

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

梅田 あや

## 目次

緒 言 .....	1
第 1 章 ミニラットの背部皮膚の組織学的性状と毛周期 .....	9
第 2 章 ミニラットの急性皮膚傷害に対する反応性 .....	31
第 3 章 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 .....	40
第 4 章 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 .....	47
結論 .....	61
謝辞 .....	65
引用文献 .....	67

## 緒 言

成長ホルモン (growth hormone, GH) は 22.5KD のポリペプチドで、下垂体前葉ホルモンの一種であり、その合成と分泌は主に GH 放出ホルモン (GHRH) とソマトスタチン (somatostatine, SS) によって制御されている (Wehrenberg and Giustina, 1992)。GH の作用は GH 受容体 (GH receptor, GHR) に結合することで発現し、ある種の標的組織では直接その組織の成長と代謝を促進する (Hull *et al.*, 1999)。しかし、GH の最も特徴的な作用の一つは、主に肝臓に作用してインスリン様成長因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) および IGF 結合タンパク (IGF binding proteins, IGFBPs、特に IGFBP-3) の遺伝子を発現させ、循環血中のこれらのタンパクのレベルを上昇させることである (Flonini *et al.*, 1996; Velloso, 2008)。循環血中の IGFs は、IGFs の生物活性を調整する IGFBPs に高度の特異性と親和性をもって結合し、標的組織に運ばれ、毛細血管内皮を通過し、細胞表面の IGF-1 受容体 (IGF-1R) に結合して作用を発揮する (Yakar *et al.*, 2005)。GH はまた、肝臓以外のほとんどの組織においても IGFs、特に IGF-1 の合成を誘導し、合成された IGF-1 は IGF-1R を介して、autocrine、paracrine あるいは endocrine に作用し、物質代謝ならびに細胞の増殖、成長および分化に寄与する (Yakar *et al.*, 2005; Martinelli *et al.*, 2008)。このように、IGF-1 は GH の作用の多くを仲介している (Ohlsson *et al.*, 1998; Su *et al.*, 1999; Bidlingmaier and Strasburger, 2010; Perrini *et al.*, 2010)。

GH は、ヒトの GH 分泌異常症 (下垂体性巨人症、末端肥大症、GH 分泌不全性低身長症等) との関連で、古くから注目されてきたホルモンのひとつである。例えば、GH の分泌過剰は、手足や内臓、顔などあらゆる組織に異常に活発な成長を引き起こし、小児期 (骨端線閉鎖前) には長骨が伸び、身長や四肢や指の異常成長が見られ (下垂体性巨人症)、成人 (骨端線閉鎖後) では骨は伸長するよりもむしろ変形する (末端肥大症)。逆に、GH の分泌不全は、小児期には均整のとれた発育が障害され (下垂体性低身長症)、低血糖を引き起こし、成人においては体脂肪が増えて筋肉組織が減り、易疲労感、骨粗鬆症などの病態を引き起こすことが知られている。また、GH は、プロラクチン、エストロゲン、アンドロゲンなどの性ホルモンと相互に作用し、下垂体性巨人症では思春期の遅れや生殖器の発育不良、末端肥大症では月経周期の不規則化、勃起機能不全、非産褥性乳汁分泌など、GH 分泌異常の生殖機能への影響が

観察されている。さらに、最近では老化や寿命への GH/IGF-1 軸の作用についても明らかになってきており (Shimokawa *et al.*, 2008)、GH は生体の正常な成長や加齢に重要な影響を及ぼすホルモンの一つであると言える。

このように、GH/IGF-1 軸は様々な組織で刺激因子としての働きを有する (Green *et al.*, 1985) が、皮膚と GH の関係についても、GH 分泌異常症との関連で古くから調べられてきている (Black *et al.*, 1972; Wolf *et al.*, 1996)。例えば、GH 分泌過剰症では体毛が硬くて濃く、皮膚の肥厚、皮脂腺と汗腺の肥大、大量の発汗と不快な体臭を発することなどが知られており、逆に、GH 分泌不全症患者では皮膚の乾燥や菲薄化、発汗機能の低下などがしばしば問題とされている。こうした所見は、皮膚もまた GH の影響を受ける臓器のひとつであることを示している。また、様々な実験においても、GHR や GH 結合蛋白 (GH binding proteins, GHBP) が表皮や皮膚付属器、真皮の脂肪細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、平滑筋、骨格筋などに広範に認められることが報告されているなど (Lobie *et al.*, 1990)、GH が直接的にあるいは主に IGF-1 を介して間接的に、皮膚の成長や構造 (Jorgensen, 1997; Rudman *et al.*, 1997; Tavakkol *et al.*, 2002) に影響していることが示されている。毛包に関しても、Philpott *et al.* (1994) および Batch *et al.* (1996) は、IGF-1 が毛包の成長と毛周期の生理学的制御因子として重要であることを示し、Su *et al.* (1999) は毛包成長期における細胞の増殖と移動に IGF-1 が重要な役割を果たしていることを明らかにするなど、GH/IGF-1 軸の重要性が指摘されている。

Mini rat (Jcl: WistarTGN (ARGHGEN) 1Nts) (MR) はラットの GH 遺伝子に対するアンチセンス RNA transgene を Wistar rat (WR) に導入して GH 遺伝子の発現を抑制したトランスジェニック動物で (Fig.1)、下垂体にアンチセンス RNA が発現し、血漿中の GH 濃度が減少して成長が阻害される (Matsumoto *et al.*, 1993, 1995)。また、由来系統である WR と比べて、組織学的に下垂体前葉が小さく、免疫組織学化学的に下垂体前葉の GH 陽性細胞は数が少なく、かつ、小型である (Matsumoto *et al.*, 2006)。血漿中 GH は WR の約 40~60% (Matsumoto *et al.*, 1993; Tani *et al.*, 2001a)、血漿中 IGF-1 は約 50% (第 1 章) に抑えられており、血中 Glucose 量も少ない。また、骨髄は低形

成を示し脂肪組織が多く、血中の白血球数や血小板数が少ない (Teranishi *et al.*, 1999a, 1999b) (Table 1)。

MR では生涯を通して発育抑制が見られる。体重は WR の 2/3 から 1/2 であり (Matsumoto *et al.*, 1993, 1995; Teranishi *et al.*, 1998, 1999b)、MR の下垂体における GH mRNA の発現の低下とそれに伴う GH 分泌の減少および体重増加抑制の程度は、雌よりも雄で目立つ (Matsumoto *et al.*, 1995)。MR では GH の分泌減少による体重増加抑制以外に異常所見は観察されないことから、治療薬としての GH やその他の薬の長期の薬効評価に有用な、ヒト成長ホルモン分泌不全性低身長症の動物モデルである (Matsumoto *et al.*, 1993)。また、生体機能の制御およびシグナルネットワークにおける GH の機能的役割を理解する上でも貴重な存在である (Matsumoto *et al.*, 2006)。

我々の研究グループではこれまで、MR を利用して、骨の成長や肝傷害の修復過程に及ぼす GH の影響を検索してきた。例えば、骨においては、MR では WR と比較して、長骨 (大腿骨) が小さく、成長板が薄く、骨密度が低いなどの特徴が認められる。これらは GH の投与により改善されるが、骨のリモデリングや破骨細胞の動態には両系統間に差が認められず、また、GH を投与しても影響は受けない。以上のことから、MR が GH 減少に関連したヒトの骨粗鬆症のモデルとなりうる可能性が示唆された (Teranishi *et al.*, 1998, 1999a, 1999b, 1999c)。一方、肝臓については、Tani *et al.* (1999, 2001b) は GH の減少が肝臓の薬物代謝能に及ぼす影響について検討した。さらに、MR では、WR に比べて、四塩化炭素、D-galactosamine、thioacetamide などによって惹起される肝傷害の程度が著しく高度で、肝細胞の再生は遅延し、代わりに間葉系の反応が顕著で、肝線維化がより早期に誘導される (Shimizu *et al.*, 2001, 2002; Uetsuka *et al.*, 1997a, 1997b; Tani *et al.*, 1998) が、こうした変化は GH の投与により軽減される (Okada *et al.*, 2003) ことなどを明らかにし、MR は薬物性肝傷害と GH の関係について検索する上でも有用であることを示唆した。さらに、GH/IGF-1 軸を適切に抑制すると寿命が延びることが解ってきているが、特にヘミ接合体 (tg/wt) の MR においては、WR と比較して 7~10% 寿命が長く、さらに適切なカロリー制限を組み合わせると、加齢性腎障害が抑制されることにより、寿命を 30% 延長できることが報告されている (Shimokawa *et al.*, 2002; Zha *et al.*, 2008)。

上述したように、GH は、直接的もしくは IGF-1 を介して間接的に、皮膚の成長に影響を及ぼすことが報告されているが、これまでに MR の皮膚の性状について検索した報告はない。また、下垂体性小人症の病態モデルは、下記に示すように、MR 以外にも数多く報告されている：Snell dwarf (*pit1<sup>def</sup>/pit1<sup>def</sup>*) mouse (Basinger and Gittes, 1975; Stickland *et al.*, 1994)、Ames dwarf (*prop1<sup>def</sup>/prop1<sup>def</sup>*) mouse (Borg *et al.*, 1995; Miquet *et al.*, 2005; Csiszar *et al.*, 2008)、GHR/BP-KO mouse (Larson mouse) (Zhou *et al.*, 1997; Asa *et al.*, 2000)、lit mouse (GHRHR mutation mouse) (Eicher and Beamer, 1976)、GH/IGF-1-deficient mouse (weaver mutant mouse) (Yao *et al.*, 2007)、spontaneous dwarf rat (Carter *et al.*, 2002; Swanson and Unterman, 2002) および GH/IGF-1-deficient dwarf rat (Lewis dwarf rat) (Gronbaek *et al.*, 1997; Symons and Seymour, 2000; Ramsey *et al.*, 2002)。しかし、これらの下垂体性小人症モデル動物の皮膚の性状について検索した報告もない。

そこで、本研究では、GH 欠乏が皮膚に与える影響を検索する一助として、雄性 MR の皮膚の組織学的性状と毛周期の特徴を解析することを目的に、下記の検討を行った。

まず、第 1 章において、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 と比較・検討し、MR の皮膚の組織学的な特性を明らかにするとともに、MR の毛周期が 8 週齢以降長期に亘って休止期に留まることを明らかにした。ついで、第 2 章では、環境中の酸化ストレス因子の一つである過酸化水素に局所暴露した背部皮膚の反応の差を MR と WR との間で組織学的に比較・検討し、GH 欠乏が急性皮膚傷害に与える影響を明らかにするとともに、その過程において、傷害刺激により MR の休止期下にある毛包に成長期が誘導されることを見出した。さらに、第 3 章では、毛周期が休止期下にある MR の背部皮膚の人為的脱毛に対する反応を確認し、一過性に新たな毛周期が誘導されることを示した。最後に、第 4 章では、脱毛刺激により一過性に均質な毛周期が誘導できるという MR の特性を利用し、誘導された毛周期の進展過程に伴い MR の背部皮膚で観察される遺伝子発現の変化を網羅的に観測した。

こうした一連の検索を通じて、MR の皮膚性状と毛周期の特性および皮膚での遺伝子発現の変化を毛周期の進展過程と関連付けて明らかにし、さらに、GH 抑制が皮膚に与える影響の検索あるいは毛周期の解析における MR のモデル動物としての有用性について検討を加えた。



Table 1. Organ weights and hematology and blood biochemistry of MRs and WRs (n=5~6) at 10 weeks old. Each value represents mean  $\pm$  S.D. \* $p$ <0.05. (Teranishi *et al.*, 1999a)

Group	Final BW (g)	BW gain (g)	Brain (g%)	Heart (g%)	Liver (g%)	Kidney(R) (g%)	Kidney(L) (g%)	Spleen (g%)
Wistar	392.8 $\pm$ 10.8	50.5 $\pm$ 12.6	0.51 $\pm$ 0.02	0.27 $\pm$ 0.01	3.56 $\pm$ 0.12	0.28 $\pm$ 0.01	0.28 $\pm$ 0.01	0.21 $\pm$ 0.01
Mini	197.1* $\pm$ 11.4	15.9* $\pm$ 2.0	0.87* $\pm$ 0.03	0.30* $\pm$ 0.02	3.00* $\pm$ 0.17	0.23* $\pm$ 0.01	0.23* $\pm$ 0.02	0.18* $\pm$ 0.01

Group	Thymus (g%)	Pituitary (mg%)	Adrenal (mg%)	Testis(R) (g%)	Testis(L) (g%)	Femur (mm)	Tibia (mm)
Wistar	0.07 $\pm$ 0.01	2.9 $\pm$ 0.2	15.4 $\pm$ 2.0	0.55 $\pm$ 0.03	0.57 $\pm$ 0.02	36.43 $\pm$ 0.20	40.22 $\pm$ 0.33
Mini	0.05 $\pm$ 0.01	1.9* $\pm$ 0.5	14.5 $\pm$ 2.1	0.37* $\pm$ 0.03	0.40* $\pm$ 0.02	30.92* $\pm$ 0.46	35.62* $\pm$ 0.33

Group	RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	WBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	PLT ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	ALP (U/l)	Ca (mg/dl)	IP (mg/dl)
Wistar	6.48 $\pm$ 0.30	10.53 $\pm$ 0.99	993.2 $\pm$ 25.2	944.3 $\pm$ 46.8	10.1 $\pm$ 0.3	5.5 $\pm$ 0.8
Mini	8.09 $\pm$ 0.25	5.49 $\pm$ 0.75	822* $\pm$ 25.6	644 $\pm$ 115.2	9.9 $\pm$ 0.2	5.8 $\pm$ 0.9

BW: body weight, R: right; L,: left.

RBC: red blood cell; WBC: white blood cell; PLT: platelet; ALP: alkaline phosphatase; Ca: calcium; IP: inorganic phosphorus.

(A)



(B)

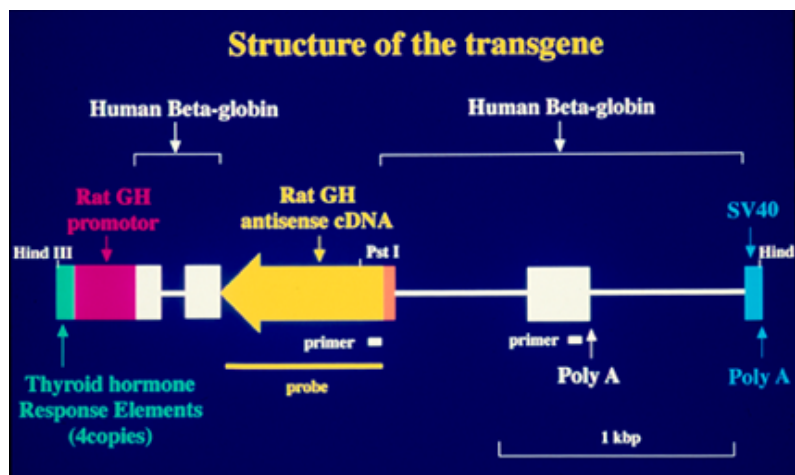


Fig.1. (A) Gross appearance of Mini and Wistar rats.  
(B) Structure of the transgene.

## 第 1 章

### ミニラットの背部皮膚の組織学的性状と毛周期

## 小序

緒言で述べたように、MR は日本で開発された GH 欠乏 dwarf rat である。この章では、GH 欠乏が皮膚の組織学的性状に及ぼす影響を明らかにするため、雄性 MR の背部皮膚の加齢に伴う組織学的性状の変化と毛周期の推移を、由来系統である WR と比較・検討した。同時に、毛周期が成長期 (anagen、5 週齢) および休止期 (telogen、8 週齢) 時の皮膚および肝臓における IGF-1 および IGF-1R の mRNA の発現量ならびに血中 IGF-1 濃度を測定した。

## 材料と方法

### 動物

0 から 16 週齢の雄性 MR (各週齢それぞれ 4 匹) を使用した。MR は財団法人日本生物科学研究所 (東京) から分与頂いた。また、対照として、日本クレア株式会社 (静岡) より購入した 0 から 13 週齢の雄性 WR (各週それぞれ 4 匹) を使用した。そのうち 0 から 3 週齢のラットについては、妊娠ラットを当研究室の実験動物室で飼育して出産させて得た出生子を使用した。動物は室温  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、14 時間-10 時間明暗周期にコントロールされた動物室で、アイソレーターケージ (仁木商事、東京) に収容して飼育し、市販の飼料 (MF 飼料、オリエンタル酵母工業株式会社、東京) と水道水を自由に摂取させた。0 から 16 週齢にかけて、1 週毎に各 4 匹の MR を体重測定後にエーテル麻酔下で放血殺した。また、0 から 13 週齢にかけて 1 週毎に各 4 匹の WR を同様な方法で殺処分した。

本実験は東京大学 動物実験委員会の承認を得て、同委員会が作成した指針に従って行った。

### Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

5 および 8 週齢時に、MR および WR の背部皮膚および肝臓の IGF-1 および IGF-1R の mRNA 量を、RT-PCR 法で測定した。すなわち、2  $\mu\text{g}$  の total RNA を皮膚および肝臓から抽出し、Superscript II reverse transcriptase (GIBCO BRL) を使用して一本鎖 cDNA

を作製し、primer および Taq DNA polymerase (Takara Taq、タカラバイオ株式会社、滋賀) を加えて、サーマルサイクラーで pre-heating (94°C、9 min) の後、denaturing (94°C)、annealings (58.5°C) および elongation (72°C) を各 1 分繰り返して複製した。IGF-1、IGF-1R および glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の primer および PCR cycle を Table 1-1 に示した。

次いで、定量化のために、PCR 産物を Tris-borate EDTA buffer 中で 2% アガロースゲル上で電気泳動して ethidium bromide で染色し、Quantity One v3.0.2 (pdi, New York, USA) を用いて分析した。その結果を GAPDH の発現量に対して標準化し、今度は任意に 1.0 に設定した対照群の平均値に対して標準化した。

#### 血漿中 IGF-1 の Enzyme immunoassay (EIA)

5 および 8 週齢時に採血した血液を、Tris-EDTA (0.1M Tris, 5mM EDTA) で 3 倍希釈し、測定まで -80°C で保存した。測定には Rat IGF-1 EIA kit (DSL-10-2900、Diagnostic Systems Laboratories, Inc. USA) を使用した。サンプルと標準液に、rat IGF-1-biotin conjugate solution と rat IGF-1 antiserum を添加して室温で 1 時間インキュベートし、余剰サンプルを十分に洗浄した後、streptavidin-enzyme conjugate solution を加えて室温で 30 分インキュベートした。余分な試薬を洗い流し、tetramethylbenzidine (TMB) 発色液を加えて遮光下でインキュベートした後、反応停止薬を加え、450 nm および 620 nm の二波長で吸光度を測定した。

#### 組織学的および電子顕微鏡学的検査

剖検時に各ラットから背部皮膚を採取し、10% 中性緩衝ホルマリンで固定した。皮膚の採材に先立ち、採取部位を電気シェーバーで剃毛した。採取した皮膚組織について、体軸に平行な 4  $\mu$ m のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) を施して組織学的検査に供した。

採材した皮膚の小組織片を 2.5% グルタルアルデヒド加 0.1M リン酸緩衝液および 1% 四酸化オスミウムで二重固定し、エポキシ樹脂に包埋した。超薄切片を酢酸ウランと酢酸鉛で二重染色し、電子顕微鏡 (JEM-1200Ex, 日本電子株式会社、東京) で

観察した。トルイジンブルー染色を施した semi-thin 切片 (1 $\mu$ m) についても形態観察を行った。

### 形態計測

毛包の深さ(表皮から毛根底部まで)を光学顕微鏡の 100 倍から 400 倍の視野下で、マイクロメーターを使って計測した。すべてのラットにつきランダムに 10 本/1 視野 $\times$ 3 視野の毛包の深さを測り、個別に平均値を算出した。また、毛周期が休止期であった 4、8 および 12 週齢のラットについては、皮膚全体の厚さ(表皮、真皮、皮下組織を含んだ厚さ)および真皮(膠原線維層)の厚さを 1 匹につき 10 箇所/1 視野 $\times$ 3 視野測定し、それぞれの個体の平均値を算出した。(Fig.1-1)

### 統計処理

上述した計測値を、各週齢群のラット 4 匹の平均値 $\pm$ 標準偏差で表した。MR と WR 間の有意差の検定は、標準偏差に有意なバラツキがない場合は Student's *t*-test で、また、バラツキがある場合には Welch's *t*-test で行い、 $P<0.05$  を以て有意であると判断した。

## 結果

### 体重

MR の体重は実験期間を通じて WR よりも軽く、両者間の差は 8 週齢以降大きくなった (Fig. 1-2)。

### IGF-1 および IGF-1R の mRNA の発現量

皮膚における IGF-1 および IGF-1R の mRNA の発現量について、MR と WR の間に有意差は認められなかった。肝臓における IGF-1 および IGF-1R の mRNA の発現量は、5 週齢の IGF-1R を除いて、WR より MR で有意に低かった (Fig.1-3)。

### 血漿中 IGF-1 濃度

血漿中の IGF-1 の濃度は、WR より MR で有意に低く、その差は特に 8 週齢時に顕著であった (Fig.1-4)。

#### 組織学および電子顕微鏡学的検査所見

表皮は MR および WR とともに生後薄くなり、4 週齢でプラトーに達した。MR の表皮は WR のそれよりも薄く、その差は特に出生時に顕著であった (Fig. 1-5)。

毛周期が telogen 期である 4、8 および 12 週齢時で両系統を比較すると、両系統ともに皮膚全体の厚さおよび真皮（膠原線維層）の厚さは加齢とともに増加したが、皮膚全体の厚さに占める真皮の厚さの割合は WR より MR のほうが低かった (Fig. 1-6)。また、WR と比較すると、MR は真皮が薄くて膠原線維が少なく、逆に皮下脂肪組織は多かった (Fig. 1-7)。皮脂腺の大きさは両系統とも加齢に伴い大きくなったが、MR のほうが WR より小さかった (Fig.1-8)。

MR の背部皮膚の電顕所見は WR と本質的に同様であった (Figs. 1-9, 10 and 11)。

#### 毛周期

毛包の組織形態 (Fig. 1-9) に基づいた毛周期の推移は、毛包の深さの変化と良く対応した (Muller-Rover *et al.*, 2001, Fig. 1-1)。すなわち、毛包の深さは成長期 (anagen) には深く、退行期 (catagen) に向かって浅くなっていった。また、休止期 (telogen) の間は一定して短かった。毛包の組織像と深さの変化から判定した毛周期は、生後最初の 8 週間は MR と WR でほとんど同じであり、各 4 週間からなる毛周期 (anagen-catagen-telogen) を 2 回繰り返した (Fig. 1-12)。しかし、その後は、MR の毛包は少なくとも我々が観測した 16 週齢まで telogen 期に留まり、毛包の伸長が見られなかったのに対し、WR では、毛包の深さに個体差が目立つものの、第 3 回目の毛周期が始まった (Fig.1-12)。

## 考察

本章では、加齢に伴う背部皮膚の組織構造の変化を MR と WR で比較した。その結果、GH 欠乏は、毛周期、皮膚の厚さおよび皮脂腺の大きさに影響を及ぼすことが明らかになった。

GH および IGF-1 は表皮の増殖や分化の制御に関与していることが知られている (Ristow and Messmer, 1988; Gilhar *et al.*, 1994; Eming *et al.*, 1996; Wertheimer *et al.*, 2000)。本章の検索でも、MR は出生時に WR よりも表皮が有意に薄かったが、このことは GH が胎子においても表皮の成長に影響を及ぼしている可能性を示唆している (Werther *et al.*, 1993)。

緒言でも触れたように、GH が直接的にあるいは IGF-1 を介して間接的に、皮膚の成長およびコラーゲン合成を制御している事を示す多くの証拠がある (Oyamada *et al.*, 1990; Granot *et al.*, 1991)。例えば、ヒトでは、下垂体性巨人症の患者の皮膚はコラーゲン量が多くて厚いことが知られている (Black *et al.*, 1972)。一方、GH 分泌不全症患者では皮膚の乾燥や菲薄化がみられるが、recombinant human GH (rhGH) の反復投与により皮膚の type 1 collagen の合成が増加することが報告されている (Kann *et al.*, 1996)。実験動物では、ラットに biosynthetic human GH を投与すると皮膚のコラーゲン量が投与量依存性に増加して機械的な強度も増加し (Jorgensen *et al.*, 1989; Oxlund *et al.*, 1991)、イヌに porcine GH を 14 週間投与すると真皮のコラーゲン量が増え、皮膚の厚さが増したという報告がある (Prahalada *et al.*, 1998)。本章の検索結果でも、MR は WR と比べてコラーゲン量が少なく真皮が薄かったが、これは GH が真皮のコラーゲン合成に影響を及ぼしているという報告を支持している。一方、WR に比べて、GH が欠乏している MR の皮膚では脂肪組織が豊富であったが、これは GH が脂肪分解促進作用および／あるいは脂肪合成抑制作用を有することを間接的に示しているものと考えられる (Kristensen *et al.*, 1998)。また、MR では WR に比べて皮脂腺の形成が低下していた。この点に関しては、下垂体性巨人症では皮膚が脂ぎっており、逆に下垂体機能低下症では皮膚が乾燥している (Dawber *et al.*, 1992) という報告があり、GH が皮脂腺の成長に対してもある種の作用を有していることを示しているものと思われる。



GH 欠乏 MR の皮膚で一番特徴的であったのは、毛周期である。毛包は、自ら周期的に再生を繰り返す独特の器官である。マウスやラットでは毛包の成長は胎生期の終わりごろから始まるが、生後には成長期（anagen 期）、退行期（catagen 期）および休止期（telogen 期）からなる毛周期を生涯にわたって繰り返し（Fig.1-1）、一定範囲の皮膚の毛周期が同調して wavy pattern を示すことが知られている（Muller-Rover *et al.*, 2001; Stenn and Paus, 2001; Plikus and Chuong, 2008）。本章の検索で、MR と WR の毛周期を毛包の組織形態と毛包の深さから判定したところ、両系統ともに生後最初の 8 週間に 2 サイクル（1 サイクル 4 週間）の毛周期が同様に観察された。しかし、その後の経過は非常に興味深く、WR では、個体差がでてくるものの、いずれの個体でも 3 サイクル目の周期が始まったのに対し、MR では少なくとも 16 週齢まですべての個体で telogen 期のままで推移した。この点に関し、第 3 章で述べるように、毛包が telogen 期にある 11 週齢の MR の背部皮膚を人為的に脱毛することにより新たな毛周期が誘導されるが、この新たな毛周期は一過性（1 サイクルのみ）で、その後再び少なくとも観察を行った 5 ヶ月齢まで telogen 期に留まった。こうしたことから、MR の毛包は永久に毛周期の過程を喪失するのではなく、第 2 サイクル後の MR の毛包は anagen 期誘導能を保持している telogen 期が長期間持続していると考えることが出来る。

GH が毛の成長を仲介しているという報告もある。例えば、GH 分泌不全性低身長症の患者では体毛が少なくて柔軟で（Dawber *et al.*, 1992）、また、GH が欠乏したイヌでは GH 反応性の発毛が認められるという報告がある（Schmeitzel *et al.*, 1990）。さらに、IGF-1 が、特に anagen 期から catagen 期への移行の間に、分裂促進因子あるいは形態形成因子として毛包を制御していることが示されており（Philpott *et al.*, 1994; Rudman *et al.*, 1997; Su *et al.*, 1999; Weger and Schlake, 2005）、また、IGF-1 は外根鞘細胞に対して増殖刺激作用のみならず化学走化性作用をも有することも示されている（Fujie *et al.*, 2001）。

本章では MR と WR の皮膚の IGF-1 および IGF-1R の mRNA の発現量を anagen 期および telogen 期に検索した結果、毛周期の如何に拘らず、皮膚における IGF-1 および IGF-1R の mRNA の発現量には両系統間で有意差は認められなかった。一方、GH の主要な標的臓器である肝臓での IGF-1 mRNA の発現量は MR で WR よりも有意に少

なく、また、血清中 IGF-1 濃度も MR で WR よりも有意に低かった。血中 IGF-1 は末梢の器官にはほとんど作用しないと言われているが (Su *et al.*, 1999)、本章の検索結果は、血漿中の IGF-1 が毛包の成長に何らかの作用を及ぼしている可能性を示唆している。GH の毛周期への作用を明らかにするには、今後、MR および WR の毛包における IGF-1 および IGF-1R の局在性を明らかにする必要がある。

なお、GH との相互作用が知られているアンドロゲン、エストロゲンなどの性ホルモンもまた、皮膚あるいは被毛に影響を及ぼすことが知られている (Ohnemus *et al.*, 2006)。皮膚における GH と各種ホルモンの相互作用の詳細については未だ不明な点が多い。しかし、体幹部に関して言えば、下垂体性巨人症における前腕の皮膚肥厚症の報告は男性のほうが圧倒的に多く (Black *et al.*, 1972)、GH-transgenic mice の皮膚の”oversized coat”は雄のみで認められ、去勢により抑えられる (Wanke *et al.*, 1999) など、GH とアンドロゲンはおおむね相乗的に作用すると考えられている。一方、エストロゲンは、条件にもよるが、おおむね GH の働きを減弱させると考えられており (Leung, *et al.*, 2004)、エストロゲンやプロラクチンは telogen 期の毛包に対して anagen 期の誘導を直接的に阻害し、雌マウスでは妊娠や哺乳に伴いこれらのホルモンが上昇することにより毛周期が telogen 期で停滞すると考えられている (Plikus and Chuong, 2008)。MR で毛周期が長期に亘る telogen 期に入る 8 週齢は、一般的にラットが性成熟に達する時期であり、GH 欠乏の性ホルモンへの影響が皮膚においても現れている可能性も考えられるが、詳細については不明で、今後の検討が必要である。

結論として、MR は GH 欠乏患者の dermatopathy の動物モデルとして、また、皮膚性状への GH の作用の正確な機序を解明する手掛かりを掴むうえで、非常に有用であると考えられる。

## 小括

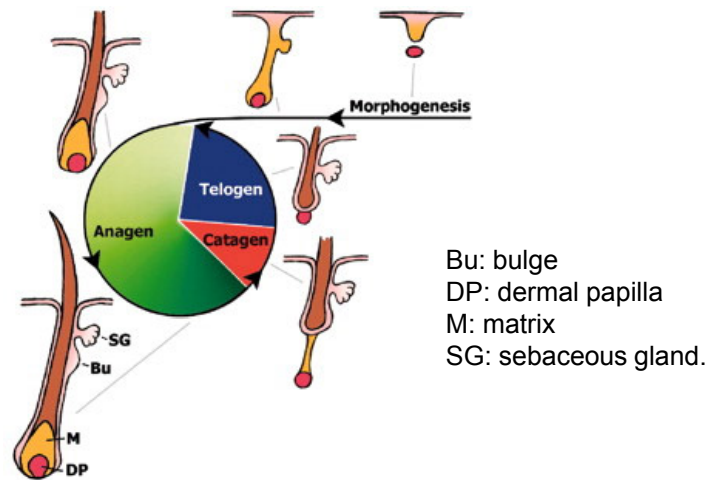
GH 欠乏が皮膚の組織学的性状にどのような影響を及ぼすかを検討するため、雄性 MR の背部皮膚の加齢に伴う変化を由来系統である WR と比較した。その結果、両系統の皮膚の組織構造には基本的な違いは認められなかった。しかし、WR と比較して、

MR では真皮膠原線維層が薄く、逆に皮下脂肪織は厚かった。また、皮脂腺の大きさが小さかった。両系統の皮膚性状のうち、毛周期については顕著な差が認められた。すなわち、両系統とも 1 サイクル 4 週間からなる毛周期が生後 2 回見られるところまでは同じであったが、その後、WR では毛周期が継続的に見られたのに対し、MR では長期にわたり telogen 期のまま停止した。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 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。このことは、MR においては、GH 欠乏に加え、肝臓由来の血中 IGF-1 減少が上記のような皮膚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。

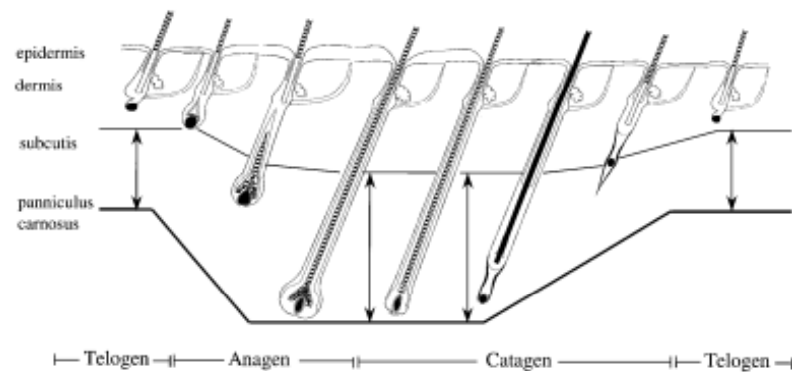
Table 1-1. Primer sequences, annealing temperature (  $T_m$  ), and cycle numbers.

Primer sequence			$T_m$ (°C)	No. of cycles	
IGF-1	sense	TCTTCTACCTGGCACTCTGC	58.5	skin	24
	antisense	CTGAGTCTTGGGCATGTCAG		liver	18
IGF-1R	sense	GCCTGGAAAACCTGCACGGTGAT	63.1	skin	31
	antisense	GGCACATTTTCTGGCAGCGAT		liver	31
GAPDH	sense	GAGTATGTCGTGGAGTCTACTG	58.5	skin	22
	antisense	GCTTCACCACCTTCTTGATGTC		liver	17

(A)



(B)



(C)

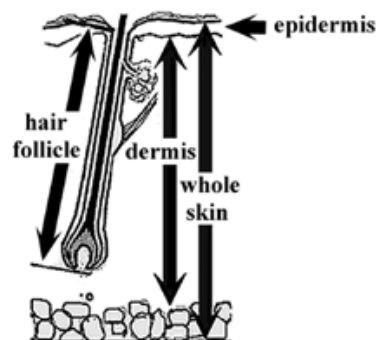


Fig. 1-1. Diagram of hair cycle pattern, which is composed of anagen (growth phase), catagen (regression phase), and telogen (resting phase).

(A) Diagram of hair cycle pattern, which is composed of anagen (growth phase), catagen (regression phase), and telogen (resting phase). (Lin *et al.*, 2004)

(B) Transition of depth of the hair follicle in the skin. (Muller-Rover *et al.*, 2001)

(C) Points of measurements in this experiment.

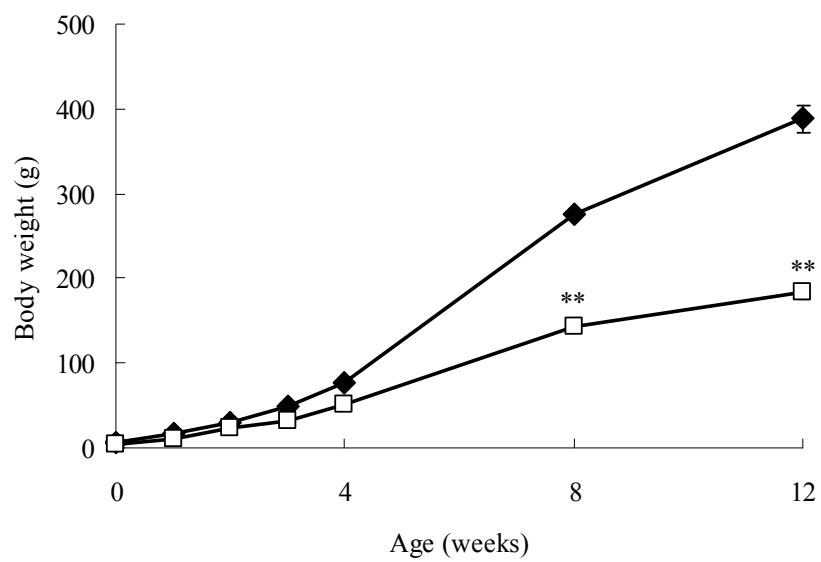


Fig. 1-2. Changes in body weights of MRs (□) and WRs (◆). Each value represents mean  $\pm$  S.D. \*\* $P < 0.01$ , Significantly different from WRs.

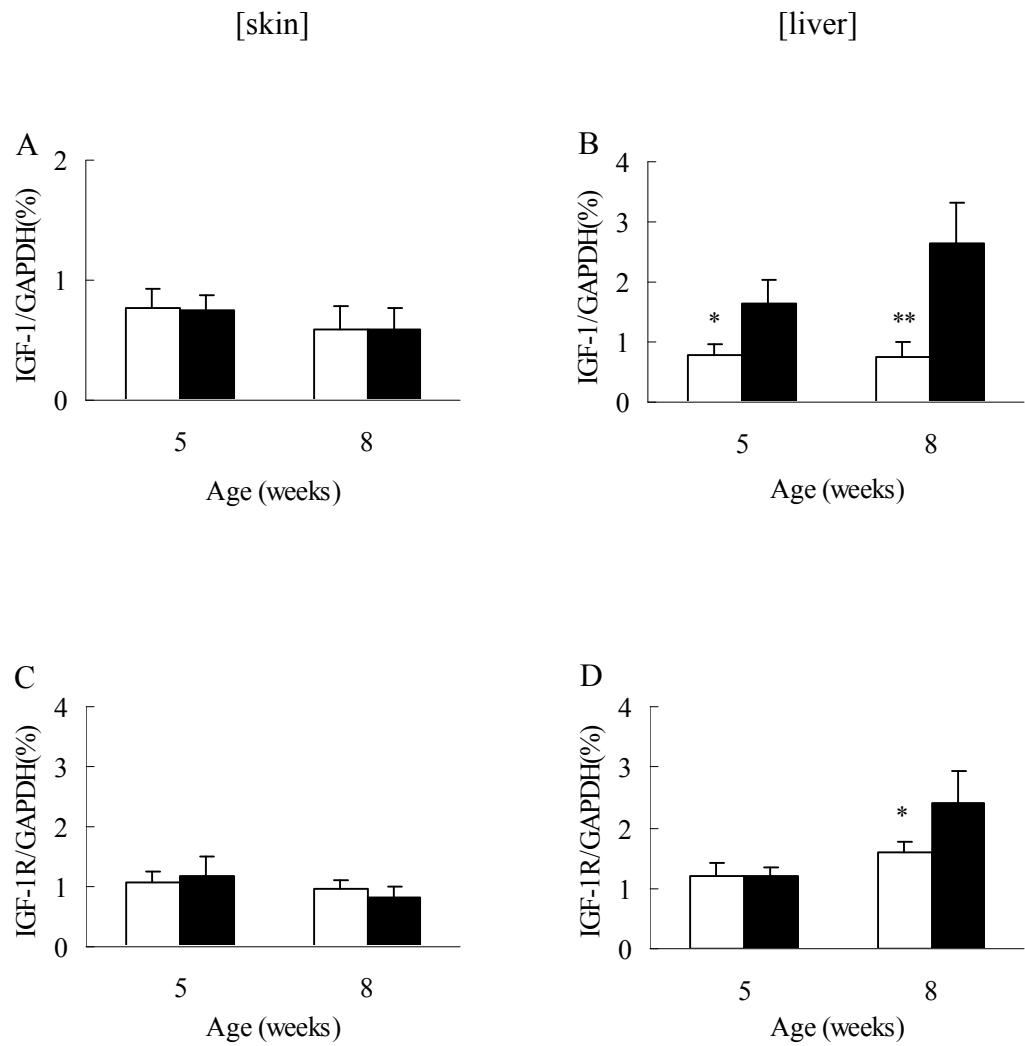


Fig. 1-3. Levels of IGF-1 (A and B) and IGF-1R (C and D) mRNAs in the skin (A and C) and liver (B and D). □:MRs and ■:WRs. Each column represents mean  $\pm$  S.D. \* $P$ <0.05 and \*\* $P$ <0.01, Significantly different from WRs.

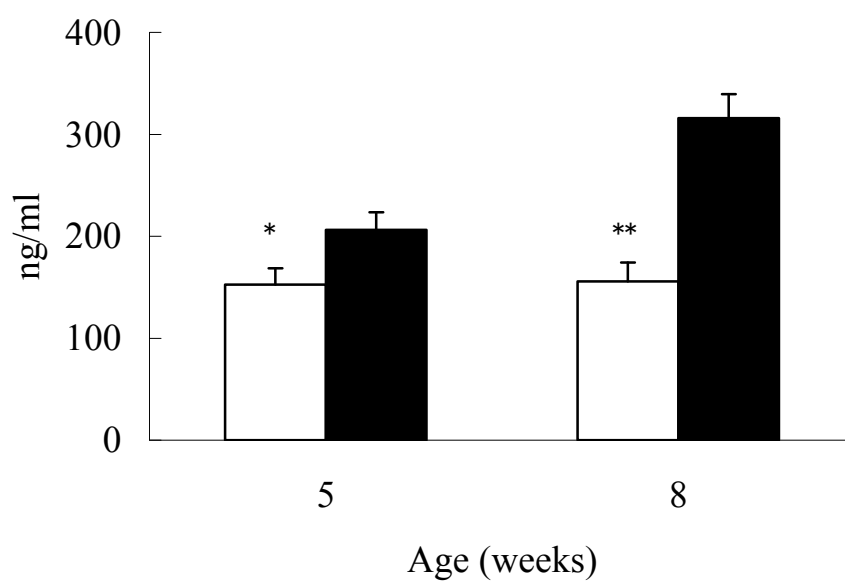


Fig. 1-4. Levels of serum IGF-1 in MRs (□) and WRs (■) at 5 and 8 weeks old. Each column represents mean  $\pm$  S.D. \* $P$ <0.05 and \*\* $P$ <0.01, Significantly different from WRs.



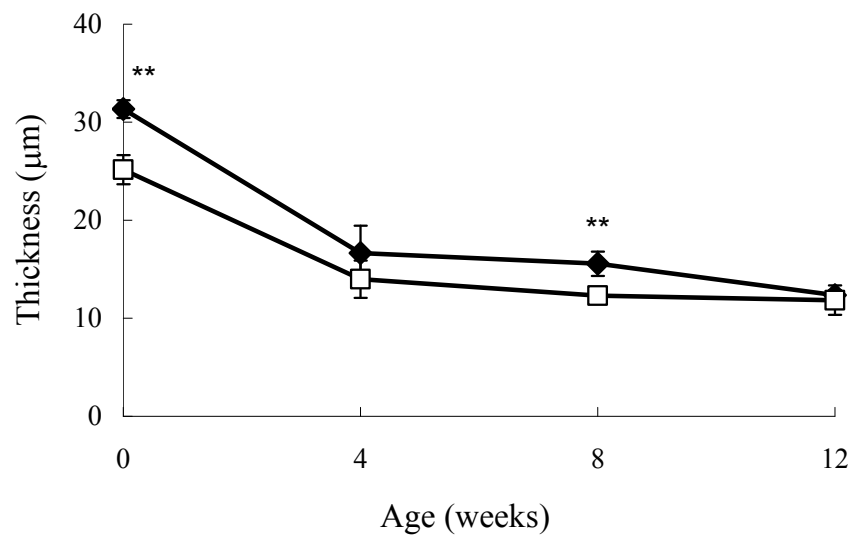
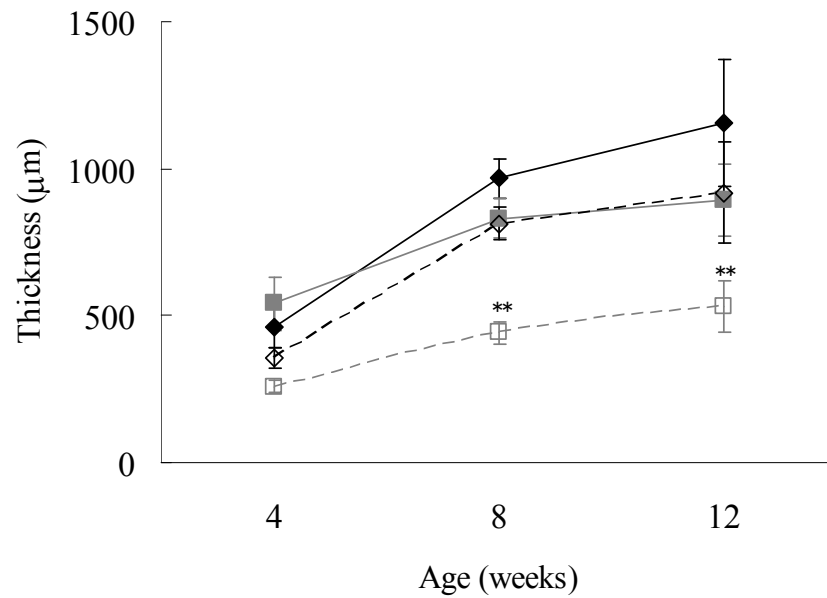


Fig. 1-5. Changes in epidermal thickness in MRs (□) and WRs (◆). Each value represents mean±S.D. \*\* $P<0.01$ , Significantly different from WRs.

(A)



(B)

Age (weeks)	Mini rat			Wistar rat		
4	46.8	±	4.7	**	78.0	± 5.5
8	53.4	±	3.1	**	84.2	± 2.6
12	59.3	±	4.2	**	79.7	± 2.4

Fig. 1-6. (A) Changes in thickness of skin components in MRs (□:dermis, ■:whole skin) and WRs (◇:dermis, ◆:whole skin). Each value represents mean±S.D. \*\* $P<0.01$ , Significantly different from WRs. (B) Percentage of the dermis in the whole skin thickness. Each value represents mean±S.D. \*\* $P<0.01$ , Significantly different from WRs.

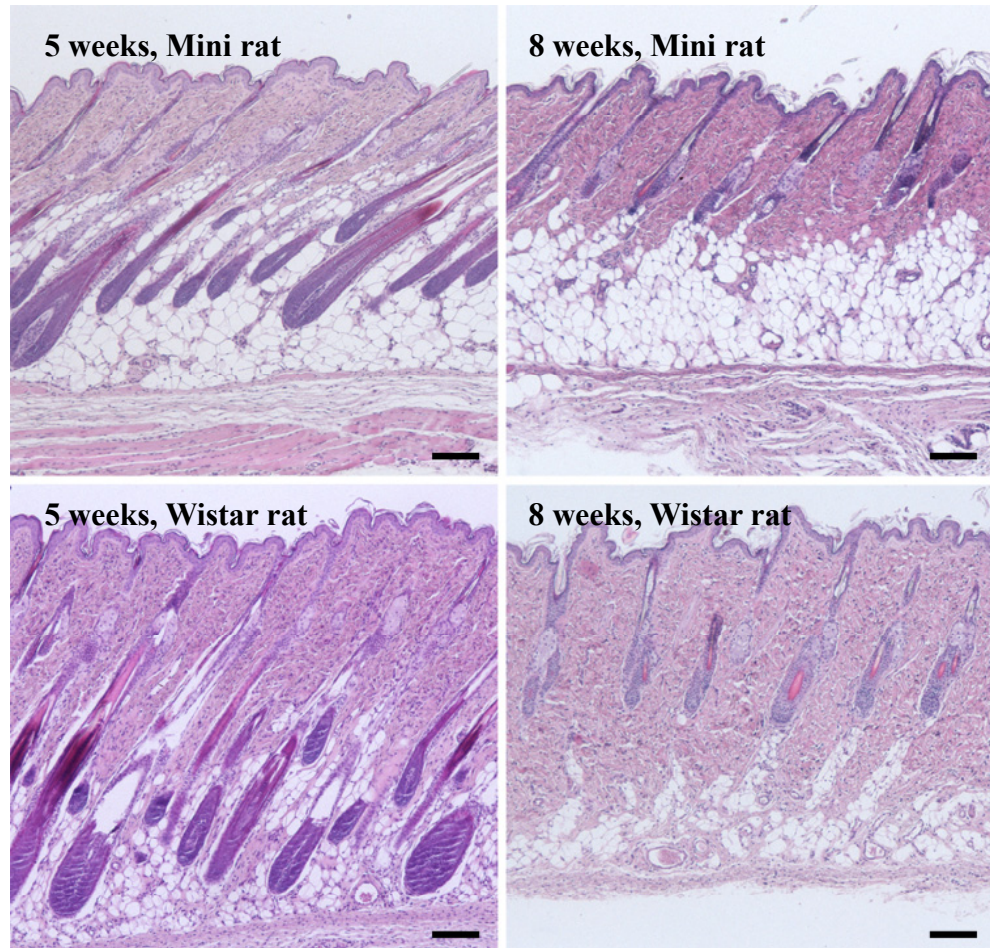
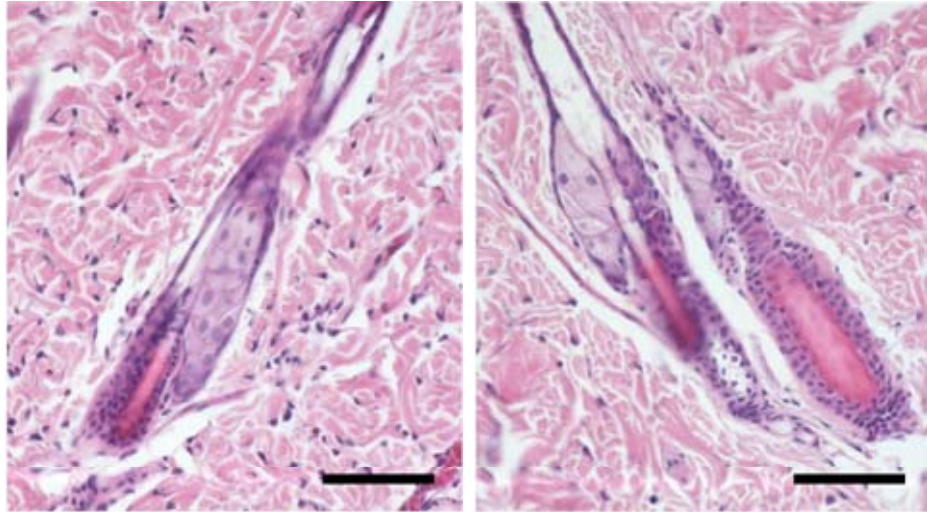


Fig. 1-7. Histology of the dorsal skin at 5 (anagen phase) and 8 weeks old (telogen phase). Compared with WR, MR has thinner dermis with less collagens and more abundant subcutaneous adipose tissues. HE stain, bar=100μm.

(A)



(B)

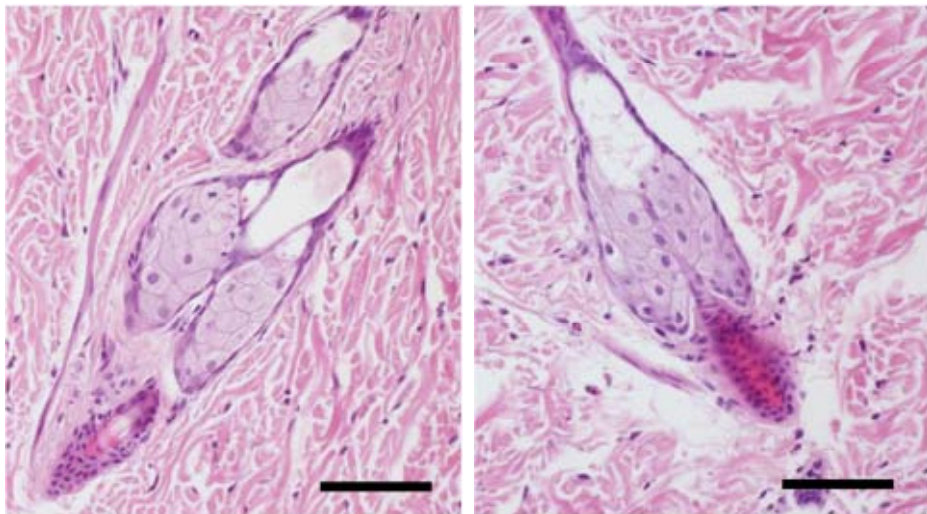


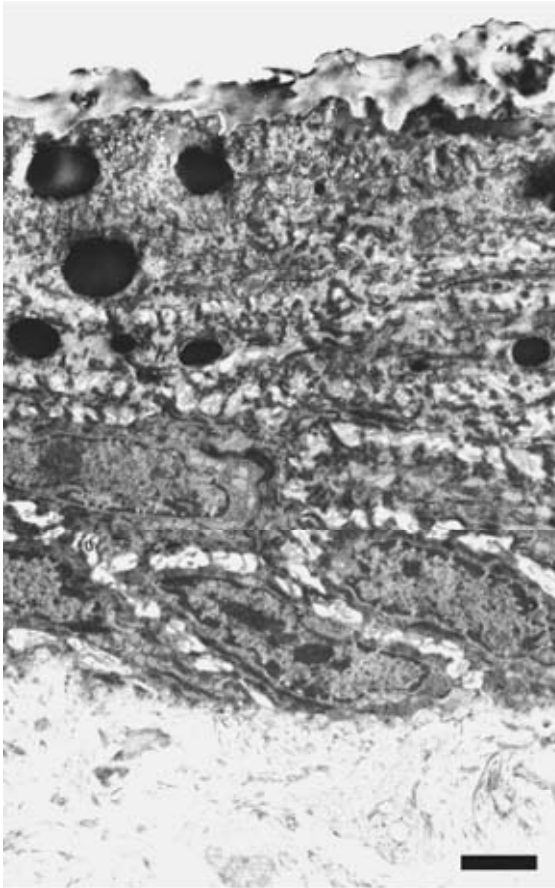
Fig. 1-8. Histology of the sebaceous glands in MRs (A) and WR (B) at 12 weeks old (telogen). The size of sebaceous glands is smaller in MR. HE stain, bar=50 $\mu$ m.



Fig. 1-9. Hair follicles of MRs at 2 weeks old (A, anagen phase), 3 weeks old (B, catagen phase) and 8 weeks old (C, telogen phase). Toluidine blue-stained semi-thin section, bar=20μm.



(A)



(B)

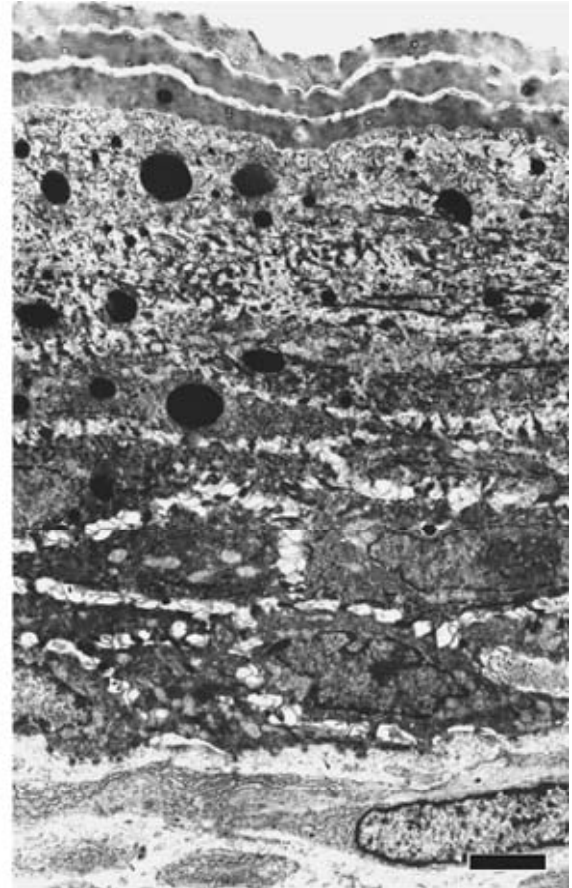
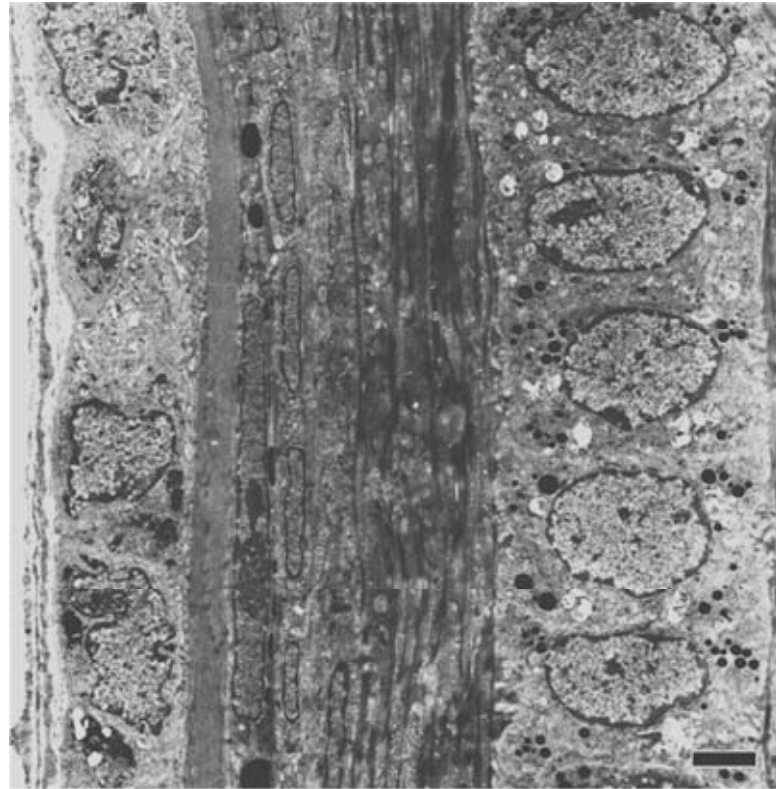


Fig. 1-10. Electron microgram of epidermis at birth in MR (A) and WR (B). bar=2.5 $\mu$  m.

(A)



(B)

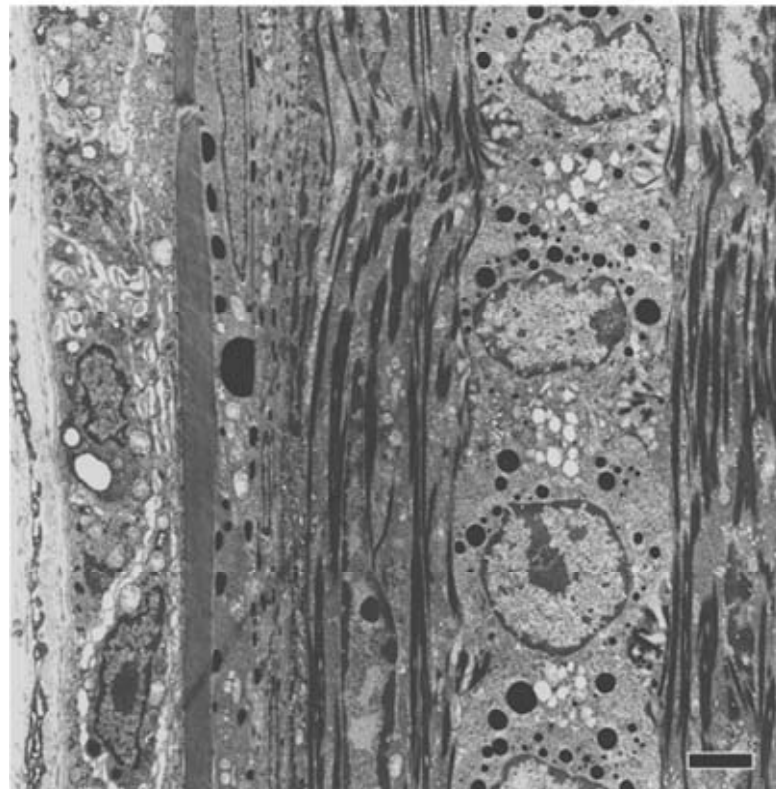


Fig. 1-11. Electron microgram of hair shaft at 1 week old in MR (A) and WR (B). bar=2.5 $\mu$  m.

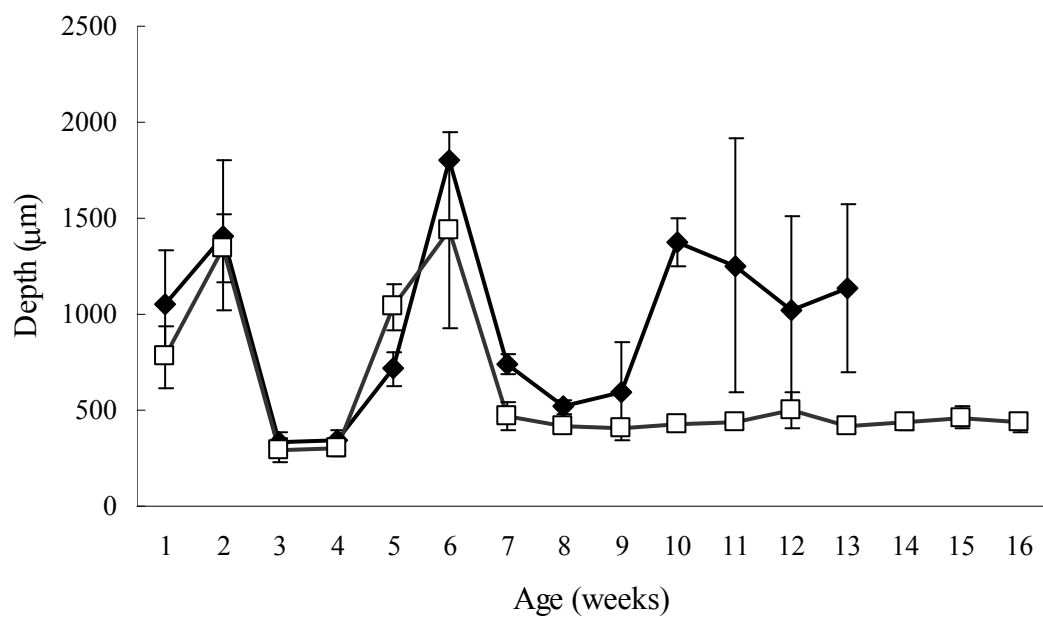


Fig. 1-12. Changes in the depth of hair follicles in MRs (□) and WRs (◆). Each value represents mean  $\pm$  S.D.



## 第 2 章

### ミニラットの急性皮膚傷害に対する反応性

## 小序

第1章では、GH 欠乏雄性 MR の背部皮膚の組織学的性状と毛周期を、由来系統である WR と比較して検討した。その結果、皮膚の組織構造に基本的な違いはないものの、表皮や真皮膠原線維層の厚さ等に系統差が見られ、また、生後8週齢以降の毛周期に顕著な系統差が認められることを明らかにした。本章では、GH 欠乏が急性皮膚傷害に対する反応性にどのような影響を及ぼすかを明らかにする目的で、環境中の酸化ストレス因子の一つである過酸化水素 (hydroxyl peroxide, HPO) 溶液の局所暴露に対する背部皮膚の反応を、MR と WR で組織学的に比較した。

## 材料と方法

### 動物

財団法人日本生物科学研究所から分与された8週齢の雄性 MR30 匹を実験に用いた。また、同週齢の雄性 WR30 匹を対照として用いた。動物は第1章と同じ条件下で飼育し、実験期間中、飼料 (MF、オリエンタル酵母株式会社) および水道水を自由に摂取させた。

本実験は東京大学 動物実験委員会の承認を得て、同委員会が作成した指針に従って行った。

### HPO 溶液の塗布

試験溶液には 30%HPO を生理食塩液 (PS) で希釈して作製した 20%溶液および PS を用いた。HPO 溶液および PS の暴露前日に、ラット背部皮膚の被毛を電気カミソリで剃毛した。

背部皮膚への局所暴露は、溶液を滲み込ませたパッチを貼付する方法で実施した。すなわち、20%HPO 溶液および PS をそれぞれ 40  $\mu$ L ずつ、ヒト皮膚アレルギー試験用メッシュパッチ (直径 9mm) (パッチテスター「トリイ」、鳥居薬品株式会社、東京) に別々に滲み込ませ、ラット背部皮膚の脊柱を挟んで対称の位置 (左側: HPO、右側: PS) に貼付し、その上を粘着性伸縮包帯 (シルキーテックス、アルケア株式会

社、東京）で被覆した。貼付 1 日後にパッチを取り除き、貼付 1, 3, 5, 7, 10 および 14 日後にそれぞれ各系統 5 匹のラットをエーテル麻酔下で殺処分し、HPO 溶液および PS を暴露した背部皮膚を各個体から採取した。

### 組織学的検査

採取した皮膚は 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定し、体軸に平行な 4  $\mu\text{m}$  のパラフィン切片を作製して HE 染色を施し、組織学的検査に供した。

### 形態計測

HE 染色標本を用いて、HPO および PS 暴露部位の表皮の厚さを、第 1 章と同じ方法で計測し、個体毎の平均値を算出した。次いで、皮膚全体（表皮、真皮および皮下の脂肪組織。ただし、痂皮／壊死層は除く）および痂皮／壊死層の厚さを同様な方法で計測した。各測定時点・各系統毎に平均値±標準偏差を算出して第 1 章と同じ方法で有意差の検定を行い、 $P<0.05$  を以て有意差があると判定した。

## 結果

HPO 適用 1 日後には、両系統の背部皮膚に炎症性細胞浸潤を伴う壊死が認められた (Fig. 2-1)。3 日後までには両系統で壊死した表皮を覆う痂皮の形成が始まった。痂皮は徐々に皮膚から剥離し (Figs. 2-1 and 2-2)、WR では 7 日後までに皮膚から完全に脱落したが、MR ではそれより遅れ、14 日後においても脱落していない個体もみられた (Fig. 2-2)。

壊死した真皮における肉芽組織の形成は、MR では WR と比べて遅れて始まり、また、弱かった (Fig. 2-1)。7 日以降には、MR では皮膚全体の厚さは PS 暴露部位よりも HPO 暴露部位で厚くなったが、WR では両部位間に差は認められなかった (Fig. 2-2)。また、両系統ともに、3 日後までには壊死組織の下に周囲から表皮細胞が増殖・侵入してきて、再表皮化が始まったが (Figs. 2-3a and 2-3b)、再表皮化の完成は MR では遅延した。さらに、再表皮化に続いて 7 日後をピークとする表皮の過形成がみられた。表皮過形成は WR では 10 日後には終息傾向にあり 14 日後にはほぼ終息したが、MR では 14 日後に至っても未だ顕著であった (Figs. 2-3 and 2-4)。

本実験の開始時にはラットは8週齢で、毛周期は telogen 期であったが、HPO 暴露部位の周囲の皮膚では、14 日後には両系統ともに anagen 期に移行した。Fig. 2-1 に示すように、HPO 暴露部位では、WR では3 から5 日後にかけて anagen 期の毛包が出現し、10 日後までにほぼ成熟した成長期毛包となった。一方、MR では、anagen 期の毛包は7 から10 日後にかけて出現し、そのうちの一部は14 日後でも未成熟であった。また、WR においては、PS 暴露部位の毛周期は HPO 暴露部位のそれとほぼ同調していたが、MR では、PS 暴露部の毛周期は HPO 暴露部のそれよりも少し遅れており、成長期毛包の数も少ない傾向がみられた。

## 考察

本章では、HPO の局所的な暴露に対する背部皮膚の反応を、MR と WR で比較した。その結果、WR に比べて、MR では HPO による皮膚病変が高度で、また、回復も遅れた。さらに、WR で見られた HPO による皮膚病変の病理組織学的性状は、WR 由来の貧毛ラットである WBN/Kob-*Ht* rat のそれと本質的に同じであった (Iwamoto *et al.*, 1997)。

GH は皮膚におけるコラーゲンの堆積に重要な役割を果たしていることが知られている (Jorgensen *et al.*, 1989; Granot *et al.*, 1991; Oxlund *et al.*, 1991; Kann *et al.*, 1996)。また、GH および／あるいは IGF-1 は、創傷治癒において直接的および間接的にアナボリック作用を促進し、局所における肉芽組織の形成とコラーゲン堆積を促進することが報告されており (Meyer *et al.*, 1996; Steenfos and Jansson, 1992; Jorgensen *et al.*, 1995)、GH は火傷や潰瘍の治療に使用されている (Herndon *et al.*, 1995; Knox *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 1998; Winawer *et al.*, 1975; Wolf *et al.*, 1996)。これらの知見は、本章の実験で、GH 欠乏 MR では WR と比べて肉芽組織の形成が弱く、また、遅延した結果と良く符合している。

正常な毛包は毛周期として知られている周期的な過程を辿り、正常なげっ歯類では毛周期は高度に同調していると言われている。第1章で述べたように、MR と WR の毛周期は顕著に異なっている。すなわち、両系統ともに出生後最初の8週間は、それ

ぞれ4週間からなる毛周期が2サイクル廻るが、その後、MRの毛包は長期に亘って telogen 期に留まり、一方、WRでは3回目の毛周期が始まる。本章の実験では、HPO 暴露部位ではMRにおいても7から10日後にかけて新たな anagen 期が始まった。このことは、MRにおいて局所的な HPO の暴露が毛周期を telogen 期から anagen 期に移行させる刺激として作用した事を示唆している。傷害を受けた皮膚で毛の成長が刺激されることは一般に知られており、細胞壊死や炎症に伴って放出される様々なサイトカイン類が直接的に anagen 期を誘導すると考えられている (Stenn and Paus, 2001)。さらに、HPO 暴露部位よりも若干遅れかつごく少数ではあるものの、MRのPS暴露部位にも新たな anagen 期毛包が観察された。このことより、HPOの局所暴露によって惹起された炎症性刺激が、HPO 暴露部位から離れた位置にある telogen 期の毛包にも何らかの方法で作用した可能性も考えられる。MRにおいては、HPO 暴露部位の再生皮膚の厚さは、PS 暴露部位のそれよりも若干厚いが、これは上述した毛周期の時間のずれを反映しているのかも知れない。

結論として、本章の実験で得られた結果は、GHの欠乏が急性傷害に対する背部皮膚の反応性に影響を与えることを示している。

## 小括

本章では、GH欠乏が外部刺激による急性皮膚傷害にどのような影響を及ぼすのかを明らかにするため、環境中の酸化ストレス因子の一つである HPO (20%溶液) を、毛周期が telogen 期にある8週齢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反応の経過を両系統間で比較した。その結果、WRに比べてMRではHPOによる皮膚病変が高度であり、また、肉芽組織の形成、再表皮化および毛包の再成長は遅延した。さらに、第1章で述べたように、MRの毛包は8週齢以降長期に亘って telogen 期に留まっているが、本章の実験の結果、HPOの背部皮膚への局所的暴露によって新たな anagen 期が誘導された。これらの所見は、GH欠乏が外部刺激に対する皮膚反応に影響を及ぼすこと、および、telogen 期にあるGH欠乏MRの背部皮膚の毛包が外部刺激によって anagen 期に移行できることを示している。



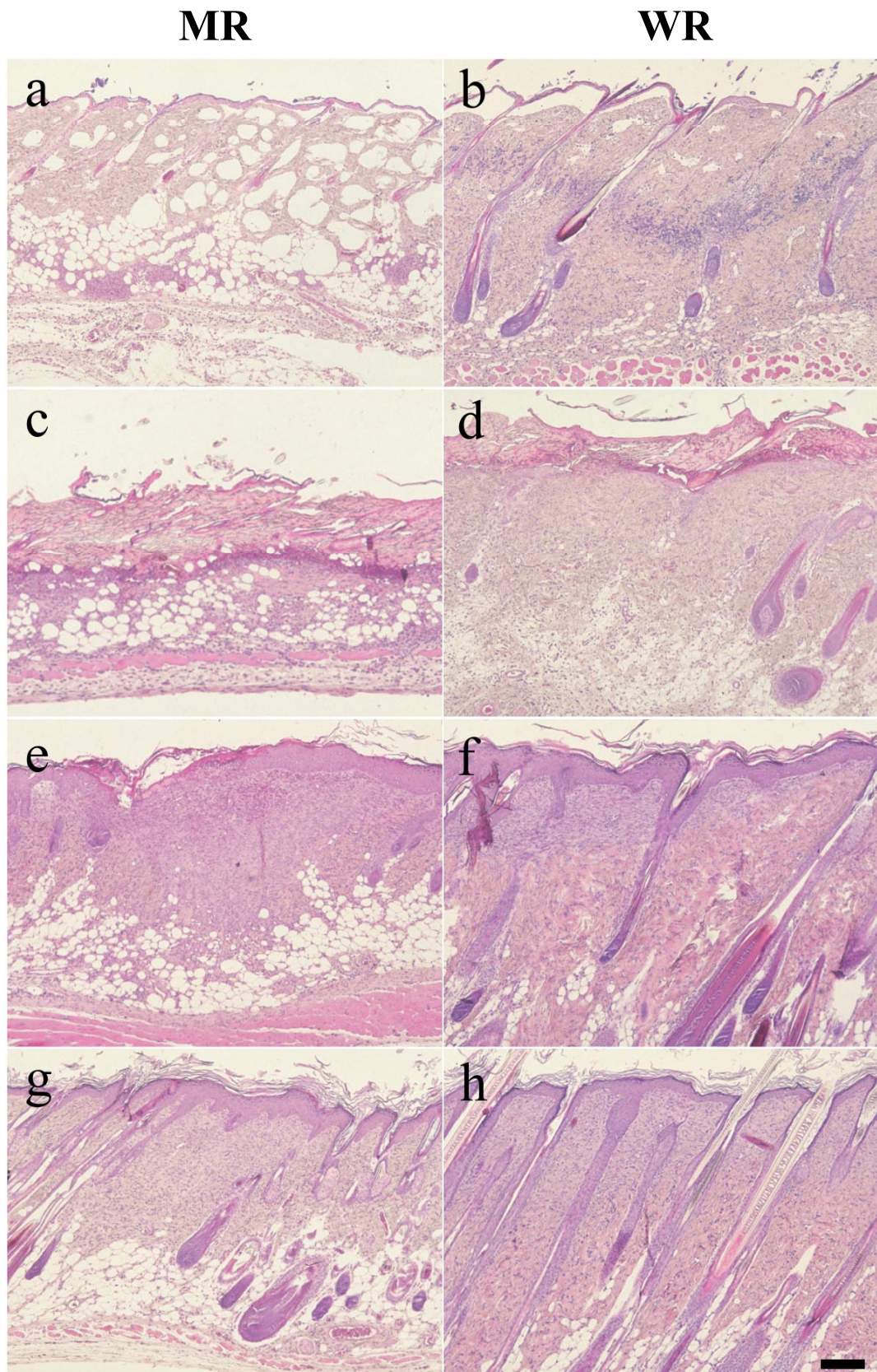


Fig. 2-1. Histology of the dorsal skin at 1 (a,b), 3 (c, d), 7 (e, f) and 14 days after application of HPO (DAA) (g, h). Skin damages are more severe and formation of granulation tissues and regrowth of hair follicles are delayed in MRs (a, c, e and g) than in WRs (b, d, f and h). A new anagen phase also started from 7 to 10 DAA in the HPO- applied area even in MRs. HE stain, bar=200 $\mu$ m.

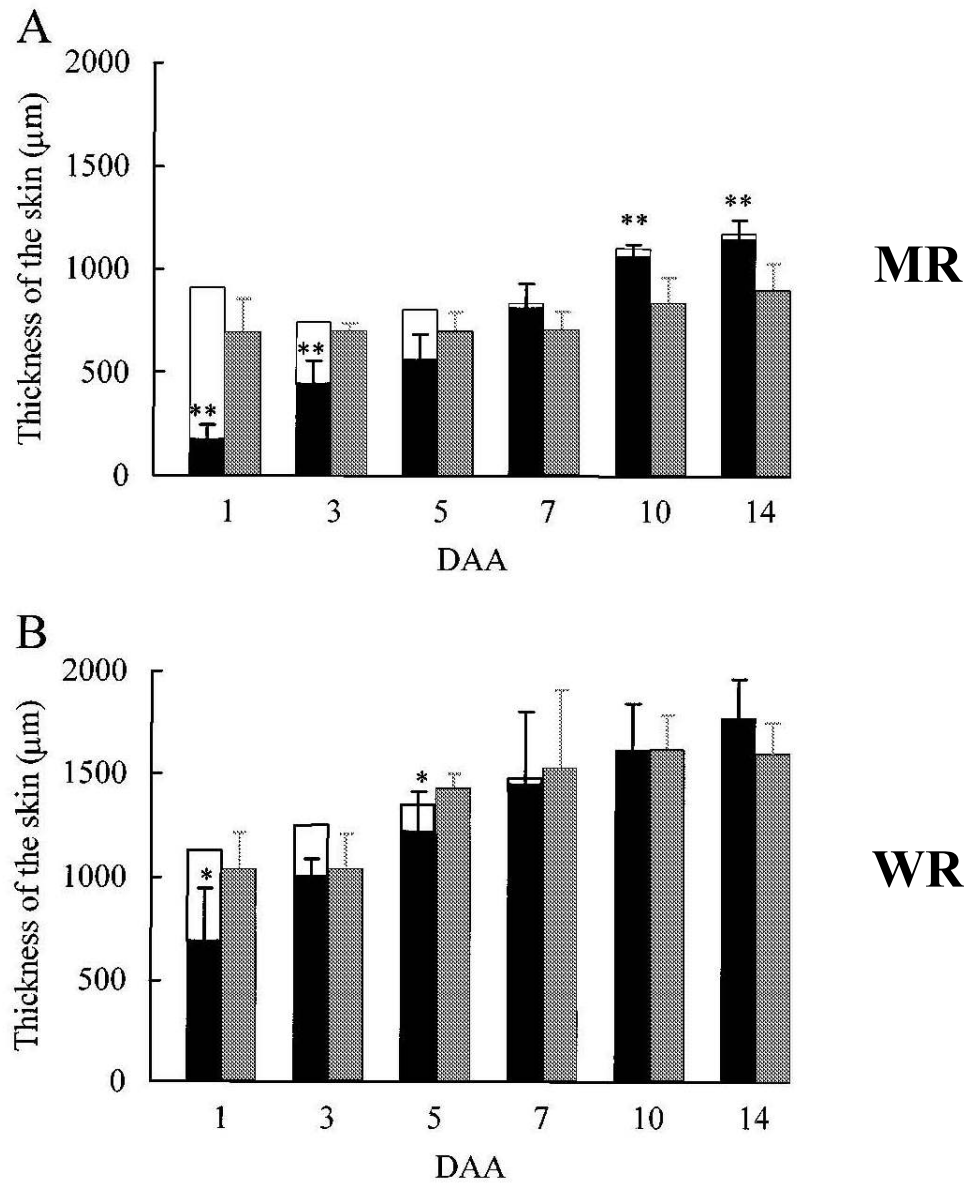


Fig. 2-2. Changes in the thickness of the whole skin at HPO-and PS-applied areas in MRs (A) and WRs (B). ■: whole skin except for necrosis/scab layer; □: necrosis/scab layer in HPO-applied area. ▒: PS-applied area. DAA: days after application. Each value represents mean  $\pm$  S.D. of 5 animals except for necrosis/scab layer. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01: Significantly different from PS-applied areas.



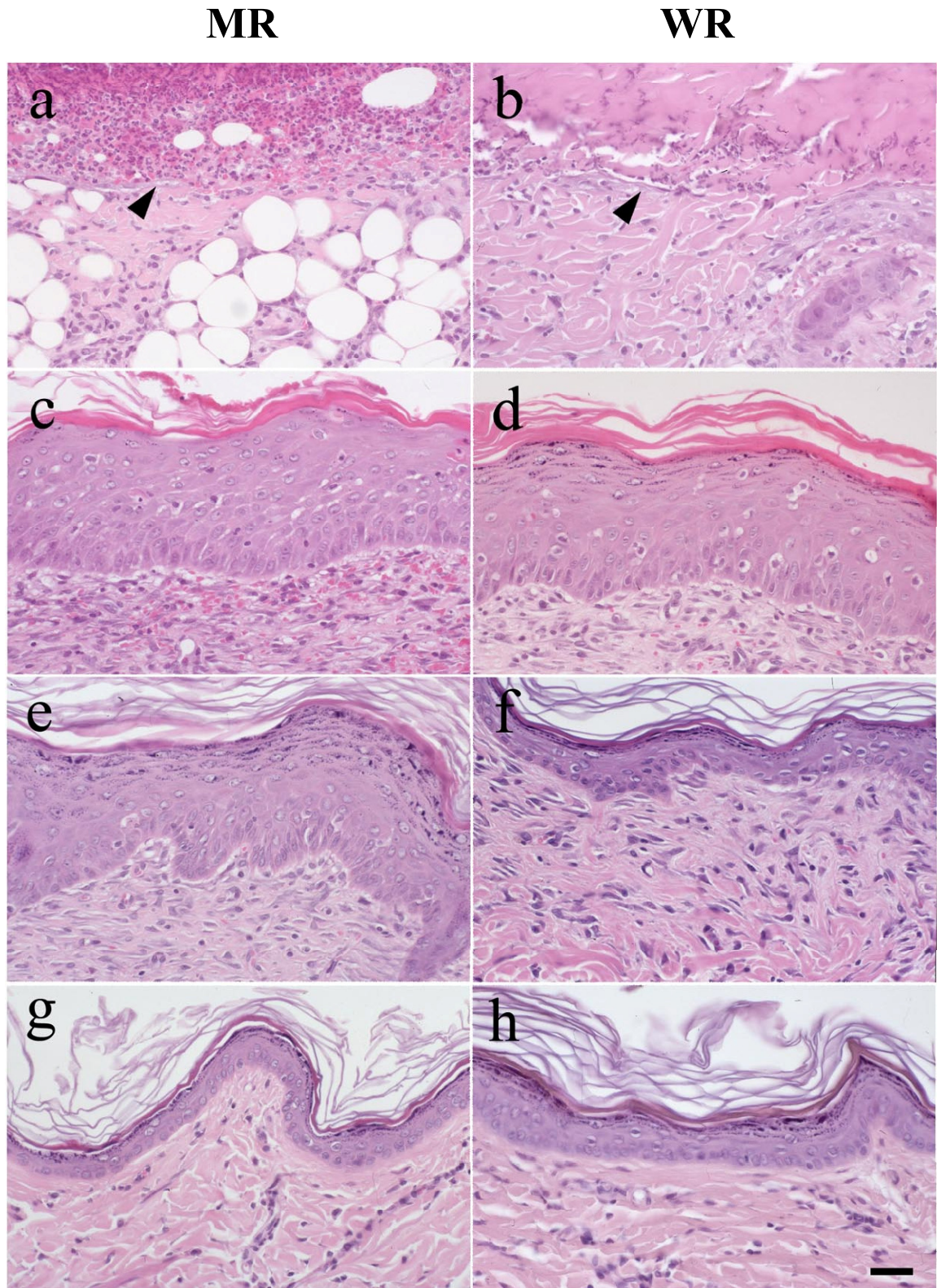


Fig. 2-3. Epidermis at HPO-applied areas (a-f) and PS-applied areas (g, h) at 3 (a, b), 7 (c, d) and 14 DAA (e-h) in MRs (a, c, e and g) and WRs (b, d, f and h). Arrowheads in a and b represent newly formed epidermis under scab. As compared with WRs (f), the epidermis is still hyperplastic even at 14 DAA in MRs (e). HE stain, bar=25 $\mu$ m.



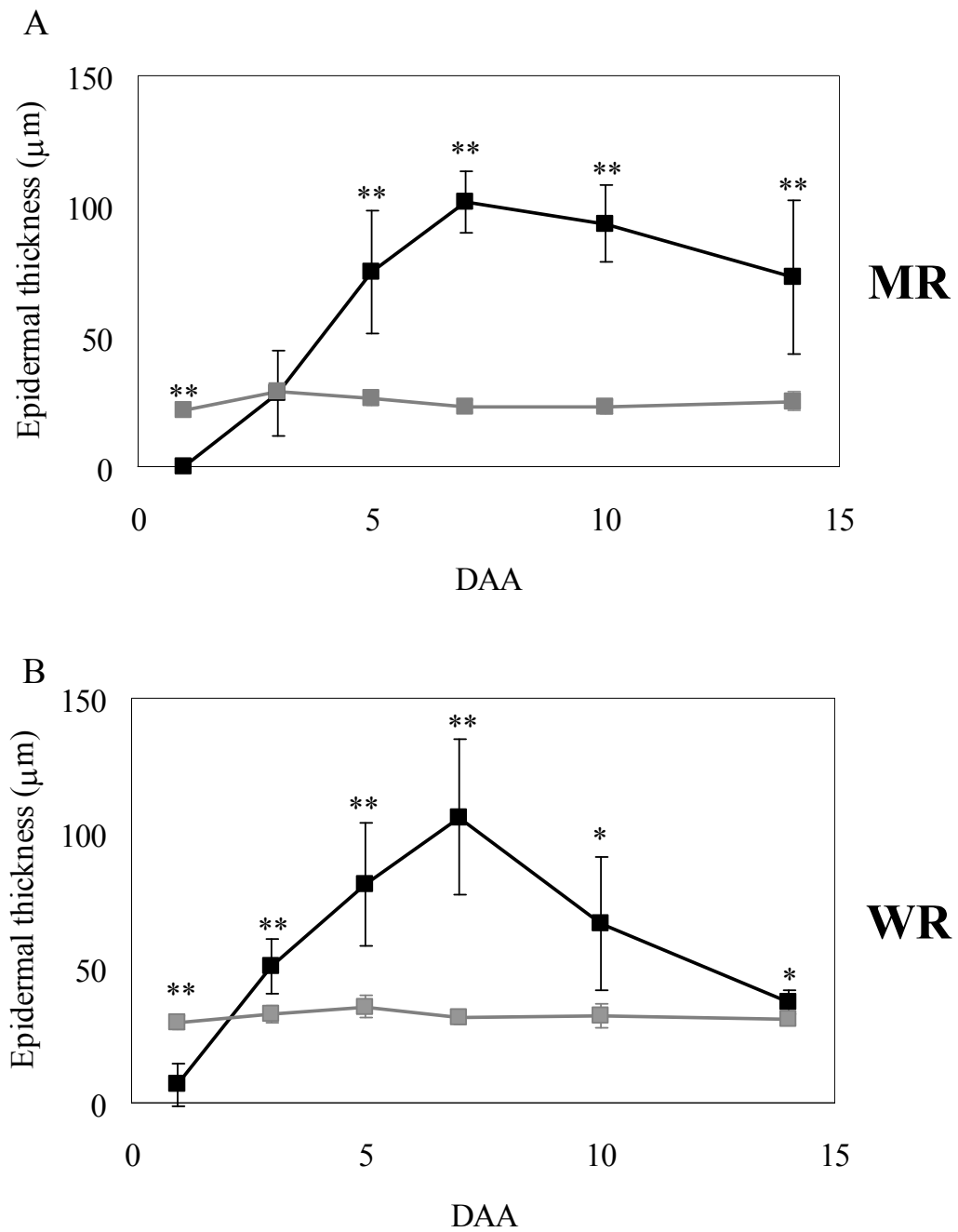


Fig. 2-4. Changes in the epidermal thickness in MRs (A) and WRs (B). ■: HPO-applied area. ■: PS-applied area. DAA: days after application. Each value represents mean  $\pm$  S.D. of 5 animals. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01: Significantly different from PS-applied areas.

## 第 3 章

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

## 小序

第 1 章で、GH 欠乏雄性 MR の皮膚性状の最大の特徴として、8 週齢以降は毛周期が telogen 期で停滞し、新たな anagen 期が見られなくなることを初めて明らかにした。次いで、第 2 章では、外部からの化学的刺激（毛包が telogen 期にある背部皮膚への HPO の局所的暴露）に対する皮膚反応を病理組織学的に検索し、HPO による刺激が新たな anagen 期を誘導することを明らかにした。本章では、毛周期が telogen 期で停滞した MR の背部皮膚を非侵襲的な方法で人為的に脱毛し、新たな毛周期が誘導されるか否かを組織学的に検索した。

## 材料と方法

### 動物

財団法人日本生物科学研究所（東京）から分与された 11 週齢の雄性 MR5 匹を用いた。動物は第 1 章と同じ条件下で飼育し、市販の飼料（MF、オリエンタル酵母工業株式会社、東京）と水道水を自由に摂取させた。

本実験は東京大学 動物実験委員会の承認を得て、同委員会が作成した指針に従って行った。

### 脱毛

第 1 章で述べたように、MR の毛周期は背部皮膚のどの部位でも同調していることを利用し、市販の脱毛シート（3 cm × 9 cm）（アンシェーヌ、レピアス株式会社、大阪）を用いて背部被毛を脱毛し、4、8、12、16、20、24、28、37 および 54 日後にそれぞれ 5 匹のラットの背部皮膚（採材日によって 9 か所のうち異なった 1 部位）から、エーテル麻酔下で直径 6 mm の皮膚生検パンチ（ディスポパンチ、マルホ株式会社、大阪）を用いて皮膚組織を採材した。実験期間中、採材部位および周囲の皮膚の搔爬を防ぐため、ラットの首にエリザベスカラーを装着し、個別ケージに収容して飼育した。

### 肉眼的観察

脱毛 10 および 20 日後に、ラットの背部皮膚の肉眼写真をエーテル麻酔下で撮影した。

### 組織学的検査

採取した皮膚サンプルは 10% 中性緩衝ホルマリンで固定した。体幹に平行な 4  $\mu\text{m}$  のパラフィン切片に HE 染色を施して組織学的検査に供し、第 1 章と同様に、毛包の深さを求め、それぞれの個体について平均値を算出した。毛周期は、第 1 章と同様に、毛包の形態と深さに基づいて判定した。

## 結果

実験開始時には MR の毛包は一様に telogen 期であったが、脱毛後には毛根の伸長を伴う毛包の成長が観察された。すなわち、脱毛 4 日後には早くも early anagen 期が始まり、16 日後には毛包は anagen 期の特徴を示した (Fig. 3-1, A)。次いで、脱毛後 24 から 28 日にかけて catagen 期に移行し、37 日には telogen 期に戻った。その後、全ての個体の全ての毛包は脱毛 54 日後にも telogen 期に留まっており、脱毛によって誘導された毛周期は 1 サイクルのみであった (Fig. 3-1, B)。また、脱毛後の毛包の成長には、肉眼的にも組織学的にも、個体差および部位差は見られなかった (Figs. 3-1 and 2)。なお、脱毛による皮膚の組織傷害は認められなかった。

## 考察

小序で触れたように、第 1 章では、MR の背部皮膚の毛包は、生後最初の 8 週間に毛周期が 2 サイクル回転した後は長期にわたって telogen 期に留まることを示し、第 2 章では、毛包が telogen 期にある MR の背部皮膚に HPO を暴露すると新たな anagen 期が誘導されることを示した。本章では、同じく長期にわたる telogen 期に留まっている MR の背部皮膚を、皮膚への組織傷害性のほとんどない方法、すなわち、人為的に脱毛することにより、新たな毛周期が 1 サイクルだけ誘導されることが明らかになった。このことは、8 週齢以降 MR の背部皮膚の毛包は telogen 期から anagen 期へ

移行するための内的刺激を欠いているが、なんらかの外的刺激があれば新しい毛周期を誘導できることを示している。このように、人為的脱毛を行うことで、組織傷害を伴わずに一過性の毛周期（anagen-catagen-telogen）が誘導され、脱毛は毛周期が一様に telogen 期に停滞した MR において正常な毛周期を誘導するのに有効な手法であることが確認された。

皮膚は毛周期に伴ってその機械的あるいは化学的性状が大きく変化する臓器であるため、一般に皮膚、特に毛包に関する動物実験においては毛周期をコントロールすることが非常に重要である。そこで、均一な毛周期を得るために、wax などを用いて telogen 期の毛包を一定範囲同時に脱毛し、均一な anagen 期を誘導する手法が古くから知られており（Chase, 1954）、特に C57BL/6 系マウスで良く用いられている。これは、C57BL/6 マウスは被毛が黒色であり、毛包が深くなる anagen 期には地肌が灰色に、また、毛包が浅くなる telogen 期にはピンク色に見え、telogen 期を肉眼で同定できることを利用したものである（Muller-Rover, *et al.*, 2001; Stenn and Paus, 2001）。しかし、第 1 章で WR の 3 サイクル目以降（8 週齢以降）の毛周期に個体差が大きかったことから示されるように、一般にラットやマウスでは生後最初の 2 サイクルまでは毛周期は synchronized waves として起こるが、成長につれて hair growth pattern の複雑さが増して unsynchronized waves となり（Muller-Rover *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2004; Plikus and Chuong, 2008）、成熟個体で均一に同調した毛周期を得るのは困難である。従って、これらの実験はもっぱら幼若期に実施されている。

この点、本章で確認された MR の脱毛後の発毛は、脱毛部全体で個体差および部位差（wavy pattern: Priestly, 1966; Plikus and Chuong, 2008）は見られなかった。また、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 期であることから、telogen 期を判別するための特別な配慮は必要なく、また、成熟した個体でも毛周期を評価できるため、幼若個体の皮膚に見られる活発な発育に伴う諸要因を排除できる利点がある。

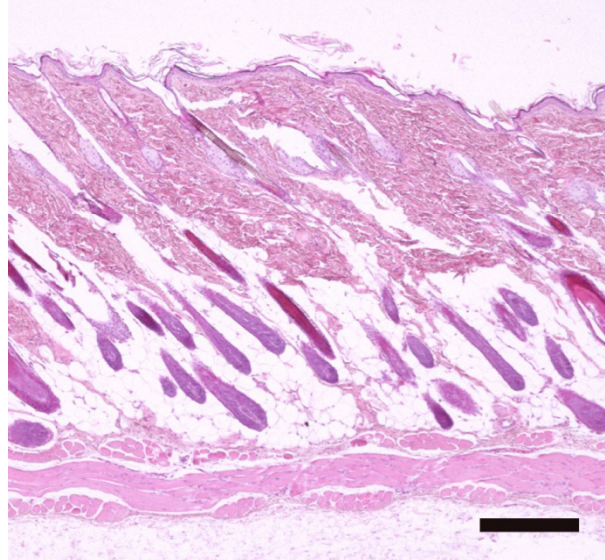
このように、MR は、成熟個体で脱毛により均一な毛周期を誘導する動物モデルとして適していると考えられ、所謂“hair cycle clock”（Paus and Foitzik, 2004）の機構や

分子的な特性の研究、あるいは **anagen** 誘発薬剤の検索・評価における強力な手段を提供する可能性があると考えられる。

## 小括

8 週齢以降の **MR** の背部皮膚の毛包は長期にわたって **telogen** 期に停滞し、**anagen** 期に移行するための内的刺激に欠けているが、人為的脱毛という皮膚への組織傷害を伴わない外的刺激によっても **anagen** 期を誘導できることが示された。また、**MR** の成熟個体では脱毛部位の全域で均一な毛周期を誘導できるため、**MR** は毛包および毛周期に関連する実験を実施する上で非常に有用なモデル動物となりうると考えられる。

(A)



(B)

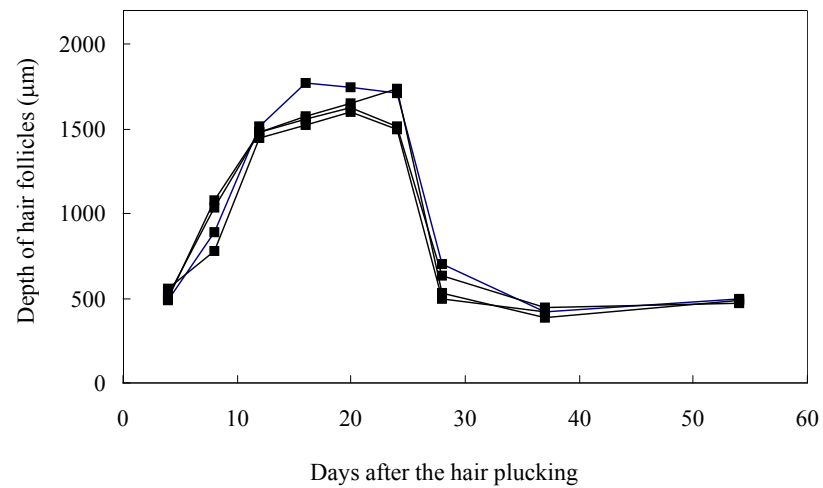
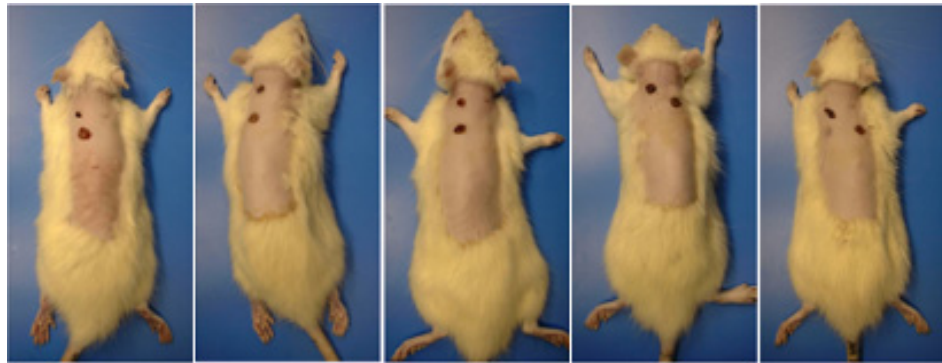


Fig. 3-1. (A) Histology of the dorsal skin of MRs at 16 days after the hair plucking. Anagen follicles were noted. HE stain, bar=250 $\mu\text{m}$ . (B) Changes in the depth of hair follicles after hair plucking at 11 weeks old in MRs.

New hair cycle was induced in MRs under the long-lasting telogen phase, though the new hair cycle was only transient and it returned to quiescence again.

10 days after the hair plucking



20 days after the hair removal

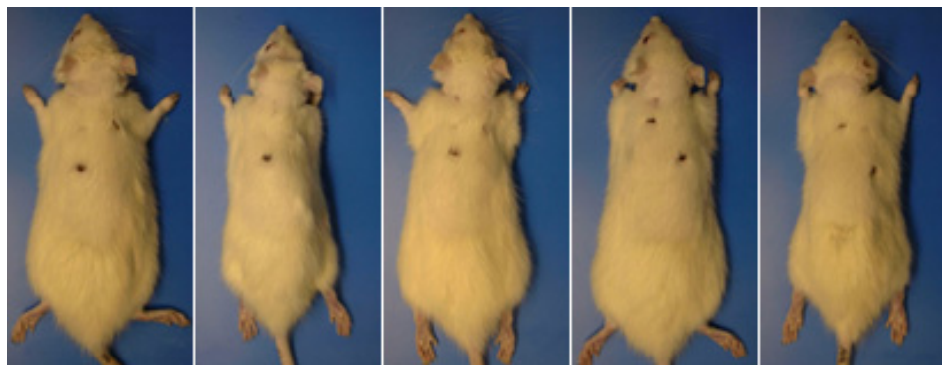


Fig. 3-2. Gross appearance of MRs at 10 and 20 days after the hair plucking. There were no individual nor regional differences in the responses to the hair plucking in MRs.



## 第 4 章

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

## 小序

げっ歯類では、毛包の形態形成は胎生後期に始まり、出生後の毛包は、活発な成長 (anagen)、毛包の退行 (catagen) および休止 (telogen) からなる周期を生涯にわたって繰り返す (Muller-Rover *et al.*, 2001)。第 1 章で示したように、MR の毛周期のパターンは WR のそれとは著しく異なっている。すなわち、出生後の最初の 8 週間は、両系統のラット共に 4 週間からなる周期が 2 回繰り返されるが、その後 WR では第 3 周期が始まるのに対し、MR では長期に亘る telogen 期に入る。ただし、第 2 章および第 3 章で示したように、長期の telogen 期にある MR の背部皮膚の毛包も、HPO の局所暴露や脱毛などの外因性刺激によって一過性の毛周期を誘発することが出来る。このことは、MR では 8 週齢以降、telogen 期から anagen 期への移行に必要な内因性の刺激やシグナルが不足しているが、然るべき外因性の刺激が毛周期を動かす引き金として機能できることを示している。

毛包の成長および毛周期における複雑な分子レベルでの変化を包括的に把握するには、表皮と間葉系構成要素の双方を含む皮膚全体についての経時的なプロファイリングが必要であることが従来から強調されており、そのための有力な手法の一つとして、非常に多くの遺伝子の発現の変化を一括して検出できる DNA マイクロアレイ分析が推奨されている。最近、毛包の成長と毛周期を支配する分子機構を理解する目的で、マウスについてそのようなプロファイリングが実施された (Lin *et al.*, 2004; Schlake *et al.*, 2004; Ishimatsu-Tsuji *et al.*, 2005)。しかし、ラットについては現在迄そのような検索報告は一切無い。

本章では、毛周期が telogen 期で停滞している 10 週齢の雄性 MR の背部皮膚を脱毛し、誘導された毛周期の進展過程に伴う皮膚での遺伝子発現プロファイルを解明する手掛かりを得る目的で、DNA マイクロアレイ法を用いて、脱毛前の対照群と脱毛後群 (5 時点) との遺伝子発現の変化を比較・検討した。

## 材料と方法

### 動物

毛周期が telogen 期にある 10 週齢の雄性 MR を 17 匹使用した。動物はアイソレーターケージ（仁木商事、東京）に収容し、温度  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、12 h/12 h 明暗周期に制御された動物室で飼育した。動物には市販の固形飼料（CRF-1、オリエンタル酵母工業株式会社、東京）および水道水を自由に摂取させた。

本実験は東京大学 動物実験委員会の承認を得て、同委員会が作成した指針に従って行った。

### 脱毛および採材

10 週齢の雄性 MR14 匹の背部皮膚を、エーテル麻酔下で市販の脱毛シート（3cm × 9cm）（アンシェーヌ、レピアス株式会社、大阪）を使って人為的に脱毛した。脱毛後 7、14、21 および 28 日に各 3 匹ならびに 42 日に 2 匹の動物をエーテル麻酔下で放血殺した。また、残りの 3 匹については、10 週齢の時点で脱毛せずにエーテル麻酔下で放血殺し、対照群とした。屠殺後直ちに各個体の背部皮膚を電気シェーバーで除毛して 1cm 角の皮膚を採取した。これを脊柱線に沿って二分し、片方を組織学的検索に、もう片方を DNA Microarray のための total RNA の抽出に用いた。後者については、RNA の変性を防ぐため、RNAlater（Ambion Inc., Austin, TX, USA）に沈めたのち、total RNA を RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit（株式会社キアゲン、東京）を用いて抽出した。

### 組織学的検査

採材した皮膚を体軸に平行に細切し、10%中性緩衝ホルマリンで固定した。パラフィン切片（4  $\mu\text{m}$ ）に HE 染色を施し、組織学的検索を行うとともに、前章までと同様に毛包の深さを計測し、毛包の組織形態と毛包の深さに基づいて毛周期を判断した。

### DNA Microarray 解析

DNA microarray 解析には、31,099 個のプローブを含む GeneChip Rat Genome 230 2.0 Arrays（Affymetrix, Santa Clara, CA, USA）を用い、遺伝子発現プロファイルを検索した。1 匹のラットから得られた total RNA サンプルにそれぞれチップ 1 つを用いた。cDNA 合成および biotin-labeled c RNA の作製には Superscript Choice System（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）および T7-（dT）24-oligonucleotide primer（Affymetrix）を用いた。断片化された cRNA は、 $45^\circ\text{C}$ 、60 rpm の条件下でアレイに 18 時間ハイブリダイズし、

洗浄後、streptavidin-phycoerythrin で染色して GeneArray scanner 3,000 (Affymetrix) でスキャンした。スキャンして得られたデータは Affymetrix Microarray Suite 5.0 (Affymetrix) および NetAffx website (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>) を用いて解析した。すべてのデータは、解析前に、各個体の平均シグナル明度が 100 になるように正規化した。

まず、**detection** がすべての個体で P (present) である群を含むプローブを抽出し、その中で、群の平均明度が中央値 (100) 以上を示す群がひとつもないプローブを除外した。次いで、群の平均明度を算出し、対照群と脱毛群の値に 3 倍以上の開きがあるものを有意な差とした。ただし、対照群および脱毛群の両方で **detection** が P 以外 (M: Marginal あるいは A: Absent) である個体が半分以上であった場合は有意差なしとした。

データの解析結果をわかりやすくするため、対照群と比較した変化の程度を下記の表のように分類した。

level 5	100 倍以上
level 4	30 倍以上
level 3	10 倍以上
level 2	6 倍以上
level 1	3 倍以上
level 0	変化なし
level -1	1/3 倍以下
level -2	1/6 倍以下
level -3	1/10 倍以下
level -4	1/30 倍以下

## 結果

### 毛包の組織学的所見

毛包の組織像および毛包の深さのグラフを Fig.4-1 に示す。毛の発育には、肉眼的にも組織学的にも、個体差および部位差は認められなかった。

前章までの結果と同様、対照群（10 週齢）の毛包はすべて telogen 期であった。脱毛後にはすべての動物で、肉眼的には発毛が、また、組織学的には毛幹の伸長がみられた。脱毛後 7 日には、低密度の結合組織からなる毛乳頭が大きくなり、毛包は対照群よりも深く、毛球および毛乳頭の多くは真皮と皮下織との境界あたりに位置していた。脱毛後 14 日には、7 日よりさらに伸長し、成熟した成長期毛包がみられた。毛乳頭は皮下織底部の筋層に近い位置まで下がり、毛幹および内毛根鞘は皮脂腺附着部付近まで延びた。脱毛後 21 日には、毛包の深さは 14 日より短くなった。毛包は小さくなり、急速に細くなりつつある毛球は皮下織あたりに位置していた。脱毛後 28 日および 42 日には、毛包は脱毛処置前（対照群）とほぼ同じ深さで、真皮の線維芽細胞に囲まれた位置まで戻った。

これらの所見より、毛周期は脱毛前が telogen 期ならびに脱毛後 7 日が early anagen 期、14 日が anagen 期、21 日が catagen 期、および 28 日と 42 日は telogen 期と判断された。

#### Microarray による遺伝子発現プロファイル

DNA microarray を用いて、脱毛処置前群（対照群）（telogen 期）と脱毛後の各群（脱毛後 7 日群：early anagen 期、14 日群：anagen 期、21 日群：catagen 期、28 日群および 42 日群：telogen 期）の遺伝子発現を比較した結果、1215 プローブでいずれかの脱毛後群に 3 倍以上の変化がみられた（Fig.4-2）。そのうち 1171 プローブは毛周期に関連して変化しており、脱毛後 7、14 および 21 日の間に発現が増加（473 プローブ）あるいは減少（698 プローブ）し、その後の telogen 期（28 および 42 日）では脱毛前と同等の値に戻った（Figs.4-2 and 3）。発現が増加した 473 プローブ中 298 および発現が減少した 698 プローブ中 229 プローブについては、2 つ以上の期で変化が観察された。また、発現に変化が見られた遺伝子のなかで、毛周期に関連した遺伝子は発現の変化の程度が比較的大きく、10 倍以上（levels 3 以上あるいは level -3）の変化を示したプローブが 214 認められた。その多くは、anagen 期に脱毛前との差が最大になり（Fig.4-2B）、Car2、Asl、Ass1 など一部の遺伝子では early anagen 期に比べて anagen 期および catagen 期で高度に大きい変化を示した（Fig.4-3）。

Table 4-1 に、発現に変化が見られた遺伝子の一部を機能別に分類して示した。毛周期に関連して、細胞周期および細胞分裂に関する遺伝子群は early anagen 期に発現が顕著に増加した。転写、接着などを制御する遺伝子群は early anagen 期から anagen 期にかけて、また、アミノ酸代謝に関連する遺伝子群や G タンパク質などを含むシグナル伝達関連遺伝子群などは anagen 期に発現の増加のピークが見られ、表皮成長、細胞伝達、タンパク質分解などに関する遺伝子群は anagen 期から catagen 期にかけて発現の増加が見られた。また、Wnt、Lef1、Notch1 とそのリガンドである Jag1、Padi3、Msx2、Ivl、Cux1、Upk1b、Pthlh、forkhead box、Kng1、Sphk1、Vangl2、Kcnel など、毛周期に関連して変化する可能性が報告されている遺伝子群の発現の増加も確認された (Fig.4-3)。脱毛前 (telogen 期) と比較して、early anagen 期、anagen 期および catagen 期のすべてにおいて強い発現の増加 (level 4 以上) がみられたプローブは 56 あり、その中には、ケラチン (Krt31、Krt33a、Krt86、Krt34、Krt25)、Lef1、Padi3、Msx2、Bambi、Tm4sf4、Lrrc15、S100a3、Mt4、Fbp1 などが含まれていた (Fig.4-3)。

成長が活発な、人為的に誘導した毛周期の間は、細胞成長を抑制するような遺伝子の発現は抑制され、また、免疫反応に関連する遺伝子群の発現が脱毛前の telogen 期に比較して抑制されていた (Table 4-1)。一方、IGF-1 およびそのレセプターの遺伝子の発現にはほとんど変化が見られなかったが、その働きを制御する結合蛋白 (Igfbp2、3、5 および 6) 遺伝子の発現については、Igfbp3 が early anagen 期および anagen 期に、また、Igfbp2、Igfbp5、Igfbp6 が anagen 期および catagen 期に、それぞれ減少した (Fig.4-3)。

この他、毛周期に関係なく、加齢に伴って発現が変化した遺伝子として、Atf3、Egr1、Fos、Id4、Jun などの発現が、脱毛後 21、28 および 42 日に軽度増加した (Table 4-1, Fig.4-3)。

## 考察

皮膚は毛周期により組織構造が大きく変化する複雑な組織であり、毛周期に伴って、表皮、真皮、皮膚付属器、皮下組織、血管、毛包などのそれぞれで、様々な生物学的プロセスが独立してあるいは関連しながら同時に起こっていると考えられている。本章

では、毛周期が休止期にある MR の背部皮膚を人為的に脱毛して新たな毛周期を誘発し、毛周期の経過に伴って皮膚で起こる遺伝子発現の変化のアウトラインを捉えることができた。

脱毛後にその発現に変化が見られた遺伝子のほとんどは毛周期に関連して変化しており、early anagen-anagen-catagen 期に変化が見られ、その後の telogen 期に至って変化が消失した。その他、少数ではあるが、毛周期とは関連なく、加齢に伴って発現が変化した遺伝子も認められた。

脱毛により脱毛前の telogen 期から新たに誘発された毛周期に連動して、細胞周期、細胞分裂、転写、接着、細胞伝達、表皮成長などに関わる遺伝子群の発現の増加がみられ、なかでも細胞増殖の制御に関わっている Tm4sf4 (transmembrane 4 superfamily member 4)、細胞間伝達に働く Lrrc15 (leucine rich repeat containing 15)、細胞の金属イオンの恒常性維持に働くと考えられる Mt4 (metallothionein 4)、糖新生に不可欠である Fbp1 (fructose-1,6-bisphosphatase 1) などの遺伝子の発現は、持続して非常に高度の増加を示した。逆に、細胞の成長を抑制するような遺伝子の発現は early anagen-anagen-catagen 期を通じて抑制されており、また、おそらく anagen 期に付随する免疫抑制状態 (Stenn and Paus, 2001) を反映して、免疫反応に関連する遺伝子群の発現も抑制されていた。

early anagen 期にはほとんど変化がなく、anagen 期から catagen 期にかけてその発現が大きく変化する遺伝子は、anagen 後期から catagen 期にかけて重要かつ特異的な出来事である毛包のアポトーシスに関連しているものと推察されたが、このようなパターンで発現が増加する遺伝子には、Car2、Asl、Hsd17b14 などステロイドホルモンの反応性に関連するものが多く含まれ、逆に、発現が減少する遺伝子としては、Soat1 やプロラクチンレセプターなどステロイドの合成あるいは代謝に関連するものが多く含まれていた (NetAffx website)。

これまでに毛周期に関連してその発現が変化することが知られている遺伝子のうちのいくつかについては、本実験でも同様な変化がみられた。例えば、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路は、転写因子 lef1 (lymphoid enhancer binding factor 1) を介して標的遺伝子の転写を活性化して細胞増殖や分化を制御し、皮膚においても毛幹の分化など

に関わり、毛周期を動かす主要経路として最重視されている (Stenn and Paus, 2001; Paus and Foitzik, 2004)。その主役である Lef1 や TGF- $\beta$  シグナル伝達経路に含まれる Bambi (BMP and activin membrane-bound inhibitor) は、脱毛前の telogen 期では発現がほとんど見られなかったが、脱毛により誘導した毛周期中には強い発現がみられた。また、表皮や毛包で毛周期に伴う細胞分化を制御していると言われている Padi3 (peptidyl arginine deiminase, type3)、成長期毛包における anagen 期の維持に貢献している Msx2 (msh homeobox 2)、毛幹の形成に重要な役割を果たす S100a3 (S100 calcium binding protein A3) なども、telogen 期に比較して early anagen-anagen-catagen 期を通じて高度の発現の増加が持続して見られた (Paus and Foitzik, 2004; Kizawa *et al.*, 1998; Nachat *et al.*, 2005)。Notch 経路は毛包の表皮系細胞を制御していると考えられており (Stenn and Paus, 2001)、本実験では Notch1 (Notch gene homolog 1) とそのリガンドである Jag1 (jagged 1) の発現の増加がみられた。その他にも、ケラチン、毛包の分化や形態形成に関連している Iv1 (involucrin)、Cux1 (cut-like homeobox 1)、および forkhead boxes、表皮細胞の成熟に関連している Kcnel (potassium voltage-gated channel, member 1) などの遺伝子の発現も増加した (NetAffx website) (Paus and Foitzik, 2004)。細胞増殖や組織再形成など多面的な役割を有する IGF-1 は、毛包においても細胞分化あるいは毛周期の制御に重要な役割を果たしていると言われているが (Weger and Schlake, 2005; Philpott *et al.*, 1994; Su *et al.*, 1999)、本実験で脱毛により誘導した毛周期においては IGF-1 あるいはそのレセプターの遺伝子の発現はほとんど変化しなかった。しかし、その働きを抑制する結合蛋白 (IGFBP) の遺伝子の発現が減少しており、これが IGF-1 の働きを強めている可能性が示唆された。

小序で触れた、毛周期の経過に伴う分子機構の解析を目的とし、幼若マウスを対象に DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現プロファイリングを行った報告 (Lin *et al.*, 2004; Schlake *et al.*, 2004; Ishimatsu-Tsuji *et al.*, 2005) では、本実験の MR での検索結果と同様、毛包の成長期に、ケラチン関連遺伝子、Fzd1、Lef1 などの Wnt 関連遺伝子、lcell division cycles、translation initiation factors、Msx2、Lef1、Padi3、Notch1、S100a3、Cutl1 (Cux1) などの遺伝子の発現が増加する傾向が示された。また、幼若ラットを



用いた実験でも本実験と同様、IGFBP3 の発現が毛包の退行期に強いと報告されている (Schlake *et al.*, 2004)。

今回の実験では、上記以外にも毛周期に関連してその発現が明瞭に変化する遺伝子が指摘され、その中には、発現の変化が毛周期に密接に関連しているがその作用の詳細が未だ明らかにされていない遺伝子も多数含まれていると考えられる。Ishimatsu-Tsuji *et al.* (2005) は、幼若な C57BL/6 mice の背部を Wax で脱毛して誘導した毛周期に関連して、それまでに報告されていなかった 12 の新しい毛周期関連遺伝子を *in situ* hybridization 法で確認している。そのうちの 5 遺伝子 (Carbonic anhydrase 6、cytidine 5'-triphosphate synthase、cathepsin E、eukaryotic translation initiation factor 5、Riken cDNA 181008K03) については、本実験で脱毛により MR の背部皮膚に誘導した毛周期でも、高度の発現増加が確認された。また、本実験の検索結果のなかには、恐らくこの他にも未知の毛周期関連遺伝子が多数含まれていると予想される。誘導された early anagen-anagen-catagen 期を通して telogen 期の 10 倍以上の発現増加が連続して見られたプローブは 56 検出されたが、その中には前述した Lef1、Padi3、Msx2 など毛周期への関連がよく知られている遺伝子 (Table 4-1) に加えて、Gsg1、Abcg2、Acy3、Cml5、Csdc2、Ctse、Entpd3、Fxyd4、Ggt1、Gnmt、Kng1、Nppb、Tagln3、Padi1、Padi4 などの遺伝子が含まれていた。例えば、2 プローブで同様な変化が確認された遺伝子として Gsg1 (germ cell associated 1) があり、これは皮膚ではこれまでまったく注目されていなかった遺伝子であるが、脱毛前の telogen 期にはほとんど発現しておらず (detection は absent、正規化後の signal は 10 以下)、脱毛により誘導した毛周期中には明瞭に発現しており (detection は present、正規化後 signal は anagen 期に 150 程度)、皮膚において毛周期に関連した働きを有する遺伝子のひとつである可能性が示唆された。

このように、本章の研究結果は、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、毛周期を制御する機序に貢献している候補遺伝子を提示する非常に有用なデータであると考えられる。ラットの毛周期の進展過程に伴う遺伝子発現のプロファイリングについての報告は本研究が初めてであり、MR は毛周期に関

するさらなる分子生物学的探求に貢献しうる非常に有用なモデル動物であることが示された。

## 小括

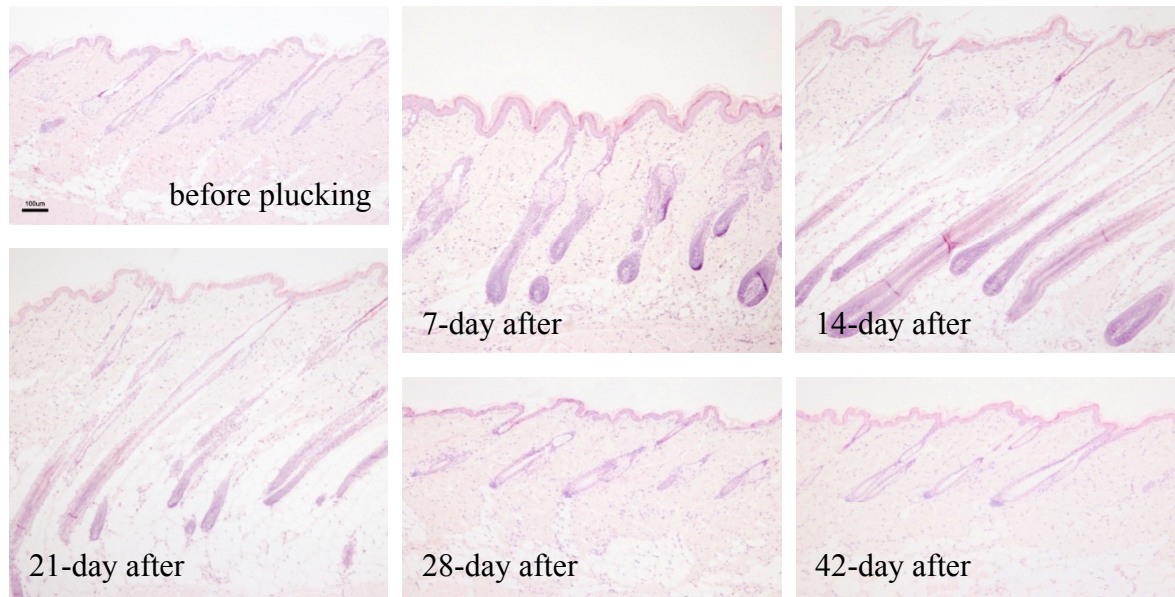
GH 欠乏雄性 MR の背部皮膚の毛包は、8 週齢以降長期に亘って telogen 期に留まるが、人為的脱毛によって一過性に均質な毛周期を誘導することができる。この特徴を利用して、本章では、telogen 期に背部皮膚を脱毛して誘導した毛周期の進展過程に伴う毛周期関連遺伝子の発現プロファイルを、DNA マイクロアレイ法で網羅的に解析した。その結果、脱毛後には、脱毛前 (telogen 期) と比較して、1215 プローブで 3 倍以上の変化がみられ、そのうちの 1171 プローブは毛周期に連動した変化を示した。特に、毛周期進展に伴う毛包の分化・増殖の制御に重要な役割を担っていることが明らかである 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多数認められた。本章の結果は、ラットの毛周期に関連する遺伝子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。

ラットを対象に毛周期の進展過程に伴う遺伝子の発現の変化を網羅的に解析した実験は本研究が初めてで、しかも成熟動物を対象にした検索報告はマウスでも見当たらない。雄性 MR は、毛周期中に皮膚で起こる分子生物学的事象の研究ならびに育毛剤あるいは脱毛剤開発のための新規の分子標的を特定する上で強力な手法を提供するものと期待される。上述の毛包成長に関連した遺伝子の特異的な発現パターンについては、今後より詳細な研究が必要である。

Table 4-1. Selected genes categorized according to their function that showed more than 3-fold changes in dorsal skin of male Mini rats after depilation of telogen-phase hairs at 10 weeks old.

Category	Gene symbol
<b>Genes up-regulated during the induced hair cycle</b>	
cell cycle/ tissue regeneration	3 cyclins, 4 cell division cycles, 3 tubulins, 3 kinesin families, Tpd52l1, Pttg1, Nuf2, Tm4sf4, Tm4sf1
proliferation/differentiation/development	Cml5, Hspa2, Kng1, Sphk1, Mycn, Pthlh, Upk1b, Cux1, Tyrp1, Vangl2, Dlx3, Stmn1, Marcks11, Pdlm7
keratin/ keratinocyte differentiation	6 keratins, Sprr1a1, Ivl, Notch1
translation	5 eukaryotic translation initiation factors, Cars, Yars, Rpl7
regulation of transcription	Foxe1, Foxq1, Foxp1, Sox4, Csd2, Top2a, Myo5a, Mafk, Trps1, Cited4, Dnmt1, E2f5, Fhl2, Hmgb2, Pcgf6
Wnt/TGF $\beta$ signaling pathway	Lef1, Bambi, Msx1, Msx2, Bmp4, Csnk1e, Gpc3, Fzd1, Stra6, Mitf, Smad7, Sostdc1, Wnt4, Tcf7
transport	11 solute carrier families, Abcg2, Fxyd4, Kcne1, Nup210, Selenbp1, Scg5, Ucp2, 2 ATPases, Bspy
signal transduction	Its1n1, Gprc5a, Gpsm2, Ednrb, P2ry5, Ptger4, Gpr56, Nradd, Farp1, Mfhas1
amino acid metabolic process	Ggt1, Acy3, Gnm1, Cbs, Gss, Gcl, Cth, Otub2
carbohydrate metabolic process	Fbp1, 2 protein phosphatases, Hexb
steroid hormone related	Hsd17b14, Tdh, Serpina1, Car2, Ass1, Asl, Arg1, Insig1, Adipor2, Fads3
cell adhesion	3 collagens, Dsc2, Gpnmb, Spon1
proteolysis	3 cathepsins, Cpm, Capn8, Lap3, Pitrm1, Metap2, Prep, St14, Atg4b
cell communication	Lrrc15, Gjb2, Gjb6, Jag1
protein modification process	Padi1, Padi3, Padi4
calcium ion binding	S100a3, S100a7a, Tesc, Tchh, Mt4
<b>Genes down-regulated during the induced hair cycle</b>	
cell cycle arrest	Akl1, Cgref1, Pmp22, Nbl1, Dst
anti-apoptosis/regulation of apoptosis	Eef1a2, Sod2, Cryab, Tsc22d3, Vnn1, Cabcl, Cidea, Nol3, Cck
negative regulation of cell growth	4 insulin-like growth factor binding proteins, Dab2, Gas6
immune response	5 chemokine ligands, 4 CD antigens, 4 Fc receptors, 4 RT1-class II, 7 complements, I11b, Hla-dma
regulation of transcription	Abra, Ldb3, Six1, Satb1, Cebp1, Dbp, Synpo2, Rxrg, Tcea3, Myf6, Tbx15, Lass5, Aebp1, Rora, Lrrfip1, Tnxa
Wnt/TGF $\beta$ signaling pathway	Cav1, Cav2, Cpz, Grem1, Grem2, Sfrp4
transport	4 ATPases, 2 calcium channels, 3 sodium channels, 6 solute carrier families, 4 transmembrane proteins, Mup5, Fxyd1, Cp, Serpinh1, Apl1s2, Rbp7, Clic2
signal transduction	Hspb6, Agtr1a, Mfap4, Lpar1, Rgs10, Cxcr7, Plcb4, Obsc
carbohydrate metabolic process	5 protein phosphatases, 2 pyruvate dehydrogenase kinases, Pgm1, Phka1, Pygm, Gpd1, Gfpt2, Agl
fatty acid biosynthetic/metabolic process	Ankrd23, Cpt1b, Fabp3, Acadm, Crot, Ptgs1, Phyh
steroid biosynthetic/metabolic process	Ebp, Soat1, Hmgcr, Prlr, Prkaa2, Sult1a1, Vldlr
cell adhesion	6 collagens, Lox, Emb, Ddr2, Itgb11, Epr1, Hrc
proteolysis	Mmp2, Ctsk, Cpa3, Mcpt1, Pcolce, Ctss, Dpp7, Pgcp
muscle contraction	9 myosin polypeptides, 6 troponins, Mybpc2, Mylk2, Myom1, Tmod1, Tpm1
<b>Genes up-regulated with aging</b>	
regulation of transcription	Jun, Fos, Atf3, Id4, Egr1

(A)



(B)

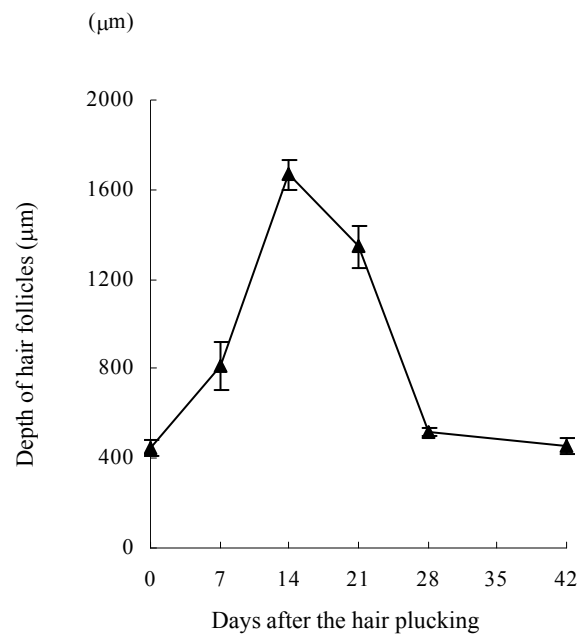


Fig. 4-1. (A) Changes in histology of dorsal skin of male Mini rats after depilation of telogen-phase hairs at 10 weeks old. HE stain, Bar=100μm. (B) Changes in depth of hair follicles in dorsal skin of male Mini rats after depilation of telogen-phase hairs at 10 weeks old. The data represents mean  $\pm$  S.D. of 3 animals except for the group at 42 days after depilation (2 animals).

The hair cycle was decided to be early anagen, anagen, catagen, telogen and telogen at 7, 14, 21, 28 and 42 days after the hair plucking, respectively.

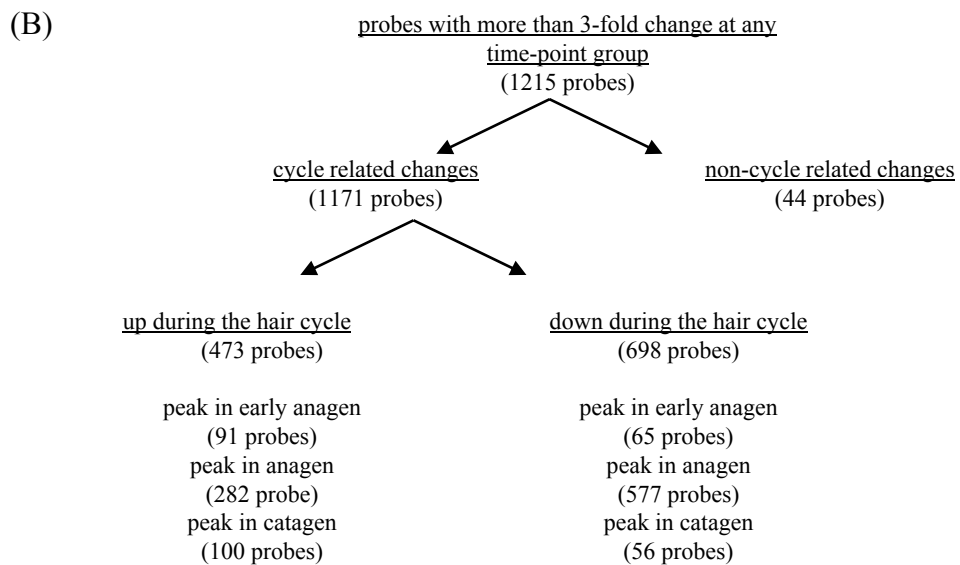
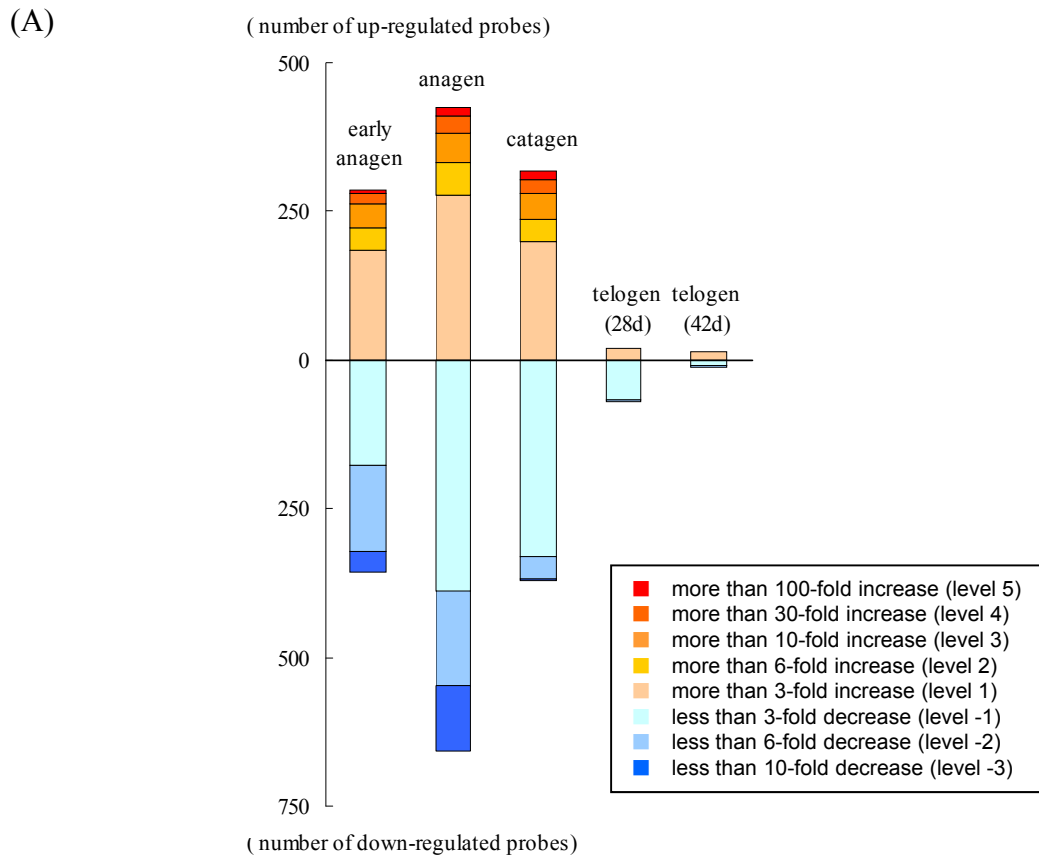


Fig. 4-2. (A) Expression pattern of probes according to their fold-change levels at each phase of hair cycle in dorsal skin of male Mini rats after depilation of telogen-phase hairs at 10 weeks old. (B) The number of probes showing the highest or lowest expression at each phase of hair cycle in dorsal skin of male Mini rats after depilation of telogen-phase hairs at 10 weeks old.

Days after the plucking				7	14	21	28	42
Hair cycle				early anagen	anagen	catagen	telogen	telogen
Gene expression	Gene Symbol	Probe Set ID	Gene Title					
Up	Car2	1367733_at	carbonic anhydrase II	-	40	39	-	-
		1386922_at	carbonic anhydrase II	-	30	26	-	-
	Asl	1368916_at	argininosuccinate lyase	-	6	5	-	-
		1367754_s_at	argininosuccinate lyase	3	6	5	-	-
	Ass1	1370964_at	argininosuccinate synthetase 1	6	26	18	-	-
	Serpina1	1367647_at	serine proteinase inhibitor, clade A, member 1	4	13	15	-	-
	Hsd17b14	1391800_at	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 14	8	26	10	-	-
	Tdh	1371303_at	L-threonine dehydrogenase	14	53	29	-	-
	Insig1	1367894_at	insulin induced gene 1	-	6	6	-	-
	Notch1	1390426_at	Notch gene homolog 1	4	4	3	-	-
		1371491_at	Notch gene homolog 1	4	3	-	-	-
	Jag1	1368725_at	jagged 1	3	4	4	-	-
	Ivl	1369846_at	involucrin	-	3	-	-	-
	Cux1	1371024_at	cut-like homeobox 1	6	6	5	-	-
	Upk1b	1383875_at	uroplakin 1B	-	4	3	-	-
	Pthlh	1368681_at	parathyroid hormone-like peptide	-	5	3	-	-
	Foxe1	1371048_at	forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2)	18	16	9	-	-
	Foxq1	1385464_at	forkhead box Q1	-	4	-	-	-
		1368550_at	forkhead box Q2	-	4	-	-	-
	Foxp1	1379651_at	forkhead box P1	3	6	3	-	-
	Kng1/ Kng2	1387050_s_at	kininogen 1 / kininogen 2	13	18	17	-	-
	Sphk1	1368254_a_at	sphingosine kinase 1	3	8	8	-	-
	Vangl2	1392667_at	vang-like 2	4	4	-	-	-
		1375493_at	vang-like 2	5	5	3	-	-
	Kcne1	1369769_at	potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, member 1	23	78	55	-	-3
	Krt31	1394140_at	keratin 31	47	79	74	-	-
	Krt33a/ Krt33b	1385010_at	keratin 33A / keratin 33B	82	138	138	-	-
		1380524_at	keratin 86	98	147	148	-	-
	Krt34	1380628_at	keratin 34	154	289	292	-	-
	Krt25	1393773_at	keratin 25	88	105	113	-	-7
	Lef1	1370138_at	lymphoid enhancer binding factor 1	53	69	41	-	3
	Padi3	1383785_at	lymphoid enhancer binding factor 2	17	24	14	-	-
		1387562_at	peptidyl arginine deiminase, type III	94	131	103	-	-
	Msx2	1391953_at	msh homeobox 2	40	50	48	-	-
	Bambi	1370823_at	BMP and activin membrane-bound inhibitor	31	58	48	-	-
	Tm4sf4	1368706_at	transmembrane 4 superfamily member 4	34	241	120	-	-
	Lrrc15	1370709_at	leucine rich repeat containing 15	38	86	60	-	-
	S100a3	1368382_at	S100 calcium binding protein A3	36	41	42	-3	-4
	Mt4	1393232_at	metallothionein 4	66	83	76	-6	-8
	Fbp1	1368077_at	fructose-1,6- biphosphatase 1	123	117	126	3	-
	Atf3	1369268_at	activating transcription factor 3	-	-	3	6	6
	Egr1	1368321_at	early growth response 1	-	-	-	4	4
	Fos	1375043_at	FBJ osteosarcoma oncogene	-	-	-	-	5
	Id4	1385923_at	inhibitor of DNA binding 4	-	-	4	3	-
		1375183_at	inhibitor of DNA binding 4	-	-	4	3	3
	Jun	1369788_s_at	Jun oncogene	-	-	-	-	4
		1374404_at	Jun oncogene	-	-	-	-	4
		1389528_s_at	Jun oncogene	-	-	-	-	3
Down	Prlr	1370384_a_at	prolactin receptor	-	-4	-	-	-
	Igfbp3	1386881_at	insulin-like growth factor binding protein 3	-4	-4	-	-	-
		1367652_at	insulin-like growth factor binding protein 3	-4	-3	-	-	-
	Igfbp5	1370960_at	insulin-like growth factor binding protein 5	-	-4	-4	-	-
		1387348_at	insulin-like growth factor binding protein 5	-	-4	-3	-	-

Fig. 4-3. Expression pattern (fold change) of main genes in dorsal skin of male Mini rats after depilation of telogen-phase hairs at 10 weeks old.

■ level 5 ■ level 4 ■ level 3 ■ level 2 ■ level 1 ■ level -1 ■ level -2 ■ level -3

## 結 論

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。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あり、その作用の多くを仲介するインスリン様成長因子-1 (IGF-1) とともに、皮膚の組織構造や成長にも重要な影響を及ぼす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 分泌不全症病態モデル動物においても、それらの皮膚性状について検索した報告は見当たらない。そこで、本研究では、WR を対照に、GH 欠乏 MR の皮膚の加齢に伴う組織学的性状の推移と毛周期の特徴を明らかにした。

無処置の雄性 MR の皮膚の組織構造に関しては、由来系統である WR のそれとの間に基本的な違いは認められなかったが、MR では真皮膠原線維層が薄く、皮下組織の脂肪層が厚く、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。また、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) の局所暴露による急性皮膚傷害後の皮膚反応を組織学的に検索したところ、MR では WR に比較して、肉芽組織の形成、表皮の再生および毛包の成長の遅延が顕著であり、GH 欠乏は皮膚の創傷治癒を遅らせることが示された。このように、MR は GH 欠乏患者に認められる皮膚性状を備えており、GH 欠乏患者の dermatopathy を反映する動物モデルとして有用であると考えられた。なお、GH の主要な標的臓器である肝臓では、IGF-1mRNA の発現量および血中 IGF-1 の濃度は 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。こうしたことから、MR では、GH 欠乏に加え、肝臓由来の血中 IGF-1 の減少が皮膚の性状に影響を与えている可能性が考えられた。

さらに、雄性 MR の皮膚の加齢に伴う組織学的性状の推移を検索した結果、成熟 MR の皮膚では毛周期が telogen 期 (休止期) で停滞することが明らかになった。すなわち、WR では 4 週間を 1 サイクルとする毛周期 (anagen-catagen-telogen) が生涯に亘って継続して観察されるのに対し、MR の毛周期は生後 2 サイクルを終えた 8 週齢以降は長期に亘って telogen 期で停滞した。このように telogen 期で停滞している MR



の背部皮膚に HPO を局所暴露すると、急性傷害への組織反応に伴い、新たな anagen 期が誘導されることが確認された。さらに、皮膚傷害を伴わない人為的脱毛によっても、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。このように、8 週齢以降の MR の背部皮膚の毛包は一様に telogen 期に停滞し、anagen 期に移行するための内的刺激に欠けているが、外的刺激によって新たに anagen 期に移行できることが明らかになった。

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ため、皮膚、特に毛包に関する動物実験では、毛周期を均質にコントロールすることが非常に重要である。しかし、マウスやラットの毛周期は生後の 2 サイクルは *synchronized waves* として起こるものの、それ以降は *hair growth pattern* の複雑さが増すため、一般に成熟動物では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である。この点、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 期であり、特別な配慮をせずとも、皮膚傷害性を伴わ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を容易に誘導できる。また、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、成熟動物で同調した毛周期を誘導できる MR は、毛周期に関連する研究を実施する上で非常に有用なモデル動物となるものと考えられた。

本研究ではさらに、上述の MR の毛周期の特徴を利用して、毛周期の進展過程に伴う背部皮膚の遺伝子発現の変化を DNA Microarray 法で網羅的に解析することに、成熟ラットで初めて成功した。得られたデータは、毛周期の進展に関連して明瞭に変化する遺伝子群を高率に含んでおり、ラットの毛周期に関連する既知遺伝子の発現変化の全体像を把握するとともに、毛周期の制御に寄与している新たな候補遺伝子を提示しうるものであり、MR が毛周期に関する研究を展開する上で非常に有用なモデル動物であることが示された。

上述した本研究の検索成績から、MR は GH 欠乏患者の皮膚病態動物モデルとして、GH 欠乏患者の皮膚の病態や治療の研究、あるいは GH と皮膚に関する基礎研究に有用であり、また、その毛周期の特徴により、成熟動物の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としても有用であることが示された。

## 謝 辭

本研究を学位論文として形にすることが出来たのは、ひとえに、長きにわたり忍耐強くご指導・ご鞭撻くださった東京大学名誉教授・土井邦雄博士のおかげです。本当にありがとうございました。

また、本研究を進めるにあたりご助言・ご協力いただいた東京大学獣医病理学教室の中山裕之教授、内田和幸准教授および土居千代氏をはじめとする教室員の皆様、Mini rat の繁殖にご協力いただいた長崎大学大学院医歯薬学総合研究科の下川功教授、動物室を使わせてくださった東京大学実験動物学教室の久和茂准教授および実験動物学教室の皆様、Genechip 解析および病理切片作成を手伝ってくださったアステラス製薬安全性研究所の田村幸太郎氏、木上大輔氏、中野健二氏に、心よりお礼申し上げます。

最後に、色々と我慢させてしまった3人の子供たち、折にふれ叱咤激励し支えてくれた夫、本論文の執筆にあたり遠方から上京して子守を手伝ってくれた母と義妹に感謝の意を表します。

## 引用文献

- Asa S.L., Coschigano K.T., Bellush L., Kopchick J.J. and Ezzat S. (2000). Evidence for growth hormone (GH) autoregulation in pituitary somatotrophs in GH antagonist-transgenic mice and GH receptor deficient mice. *Am. J. Pathol.* 156, 1009-1015.
- Basinger G.T. and Gittes R.F. (1975). Compensatory renal hypertrophy in male dwarf mice. *Invest. Urol.* 13, 165-168.
- Batch J.A., Mercuri F.A. and Werther G.A. (1996). Identification and localization of insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) messenger RNAs in human hair follicle dermal papilla. *J. Invest. Dermatol.* 106, 471-475.
- Bidlingmaier M. and Strasburger C.J. (2010). Growth hormone. *Handb. Exp. Pharmacol.* 195, 187-200.
- Black M.M., Shuster S. and Bottoms E. (1972). Skin collagen and thickness in acromegaly and hypopituitarism. *Clin. Endocrinol.* 1, 259-263.
- Borg K.E., Brown-Borg H.M. and Bartke A. (1995). Assessment of the primary adrenal cortical and pancreatic hormone basal levels in relation to plasma glucose and age in the unstressed Ames dwarf mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 210, 126-133.
- Carter C.S., Ramsey M.M., Ingram R.L., Cashion A.B., Cefalu W.T., Wang Z.Q. and Sonntag W.W. (2002). Models of growth hormone and IGF-1 deficiency: applications to studies of aging processes and life-span determination. *J. Gerontol.:Biological Sci.* 57A, B117-B188.
- Chase H.B. (1954). Growth of hair. *Physiol. Rev.* 34, 113-126.
- Csiszar A., Labinskyy N., Perez V., Recchia F.A., Podlutzky A., Mukhopadhyay P., Losonczy G., Pacher P., Austad S.N., Bartke A. and Ungvari Z. (2008). Endothelial function and vascular oxidative stress in long-lived GH/IGF-I-deficient Ames dwarf mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295, H1882-1984.
- Dawber R.P.R., Ebling F.J.G. and Wojnarowska F.T. (1992). Diffuse alopecia of endocrine origin. In: *Textbook of Dermatology*. 5th ed. Champion R. H. , Burton J. L. and Ebling F. J. G.(eds). Blackwell. pp 2582.
- Eicher E.M. and Beamer W.G. (1976). Inherited ateloid dwarfism in mice. Characteristics of the mutation, little, on chromosome 6. *J. Hered.* 67, 87-91.
- Eming S.A., Snow R.G., Yarmush M.L. and Morgan J.R. (1996). Targeted expression of insulin-like growth factor to human keratinocytes: modification of the autocrine control of keratinocyte proliferation. *J. Invest. Dermatol.* 107, 113-120.
- Florini J.R., Ewton D.Z. and Coolican S.A. (1996). Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr. Rev.* 17, 481-517.
- Fujie T., Katoh S., Oura H., Urano Y. and Arase S. (2001). The chemotactic effect of a dermal papilla cell-derived factor on outer root sheath cells. *J. Dermatol. Sci.* 25, 206-212.

- Gilhar A., Ish-Shalom S., Pillar T., Etzioni A. and Silbermann M. (1994). Effect of antiinsulin-like growth factor I on epidermal proliferation of human skin transplanted onto nude mice treated with growth hormone. *Endocrinology* 134, 229-232.
- Granot I., Halevy O., Hurwitz S. and Pines M. (1991). Growth hormone and insulin-like growth factor I regulate collagen gene expression and extracellular collagen in cultures of avian skin fibroblasts. *Mol. Cel. Endocrinol.* 80, 1-9.
- Green H., Morikawa M. and Nixon T. (1985). A dual effector theory of growth-hormone action. *Differentiation* 29, 195-198.
- Gronbaek H., Volmers P., Bjorn S.F., Osterby R., Orskov H. and Flyvbjerg A. (1997). Effect of GH/IGF-I deficiency on long-term renal changes and urinary albumin excreio in diabetic dwarf rats. *Am. J. Physiol.* 272, E918-924.
- Herndon D.N., Hawkins H.K., Nguyen T.T., Pierre E., Cox R. and Barrow R.E. (1995). Characterization of growth hormone enhanced donor site healing in patients with large cutaneous burns. *Ann. Surg.* 221, 649-659.
- Hull K.L. and Harvey S. (1999). Growth hormone resistance: clinical state and animal models. *J. Endocrinol.* 163, 165-172.
- Ishimatsu-Tsuji Y., Moro O. and Kishimoto J. (2005). Expression profiling and cellular localization of genes associated with hair cycle induced by wax depilation. *J. Invest. Dermatol.* 125, 410-420.
- Iwamoto S, Nakayama H, Yasoshima A. and Doi K. (1997). Hydrogen peroxide-induced dermatitis in WBN/Kob-Ht rats. *Exp. Anim.* 46, 147-51.
- Jorgensen P.H., Andreassen T.T. and Jorgensen K.D. (1989). Growth hormone influences collagen deposition and mechanical strength of intact rat skin. A dose-response study. *Acta Endocrinol.* 120, 767-772.
- Jorgensen P.H., Bang C., Andreassen T.T., Flyvbjerg A. and Orskov H. (1995). Dose-response study of the effect of growth hormone on mechanical properties of skin graft wounds. *J. Surg. Res.* 58, 295-301.
- Jorgensen P.H. (1997). Growth hormone, skin and wound healing-experimental studies in the rat. *APMIS. Suppl.* 72, 1-54.
- Kann P., Piepkorn B., Schehler B., Lotz J., Prellwitz W. and Beyer J. (1996). Growth hormone substitution in growth hormone-deficient adults: effects on collagen type I synthesis and skin thickness. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 104, 327-333.
- Kizawa K., Tsuchimoto S., Hashimoto K. and Uchiwa H. (1998). Gene expression of mouse S100A3, a cysteine-rich calcium-binding protein, in developing hair follicle. *J. Invest. Dermatol.* 111, 879-886.

- Knox J., Demling R., Wilmore D., Sarraf P. and Santos A. (1995). Increased survival after major thermal injury: the effect of growth hormone therapy in adults. *J. Trauma*. 39, 526-532.
- Kristensen K., Pedersen S.B., Fisker S., Norrelund H., Rosenfalck A.M., Jorgensen J.O. and Richelsen B. (1998). Serum leptin levels and leptin expression in growth hormone (GH)-deficient and healthy adults: influence of GH treatment, gender, and fasting. *Metabolism* 47, 1514-1519.
- Leung K., Johannsson G., Leong G.M. and Ho K.K.Y. (2004). Estrogen regulation of growth hormone action. *Endocr. Rev.* 25, 693-721.
- Lin K.K., Chudova D., Hatfield G.W., Smyth P. and Anderson B. (2004). Identification of hair cycle-associated genes from time-course gene expression profile data by using replicate variance. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 101, 15955-15960.
- Lobie P.E., Breipohl W., Lincoln D.T., Garcia-Aragon J. and Waters M.J. (1990). Localization of the growth hormone receptor/binding protein in skin. *J. Endocrinol.* 126, 467-471.
- Martinelli C.E.Jr., Custódio R.J. and Aguiar-Oliveira M.H. (2008). Physiology of the GH-IGF axis. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 52, 717-725.
- Matsumoto K., Kakidani H., Takahashi A., Nakagata N., Anzai M., Matsuzaki Y., Takahashi Y., Miyata K., Utsumi K. and Iritani A. (1993). Growth retardation in rats whose growth hormone gene expression was suppressed by antisense RNA transgene. *Mol. Reprod. Dev.* 36, 53-58.
- Matsumoto K., Kakidani H., Anzai M., Nakagata N., Takahashi A., Takahashi Y. and Miyata K. (1995). Evaluation of an antisense RNA transgene for inhibiting growth hormone gene expression in transgenic rats. *Dev. Genet.* 16, 273-277.
- Matsumoto Y., Tsukamoto Y., Miki T., Ogawa K., Lee K.Y., Yokoyama T., Satriotomo I., Li H.P., Gu H., Wang Z.Y., Karasawa S., Ueda S., Sasaki F. and Takeuchi Y. (2006). Age-related changes in growth hormone-immunoreactive cells in the anterior pituitary gland of Jcl: Wistar-TgN (ARGHGEN) 1Nts rats (Mini rats). *Congenit. Anom.* 46, 188-193.
- Meyer N.A., Barrow R.E. and Herndon D.N. (1996). Combined insulin-like growth factor-1 and growth hormone improves weight loss and wound healing in burned rats. *J. Trauma* 41, 1008-1012.
- Miquet J.G., Sotelo A.I., Dominici F.P., Bonkowski M.S., Bartke A. and Turyn D. (2005). Increased sensitivity to GH in liver of Ames dwarf (*Prop1<sup>df</sup>/Prop1<sup>df</sup>*) mice related to diminished CIS abundance. *J. Endocrinol.* 187, 387-397.
- Muller-Rover S., Handjiski B., Van Der Veen C., Eichmuller S., Foitzik K., McKay I.A., Stenn K.S. and Paus R. (2001). A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J. Invest. Dermatol.* 117, 3-15
- Nachat R., Mechlin M.C., Charveron M., Serre G., Constans J. and Simon M. (2005).



Peptidylarginine deiminase isoforms are differentially expressed in the anagen hair follicles and other human skin appendages. *J. Invest. Dermatol.* 125, 34-41.

Ohlsson C., Bengtsson B.A., Isaksson O.G., Andreassen T.T. and Słotweg M.C. (1998). Growth hormone and bone. *Endocr. Rev.* 19, 55-79.

Ohnemus U., Uenalan M., Inzunza J., Gustafsson J. and Paus R. (2006). The hair follicle as an estrogen target and source. *Endocr. Rev.* 27, 677-706.

Okada T., Uetsuka K., Yamauchi H., Tani Y., Endo K., Nakayama H. and Doi K. (2003). Effects of exogenous growth hormone (GH)-treatment on Carbon Tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced acute liver injury in GH-deficient Mini rats. *J. Toxicol. Pathol.* 16, 49-57.

Oxlund H., Jorgensen P.H., Ortoft G. and Andreassen T.T. (1991). Alterations in the cross-links of skin collagen of rats treated with biosynthetic growth hormone. *Connect Tissue Res.* 26, 65-75.

Oyamada I., Palka J., Schalk E.M., Takeda K. and Peterkofsky B. (1990). Scorbutic and fasted guinea pig sera contain an insulin-like growth factor I-reversible inhibitor of proteoglycan and collagen synthesis in chick embryo chondrocytes and adult human skin fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 276, 85-93.

Paus R. and Foitzik K. (2004). In search of the "hair cycle clock": a guided tour. *Differentiation* 72, 489-511.

Perrini S., Laviola L., Carreira A., Natalicchio A. and Giorgino F. (2010). The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *J. Endocrinol.* 205, 201-210.

Philpott M.P., Sanders D.A. and Kealey T. (1994). Effects of insulin and insulin-like growth factors on cultured human hair follicles, IGF-I at physiologic concentrations is an important regulator of hair follicle growth in vitro. *J. Invest. Dermatol.* 102, 857-861.

Plikus M.V. and Chuong C.M. (2008). Complex Hair Cycle Domain Patterns and Regenerative Hair Waves in Living Rodents. *J. Invest. Dermatol.* 128, 1071-1080.

Prahalada S., Stabinski L.G., Chen H.Y., Morrissey R.E., De Burlet G., Holder D., Patrick D.H., Peter C.P. and Van Zwieten M.J. (1998). Pharmacological and toxicological effects of chronic porcine growth hormone administration in dogs. *Toxicol. Pathol.* 26, 185-200.

Priestley G.C. (1966). Rates and duration of hair growth in the albino rat. *J. Anat.* 100, 147-157.

Ramsey M.M., Ingram R.L., Cashion A.B., Ng A.H., Cline J.M., Parlow A.F. and Sonntag W.E. (2002). Growth hormone-deficient dwarf animals are resistant to dimethylbenzanthracene (DMBA)-induced mammary carcinogenesis. *Endocrinology* 143, 4139-4142.

Ristow H.J. and Messmer T.O. (1988). Basic fibroblast growth factor and insulin-like growth

- factor I are strong mitogens for cultured mouse keratinocytes. *J. Cell. Physiol.* 137, 277-284.
- Rudman S.M., Philpott M.P., Thomas G.A. and Kealey T. (1997). The role of IGF-I in human skin and its appendages: morphogen as well as mitogen? *J. Invest. Dermatol.* 109, 770-777.
- Schlake T., Beibel M., Weger N. and Boehm T. (2004). Major shift in genomic activity accompany progression through different atages of the hair cycle. *Gene Expr. Patterns* 4, 141-152.
- Schmeitzel L.P. and Lothrop C.D.Jr. (1990). Hormonal abnormalities in Pomeranians with normal coat and in Pomeranians with growth hormone-responsive dermatosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 197, 1333-1341.
- Shimizu H., Uetsuka K., Nakayama H. and Doi K. (2001). Liver responses to repeated doses of carbon tetrachloride in Mini and Wistar rats. *J. Toxicol. Pathol.* 15, 79-83.
- Shimizu H., Uetsuka K., Okada T., Nakayama H. and Doi K. (2002). Carbon tetrachloride-induced acute liver injury in Mini and Wistar rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 53, 11-17.
- Shimokawa I., Higami Y., Utsuyama M., Tuchiya T., Komatsu T., Chiba T. and Yamaza H. (2002). Life span extension by reduction in Growth Hormone-Insulin-like growth factor-1 axis in a transgenic rat model. *Am. J. Pathol.* 160, 2259-2265.
- Shimokawa I., Chiba T., Yamaza H., and Komatsu T. (2008). Longevity genes: insights from calorie restriction and genetic longevity models. *Mol. Cells* 26, 417-435.
- Singh K.P., Prasad R., Chari P.S. and Dash R.J. (1998). Effect of growth hormone therapy in burn patients on conservative treatment. *Burns* 24, 733-738.
- Steenfos H.H. and Jansson J.O. (1992). Growth hormone stimulates granulation tissue formation and insulin-like growth factor-I gene expression in wound chambers in the rat. *J. Endocrinol.* 132, 293-298.
- Stenn K.S. and Paus R. (2001). Controls of hair follicle cycling. *Physiol. Rev.* 81, 449-494.
- Stickland N.C., Crook A.R. and Sutton C.M. (1994). Effects of pituitary dwarfism in the mouse on fast and slow *skeletal* muscles. *Acta Anat.* 151, 245-249.
- Su H.Y., Hickford J.G., Bickerstaffe R. and Palmer B.R. (1999). Insulin-like growth factor 1 and hair growth. *Dermatol. Online J.* 5, 1.
- Swanson S.M. and Unterman T.G. (2002). The growth hormone-deficient spontaneous dwarf rat is resistant to chemically induced mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis* 23, 977-982.
- Symons A.L. and Seymour G.J. (2000). A histological study of the effect of growth hormone on odontogenesis in the Lewis dwarf rat. *Arch. Oral Biol.* 45, 123-131.

Tani Y., Murata S., Kajiwarra S., Mizuno H., Fukushige J., Hosokawa T., Uetsuka K., Nakayama H. and Doi K. (1998). Rapid induction of liver cirrhosis in Mini rats by Thioacetamide. *J. Toxicol. Pathol.* 11, 119-125.

Tani Y., Yamamoto H., Kawaji A., Mizuno H., Fukushige J., Hosokawa T. and Doi K. (1999). Hepatic cytochrome P450 and flavin-containing monooxygenase in male Nts:Mini rat, a transgenic rat carrying antisense RNA transgene for rat growth hormone. *Toxicol. Lett.* 106, 159-169.

Tani Y., Kamai Y., Yamate K., Mizuno H., Yamamoto H., Hosokawa T. and Doi K. (2001a). Restitutive response of Mini rat liver to injury induced by a single oral administration of thioacetamide. *J. Toxicol. Sci.* 26, 25-37.

Tani Y., Yamamoto H., Kamai Y., Maeda N., Hosokawa T. and Doi K. (2001b). Hepatic CYP1A induction in 3-methylcholanthrene-treated transgenic rats with insufficient blood growth hormone. *J. Toxicol. Pathol.* 14, 151-155.

Tavakkol A., Elder J.T., Griffiths C.E., Cooper K.D., Talwar H., Fisher G.J., Keane K.M., Foltin S.K. and Voorhees J.J. (1992). Expression of growth hormone receptor, insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and IGF-1 receptor mRNA and proteins in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 99, 343-349.

Teranishi M., Tani Y., Manabe S. (1998). Comparison of age-related bone changes between Mini rats and Wistar rats. *J. Toxicol. Pathol.* 11, 137- 143.

Teranishi M., Sato S., Tani Y., Yamamoto H., Makino T., Tanaka K., Sehata S., Ogata S., Watanabe M., Igarashi I., Maeda N., Matsumoto E., Yamoto T., Takaoka M., Fukushige J., Endo K., Hosokawa T. and Manabe S. (1999a). Comparison of bone changes between hypophysectomized rats and Mini rats. *J. Toxicol. Pathol.* 12, 131-140.

Teranishi M., Sato S., Tani Y., Yamamoto H., Makino T., Tanaka K., Sehata S., Ogata S., Watanabe M., Maeda N., Matsumoto E., Yamoto T., Takaoka M., Fukushige J., Endo K., Hosokawa T. and Manabe S. (1999b). Comparative bone morphometry between Mini rats and Wistar rats. *J. Toxicol. Pathol.* 12, 119-129.

Teranishi M., Sato S., Tani Y., Yamamoto H., Makino T., Tanaka K., Sehata S., Ogata S., Watanabe M., Maeda N., Matsumoto E., Yamoto T., Takaoka M., Fukushige J., Endo K., Hosokawa T. and Manabe S. (1999c). Effects of Growth Hormone on Bone in Mini Rats. *J. Toxicol. Pathol.* 12, 191-202.

Uetsuka K., Suzuki M., Nakayama H. and Doi K. (1997a). Immunohistochemical study on galactosamine-induced subacute hepatitis in rats of JCL: Wistar-TGN (ARGHGEN) 1 Nts strain (Mini rats). *Exp. Anim.* 46, 203-209.

Uetsuka K., Suzuki M., Nakayama H. and Doi K. (1997b). Prolonged oval cell proliferation with Ito cell activation and extracellular matrix accumulation in galactosamine-induced acute hepatitis in Mini rats. *Histol. Histopathol.* 12, 937-943.

- Velloso C.P. (2008). Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-1. *Br. J. Pharmacol.* 154, 557-568.
- Wanke R., Milz S., Rieger N., Ogiolda L., Renner-Muller I., Brem G., Hermanns W. and Wolf E. (1999). Overgrowth of skin in growth hormone transgenic mice depends on the presence of male gonads. *J. Invest. Dermatol.* 113, 967-971.
- Weger N. and Schlake T. (2005). IGF-1 signaling controls the hair growth cycle and the differentiation of hair shafts. *J. Invest. Dermatol.* 125, 873-882.
- Wehrenberg W.B. and Giustina A. (1992). Basic counterpoint: mechanisms and pathways of gonadal steroid modulation of growth hormone secretion, *Endocr. Rev.* 13, 299–308.
- Wertheimer E., Trebicz M., Eldar T., Gartsbein M., Nofeh-Moses S. and Tennenbaum T. (2000). Differential roles of insulin receptor and insulin-like growth factor-1 receptor in differentiation of murine skin keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 115, 24-29.
- Werther G.A., Haynes K. and Waters M.J. (1993). Growth hormone (GH) receptors are expressed on human *fet al* mesenchymal tissues--identification of messenger ribonucleic acid and GH-binding protein. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76, 1638-1646.
- Winawer S.J., Sherlock P., Sonenberg M. and Vanamee P. (1975). Beneficial effect of human growth hormone on stress ulcers. *Arch. Intern. Med.* 135, 569-572.
- Wolf S.E., Barrow R.E. and Herndon D.N. (1996). Growth hormone and IGF-I therapy in the hypercatabolic patient. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 10, 447-463.
- Yakar S., Sun H., Zhao H., Pennisi P., Toyoshima Y., Setser J., Stannard B., Scavo L. and Leroith D. (2005). Metabolic effects of IGF-1 deficiency: lessons from mouse models. *Pediatr. Endocrinol. Rev.* 3, 11-19.
- Yao W., Bethin K., Yang X., Zhong J. and Lee W.H. (2007). Role of the GH/IGF-1 axis in the growth retardation of weaver mice. *Endocrine* 32, 227-234.
- Zha Y., Taguchi T., Nazneen A., Shimokawa I., Higami Y. and Razzaque M.S. (2008). Genetic Suppression of GH-IGF-1 Activity, Combined with Lifelong Caloric Restriction, Prevents Ag
- Zhou Y., Xu B.C., Maheshwari H.G., He L., Reed M., Lozykowski M., Okada S., Cataldo L., Coschigamo K., Wagner T.E., Baumann G. and Kopchick J.J. (1997). A mammalian model for Larson syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/bndng protein gene (the Larson mouse). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13215-13220.