

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 3 0 年 5 月 2 6 日現在

機関番号：3 2 6 1 2

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016 ~ 2017

課題番号：1 6 K 2 0 3 6 7

研究課題名（和文）線維芽細胞凝集塊の大きさによる毛髪誘導能の検討

研究課題名（英文）the analysis of hair guiding ability depending on size of fibroblast clumps

研究代表者

西田 倫 (Nishida, Michi)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：5 0 7 4 8 9 0 2

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、線維芽細胞凝集塊による毛髪誘導の臨床応用を前提に、凝集塊をどのような状態で移植するのが適しているのかを検討するため、その大きさによる未分化マーカーの発現変化を検討し、実際に *in vivo* への移植実験を行うことで、その毛包誘導能の効率を検討することを目的とした。大きさの違う 3 群の凝集塊を用い、毛包誘導に関連する各種マーカーの発現を比較検討した結果、細胞凝集塊が大きくなると *cxcr4* および *prom1* (CD133) の発現が有意に上昇していた。現在、最終的な移植に向け毛髪誘導の効率のよい凝集塊形成条件についての検討を行っている。

研究成果の概要（英文）：In this study, in order to investigate the aggregation state of clumps on the premise of clinical application of hair induction by fibroblast lumps, the expression levels of undifferentiated markers based on the size of aggregate were compared and examined. As a result of comparing the expression of various markers related to hair follicle induction using groups of three groups of different sizes, the expression of *cxcr4* and *prom1* (CD133) increased significantly as cell clumps increased. Currently, we are studying the conditions of aggregate formation effective for hair guidance for final implantation.

研究分野：再生

キーワード：毛包誘導能

1. 研究開始当初の背景

これまで、研究代表者らの研究室では、間葉系細胞を非接着培養皿で無血清培地による培養を行い、細胞凝集塊を形成させることで、毛包誘導能が消失した細胞や、本来毛包誘導能を有していない細胞が、毛包誘導能を回復ないし獲得するという現象を発見し、報告した (図1: Shimizu R, et al., *Exp. Dermatol.* 2011)。

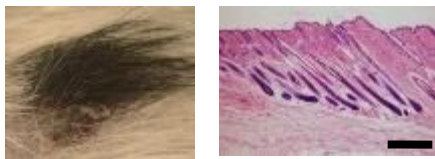


図1: 線維芽細胞凝集塊により再生した毛包

細胞凝集塊を形成することで、間葉系細胞が脱分化し、幹細胞様の細胞に変化するよう働くのではないかと推測しており、その検証を行うため、これまで様々な幹細胞において幹細胞特異的に働いている膜表面マーカーおよび転写因子の発現を real time PCR 観察し、検討している。

また、fibronectin, sca-1, nestin を用いた免疫染色を行い、コンフォーカルマイクロスコープで観察したところ、線維芽凝集塊が一様に未分化因子を発現しているのではなく、不均一に分布している像が観察された (図2: Shimizu R, et al. *Exp. Dermatol.* 2011)。

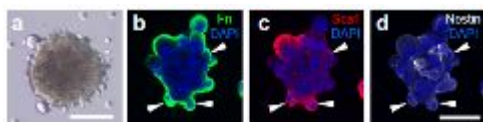


図2 線維芽細胞凝集塊における fibronectin, sca1, nestin 染色

これらの基礎実験の結果をもとに、現在臨床応用への準備を進めている。しかし、ヒト検体から採取できる細胞数は限られており、その中でいかに効率的に毛髪誘導を起こす

条件を設定するかは重要な課題である。

2. 研究の目的

これまで、線維芽細胞を非接着培養皿を用いて培養し、細胞凝集塊を形成すると細胞がある程度未分化な状態に変化し、毛包誘導能を獲得することが報告されている。また、Embryonic stem cell (ES cell) の凝集塊では、その大きさによりその分化の方向性が影響されることが報告されている。そこで、本研究では、線維芽細胞凝集塊による毛髪誘導の臨床応用を前提に、凝集塊をどのような状態で作成し、移植するのが適しているのかを検討するため、その大きさによる未分化マーカーの発現変化を検討し、実際に in vivo への移植実験を行うことで、その毛包誘導能の効率を検討することを目的とする。また、凝集塊を作ること、なぜ細胞が未分化な状態に近づくのか、というメカニズムにせまる。

3. 研究の方法

(1) 均一な細胞凝集塊の作成

新生仔マウス背部皮膚から explant 法にて分離培養した線維芽細胞を 10%FBS 含有 DMEM 培地で培養する。20-30 継代目の細胞を用い、Aggrewell plate® (逆ピラミッド型の特殊なマイクロウェルが刻まれて、大きさの違う均一化した細胞凝集塊を得ることができる) に細胞を播種し、大きさの違う線維芽細胞凝集塊を形成する。生後1日目のC57B6のマウス背部より explant 法を用い、線維芽細胞を分離培養を行う。

(2) 大きさによる各遺伝子発現の比較検討

EGF, bFGF, B27 を添加した DMEM/F12 混合培地で培養開始し、48 時間後に回収する。

回収された大きさの違う3群の凝集塊からRNAを抽出し、毛包誘導に関連する各種マーカー（myc, klf4, sox2, oct3/4, nanog, cxcr4, prom1）の発現をreal time PCR法にて、比較検討した。

回収された細胞凝集塊をwhole mount染色、一部パラフィン包埋し、切片を作成し、cxcr4, prom1を始めとして、nestinやversicanと言った細胞外マトリックスのマーカーの多重染色を行い、大きさによっての差があるかを比較検討した。

（3）MMP inhibitorによる凝集塊の大きさの変化

過去の研究代表者らのデータからMMPが細胞凝集塊で発現が認められていることから、MMP inhibitor添加（BB94, MMP-9,13 inhibitor）により大きさの変化が起こるか検討した。またその大きさにより毛包誘導に関連する各種マーカー（myc, klf4, sox2, oct3/4, nanog, cxcr4, prom1）の発現がどう変化するかをreal time PCR法にて、比較検討した。

（4）ヒト線維芽細胞を用いた移植実験
倫理委員会承認のもと得られたヒト皮膚より explant 法にて、線維芽細胞を分離培養を行う。（1）（2）で得られた結果より、最適な凝集塊の大きさの細胞凝集塊を作成し、ヌードマウス背部皮下に埋入し、毛包誘導能を検討した。

4．研究成果

（1）均一な細胞凝集塊の作成

特殊な非接着培養皿に各well細胞数50, 500, 5000の線維芽細胞を播種し、大きさの異なる均一な細胞凝集塊の作成を行った。図

3のごとく、均一な大きさの異なる細胞凝集塊の作成が確認できた。



図3 大きさの異なる線維芽細胞凝集塊の作成
（左から:各well細胞数50, 500, 5000）

（2）大きさによる各遺伝子発現の比較検討

（1）で得られた大きさの違う3群の凝集塊を用い、毛包誘導に関連する各種マーカーの発現を比較検討した。その結果、細胞凝集塊が大きくなるとcxcr4およびprom1(CD133)の発現が有意に上昇していた（図4）。

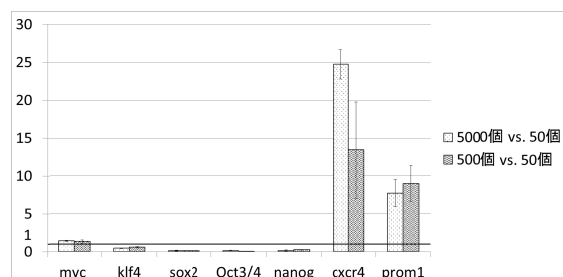


図4 凝集塊の大きさによる各種マーカーの発現

（3）MMP inhibitorによる凝集塊の大きさの変化

MMPを阻害すると細胞凝集塊を大きくする傾向があった（図5）。

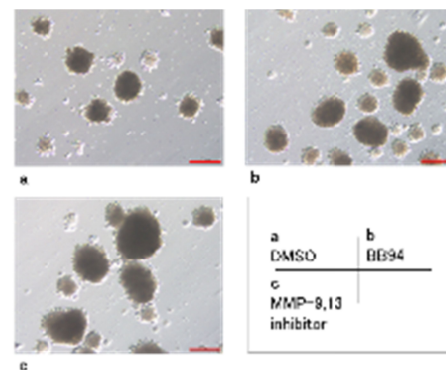


図5 MMP inhibitorによる凝集塊の大きさ

細胞凝集塊が大きくなることで myc、klf4、sox2、nanog の発現を増加させ、未分化能を発現することに寄与する可能性が示唆された（図6）。

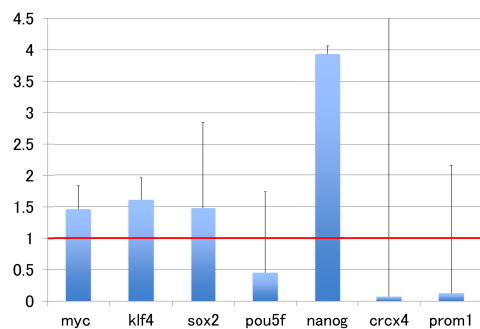


図6 凝集塊の大きさによる各種マーカーの発現

（４）ヒト線維芽細胞を用いた移植実験

現在、最終的な移植に向け毛髪誘導の効率のよい凝集塊形成条件についての検討を行う。細胞凝集塊の最適化条件を細部に渡り、検討しているところである。

５．主な発表論文等

なし

６．研究組織

西田 倫（NISHIDA, Michi）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：50748902