

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 (課)・論	第 639 号	氏 名	佐川 倫子
審 査 委 員 会 委 員		主査氏名	松 浦 恵 子 
		副査氏名	河 野 憲 司 
		副査氏名	北 谷 五 樹 
<p>論文題目                  Role of increased vascular permeability in CIA: in vivo imaging of the hair follicular microenvironment in mice</p> <p>(抗がん剤脱毛における血管透過性亢進の役割                  -マウスにおける毛包微小環境の <i>in vivo</i> イメージング-)</p> <p>論文掲載雑誌名                  Cancer Science</p> <p>論文要旨</p> <p>【目的】                  抗がん剤による脱毛は、精神的苦痛を伴う有害事象の1つであるが、メカニズムの詳細はいまだ明らかでない。そこで脱毛モデルとして確立されている抗がん剤 cyclophosphamide(CYP)投与マウスを用いて、生体内の微小環境を二光子顕微鏡により <i>in vivo</i> イメージング解析を行い、抗がん剤による脱毛メカニズムを明らかにすることを目的とした。</p> <p>【方法】                  6週ICRマウスの背部の毛を、ワックス抜毛により anagen phase に導入したのち、CYP120 µg/g を腹腔内投与し、24時間後の毛球の形態学的変化、皮下の血管透過性および血管量を二光子顕微鏡で生体下に観察した。また固定後に HE 染色、蛍光免疫染色、Miles アッセイ、TUNEL 染色により、形態学的変化とアポトーシスの有無を検討した。さらに CYP の腹腔内投与後にヒスタミンの皮下投与を行い、血管透過性亢進を惹起して毛球部のアポトーシスの有無を検討した。</p> <p>【結果】                  CYP を投与したマウスでは二光子顕微鏡検査と HE 染色、蛍光免疫染色、Miles アッセイにより、24時間後の背部で毛球が小さくなり、毛包周囲の血管が減少し、血管透過性が亢進していた。また TUNEL 染色で毛包と血管内皮細胞にアポトーシスが起きていたことがわかった。CYP 50µg/g の腹腔内投与とヒスタミンの皮下投与を併用すると中等度の脱毛と毛球部のアポトーシスが起きた。</p> <p>【考察】                  CYP 投与により毛包周囲の血管透過性が亢進し、血管の数の減少がみられた。本研究は抗がん剤による脱毛メカニズムに、血管透過性の変化が重要であることをはじめて明らかにした。さらに、ヒスタミン併用により血管透過性亢進を惹起することにより、少ない量の CYP でも脱毛が生じ、頭皮の炎症性病変の存在が脱毛をさらに起こしやすい状態であることが示唆された。今後、血管透過性を局所的に低下させる薬剤が、抗がん剤脱毛の新規予防薬となりうる可能性がある。</p>			

最終試験  
の結果の要旨  
~~学力の確認~~

審査区分 ①・論	第 639 号	氏 名	佐川 倫子
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	松 浦 克 子	
	副査氏名	河 野 憲 司	
	副査氏名	北 谷 直 樹	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の背景、方法、結果および考察について以下の質問を受けた。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ INTRODUCTION で dysfunction of hair growth が changes in the local microenvironment の原因になると仮説を立てているが、これでよいのか？</li> <li>・ 抗がん剤で脱毛を起こしやすいものとそうでないものがあるのか。</li> <li>・ Materials and Methods で、PBS に溶解した dextran をマウスに投与したと思われるがその記載がない。</li> <li>・ CYP の分子量は？どのメーカーのどの規格品を使用したのか？</li> <li>・ ICR マウスのメスを使用した理由は何か？</li> <li>・ 二光子顕微鏡はどの程度の深度まで観察可能であるのか。通常免疫染色等と比べたメリットは何か。</li> <li>・ マウスに投与した CYP の量は臨床での治療量と比べてどうか？</li> <li>・ Figure S1A,B、Figure S2A、Figure S2B が提出された論文に添付されていない。</li> <li>・ Vascular density は血管腔の面積の割合か？ Figure 5B の単位は何か？面積であれば蛍光染色標本では血管構造を捉えにくく計測は困難と思われる。通常免疫染色 (DAB 発色) で行なった方が正確と思われるが、いかがか？</li> <li>・ CYP 投与により皮下組織が薄くなっているが、血管透過性亢進により浮腫を生じ逆に厚くあるように思われる。皮下組織が薄くなる理由をどのように解釈するか？</li> <li>・ Figure 5C で毛嚢あたりの TUNEL 陽性細胞数を提示しているが、毛嚢の全細胞数に対する TUNEL 陽性細胞の比率で示さなかったのは何故か？</li> <li>・ CYP の一回投与でどの程度脱毛したか。HE 染色では毛包周囲の炎症等の所見はどの程度あったか。</li> <li>・ Figure 2B で CYP 投与マウスの毛包部にみられる small granule は何か？</li> <li>・ Figure 5E で間質にみられる TUNEL 陽性細胞は fibroblast か？</li> <li>・ Histamine 投与により CYP 以外の血漿タンパクも血管外へ漏出するのか？</li> <li>・ Figure 1 は C57BL/6 マウスでうまく撮影できない結果だが、これを Figure 1 にした理由は何か。</li> <li>・ DISCUSSION で、ischemia が脱毛の原因になったと記載しているが、これは CYP の効果を血管透過性亢進が強めたという本論文の結論に合わない。記載が不適切と思われるがいかがか？</li> <li>・ 抗がん剤の幹細胞への効果をどのように考えているか。</li> <li>・ 基礎に血管透過性亢進を起こしやすい患者では脱毛が起こりやすいということであったが、乳癌では 100%脱毛が起きるので基礎的な状態とは関係ないのではないか。</li> </ul> <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

# 学 位 論 文 要 旨

氏名 佐川 倫子

## 論 文 題 目

Role of increased vascular permeability in CIA: *in vivo* imaging of the hair follicular microenvironment in mice

(抗がん剤脱毛における血管透過性亢進の役割

—マウスにおける毛包微小環境の *in vivo* イメージング—)

## 要 旨

【緒言】 抗がん剤による脱毛は、精神的苦痛を伴う有害事象の1つである。しかし、脱毛が生じるメカニズムは詳細にはわかっておらず、脱毛を完全に予防できる手段も現在は存在しない。生体内の反応をリアルタイムに観察できる二光子顕微鏡を用いた *in vivo* イメージング技術を用いて、マウスの抗がん剤による脱毛のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

【研究対象および方法】 6週 ICR マウスの背部の毛を、ワックスを用いて抜毛することで背部の毛を anagen phase に導入したのち、シクロフォスファミド (CYP) 120  $\mu\text{g/g}$  を腹腔内投与した。24時間後の毛球の形態学的変化、皮下の血管透過性および血管量を二光子顕微鏡で生体下に観察、および HE 染色、蛍光免疫染色、Miles アッセイ、TUNEL 染色など従来の検査法を用いて犠死させたマウスより採取した背部組織において評価した。

また、血管透過性亢進が抗がん剤脱毛を誘発するかを調べるために、腹腔内に CYP50 $\mu$ g/g もしくは PBS を投与したのち、背部皮下にヒスタミンもしくは PBS を投与するモデルを作成した。脱毛の差異と TUNEL 染色法を用い、毛球部のアポトーシスの有無を検討した。

【結果】 CYP を注射して 24 時間後のマウスの背部では、毛球が小さくなったこと、毛包周囲の血管が減少したこと、血管透過性が亢進したことが、二光子顕微鏡検査と HE 染色、蛍光免疫染色、Miles アッセイにより確認された。TUNEL 染色との多重染色の結果、血管内皮細胞にアポトーシスが生じていた。

また、CYP50 $\mu$ g/g にヒスタミンの皮下投与を併用すると中等度の脱毛と毛球部のアポトーシスが確認できたが、PBS を皮下投与した群やヒスタミン皮下投与単独群では脱毛は肉眼的にも顕微鏡検査でも確認できず、毛球部のアポトーシスもみられなかった。

【考察】 二光子顕微鏡を用いた生体 *in vivo* イメージングにより CYP120  $\mu$ g/g 投与後の毛包周囲の血管透過性が亢進していたこと、血管が減少していたことが明らかとなった。またそれらは、従来の検査法により確認することができた。抗癌剤脱毛研究において血管に着目している研究は少なく、血管透過性に着目した研究はない。

また、ヒスタミンにより血管透過性亢進状態を惹起させると、脱毛が生じない CYP の投与量 50 $\mu$ g/g でも脱毛が生じたことから、血管透過性亢進は抗癌剤脱毛の一因であると考えられる。これは、脂漏性湿疹などの頭皮の炎症性病変の存在は抗癌剤脱毛が惹起されやすい状態であること、血管透過性を局所的に低下させる薬剤が抗癌剤脱毛の新規予防薬となりうる可能性があること、が考えられる。

【結語】 CYP による脱毛モデルにおいて、二光子顕微鏡を用いた *in vivo* イメージングは毛包周囲の血管量の減少と血管透過性の亢進を明らかにした。血管透過性の増加は、抗癌剤脱毛の原因の 1 つである可能性がある。