

平成 22 年 6 月 13 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20890192  
 研究課題名（和文） 男性型脱毛発症とアンドロゲンレセプター遺伝子プロモーター環境との  
 関連に対する研究  
 研究課題名（英文） A study about the connection of the pattern of hair loss and the  
 promoter environment of androgen receptor gene.  
 研究代表者  
 北川 朋子（KITAGAWA TOMOKO）  
 京都府立医科大学・医学研究科・助教  
 研究者番号：20515267

研究成果の概要（和文）：男性型脱毛患者および正常コントロールの血液サンプルを収集した。目標予定症例数 350 人であり、現在も男性型脱毛患者および正常コントロールの血液サンプル収集中である。よって現在は解析には至っていない。収集した血液サンプルから DNA を抽出し、アンドロゲンレセプターのプロモーター領域を PCR 法にて増幅し DNA 断片を抽出収集している。毛乳頭細胞のサンプル収集は症例数が少なく進んでいない。

研究成果の概要（英文）：We collected the blood sample, a patient of pattern of hair loss and normal control. The number of the aim plan cases is 350 people. However, we do not yet reach the aim numbers, so we have been continued sample collection. And the plan does not yet reach analysis. We extract DNA from the blood sample which I collected. And we amplified the promoter domain of the androgen receptor by PCR method and extract a DNA fragment afterwards. There is little number of the cases, and the sample collection of dermal papilla cells does not advance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

研究の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：男性型脱毛症、アンドロゲンレセプター

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、男性型脱毛の治療薬が次々に

開発され、多くの男性の需要を獲得している。また、脱毛疾患は人との関わりが億劫になったり、外出がストレスになりコミュニケーションを阻害したり、Quality of Life の点においても重要な要素となり、精神的なサポートを要する疾患であるといえる。

(2) 男性型脱毛 (以下 AGA) の発症にはアンドロゲンの作用が不可欠であるが、AGA の患者と AGA でない男性において、血中アンドロゲン濃度に優位な差が見られないと報告されている。しかしながら、男性ホルモンは AGA の前頭部や頭頂部においては毛の成長を阻害し毛胞のミニチュア化を引き起こすも、鬚においては毛の成長を促進し、後頭部においては毛の成長に影響を与えないといった、部位特異的な作用を示すことが知られている。

(3) 一方で、最近、プロモーターの DNA メチル化が遺伝子発現調節に重要な働きをしていることが明らかとなっている。遺伝子のプロモーターにある CG の豊富な DNA 領域は、一般に、転写が活発な遺伝子は低メチル化状態にあり、不活発な遺伝子は高度にメチル化されているといわれている。AGA 患者と健常者の間で何らかの DNA メチル化調節機構の差異があり、その結果アンドロゲンレセプターの発現に差が生じている可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

男性型脱毛の発症にはアンドロゲンのレセプターを介した作用が不可欠である。男性型脱毛患者と健常者ではアンドロゲンレセプターの発現量に違いがあることが明らかになっている。また、AGA は遺伝する傾向があることはよく知られている。以上を考えると、アンドロゲンレセプター遺伝

子の発現調節が遺伝的素因で決定されており、これが AGA の罹患性に関わっているのではないかと考えられる。研究代表者は、アンドロゲンレセプターの発現制御が男性型脱毛発症の原因の一つであると仮説を立てた。遺伝的素因を含んだ発現調節メカニズムとしては、まず、プロモーター領域の遺伝子多型が考えられる。末梢血の白血球細胞より DNA を回収し、PCR 法にてアンドロゲンレセプターのプロモーター領域を増幅させシーケンスする。これにより遺伝的素因との関係を明らかにする。一方で、最近、プロモーターの DNA メチル化が遺伝子発現調節に重要な働きをしていることが明らかとなっている。遺伝子のプロモーターにある CG の豊富な DNA 領域は、一般に、転写が活発な遺伝子は低メチル化状態にあり、不活発な遺伝子は高度にメチル化されているといわれている。AGA 患者と健常者の間で何らかの DNA メチル化調節機構の差異があり、その結果アンドロゲンレセプターの発現に差が生じている可能性が考えられる。そこで、本研究計画では、AGA の患者と AGA でない患者より採取した毛乳頭細胞の DNA を用いて、バイサルフェイトーシーケンス法にてアンドロゲンレセプター領域のメチル化状態を解析する。以上、二つの観点から男性型脱毛発症とアンドロゲンレセプター遺伝子プロモーター環境との関連について検討を行う。

## 3. 研究の方法

AGA の患者および AGA でない男性の末梢血とアンドロゲンに感受性のある領域、すなわち前頭部または頭頂部とアンドロゲンに感受性のない後頭部の組織を採取し、毛乳頭細胞を分離し初代培養する。継代 4~6 の細胞が増殖したら、その DNA を回収し、PCR 法

にてアンドロゲンのプロモーターを増殖させ、シーケンスする。そこで、遺伝的素因との関係を明らかにする。また DNA メチル化の方は、細胞の DNA をバイサルフェイトシーケンス法にてプロモーター領域のメチル化状態を解析する。

#### (1) 初代培養

20～70 歳の頭部皮膚腫瘍切除術を受ける患者に同意を得た上で、切除組織内の正常皮膚組織片を入手し、実体顕微鏡下にて毛胞下部を切離し、1mg/ml Collagenase (和光純薬) に 5 時間、37℃にて反応させる。培養液 (DMEM, 10% FBS) 追加後、ピペッティングにて毛乳頭を分離する。分離した毛乳頭を回収後、上記培養液にて初代培養を行う。継代 4～6 を実験に使用する。

#### (2) DNA 抽出

患者末梢白血球あるいは、培養毛乳頭細胞から DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) を用いて、ゲノム DNA を抽出する。

#### (3) PCR

アンドロゲンレセプターの 5' 末端側の翻訳されないプロモーター領域を PCR 法によって増幅する。増幅した DNA 断片は、1.4%の agarose gel にて電気泳動により可視化する。

#### (4) DNA断片のクローニング、シーケンス

3のゲルより増幅した DNA 断片を抽出し、これをプラスミドベクターに組み込む。このプラスミドを常法にて大腸菌コンピテントセル DH5αにトランスフォームし、X-gal による染色判定により選択したクローンを培養し、QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを回収する。T7 primer

を用いてシーケンス反応後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer(Perkin Elmer Applied Biosystems)にてシーケンスし、遺伝子解析ソフト Genetyx を用いて遺伝子多型を解析する。

(5) バイサルフェイトシーケンス法によるメチル化解析

2で抽出したDNAをバイサルファイト化する。バイサルファイト化したDNAをサンプルにrTaq polymeraseを用いてPCRを行う。増幅したDNA断片は、気泳動により可視化する。増幅したDNA断片をpTA2ベクターに組み込む。プラスミドを回収後、シーケンスを行う。断片中に含まれる19カ所のCpG配列のメチル化状態を解析する。

#### 4. 研究成果

平成 20 年、21 年度はサンプルである AGA の患者と正常コントロールの末梢血の採取をおこない、これらの細胞より DNA を回収し、サンプル収集に努めた。目標予定症例数は 350 人であり、よって現在も解析には至っていない。

AGA 患者数は増加傾向にあるも、サンプル収集には時間を要する。今後も引き続きサンプル収集を継続し、母数の蓄積を目指す。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)  
Tomoko Kitagawa, Ken-Ichi Matsuda, Shigeki Inui, Hideya Takenaka, Norito Katoh, Satoshi Itami, Saburo Kishimoto, Mitsuhiro Kawata. Keratinocyte Growth inhibition through the modification of Wnt Signaling by Androgen in balding Dermal Papilla Cells. J Clin Endocrinol Metab, 査読あり. 94(4) 2009:1288-1294.

〔学会発表〕（計 0件）

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北川 朋子 (KIYAGAWA TOMOKO)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：20515267

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし