

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 2 月 20 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07454

研究課題名(和文) 器官誘導能をもつ毛包幹細胞の同定と分子機構の解明

研究課題名(英文) Identification of organ inductive hair follicle stem cells and its regulation mechanism

研究代表者

武尾 真 (Takeo, Makoto)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・研究員

研究者番号：50782116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、成体幹細胞が持つ器官誘導、および未分化能と増殖能を同時に維持するメカニズムの解明と、次世代再生医療の先駆けとして毛包器官再生医療への応用を目的とし、器官誘導能をもつ毛包上皮性幹細胞の存在するバルジ領域の細胞を培養、増幅する技術を確立し、毛包上皮幹細胞候補となる細胞集団を特定するとともに未分化性の維持と増幅には関与すると考えられるシグナル経路を明らかにした。また、培養条件を一部変更することでヒト毛包由来細胞の培養、増殖が可能であることが明らかとなった。本研究により三次元的な器官を誘導する幹細胞の学術的な知見とともに毛包器官再生医療の実現化の可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、周期的な毛包再生能を維持したまま毛包上皮性幹細胞を増幅できる培養方法の開発に成功するとともに、長期間の器官誘導能力の維持にはCD34/Itga6/Itgb5三重陽性細胞が重要であることが明らかとなった。

本成果は、毛包上皮性幹細胞の周期的な毛包再生や分化、運命決定のメカニズムや、上皮性幹細胞間の細胞系譜の理解などの幹細胞生物学研究に大きな貢献するとともに、本研究により確立された培養方法を応用することで、少数の毛包から大量の再生毛包を人為的に製造できることから、世界初の器官再生医療である毛包器官再生医療(毛髪再生)の実現に大きく貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：The aims of this project are to elucidate the mechanism underlying the organ induction ability of hair follicle epithelial stem cells (EpiSCs) and simultaneously maintain undifferentiated status and proliferative capacity and apply to achieve hair follicle regeneration as a milestone of next generation regenerative medicine. We successfully established the culture method of bulge cells, in which EpiSCs harbors, and identified the candidate cell population for organ inductive EpiSCs and the signaling pathways involved in simultaneously maintain undifferentiated status and proliferative capacity of EpiSCs. Moreover, we confirmed that epithelial cells isolated from human scalp hair follicle can be cultured using similar culture condition. This study showed the possibility of realization of follicular organ regenerative medicine along with the academic knowledge of adult tissue stem cells that possess the ability to induce three dimensional organs.

研究分野：幹細胞生物学、再生生物学

キーワード：毛包上皮性幹細胞 毛包 培養 器官再生

1. 研究開始当初の背景

これまで発生過程における幹細胞系譜と、成体組織幹細胞の研究から、多分化能を維持したまま単一の幹細胞を培養・増殖させることが可能であることが示され、再生医療への新たな細胞ソースとして応用研究が進められている。現在、次世代再生医療として、器官再生医療の基盤技術の確立が期待されているが、三次元的な器官を誘導する幹細胞の解析が大きな課題として残されている。その理由として、ほとんど全ての成体の器官は胎児期に発生し、器官誘導能のある幹細胞は胎児期にのみ存在しており、成体での器官形成機構が解析できないことによる。一方、毛包は、哺乳類の成体において再生できる数少ない器官であり、成体内で器官形成能を持つ毛包上皮幹細胞は、培養成体幹細胞を使った器官再生の実現に向けた基盤研究を行う上で非常に適したモデルである。

これまでに私たちは、機能的な歯や毛包、分泌線の生体内再生を可能とした「器官原器法」を発展させ、単一の細胞から毛包を再生させる技術を確認し、毛包上皮幹細胞一つの器官誘導能を解析することを可能にした。この技術を用いることにより、器官誘導能を有する毛包上皮幹細胞を特定し、器官誘導メカニズムを解明することは、幹細胞生物学・再生生物学において新たな研究分野が開拓されるばかりではなく、成体幹細胞を用いた器官再生医療の実現化に向けた重要な基盤技術の確立が期待される。

2. 研究の目的

本研究課題では、生体内で唯一、器官誘導能が示されている毛包上皮幹細胞をモデルに、下記の研究課題を遂行することにより幹細胞が持つ器官誘導、および未分化能と増殖能を同時に維持するメカニズムを明らかにすることにより、学術的な幹細胞生物学に貢献すると共に、次世代再生医療の先駆けとして毛包器官再生医療への応用を目的とする。

1) 器官誘導能をもつ毛包上皮幹細胞の同定と器官誘導の分子機構の解明にむけて、毛包上皮性幹細胞の培養技術を確認し、器官原基法により毛包器官形成能を評価する。また、これらの細胞の性状および毛包形成過程の遺伝子発現を解析する。

2) 毛包上皮幹細胞の未分化性と増殖能を制御する分子機構の解明に向け、バルジ細胞の分化状態を制御する培養条件の確立を行う。さらに、各培養条件での遺伝子発現を比較し、毛包上皮幹細胞の未分化性と増殖を同時に可能にする分子機構を明らかにする。

3) 毛包上皮幹細胞の臨床応用へ向けた技術開発にむけ、上記研究目的1)、2)において明らかになった知見から、ヒト毛包上皮幹細胞について未分化性を維持したまま増幅

できる培養条件を確立する。毛包上皮幹細胞を明らかにする。さらに、培養毛包上皮幹細胞と毛乳頭間葉幹細胞を用いて毛包器官再生技術を確認する。

3. 研究の方法

1) 器官誘導能をもつ毛包上皮幹細胞の同定と器官誘導の分子機構の解明

先行研究により研究により、いくつかの成体幹細胞において、生体内での増殖・維持機構を再現することにより分化能を維持したまま増殖させることが可能となった。そこで、本研究項目では生体内での幹細胞の増殖・維持機構を再現することにより、毛包上皮性幹細胞を含む毛包バルジ領域の細胞を培養、増殖させる技術を確認し、器官原基法による毛包形成能の評価を行った。またFACSにより増幅後の細胞集団のポピュレーション解析を行った。

2) 毛包上皮幹細胞の未分化性と増殖能を制御する分子機構の解明

生体内において毛包上皮性幹細胞の維持、増殖、分化には様々なシグナル経路が関与していることが知られている。そこで、本研究項目では、サイトカインや阻害剤を用いてシグナル経路の活性化状態を制御することにより、毛包バルジ細胞の分化状態を制御する培養方法を確立し、毛包上皮幹細胞の未分化性と増殖を同時に可能にする分子機構の探索を行った。

3) 毛包上皮幹細胞の臨床応用へ向けた技術開発

本研究項目では、上記研究項目1)、2)において明らかになった知見から、ヒト毛包上皮幹細胞について未分化性を維持したまま増幅できる培養条件を確認した。また、培養毛包上皮幹細胞と毛乳頭間葉幹細胞を用いて毛包器官再生技術の確立を行った。

4. 研究成果

1) 器官誘導能をもつ毛包上皮幹細胞の同定と器官誘導の分子機構の解明

周期的な毛包再生に必要な幹細胞集団を明らかにするため、生体外でさまざまな培養方法を試みた。初めに、毛包上皮性幹細胞の維持や増殖に関連するシグナル経路に関わるサイトカインや低分子化合物、培養足場材料などの組み合わせについて、220通り以上の培養条件を検討した(図1a)。この結果、BMPシグナルを抑制するNoggin、線維芽細胞増殖因子(FGF)、HHシグナルを活性化させるSAG、上皮成長因子(EGF)を含む培地(NFFSE培地)で、アテロコラーゲンゲルを用いて立体培養すると、毛包器官誘導能を持つ上皮性幹細胞が最も高い増殖率を示し、6日間の培養で約190倍にまで増幅できることが明らかとなった(図1b)。

また、蛍光活性化セルソーティング(FACS)

による増幅細胞集団の解析では、バルジ領域幹細胞のマーカである CD34/I α 6 (インテグリン β 6) 二重陽性細胞が全体の 4% から 70.8% に増加することが認められた (図 1c, d)。一方で、この培地から EGF を除いた培地 (NFFSE 培地) や Wnt シグナルおよび Notch シグナルを活性化させるサイトカインを加えた培地 (NFFSWN 培地) では、CD34/I α 6 二重陽性細胞の割合がそれぞれ 56.2% および 30.6% と、NFFSE 培地に比べて低い増加率を示した (図 1d)。NFFSE 培養細胞では、毛包下部の再生を担う幹細胞のマーカである Lgr5 の発現が 137.6 倍、NFFSWN 培養細胞では、皮脂腺幹細胞のマーカである Blimp1 の発現が 9.01 倍まで上昇していた。これらのことから、NFFSE 培地が器官再生能のある毛包上皮性幹細胞を未分化状態で維持しながら増幅することが示唆された (図 1e)。

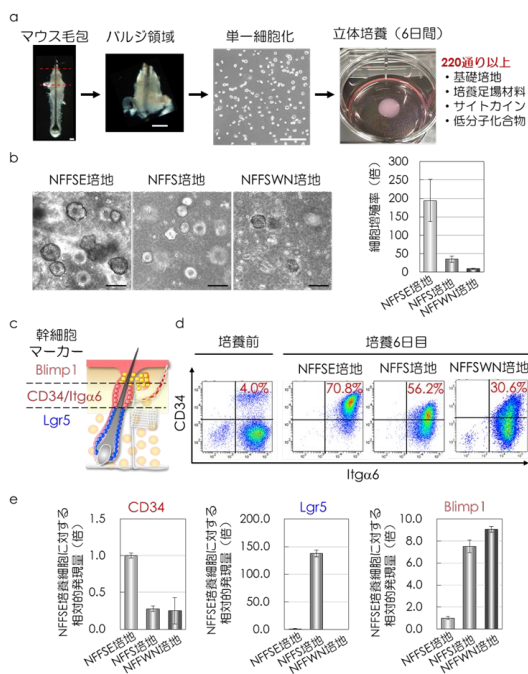


図 3 未分化状態を維持する毛包上皮性幹細胞培養法の確立

a) 毛包バルジ細胞の立体培養イメージ。
 b) 培養 6 日目における位相差顕微鏡像 (左) と細胞増殖率 (右)。NFFSE 培地においてバルジ細胞は最も高い増殖率を示す。
 c) 毛包上皮性幹細胞分布の模式図。
 d) 培養前後における CD34 および I α 6 発現細胞の解析。CD34/I α 6 二重陽性細胞の割合はいずれの培養条件においても増加するが、NFFSE 培地で最も高い割合を示した。
 e) 培養後の遺伝子発現解析。NFFSE 培養細胞では毛包下部のマーカである Lgr5 の発現が、NFFSWN 培養細胞では毛包上部のマーカである Blimp1 の発現が上昇している。スケールバーは全て 100 μ m。

そこで、培養細胞の器官誘導能を明らかにするため、器官原基法により毛包原基を再生し、

ヌードマウス皮内へ同所的に移植を行ったところ、NFFSE 培養細胞および NFFS 培養細胞を用いた再生毛包原基から、同程度の毛包再生 (再生毛の萌出) が認められた (図 2a, b)。周期的な毛包の再生回数には違いが認められ、NFFSE 培養細胞では 79.0% の毛包が 2 回以下の毛周期しか示さないのに対し、NFFSE 培養細胞から再生した毛包の 81.0% が 3 回以上の毛周期を示したことから、長期的な毛包再生を可能とする毛包上皮性幹細胞の誘導には、NFFSE 培養が重要であることが示された (図 4b)。

これらの結果から、周期的な毛包再生能を持つ毛包上皮性幹細胞の生体外培養方法が確立された。

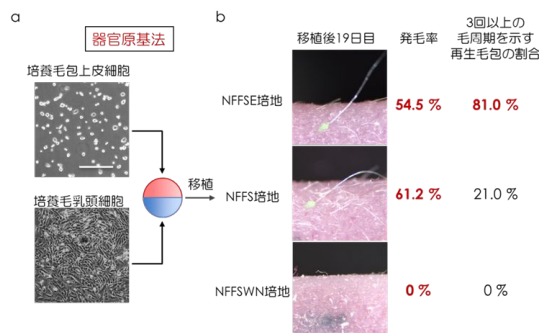


図 2 器官原基法による培養細胞の機能解析

a) 培養毛包上皮細胞および毛乳頭細胞を用いた器官原基法の模式図。コラーゲンゲル内において 2 種類の細胞を高密度で立体的に区画化し配置することにより、器官のもととなる器官原基を再現できる。

b) 再生毛包原基をヌードマウス皮内へ移植後 19 日目の実体顕微鏡像と発毛率および 3 回以上の毛周期を示す再生毛包の割合。NFFSE 培養細胞から再生した毛包の多く (81.0%) が 3 回以上の毛周期を示した。

2) 毛包上皮幹細胞の未分化性と増殖能を制御する分子機構の解明

1) の結果から、NFFSE 培養細胞中には持続的な毛包再生を可能とする幹細胞集団が含まれていると予想された。そこで、その細胞集団を明らかにするため、NFFSE 培地で培養した細胞と、限定的な毛周期を示す NFFS 培地で培養した細胞集団の特徴を細胞表面マーカーの発現により比較した。一般的に、幹細胞の自己複製には細胞外分子群が重要な役割を果たしているため、細胞接着分子および細胞外基質の発現を比較したところ、NFFSE 培養細胞集団には、バルジ幹細胞である CD34/I α 6 二重陽性細胞集団中にインテグリン β 5 (I α 5) を高発現する細胞集団が含まれることが明らかになった (図 3a)。

そこで、NFFSE 培養細胞から CD34/I α 6/I α 5 三重陽性細胞を除去し、機能解析を行ったところ、3 回以上の毛周期を示す再生毛包の割合が 79.9% から 13.3% へと大幅な減少が認められた (図 3b)。また、細

胞系譜解析では、再生毛包において三重陽性細胞は皮脂腺、バルジ領域、および毛球部を含む毛包可変部に分化することが示された。これらの結果から、再生毛包において CD34/Itgα6/Itgβ5 三重陽性細胞が周期的な毛包再生に必要なことが示された。

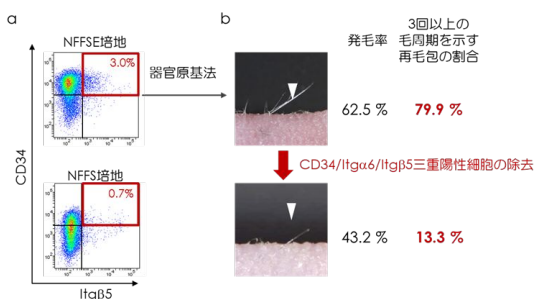


図 3 培養後の細胞集団解析と CD34/Itgα6/Itgβ5 三重陽性細胞の機能試験

- a) 培養細胞の細胞表面マーカー解析。NFFSE 培養細胞においては CD34/Itgα6/Itgβ5 三重陽性細胞の割合が高い。
- b) NFFSE 培養細胞の発毛機能解析。NFFSE 培養細胞集団から CD34/Itgα6/Itgβ5 三重陽性細胞を除去すると 3 回以上の毛周期を示す再生毛包の割合が減少することから、三重陽性細胞が周期的な毛包再生に必要なことが分かる

培養実験で観察された CD34/Itgα6/Itgβ5 三重陽性細胞の毛包における局在を明らかにするため、免疫染色による解析を行ったところ、マウスおよびヒト頭髪毛包では、サイトケラチン 15 (CK15) 陽性バルジ領域の上部において Itgβ5 発現細胞の局在が認められた(図 4a 上段)。また、この領域において EGF 様ドメインを持ち、細胞接着分子のインテグリンと結合する細胞外基質の糖タンパク質である「テネイシン」の発現が認められた(図 4a 中下段)。

これらの結果から、天然毛包において CK15 陽性バルジ細胞に機能的な多様性が存在し、Itgβ5 陽性細胞が長期間の毛周期の維持に必要であり、テネイシンが Itgβ5 陽性細胞のニッチとして機能している可能性が示された(図 4b)。

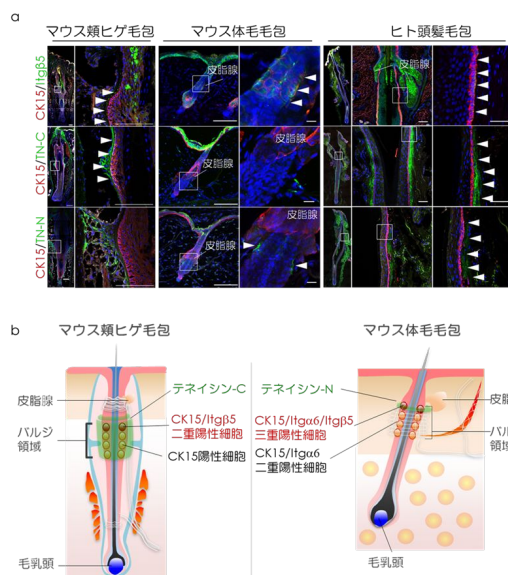


図 6 免疫組織染色による Itgβ5 陽性細胞の天然毛包における局在解析

- a) 免疫染色による天然毛包における空間的タンパク発現解析。マウス頬ヒゲ毛包、マウス体毛毛包、およびヒト頭髪毛包において、Itgβ5 陽性細胞(緑)は CK15 陽性バルジ領域上部に存在し(上段)、テネイシン(TN-C および TN-N)とともに局在していることが分かる(中下段)。矢尻は Itgβ5、TN-C または TN-N 発現領域を示す。スケールバーは全て 50μm。
- b) マウス天然毛包における Itgβ5 陽性細胞およびテネイシン分布の模式図。

3) 毛包上皮幹細胞の臨床応用へ向けた技術開発

成体幹細胞を用いた器官再生医療の実現化に向けた基盤技術の開発のため、上記 1) でマウス毛包細胞を用いて確立した毛包形成能を保持したまま増殖可能な培養方法を一部改変することにより、ヒト頭皮毛包由来細胞を培養、増幅させる技術を開発した(図 3)。この培養方法を応用することで、ヒト頭髪バルジ由来細胞が 1 毛包から 4000 倍に増幅され、同一期間内に毛乳頭細胞が約 100 倍に増幅されることから、最終的に 1 毛包から約 100 毛包相当まで増幅可能となり、毛包再生医療の臨床応用の実現に大きく前進したと言える。

本研究により、周期的な毛包再生能を維持したまま毛包上皮性幹細胞を増幅できる培養方法の開発に成功するとともに、長期間の器官誘導能力の維持には CD34/Itgα6/Itgβ5 三重陽性細胞が重要であることが明らかとなった。

本成果は、毛包上皮性幹細胞の周期的な毛包再生や分化、運命決定のメカニズムや、上皮性幹細胞間の細胞系譜の理解などの幹細胞生物学研究に大きな貢献するとともに、「な

ぜほとんど全ての体性幹細胞は器官誘導能を失っているのか」、「どうやったら組織幹細胞においても器官誘導能を維持できるのか」という、発生生物学上の根本的な問いに答える足掛かりになるものと期待できる。
また、本研究により確立された培養方法を応用することで、少数の毛包から大量の再生毛包を人為的に製造できることから、世界初の器官再生医療である毛包器官再生医療（毛髪再生）の実現に大きく貢献すると期待される。

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 1件)

1. Makoto Takeo, Kyosuke Asakawa, Koh-ei Toyoshima, Miho Ogawa, JingJing Tong, Tarou Irié, Masayuki Yanagisawa, Akio Sato and Takashi Tsuji
Expansion and characterization of epithelial stem cells with potential for cyclical hair regeneration
Sci. Rep. 2021. 11(1):1173

〔学会発表〕(計 2件)

1. 武尾真, 浅川杏祐, 小川美帆, 童菁菁, 辻孝, 辻孝
成体マウスにおける持続的な毛周期に必要な毛包幹細胞の同定
第42回日本分子生物学会年会
2. 童菁菁, 武尾真, 浅川杏祐, 小川美帆, 辻孝
マウス毛包上皮性幹細胞の器官誘導能を制御する培養方法の確立
第42回日本分子生物学会年会

〔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

武尾 真 (Makoto Takeo)
国立研究開発法人理化学研究所
多細胞システム形成研究センター
研究員

研究者番号：50782116

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()