

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32610

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15421

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞を用いた脱毛症治療薬の創薬スクリーニング系の確立

研究課題名(英文) Attempt to establish screening system for drug to treat alopecia using human iPS cells

研究代表者

大山 学 (Manabu, Ohyama)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：10255424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、従来必要とされたフィーダー細胞なしの簡便な方法で培養したヒトiPS細胞から、ヒトの毛包の本体を成すケラチノサイトと毛包の再生などを司る毛乳頭細胞の特性を有する2種類の細胞を作成し、それらを共に培養することでヒトの毛髪の成長の要である毛球部の性質を模倣した実験系の作成を試みた。その結果、完全ではないもののヒト毛包で生じる細胞間の相互作用を再現するモデルを確立することができた。これは今後の改良により脱毛症に有効な薬剤のスクリーニングをするための技術的基盤の一つとなる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to establish a co-culture model mimicking hair follicle (HF) using human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) maintained under feeder-free condition. hiPSCs were induced into keratinocytes (KCs) and dermal papilla (DP) substituting cells using retinoic acid and BMP4 or mesenchymal stem cell medium and dermal papilla activation medium respectively. hiPSCs were successfully induced into KC or DP-like cells as confirmed by their morphology and high expression of KC or DP markers. hiPSC-derived KCs co-cultured with hiPSC-derived DP substitute cells expressed HF-related markers including LEF1, MSX2, TRPS1 and KRT17.

These findings suggested that hiPSCs maintained under a feeder-free condition hold promise as an easily accessible and useful cell source for the development of co-culture model reproducing, at least, some aspects of HF epithelial-mesenchymal interactions which may provide valuable tools for discovery of drugs for alopecia treatment.

研究分野：皮膚科学

キーワード：ヒトiPS細胞 毛包 分化誘導 共培養 スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

毛髪の伸長や毛周期における成長期毛と休止期毛の移行などに代表される毛包の恒常性の維持は上皮・間葉系細胞間の相互作用に依存する。なかでも、成長期毛の毛球部では毛乳頭細胞(間葉系)からの各種成長因子やシグナル伝達物質により増殖能に富む特殊なケラチノサイトである毛母細胞(上皮系)が盛んに分裂し毛髪が作られる。

この相互作用を模倣する実験系として毛包より分離・培養したケラチノサイトと毛乳頭細胞が培養液を介して相互作用できるように工夫した共培養系が用いられてきた(Ohyama et al. J Cell Sci 2012)。

しかし、実際に研究に利用可能なヒト毛包の数は限られる。また市販されているヒト毛包由来細胞は少なくとも2-3代の継代操作を経ていたため本来の特性を失っていることが多いという問題がある。

我々はこれまでヒトiPS細胞からケラチノサイトと毛乳頭細胞の特性をもつ細胞を誘導する技術を開発してきた。これらの細胞で毛包由来細胞を用いた共培養系を模倣する培養系を確立することができれば脱毛症の治療薬開発や毛包の特性に関する理解が進むことが期待できる。

しかし、これまで実験に使用してきたヒトiPS細胞はフィーダー細胞を使用して培養していたため維持には相応の労力やコストが必要であった。しかし近年、フィーダーを使用することなくiPS細胞の特性を維持する技術が急速に普及してきていることから、この技術を利用した前述の培養系の確立を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的はフィーダー細胞を用いることなく維持されたヒトiPS細胞を用いてヒト毛包を構成するケラチノサイト(上皮系細胞)と毛乳頭細胞に相当する細胞を誘導し、それらを用いて毛包における上皮-間葉系相互作用を再現する共培養系を確立することである。さらに、それを用いて毛包に作用する薬剤のスクリーニングの可能性を検証することを目指す。

3. 研究の方法

本研究は(1)フィーダーフリーの条件下で培養したヒトiPS細胞からの毛包上皮系・間葉系細胞の誘導(2)ヒトiPS細胞由来毛包細胞を用いた共培養系の確立(3)共培養系を用いた薬剤スクリーニングの試みの段階からなる。

ヒトiPS細胞からの分化誘導に関して、上皮系に関してはレチノイン酸とBMP4を用いて分化誘導を開始し、ケラチノサイト培地とコラーゲンコートした培養皿で継代すること(Veraitch et al. J Invest Dermatol 2013)でケラチノサイトの特性を獲得した細胞の純度をあげる。また、間葉系については、PDGF、TGF

、FGFを含む間葉系幹細胞培地ヒト化細胞外基質を用いて、まず間葉系幹細胞に分化した後、申請者が確立した毛乳頭細胞の特性を付与する培養条件(Ohyama et al. J Cell Sci 2012)で毛乳頭の特性を獲得をはかる。

共培養は上皮系、間葉系の培養に用いられる培地を混合したものをiPS由来の上皮、間葉系細胞が共有できるようにセルインサートを用いて工夫した共培養系を使用し、基本的には共培養開始48時間後にtotal RNAを回収し毛包特異的遺伝子の発現を解析する。

薬剤スクリーニングは、まず毛包に作用する効果が既に確認されているミノキシジルを培養系に添加し毛包関連マーカーの発現の変化を確認する。

4. 研究成果

(1)フィーダーフリーヒトiPS細胞から毛包構成細胞への分化誘導

フィーダーを用いて維持したヒトiPS細胞で確立したレチノイン酸とBMP4を用いてケラチノサイトに分化誘導する手法をフィーダーフリーで維持したヒトiPS細胞にも適用したところフィーダー細胞有で維持した場合と同様の形態変化をみた(図1)。

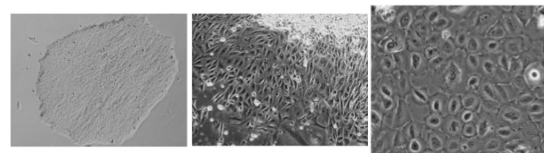


図1. iPS細胞からケラチノサイトへの分化誘導。左よりフィーダーフリーヒトiPS細胞、分化途中、誘導終了後の細胞。次第に細胞が多角形に形態を変えていく様子がわかる。

分化誘導の程度をケラチノサイトマーカーの発現を遺伝子(図2)とタンパクのレベルで確認し良好な分化傾向が維持されておりケラチノサイト相当細胞(iKCSCs)と呼ぶに値する細胞であることを確認した(図2)。

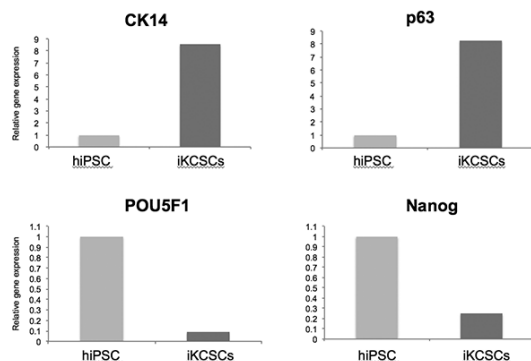


図2. ヒトiPS細胞由来ケラチノサイト相当細胞(iKCSCs)はヒトiPS細胞と比較してケラチノサイトマーカーであるCK14、p63を強く発現する一方、多分化能を反映するPOU5F1やNanogの発現はほとんど見られない(代表的な実験のデータを示す)

また間葉系細胞への分化誘導でも、フィー

フィーダーフリーヒト iPS 細胞はまず間葉系幹細胞への分化誘導の段階でフィーダー有りの条件で維持した場合と同様に紡錘形細胞への形態変化を示した。(図3)

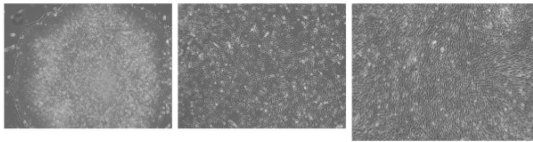


図3 . フィーダーフリーヒト iPS 細胞から間葉系幹細胞への分化 左から細胞が次第に紡錘形の形態に変化していく様子がわかる

また骨・脂肪・軟骨の間葉系3系統への分化能を示すことがわかった(図4)

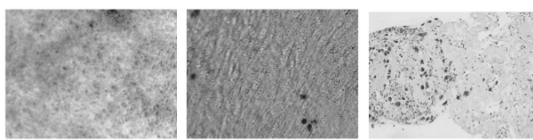


図4 . ヒト iPS 細胞由来間葉系幹細胞から3系統の間葉系系統への分化

さらにこれらの細胞に WNT、BMP、FGF の各々のシグナルの活性化分子を作用させて得られた細胞は毛乳頭細胞のマーカーを正常ヒト毛乳頭細胞と比較して、一定のレベル発現していることがわかり(図5、6)毛乳頭相当細胞(iDPSCs)と呼ぶにふさわしい細胞であることがわかった。

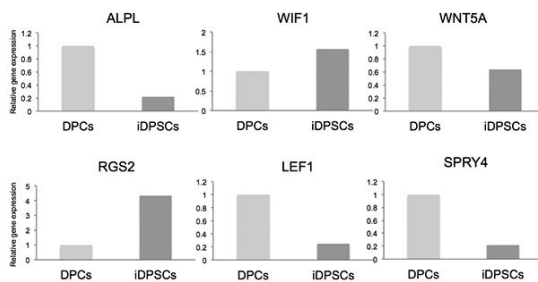


図5 . 正常ヒト毛乳頭細胞と比較した場合のフィーダーフリーヒト iPS 細胞由来毛乳頭相当細胞(iDPSCs)における毛乳頭細胞マーカーの発現 WIF1、RGS2などのマーカーの発現は対照群と比較して良好である(代表的実験結果を示す)

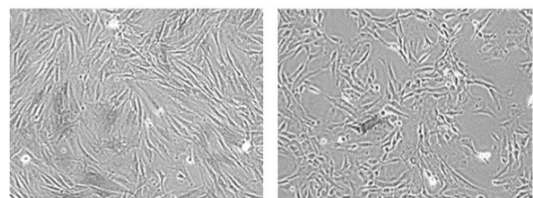


図6 . 正常ヒト毛乳頭細胞と iDPSC の形態とマーカー発現 iDPSC では発現が弱い。

しかし、毛乳頭細胞への分化については同様に誘導されたフィーダーを用いて維持されたヒト iPS 細胞と比較して劣っており、分化誘導プロトコルの更なる改善が必要であることがわかった。

以上の結果から、今後さらなる改良の余地はあるが、フィーダーフリーの条件で維持したヒト iPS 細胞からでも毛包を構成する上皮・間葉系それぞれ二つの系統の細胞を誘導可能であることが示された。

#### (2) ヒト iPS 細胞由来毛包構成系を用いた共培養系の確立

本研究で確立を目指す共培養系ではセルインサートを用いて培養プレートの底面に付着する細胞と別の細胞が培養液を共有する。ここでまず iKCSC、iDPSC のどちらをインサート上で培養するかが問題となる。

条件を検討したところ iKCSC は維持にコラーゲンコーティングした培養面に接着していることが維持に必要であるが、iDPSC はインサート上でも良好に発育することがわかった(図7)

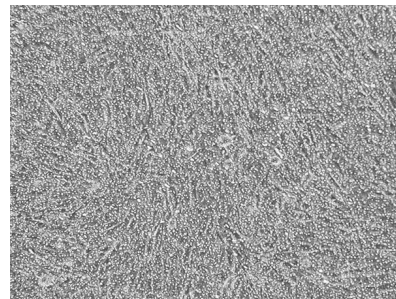


図7 . iDPSC のインサート上での良好な発育の様子 iKCSC はインサート上での発育は不良であった。

以上より iKCSC、iDPSC を共培養する準備が整った。

我々の保持するヒト iPS 細胞ラインのうちフィーダーフリー条件でも上皮・間葉系双方の細胞に分化が良好であった WD39 を用いて共培養の実験を進めることとした。上皮系と間葉系への分化誘導の期間が異なるため問題であった誘導のスケジュールを最適化した後、共培養を試みた(図8)



図8 . 確立した共培養系 インサート上に iDPSC プレート上に iKCSC が維持されている。



### (3) 共培養系を用いた薬剤スクリーニングの試み

本研究で確立された共培養系がヒト毛包における上皮・間葉系相互作用を再現しているか否かを検証するため、培養ヒト正常ケラチノサイトと培養毛乳頭細胞を用いた共培養系をコントロールとしてヒト iPS 細胞由来細胞を用いた共培養系を評価した。リードアウトとして上皮系・間葉系各々の毛包関連遺伝子の発現レベルを用いた (図9、10)。

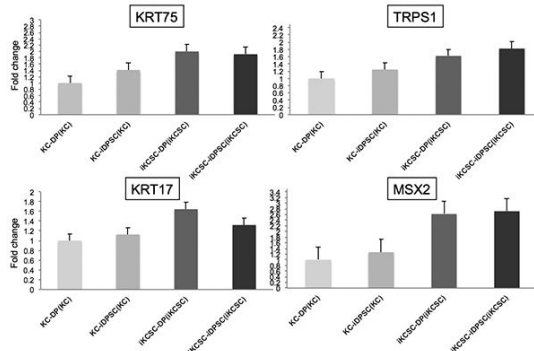


図9 . iPS 細胞由来細胞を用いた共培養系の評価 (上皮系) グラフ左から正常ケラチノサイトと毛乳頭細胞を用いたコントロール、次いでケラチノサイトと iDPSC、iKCSC と毛乳頭細胞、最も右が iKCSC と iDPSC を用いた共培養系における毛包上皮関連遺伝子の発現。コントロールと比較して iKCSC と iDPSC の共培養における毛包関連マーカー遺伝子の発現は良好である (n=3)。

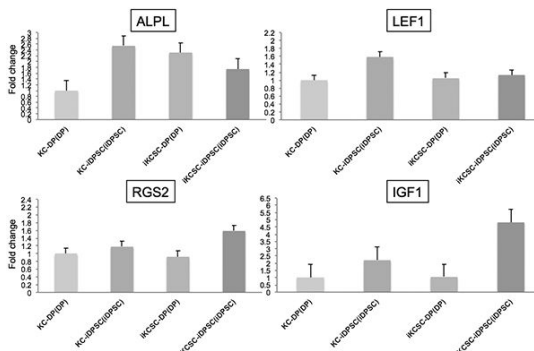


図10 . iPS 細胞由来細胞を用いた共培養系の評価 (間葉系) マーカーにもよるがコントロールと比較して iKCSC と iDPSC からなる共培養系は毛乳頭マーカーの遺伝子を比較的同等なレベルで発現している (グラフの配置は図9に同じ ; n=3)。

正常細胞を用いた共培養系と比較して iKCSC、iDPSC をそれぞれ正常培養ケラチノサイト、培養毛乳頭細胞と共培養した場合に毛包関連ケラチノサイトマーカーの遺伝子発現の上昇をみた (図9)。また興味深いことに iKCSC と iDPSC からなる共培養系でコントロールと比較して毛包上皮関連遺伝子の良好な発現をみた (図9)。上皮系のマーカー発現と比較した場合に程度はやや劣るが毛乳

頭関連マーカー遺伝子の発現も iKCSC、iDPSC の共培養で良好であった (図10)。以上から確立した共培養系は、ヒト毛包における上皮-間葉系相互作用の少なくとも一部を再現していることが明らかとなった。

次いで、確立した共培養系の薬剤スクリーニングにおける有用性を評価するため、毛包に作用し各種マーカーの発現を向上させることが知られる既知の薬剤であるミノキシジルを作用させた。

まずコントロールとして培養正常ヒトケラチノサイトと毛乳頭細胞からなる共培養系にミノキシジルを作用させたところ、ミノキシジル存在下で毛乳頭細胞の活性を示す *ALPL*、*LEF1*、*BMP4*、*IGF1* などのマーカー遺伝子の発現の増強をみたことから正常細胞を使用した場合には共培養系が薬剤スクリーニングに使用可能であることが示された (Veraitch et al. Sci Rep 2017)。フィーダーを用いて作成した iDPSC と正常ヒトケラチノサイトの共培養でも同様の結果を得たことから、本研究で確立した共培養系でも同様の評価を行った。

研究年度内では十分に検討を行うことができなかったが、毛乳頭細胞の活動性を反映するマーカーである *ALPL* などの発現などをみると、正常細胞と異なりミノキシジル添加によりむしろマーカーの発現が低下するものがあつた (図11)。

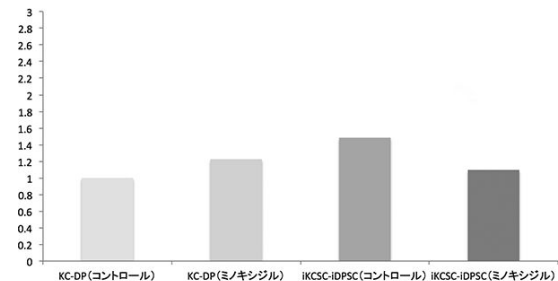


図11 . コントロール細胞 (右2レーン) と iPS 細胞由来細胞 (左2レーン) により構成された共培養系における代表的毛乳頭マーカーで *ALPL* の遺伝子発現 正常細胞ではミノキシジル添加により発現が上昇しているのに対して iPS 細胞由来細胞により構成された系で添加後発現が低下している。

以上の所見から、本研究の遂行により、今後、特に薬剤作用の評価の点で、培養時間の最適化などさらなる技術的改良が必要であり、複数の iPS 細胞ラインを用いての追加検討が必要ではあるものの、フィーダーフリーで維持されたヒト iPS 細胞を用いて毛包の上皮-間葉系相互作用を再現する共培養系の確率が可能であること、また、それを用いて毛包に作用する薬剤のスクリーニングをするための技術的基盤の一部を確立することができた。

<引用文献>

Ohyama M, Kobayashi T, Sasaki T, Shimizu A, Amagai M. Restoration of the intrinsic properties of human dermal papilla in vitro. J Cell Sci 125、2012、4114-25

Veraitch O, Kobayashi T, Imaizumi Y, Akamatsu W, Sasaki T, Yamanaka S, Amagai M, Okano H, Ohyama M. Human induced pluripotent stem cell-derived ectodermal precursor cells contribute to hair follicle morphogenesis in vivo. J Invest Dermatol 133、6、2013、1479-88

Veraitch O, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Sasaki T, Okuno H, Tsukashima A, Amagai M, Okano H, Ohyama M. Induction of hair follicle dermal papilla cell properties in human induced pluripotent stem cell-derived multipotent LNGFR(+)/THY-1(+) mesenchymal cells. Sci Rep 21、2017、42777

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2件)

Veraitch O, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Sasaki T, Okuno H, Tsukashima A, Amagai M, Okano H, Ohyama M. Induction of hair follicle dermal papilla cell properties in human induced pluripotent stem cell-derived multipotent LNGFR(+)/THY-1(+) mesenchymal cells. Sci Rep 査読有; 21、2017、42777 DOI: 10.1038/srep42777

〔学会発表〕(計4件)

Ohyama M, Tsukashima A, Kimishima M, Yamasaki Y, Okano H. Attempt to establish a hair follicle culture model using feeder-free human iPS cells. The 27<sup>th</sup> Annual meeting of the Korean Society for Investigative Dermatology (国際学会) 2017年03月25日 ソウル(大韓民国)  
大山 学 ヒト iPS 細胞を用いた毛包再生の試み 第79会日本皮膚科学会東京・東部支部合同学術大会 (招請講演) 2016年02月20日 東京

Ohyama M. Current strategies for human hair follicle regeneration using stem or progenitor cells. World Congress of Dermatology 2015 (招請講演・国際学会) 2015年06月09日 バンクーバー(カナダ)

〔図書〕(計2件)

大山 学、脱毛症と再生医療、平成28年度日本皮膚科学会研修講習会テキスト

ト、日本皮膚科学会、2017 8

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/graduate/medicine/education/departments/dermatology/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大山 学 (MANABU OHYAMA)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：10255424

(2)研究分担者

天谷雅行 (MASAYUKI AMAGAI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：90212563

久保亮治 (AKIHARU KUBO)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：70335256

(3)連携研究者

岡野栄之 (HIDEYUKI OKANO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：60160694