

平成30年 7月11日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19740

研究課題名(和文) 不死化毛乳頭細胞の樹立と毛包再生技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of Immortal Dermal papilla cells and Hair follicle regeneration technology

研究代表者

木曾 真弘(Kiso, Masahiro)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・医師

研究者番号：20769517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：毛乳頭細胞を無毛部である掌蹠部に移植すると、掌蹠部でも毛包誘導されることから毛乳頭細胞は毛包の再生に必要な細胞であると考えられている。しかしながら、毛乳頭細胞を2次元下で培養すると速やかに増殖能と毛包誘導能が失われる。本研究において、我々はマウスとヒトの毛乳頭細胞を培養し、TERT遺伝子とBMI1遺伝子を細胞に導入することで、毛乳頭細胞の増殖能の向上と毛包誘導能が保持されたことを示した。これらの細胞は、毛包が誘導されるメカニズムの解明に大いに役立つものと思われる。

研究成果の概要(英文)：It is reported that dermal papilla cells are necessary for regeneration of hair follicles since hair follicle is induced at the palm pad area, when dermal papilla cells (DPCs) were transplanted into a hairless area. However, once DPCs are cultured under two-dimension culture, the ability of proliferate and hair inductive activity are quickly lost. In this study, we clearly showed that murine and human DPCs induced by TERT and BMI1 restored their growth potential and characteristics as DPs in terms of the hair inductive activity. These DPCs are seems to be attractive as great tools to investigate the precise mechanism of maintaining hair inductive activity.

研究分野：皮膚科学

キーワード：毛乳頭細胞 毛包再生 TERT遺伝子 BMI1遺伝子

1. 研究開始当初の背景

皮膚科領域において、脱毛症は非常によくみられる疾患であり、整容的側面から Quality of Life が大きく損われることから数多くの患者を悩ませている。脱毛症の原因は実に様々であるが、特に生まれつき毛包形成のない先天性脱毛症や、膠原病、感染症などによって毛包が破壊されてしまう癬痕性脱毛症など、毛包が存在しないために、一般的な治療方法が奏功しないものも多く、毛包そのものを再生しうる治療方法の確立が望まれている。

毛包は皮膚の付属器の一つであり、体温調整、皮膚の繊細な部位の保護、さらには整容面においても重要な役割を持つ。毛包の発生、ヘアサイクルによる毛包のリモデリングは、上皮(表皮細胞)と間葉(毛乳頭細胞)が相互にシグナルを伝達し合い行われている (Schmidt-Ullrich R, et al. Bioessays 2005)。毛包球部で小さな細胞集団を形成する毛乳頭細胞を、無毛部である掌蹠部に移植すると、掌蹠部でも毛包誘導されることから (Reynold AJ, et al. Development 1992)、毛乳頭細胞こそが毛包の再生に必要な細胞であると考えられている。

現在、移植による毛包再生治療は、現存する毛包を株分けして行う植毛術が中心であり、多数の毛包を移植することは困難である。この問題を解決するためには、毛包誘導能を持つ毛乳頭細胞を十分に確保する必要がある。しかし、毛乳頭細胞は一旦、2次元培養下に置かれると、増殖も遅延し、速やかに毛包誘導能を失うため、培養した毛乳頭細胞を移植するには多くの課題が残る。以前、我々の共同研究者である大河内仁志先生のグループは、毛乳頭細胞を培養する際に Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) を添加すると、増殖能が向上できると報告しているが (Osada A, et al. Tissue Eng 2007)、移植可能な毛包誘導能を保ったままの状態を維持するのは依然として困難であった。最近では、ヒト毛乳頭細胞を2次元培養下に置くと速やかに遺伝子プロファイリングも変化するとされており (Higgins CA, et al. Proc Natl Acad Sci 2013)、毛乳頭細胞の性質を維持するためには、更に最適な培養環境を整えていく必要がある。

Platelet-derived growth factor-AA (PDGF-AA) は毛包の成長期の誘導と維持に寄与しているという報告がなされている (Festa E, et al. Cell 2011)。PDGF-A ノックアウトマウスでは、野生型マウスと比較して、真皮形成が浅く、毛包形成不全を認め、毛乳頭細胞も小さく、異常な真皮鞘細胞の形成、毛包が細いなどの形態学的な変化が認められたことから (Karlsson L, et al. Development 1999)、毛包形成において重要な因子の一つとして考えられている。そこで我々は、この PDGF-AA に注目し、図1に示すように、前述の FGF2 と PDGF-AA の相互作用

により、毛乳頭細胞の増殖能が向上することを示し、加えて毛包再構築実験によって、培養過程を経た後でも、毛乳頭細胞の毛包誘導能が保持されることを報告し (Kiso M, et al, J Dermatol Sci 2015)、毛乳頭細胞の最適な培養環境の基盤を確立した。

本研究においては、我々が確立した培地条件下で育てた毛乳頭細胞を用いる。また、移植に安定した細胞数を獲得するため、不死化毛乳頭細胞を樹立する。細胞を不死化させる方法としては、テロメア逆転写タンパク質 (TERT) 遺伝子の導入があげられる。繰り返しの細胞分裂によって、染色体末端部にあるテロメア鎖長が短縮し、細胞老化が進むことが知られているが、外因的に TERT を強制発現させると、細胞は十分なテロメア鎖長を維持することができ、細胞を不死化させることができる。更に TERT 遺伝子とともに BMI1 遺伝子 (体性幹細胞の自己複製に重要) を導入することで、より効率的に細胞を不死化出来ることが報告されており (Kei Haga et al; Cancer Sci 2007)、本研究ではレンチウイルスベクターを用いて、TERT 遺伝子と Bmi1 遺伝子の双方を遺伝子導入する。その後、不死化した細胞を様々な方法で毛包再構築実験を行い、再生し得た毛包の数と質の評価を行い、より現実的な移植方法を模索する。更には、樹立した不死化毛乳頭細胞、遺伝子導入していない毛乳頭細胞、直接単離した毛乳頭細胞の遺伝子プロファイリングを行い、その差異を検討することで、毛包誘導能に関連する新たな遺伝子の候補を検索する。また同様の実験をヒトの毛乳頭細胞でも行い、種を超えて同じ結果が得られるかを検証する。本研究は、培養毛乳頭細胞を用いた移植による新たな毛包再生治療を確立するための研究である。

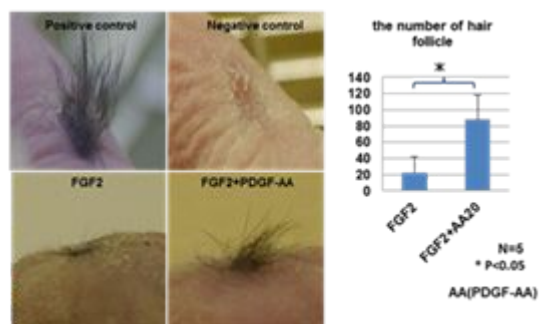


図1. 毛乳頭細胞に対する PDGF-AA の効果

2. 研究の目的

本研究では、マウスもしくはヒト由来の毛乳頭細胞を単離し、適切な条件下で培養して増殖させ、細胞数を十分に獲得した上で移植する方法を確立し、毛包を再生させる新たな治療法を樹立し、新規脱毛症の治療としての可能性を探求する。具体的な研究項目は、単離した毛乳頭細胞にとって最適な培養環境を樹立、毛乳頭細胞の性質を保持した細胞

胞を不死化させ、移植術に安定した数の細胞供給を図り、様々な毛包再構築実験を施行し、再生した毛包の評価を行うことで、より質の高い毛包再生技術を確立する。以上の3項目を *in vitro* および *in vivo* で検討することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

本研究計画において、以下の4つの達成目標を掲げて研究を進めた

- 1) 毛乳頭細胞の単離と培養、不死化毛乳頭細胞の樹立
- 2) 毛包再構築実験による毛包再生と毛包の質の検討
- 3) 不死化していない毛乳頭細胞と不死化毛乳頭細胞、直接単離した毛乳頭細胞の遺伝子プロファイリングの検討
- 4) ヒトの毛包から単離した毛乳頭細胞を用いて不死化毛乳頭細胞の樹立、毛包再構築実験による毛包再生

4. 研究成果

1 マウス不死化毛乳頭細胞の樹立

我々はまず B6 マウスの頬髭より毛包を採取、実体顕微鏡下で毛乳頭細胞を単離した。FGF2 を添加し、培養し細胞数を獲得した段階で、TERT 遺伝子と BMI 遺伝子をレンチウイルスにて導入。(図 1A)

その後、RT-PCR にて遺伝子を導入していない群 (cultured DPCs) と導入した群 (transfected DPCs) で分けて、TERT 遺伝子と BMI 遺伝子の発現を比べた。遺伝子導入した群のみ TERT 遺伝子と BMI 遺伝子を確認した。更に増殖能を比較したところ、遺伝子導入群 (TERT+BMI1) は遺伝子導入なし群 (empty) と比較したところ、増殖能が維持されているのが確認された。

図 1A

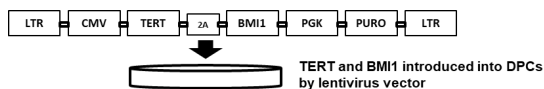


図 1B

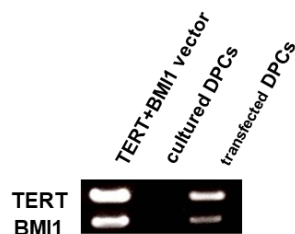
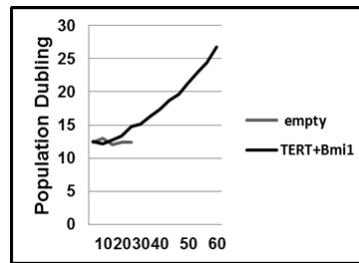
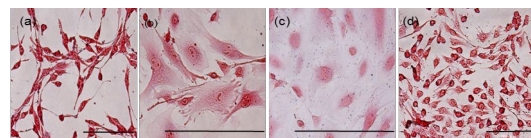


図 1C



2 不死化マウス毛乳頭細胞の ALP 活性
毛乳頭細胞のマーカーとし ALP 活性の有無を確認した。遺伝子導入なし群の第 1、3、5 継代の毛乳頭細胞 [図 2 (a)、(b)、(c)] と遺伝子導入した第 1 8 継代 [図 2 (d)] を比較したところ、遺伝子導入なし群は継代とともに ALP 活性が低下しているが、遺伝子導入群は ALP 活性が維持されていた。

図 2

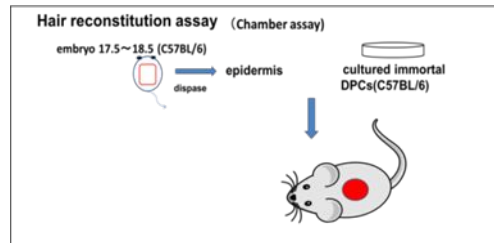


Bar = 100µm

3 不死化毛乳頭細胞の毛包誘導能

遺伝子導入しない群は第 8 継代を超えると毛包誘導能が失われるとされている。毛包再構築実験 (チャンパー法) を施行し、不死化毛乳頭細胞の毛包誘導能を確認した。下記の図のごとく第 18 継代の不死化毛乳頭細胞の毛包誘導能が確認された。

図 3

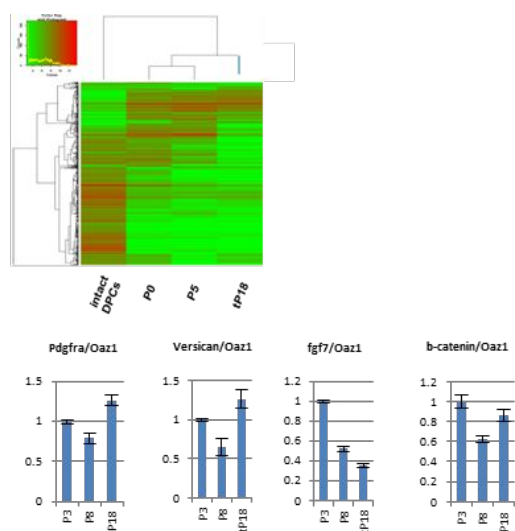


4 毛乳頭細胞と不死化毛乳頭細胞の遺伝子プロファイリング

B6 マウスの頬髭より直接単離した毛乳頭細胞 (intact DPCs)、初代培養毛乳頭細胞 (P0)、第 5 継代培養毛乳頭細胞 (P5)、第 18 継代不死化培養毛乳頭細胞 (tP18) をマイクロアレイ解析を行った。毛乳頭細胞は 2 次元培養下にて劇的に遺伝子が変化することが示された。また、毛包の成長期に発現が認められる *pdgfra*、*fgf7*、*fgf10*、更に毛乳頭細胞のマーカーとされる *Versican* の発現量を real time PCR にて確認したところ、*fgf7* 以外は早期培養毛乳頭細胞と比較したところ、不死化毛乳頭細胞で発現量が維持される、もしくは

は増加傾向を示した。このことから、これらの遺伝子は毛包誘導能と相関している可能性も示唆された。

図 4



5 ヒト毛乳頭細胞の単離と遺伝子導入

我々はヒト毛乳頭細胞を国立国際医療研究センター病院の倫理委員会の審査を経た後に、頭部毛包より毛乳頭細胞を単離し培養に成功した。また、TERT 遺伝子と BMI1 遺伝子をマウスと同様にレンチウイルスにより遺伝子導入をすることで、遺伝子導入しない群と比較すると増殖能が維持されるだけでなく、毛包再構築実験において毛包誘導能を保持されたのを確認した。

引用文献

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Kiso M, Yabe S, Itoh M, Nakagawa H, Okochi H. Introduction of the TERT and BMI1 genes into murine dermal papilla cells ameliorates hair inductive activity. J Dermatol Sci. 2018 May;90(2):218-221. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2018.02.003>

〔学会発表〕(計1件)

発表者 Masahiro Kiso
題名 Immortalization of primary human dermal papilla cells by Bmi-1 and TERT
学会名 47th Annual ESDR Meeting in Salzburg
発表年度 2017年

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：不死化ヒト毛乳頭細胞及びその製法、並びに初代ヒト毛乳頭細胞の培養方法
発明者：木曾 真弘

権利者：同上

種類：特許

番号：特許願 2017-183712 号

出願年月日：2017年9月25日

国内外の別：国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

木曾 真弘 (KISO Masahiro)
東京慈恵医科大学皮膚科学講座 助教
国立国際医療研究センター病院 皮膚科
研究者番号：20769517

(2)連携研究者

矢部 茂治 (YABE Shigeharu)
国立国際医療研究センター
細胞組織再生医学研究部 上級研究員
研究者番号：40533716

大河内 仁志 (Okochi Hitoshi)
国立国際医療研究センター
細胞組織再生医学研究部 部長
研究者番号：30185235

伊藤宗成 (ITO H Munenari)
東京慈恵医科大学皮膚科学講座 講師
研究者番号：20408371

中川秀己 (NAKAGAWA Hidemi)
東京慈恵医科大学皮膚科学講座 教授
研究者番号：20114580