヘアレスラット、乏毛、繊維芽細胞、細胞周期、脱毛疾患

1. 研究開始当初の背景

以前我々はヒロサキヘアレスラット由来皮膚線維芽細胞（HHR-DF）は初代培養で観察

すると胞体の大きい多核の線維芽細胞が現れ、また Sprague-Dawley ラット（SDR）の線維芽細胞（SDR-DF）に比べて低増殖能を示す

ことを示したが、その分子生物学的なメカニズムは明らかになっていない。



図1 弘前ヘアレスラット(HHR)

2. 研究の目的

本研究では種々の増殖刺激に対して HHR-DF がどのような生物学的反応を示すかを、*in vitro* (細胞数増加) および *in vivo* (人工皮膚欠損に対する各種増殖因子に対する創傷治癒反応の検討) で調べることによって、HHR-DF の低増殖能という特質を明らかにする。

3. 研究の方法

- 1) SDR および HHR 皮膚から初代培養皮膚線維芽細胞 SDR-DF および HHR-DF を分離する。
- 2) 両ラット由来 DF の継代を行い HHR-DF では大型で多核の細胞が継代5代目以降出現することを確認する。
- 3) 継代5代目の DF を用い、増殖刺激因子すなわちウシ胎児血清、フォルボールエステル (PMA)、TGF- β 、および塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) で刺激し、24、48、および 72 時間後に細胞増殖の程度をトリパンブルー法による生細胞数計測で評価した。

- 4) SDR および HHR 背面に 5 および 10mm 径の皮膚潰瘍を人工的に作成し、皮膚欠損部位に再生する肉芽組織の増殖速度は組織上の面積を指標に、また、肉芽組織を覆うように再生する表皮の増殖速度は再生表皮の長さを指標として計測した。

4. 研究成果

- 1) HHR-DF では大型で多核の細胞が継代5代目以降出現することを確認した。

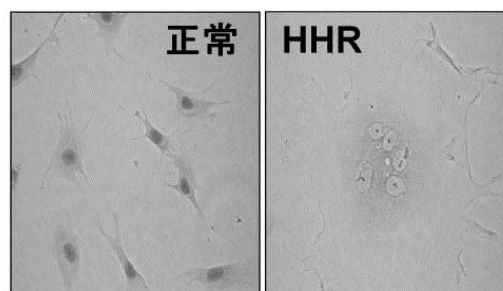


図2 HHR線維芽細胞の大型多角化

- 2) HHR-DF の細胞増殖能に対する各種増殖刺激因子の影響を調べるために、5%MEM で培養した HHR-DF あるいは SDR-DF を 20%ウシ胎児血清、PMA、TGF- β 、および bFGF で刺激し、細胞増殖能を経時的に計測したところ、いずれの刺激によっても SDR-DF は刺激開始 48 時間で対象に比較して細胞数が 1.5 倍程度に増加するが、HHR-DF では対象に比較して細胞数の有意な増加が認められなかった。すなわち、HHR-DF はこれら細胞増殖因子に対する反応性が低下していると考えられた。
- 3) HHR 背部皮膚に直径 5 mm の皮膚欠損を作成し、創傷部位が再生治癒するまでの過程を組織学的に解析したところ、いずれの指標も SDR に比して HHR で低い傾向を認めたが、有意差が認められなかつ

た。データに多少のばらつきがある点と、5mm の皮膚欠損が小さいために両ラット間で創傷治癒に差がつきにくかった可能性があった。そこで、HHR 背部皮膚に直径 10mm の皮膚欠損を作成し、同様の解析を行ったところ、いずれの指標も SDR に比して HHR で低かった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Korekawa A, Nakano H, Toyomaki Y, Takiyoshi N, Rokunohe D, Akasaka E, Nakajima K, Sawamura D.
Buschke-Ollendorff syndrome associated with hypertrophic scar formation: a possible role for LEMD3 mutation.
Br J Dermatol, 2012;166:900-903.
査読有
Doi:10.1111/j.1365-2133.2011.10691.x
- ② Akasaka E, Nakano H, Nakano A, Toyomaki Y, Takiyoshi N, Rokunohe D, Nishikawa Y, Korekawa A, Matsuzaki Y, Mitsuhashi Y, Sawamura D.
Diffuse and focal palmoplantar keratoderma can be caused by a keratin 6c mutation.
Br J Dermatol, 2011;165(6) : 1290-1292.
査読有
doi: 0.1111/j.1365-2133.2011.10552.x.
- ③ Umegaki N, Nakano H, Tamai K, Mitsuhashi Y, Akasaka E, Sawamura D, Katayama I.
Vörner type palmoplantar keratoderma: novel KRT9 mutation associated with

knuckle pad-like lesions and recurrent mutation causing digital mutilation.
Br J Dermatol, 2011;165(1):199-201.
査読有

doi:10.1111/j.1365-2133.2011.10317.x.

- ④ Takeuchi S, Akasaka E, Rokunohe D, Kayo SJ, Matsuzaki Y, Ooshima H, Nakano H, Sawamura D.

Leukemia cutis is an early sign of blast transformation that may mimic a common skin disease: sycosis-like eruptions in chronic myelomonocytic leukemia.
J Dermatol, 2010;37:916-918. 査読有

doi:10.1111/j.1346-8138.2010.00901.x

- ⑤ Akita M, Nanashima N, Yamada T, Nakano H, Shimizu T, Fan Y, Tsuchida S.

Characterization of Hair Follicles in Hirosaki Hairless Rats with Deletion of Basic Hair Keratin Genes. Enlarged Medulla, Loss of Cuticle and Long Catagen.

Hirosaki Medical Journal, 2009;60:1-11

査読有

<http://ci.nii.ac.jp/naid/110007079174>

[学会発表] (計 1 件)

- ① 秋田美季. ヘアケラチン遺伝子の欠損がある弘前ヘアレスラット (HHR) の毛構造の変化、毛周期の変化.
第 108 回日本皮膚科学会総会,
2009 年 4 月 25 日, 福岡国際会議場

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 創 (NAKANO HASJIME)
弘前大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：90281922

(2) 研究分担者

松崎 康司 (MATSUZAKI YASUSHI)
弘前大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50322946
澤村 大輔 (SAWAMUERA DAISUKE)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：60196334

(3) 連携研究者

()

研究者番号：