

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592095

研究課題名(和文) 虚血後脱毛における細胞腫特異的小胞体ストレス応答の関与
-毛包細胞の対虚血脆弱性-

研究課題名(英文) Implication of the endoplasmic reticulum stress response in postischemic alopecia and tolerance for ischemic stress of hair follicles.

研究代表者

今井 啓道 (IMAI YOSHIMICHI)

東北大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：80323012

研究成果の概要(和文)：

本研究の目的は皮弁手術などの後に生じる一過性虚血後の脱毛について、そのメカニズムを明らかにすることである。

皮弁の虚血モデルを作成したところ、脂肪層まで入り込む活動期毛包と真皮層に留まる休止期毛包では虚血ストレスに対する耐性が異なり、ある一定の虚血ストレスを与えると活動期毛包だけが選択的に脱毛することが明らかとなった。さらに、形態的に同一の毛包細胞でありながら、休止期毛包細胞と活動期毛包細胞で耐性に違いが生じる要因の一つとして小胞体ストレス応答機構が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

The purpose of this study is to reveal the mechanism of alopecia after transient ischemia in the skin flaps.

Under ischemic stress with skin flaps, the tolerance for ischemic stress was difference between anagen follicles which got into subcutaneous tissue and telogen follicles which staid in dermis tissue. This made it clear that transient ischemic stress with anagen follicles caused alopecia selectively. And this study suggest that one of a factor made these differences of tolerance with anagen and telogen follicles was the endoplasmic reticulum stress response.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|----------|------------|
| 2008年度 | 1,100,000円 | 330,000円 | 1,430,000円 |
| 2009年度 | 700,000円 | 210,000円 | 910,000円 |
| 2010年度 | 1,100,000円 | 330,000円 | 1,430,000円 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,900,000円 | 870,000円 | 3,770,000円 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：皮弁、虚血ストレス、小胞体ストレス、Heat Shock Protein(HSP)、GRP78、脱毛

1. 研究開始当初の背景

形成外科の手術では腫瘍切除後に皮弁を用いて再建することがしばしばある。我々は皮弁における血後の細胞内ストレス反応の研究を一貫して行ってきた。これは形成外科

の基本手技である植皮術から発想された、「なぜ表皮細胞は虚血に対する耐性が他の細胞に比べて圧倒的に強いのか」という根源的なものからはじまった。この虚血に対する耐性を示す際に働くものとして“molecular

chaperone”として細胞のタンパク質の構造変化を修復し細胞死を防ぐ Heat Shock Protein(HSP)に注目し、研究を進めてきた。これまでの研究で、ある閾値を超えた虚血ストレスを加えると、脂肪細胞ではHSP72の持続発現に障害が生じ細胞死を生じるが、表皮keratinocyteではHSP72の持続的発現が障害されず細胞死は生じないことを明らかにした。この研究過程で、表皮と同一のkeratinocyteを持つはずの体毛が脱毛していることに気づいた。これは我々形成外科医が臨床の現場で皮弁手術などの後に経験する一過性虚血後の脱毛の所見に一致している。

また、近年、小胞体ストレスとその応答機構が注目されている。細胞内環境を制御する多くの蛋白質は小胞体を経由して合成され、そこで様々な修飾を受け正常な形に折畳まれて3次元的な形態を獲得し完成する。この過程に不具合が生じ合成された異常な蛋白質は小胞体ストレスを引き起こし細胞死を生じる。それに対して細胞死を回避する防御機構も存在し小胞体ストレス応答と呼ばれる。

以上より、虚血ストレスにより引き起こされる脱毛は毛包細胞における“molecular chaperone”としてのHSPの発現様式や、小胞体ストレス応答が関与しているのではないかという発想に至った。

2. 研究の目的

形態的には同一のkeratinocyteをもつ表皮細胞と毛包細胞の虚血ストレスに対する耐性の違いをHSPや小胞体ストレスに着目し明らかにすること。

3. 研究の方法

ラット腹部にsuperficial epigastric vessels(浅腹壁動脈)を血管茎とする、2.5×4cmの下腹部皮弁を挙上した。その後、血管茎を微細血管用クランプで遮断し、8時間虚血状態にした後再還流した。

実験群は8時間虚血群、Sham対照群で、再還流後観察点は4、6、8、10、12時間後とし、皮弁を採取した。標本は皮弁中央部で長軸に沿って分割し、中央部を用いて切片を作成した。

まずは、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作成し、毛包の数をカウントした。さらに、TUNEL染色、HSPファミリーである小胞体シャペロンGRP78に対し免疫組織染色を行い、western blotting法によるタンパク質の定量を行った。

4. 研究成果

形成外科の手術では腫瘍切除後に皮弁を用いて再建することがしばしばある。その

際、皮弁の虚血時間が長くなると、遅延性に一過性の脱毛が起こることは経験的に知られており、表皮の脱落が生じないとは対称的である。これは、表皮と毛包のケラチノサイトで虚血耐性に違いがあるためではないかと我々は考え、虚血耐性において防御機構の違いを生む要因として小胞体ストレスに焦点を当てた。

小胞体ではタンパク質の品質管理が行われているが、小胞体内への不良タンパク質の蓄積を起こす諸条件を小胞体ストレスと呼び、このストレスに対しておこる反応が小胞体ストレス応答である。小胞体ストレス応答は3つあり、タンパク質の合成を減らす翻訳制御、小胞体シャペロン増量による品質強化(フォールディング強化)、不良タンパク質の分解強化である。このストレス応答機構が働いても問題が解消されないとき、細胞はapoptosisを引き起こす。我々は防御機構の違いとして小胞体シャペロンに着目した。

(1) 虚血ストレスによる脱毛

ラット腹部から採取した皮弁で作成した標本をヘマトキシリン・エオジン染色し、毛包の状態を観察した。8時間の虚血ストレスを与えた皮弁では、再還流から4、6、8時間後の標本では脂肪層まで深く入り込んだ活動期毛包が多数認められるのに対して、再還流後、10時間以降の標本で確認できるのは真皮内に留まる休止期・退行期毛包ばかりで、活動期の毛包は確認できなかった。活動期と休止期の毛包を周期別にカウントし、毛包数の推移を図1に表した。なお、退行期毛包はいずれの観察点においても観察されることは稀で、あっても数が非常に少ないためデータから除外した。

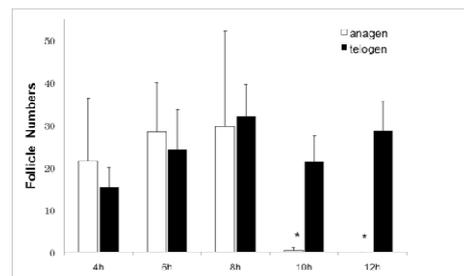


図1 毛包数の推移
休止期毛包では明らかな変化を認めないが、活動期毛包では再還流から10時間以降、明らかな毛包数が減少している。*p < 0.001

標本を薄切した際に毛包に対して水平に切れたもの以外は正確な周期を断定できないため、数にばらつきがあるが休止期毛包はいずれの標本でも確認できたのに対し、活動期毛包は再還流から10時間後にはほぼ消失し、明らかな有意差を認めた。

活動期毛包が再還流から8時間を境に跡形もなく姿を消したことから、これまでの研究を照らし合わせると、虚血により活動期毛包のみに選択的に細胞死が誘導されている可能

性が考えられた。活動期毛包の apoptosis を確認するために TUNEL 染色を行った。休止期毛包ではいずれの群でも陽性細胞は確認できなかったのに対し、再還流後 8 時間群の活動期毛包では TUNEL 陽性細胞が確認され、虚血ストレスにより活動期毛包は選択的に apoptosis が誘導されている可能性が示唆された。

(2) 小胞体ストレス応答

休止期毛包と活動期毛包の防御機構の違いに小胞体ストレス機構が関与している可能性について検討した。今回は先に述べた防御機構の違いとして小胞体分子シャペロンの GRP78 に着目した。

まずは発現を確認するために GRP78 を免疫染色した。活動期毛包では再還流から 4 時間の時点で強く染色されたが、その後徐々に弱くなり、活動期毛包が消失する直前の 8 時間では一部の外鞘を除いては染色されず、GRP78 は一時的には発現したものの、消失したと考えられた。これに対し、休止期毛包は経時的な変化は認められず同程度の濃度を維持しており、GRP78 が持続的に発現していると考えられた。

さらにウエスタンブロッディングで発現している GRP78 の定量を行った。活動期毛包と休止期毛包のみを分離するのは困難だったため、休止期毛包を含む皮膚と活動期毛包を含む皮下組織を分層し、タンパクを抽出した。ウエスタンブロッディングでは、GRP78 の発現量を相対的に評価するため、loading control として β -actin も定量した。得られたバンドを画像解析ソフトで数値化し、統計処理を行ったところ、活動期毛包を含む皮下組織は再還流から 6 時間後に GRP78 は有意に増加し、その後は徐々に減り、活動期毛包が

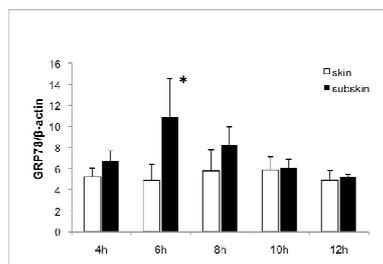


図2 Western blotting (ischemic groups) sub skin 群では再還流から 6 時間後に GRP78 は有意に増加し、その後は徐々に減少。Skin 群ではいずれの観察点においても同程度の発現量だった。

消失する 10 時間には皮膚と同程度まで減っていた。一方、皮膚は多少の変化はあるものの、経時的に大きな変化は認められず、同程度の発現量を示していた。

Sham 群に対しても同様にウエスタンブロッディングを行ったところ、皮下組織 8 時間後の値がやや上昇しているものの、いずれの群でも著しい変化は認められず、また、虚血ストレス群に比べ、小さな値となった。

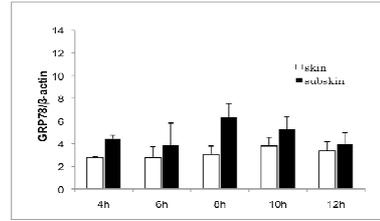


図3 Western blotting (sham groups) skin 群、sub skin 群のいずれも有意な変化は認めず、発現量も少ない。

今回の実験では活動期毛包と休止期毛包は同一のケ

ラチノサイトであるにもか

かわらず、休止期毛包は表皮と同様に虚血に対する耐性がより高くなっていった。これは休止期毛包では持続的に GRP78 を発現することで細胞腫特異的小胞体ストレス応答を生じ、虚血ストレスに対する耐性を示している可能性を示唆しているのではないかと考えられた。また、活動期毛包は小胞体シャペロン GRP78 を強く発現しているにもかかわらず、apoptosis していた。これは本来防御機構として働くはずの GRP78 が何らかの原因でシャペロンとして機能できなかった可能性や GRP78 が過剰に発現したことが逆に apoptosis 誘導に関与している可能性などが考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

- ①渡辺悠子、周期別毛包の虚血耐性と小胞体ストレス反応の関与、第 19 回日本形成外科学会基礎学術集会、平成 22 年 9 月 16 日、横浜
- ②渡辺悠子、毛周期による毛包の対虚血耐性の相違と小胞体ストレスの関与、第 18 回日本形成外科学会基礎学術集会、平成 21 年 10 月 2 日、東京
- ③渡辺悠子、毛包の対虚血耐性に関する研究、第 19 回東北大学形成外科同門会、平成 21 年 2 月 21 日、仙台市

〔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

今井 啓道 (IMAI YOSHIMICHI)
東北大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：80323012

(2) 研究分担者

武田 睦 (TAKEDA ATUSHI)
東北大学・病院・助教
研究者番号：30333800

(3) 連携研究者

()

研究者番号：