

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006 -2008

課題番号：18390315

研究課題名（和文） CD200 陽性バルジ細胞を用いたヒト毛嚢再生の試み

研究課題名（英文） Experimental regeneration of human hair follicles using CD200 positive bulge cells

研究代表者

大山 学 (MANABU OHYAMA)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10255424

研究成果の概要：CD200 と呼ばれる細胞表面のタンパクを目印に、ヒトの毛嚢のもととなる幹細胞を多く含んだケラチノサイト（皮膚の細胞）をヒト頭皮から分離・培養した。また、毛嚢を形作るシグナルを送る能力（毛誘導能）を維持したままヒト毛乳頭細胞を培養する技術を開発した。得られた CD200 陽性の毛嚢細胞（バルジ細胞）と毛誘導能を有する毛乳頭細胞を組合せて免疫不全マウスの体内に移植し、ヒト毛嚢に類似した構造体を得ることができた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2007年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2008年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚生理学、再生医学

1. 研究開始当初の背景

毛嚢は毛周期による自己再生を繰り返すことから毛嚢独自の幹細胞が存在すると考えられてきた。マウスを用いて毛嚢の幹細胞が外毛根鞘の最外層の中央部、立毛筋附着部であるバルジ領域に存在することが明らかにされた。その後、マウスのバルジ細胞が毛嚢だけでなく、表皮、脂腺も再生する多分化能を有することが示されたことから、ヒト毛嚢バルジ幹細胞も同様の再生能を有すると期

待された。マウスでは通常のケラチノサイトと毛乳頭細胞を免疫不全マウスに混合移植することにより毛嚢再生が可能であるが、ヒトでは同法による毛嚢再構成は困難である。しかし、通常のヒトケラチノサイトに替えて、ヒトバルジ幹細胞を用いれば同様の方法で毛嚢を再生できる可能性がある。しかし、生きたヒトバルジ細胞を分離する技術が存在しなかった。

本研究申請前に申請者らにより CD200 をは

はじめとするヒトバルジ細胞の表面マーカーが同定され、それにより幹細胞に富んだバルジ細胞をそのまま分離することが可能となった。この時点から、ヒト毛嚢幹細胞を利用したヒト再生毛嚢実現のための研究が可能になった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が新しく同定した表面マーカーの一つである CD200 を用いて幹細胞に富んだバルジ細胞をヒト毛嚢から分離し、毛誘導能を有する中胚葉由来細胞と組み合わせることでヒト毛嚢を再生することである。つまり、成人の毛嚢に存在する幹細胞を利用し毛嚢を再生する基礎的技術の確立を目指す。

3. 研究の方法

本研究は大きく下記の4段階からなる。

(1) ヒト毛嚢からの CD200 陽性バルジ細胞の分離・培養

ヒト頭皮から効率よく CD200 陽性バルジ細胞を分離培養する。また、毛嚢再構成実験には大量の細胞が必要となることから、継代培養が CD200 陽性バルジ細胞の増殖能、分化度などについていかなる影響を与えるか検討し、毛嚢再構成に必要な細胞の備蓄を行う。

(2) 免疫不全マウスへの毛嚢由来細胞混合移植による毛嚢再構成系の確立

ヌードマウスを用いた *in vivo* の毛嚢再構成系は手術操作、器官培養など高度な技術を必要とする。マウス、さらにヒトに近いイヌの毛嚢を用いて毛嚢由来細胞混合移植による毛嚢再構成実験を施行し、技術の安定化をはかる。

(3) 毛誘導能を維持するヒト毛乳頭細胞の培養方法の最適化

毛嚢の発生・再生には毛乳頭細胞からの毛誘導シグナルが必要である。毛嚢再構成実験に必要とされるヒト毛乳頭細胞の数が多く、培養操作による増幅が必要となるが、毛誘導能を含む毛乳頭細胞の生物学的特性は培養操作により失われる。この特性を維持する培養条件を毛誘導能関連遺伝子の発現をモニタリングすることで最適化する。

(4) *In vivo* でのヒト毛嚢再構成

上記(1)、(3)により理論的に最適な毛誘導条件を備えたヒト毛嚢バルジ細胞と毛乳頭細胞を様々な条件で組合せ、(2)で確立した毛嚢再構成系に導入しヒト毛嚢再生を試みる。

4. 研究成果

(1) ヒト毛嚢からの CD200 陽性バルジ細胞の

分離・培養

申請者らにより CD200 を用いて生きたバルジ細胞をヒト毛嚢から分離する方法が確立された(図1)。また、分離されたバルジ細胞が短期培養のもとでは高いコロニー形成能を示すことが明らかになった。しかし、CD200 陽性バルジ細胞を用いてヒト毛嚢を再生するには大量の CD200 陽性細胞を培養し、準備する必要がある。そのために今まで明らかではなかった長期培養、継代操作が CD200 陽性細胞の特性に与える影響を評価した。

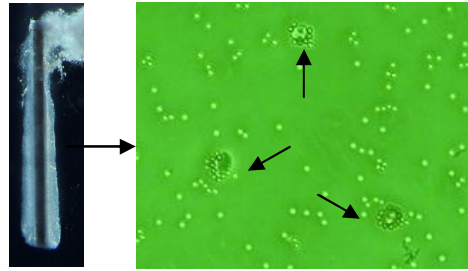


図1 本研究においてヒト毛嚢より磁気ビーズ法で分離された CD200 陽性バルジ細胞(矢印)

短期初代培養では、バルジ細胞は小型で未分化な形態を有し、高い増殖能を示した(図2右)。

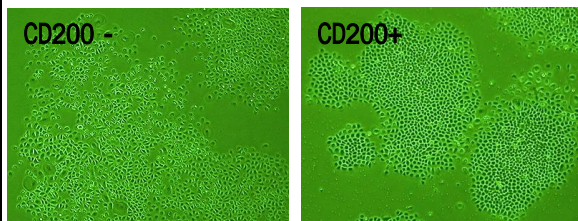


図2 CD200 陰性細胞(左)と比較してヒト CD200 陽性バルジ細胞(右)は高い増殖能を示した(短期初代培養)

次に長期継代培養を試みたところ、CD200 陽性バルジ細胞は5代を超えても高いコロニー形成能を維持したことから、CD200 陽性バルジ細胞の増殖能は長期の培養でも保たれることが示された(図3)。

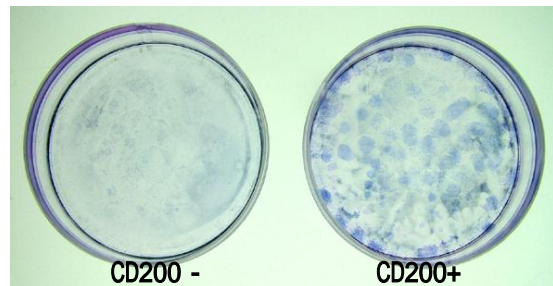


図3 CD200 陽性バルジ細胞(右)は5継代を超えて高い増殖能を維持した。

しかし、次第に扁平で大型の分化したケラチノサイトの形態を有する細胞の割合が増え、また CD200 の発現も培養とともに失われることが明らかになった（図 4）。

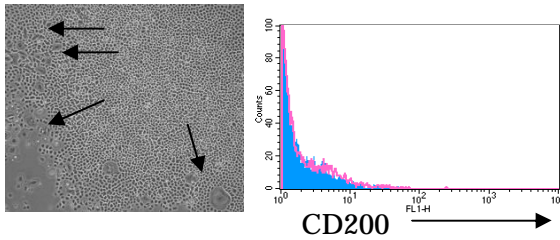


図 4 CD200 陽性バルジ細胞にも長期培養すると分化したケラチノサイト（矢印）が増える（左）。また、CD200 の発現は失われる。

以上の所見から、CD200 陽性バルジ細胞は増殖能こそ長期培養しても維持するものの、その生物学的特性は失うことが示唆された。この結果を踏まえ、ヒト毛嚢再生実験に使用する CD200 陽性バルジ細胞の培養による増幅は継代 2-3 代までとすることとし、ヒト頭皮検体からの CD200 陽性バルジ細胞の分離・培養・備蓄を行った。

(2)免疫不全マウスへの毛嚢由来細胞混合移植による毛嚢再構成系の確立

毛嚢の発生・再生には毛嚢ケラチノサイトと中胚葉由来の毛乳頭細胞の相互作用が必要である。In vivo の環境にこれらの細胞を混合移植し、毛嚢を再構成する系はいくつか過去に報告があるが、いずれも高度な技術が必要とし、安定化させるのが困難とされる。また、ヒト毛嚢細胞を用いた同様の実験は限られた報告しかないのが現状である。そこで、まずマウス・ラットの細胞を用いて毛嚢再構成系を遂行する技術の確立を試み、毛嚢の再構成の効率・必要とされる細胞数等につき比較検討した。

毛嚢再構成系としてはチェンバー法（図 5）

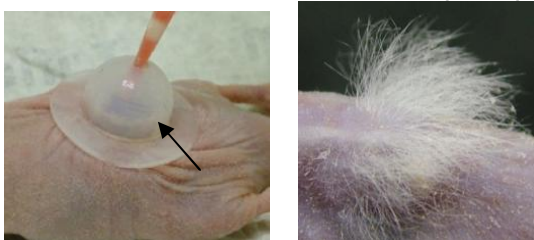


図 5 チェンバー法による毛嚢再構成実験。

ヌードマウスの背部にシリコンチャンパー（矢印）を移植し、ケラチノサイトと毛乳頭細胞を混合移植すると（左）背部に毛嚢が新たに再生された（右）。

パッチ法（図 6）、サンドイッチ法（図 7）を用いた。図 5-7 に示すようにいずれの手法にても毛嚢構造を再構成できた。

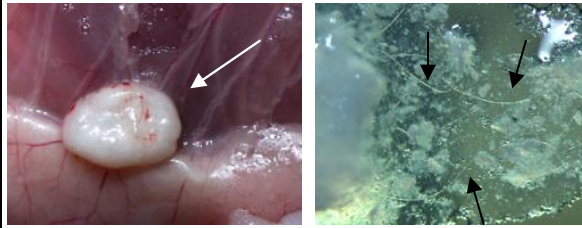


図 6 パッチ法による毛嚢再構成実験。ヌードマウスの背部皮下にケラチノサイトと毛乳頭細胞を混合移植すると嚢腫が形成される（左、矢印）。嚢腫の中には毛嚢が新たに再生された（右、矢印）。

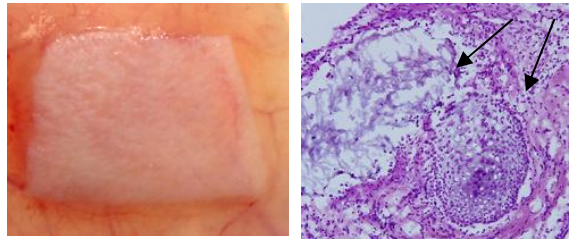


図 7 サンドイッチ法による毛嚢再構成実験。ヌードマウスの背部皮下に毛乳頭細胞を皮下に移植した無毛部マウス皮膚（手掌）を移植する（左）。毛乳頭により無毛部に毛嚢様構造が誘導された（右、矢印）。

検討の結果、毛誘導能を最も直接的に評価できるのは無毛部に毛嚢構造を誘導するサンドイッチ法だが、器官培養、複雑な手術手技を必要とし、実際の実験では CD200 バルジ細胞から表皮シートを作成しマウス表皮と置換する必要があるなど技術的ハードルが高いことが判明した。また、チェンバー法は生理学的に正しい位置に毛嚢を再構成できるが（図 5）、 1×10^7 個程度のケラチノサイトが必要であり数に限りのあるヒト細胞を用いるには適さないと考えられた。パッチ法は最低 5×10^5 個から施行可能で、手技も容易であった。以上から、毛嚢再構成系としてはパッチ法が最も実用的であると考えられた。

(3)毛誘導能を維持するヒト毛乳頭細胞の培養方法の最適化（特願 2008-213845）

毛嚢の発生・再生には中胚葉由来の毛乳頭からケラチノサイトへの毛誘導能シグナルが必要である。数の限られたヒト毛嚢由来細胞を用いて実験的に毛嚢を再生するには毛乳頭細胞も培養し増幅しておく必要がある。従来から報告されている方法でヒト毛乳頭細胞を培養したところ、毛乳頭細胞の毛誘導する能力と密接に関連する遺伝子（毛誘導能関連遺伝子）の発現が培養操作後に失われてい

ることが明らかとなった(図8)。

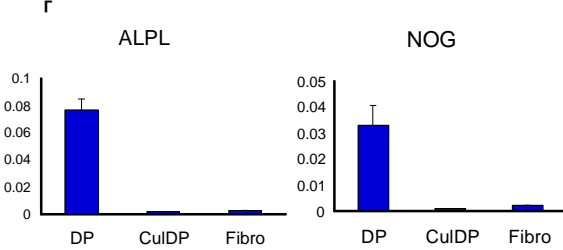


図8 培養操作がヒト毛乳頭細胞の毛誘導能関連遺伝子の発現に与える影響。Alkaline phosphatase (ALPL)、Noggin (NOG)とも遺伝子の発現レベルは毛乳頭細胞の毛誘導能と正に相関する。ヒト頭皮から分離したばかりの毛乳頭(DP)と比較して培養した毛乳頭細胞(CuIDP)また線維芽細胞(Fibro)では発現が低下している。

そこで、培養操作がヒト毛乳頭細胞に与える影響をさらに詳細に検討するため、4名の異なる提供者の新鮮分離毛乳頭(DP)、培養毛乳頭細胞(CuIDP)、線維芽細胞(Fibro)からRNAを抽出し、それぞれからマイクロアレイを作成し、網羅的遺伝子解析を行った。特に組織の分化・発生に重要な役割をはたすシグナル伝達系に注目し解析したところ、WNT、BMP、FGFシグナル伝達系に關与する遺伝子群の発現が低下していることが明らかとなった。この結果より、これらのシグナル伝達系を活性化する因子を外から毛乳頭細胞培養系に加えることによりヒト培養毛乳頭細胞における毛誘導能関連遺伝子の発現が維持しうる可能性が示唆される。

実際、それぞれのシグナル系を活性化する因子の添加にて培養ヒト毛乳頭細胞における毛誘導能関連遺伝子の発現が一部上昇した。また、発現が上昇する遺伝子は活性化するシグナル系により異なっていた(図9)。この結果より、添加する因子を組み合わせれば、それぞれの遺伝子発現増強効果を補足しあい生体内における毛乳頭に近い生物学的特性を有する培養毛乳頭細胞が作成可能なのではないかと考えられた。しかし、添加する因子によっては、濃度により遺伝子発現の観点からは良好な効果を示しても、増殖速度が著しく阻害される場合があった。そこで、ALPL、NOGに代表されるいくつかの毛誘導能関連遺伝子の発現をモニタリングしつつ、WNT、BMP、FGFシグナル経路の活性化因子3つを様々な濃度で組合せ培養条件の最適化を行った(図10)。最終的に最適化された培養条件(WNT-BMP-FGF条件:WBF条件と略す)では従来法で培養した毛乳頭細胞と比較して多くの毛誘導能関連遺伝子の発現が高く維持されており(図11)とくにALPL、WNT5Aなどについては新鮮分離ヒト毛乳頭と発現のレベルがほぼ同じに維持されていた。

以上より、この最適化したWBF条件で培養されたヒト毛乳頭細胞を用いてヒト毛嚢再構成実験を施行することとした。

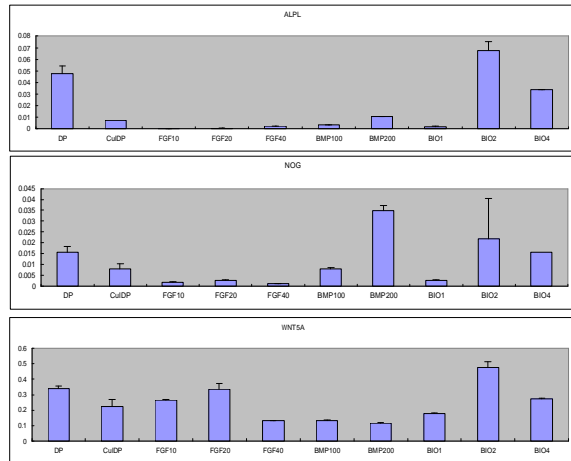


図9 各因子が培養ヒト毛乳頭細胞の毛誘導能関連遺伝子の発現に与える影響。WNT(BIO)、BMP、FGFそれぞれのシグナル系を刺激する因子をヒト毛乳頭細胞培養条件に加えるとCuIDPと比較してALPL、NOG、WNT5Aなどの毛誘導能関連遺伝子の発現が高く維持される。濃度によってはDPと同じレベルに維持される。

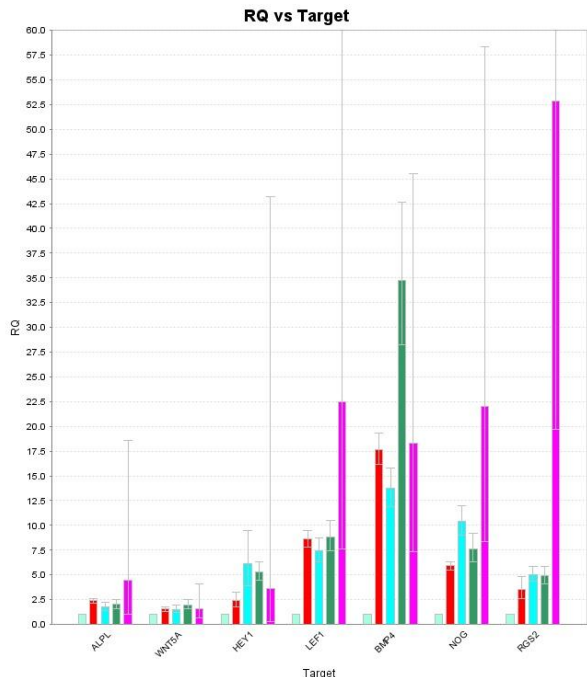


図10 濃度を変えた3因子組合せのバリエーションが毛誘導能関連遺伝子の発現に与える影響。横軸に毛誘導能関連遺伝子。縦軸に遺伝子発現強度を示す。従来法による培養ヒト毛乳頭細胞における各遺伝子の発現の強さをヒトライトブルーのバーで示す。最適化された培養条件であるWBF条件(紫のバー)では各遺伝子の発現が良好である。

(4) *In vivo* でのヒト毛嚢再構成

1)–3) までの成果により、ヒト毛嚢再生実験の遂行に必要な材料と実験系を準備することができた。次にそれを用いて *In vivo* でのヒト毛嚢再構成を試みた。実験系としてはチャンバー法、サンドイッチ法を試みたが有意な結果を得ることができなかつたので、ここではパッチ法による毛嚢再構成実験の結果について述べる。

実験には、ケラチノサイトとしてヒト頭皮サンプルより得られた毛嚢より分離した CD200 陽性バルジ細胞の継代 2 代目の形態学的に未分化なもの (図 1 1 左)、毛乳頭細胞として 3) で最適化した WBF 条件で培養したヒト毛乳頭細胞 (図 1 1 右、初代培養) を使用した。

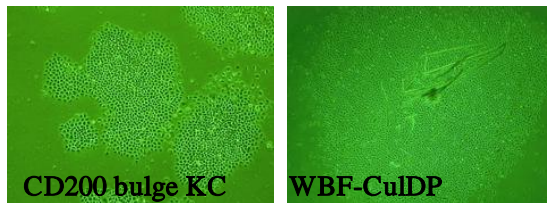


図 1 1 免疫不全マウスへの細胞混合移植に用いた CD200 陽性バルジ細胞 (左) と最適化された条件で培養されたヒト毛乳頭細胞 (右)

それぞれ 5×10^5 個のケラチノサイトとヒト毛乳頭細胞を、サポートとしての線維芽細胞と混合し、2) で確立したパッチ法の手法に従いヌードマウスの皮下に移植した。3 週間後、マウス皮下に形成されたパッチ (嚢腫) を解析したところ、線維芽細胞のみを移植したコントロール群では線維性の嚢腫被膜を認めるのみであったが (図 1 2)、ケラチノサイトと毛乳頭細胞を移植した群では図に示すように毛嚢類似構造を認めた (図 1 3)。

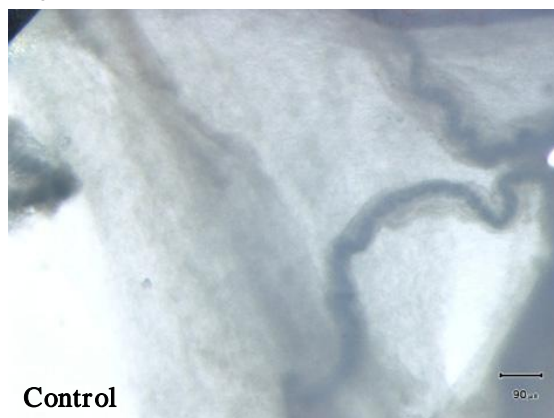


図 1 2 パッチ法によるヒト毛嚢再構成実験のコントロールの所見。マウス皮下には線維性の嚢腫被膜 (パッチ) を認めるのみである。

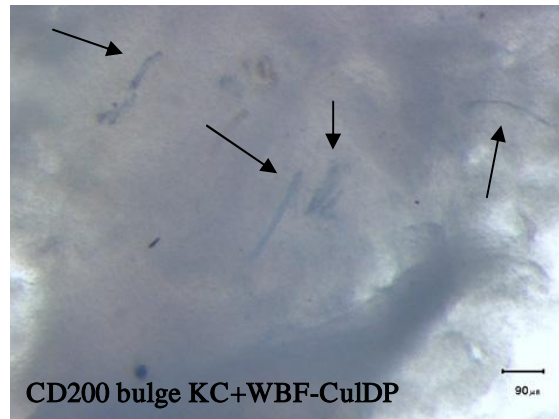


図 1 3 パッチ法によるヒト毛嚢再構成実験で認められた毛嚢類似構造。CD200 陽性バルジ細胞と WBF 条件で培養したヒト毛乳頭細胞を混合しヌードマウスの皮下に移植したところ毛嚢類似の構造 (矢印) を認めた。

(5) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト・今後の展望

毛嚢を再生する技術は、毛嚢に作用する薬剤の開発や、再生医学による難治性脱毛症の治療という観点からも重要であるが、上皮系細胞と間葉系細胞の相互作用による小器官形成の機構の解明にも有用である。マウスで確立された毛嚢再構成系を用いたヒト成人毛嚢細胞による毛嚢構造の再生の試みは今まで極めて限られた報告しかなく、一般に困難とされてきた。その一因として、ヒト成人毛嚢細胞は分化しており、組織再構成のための可塑性に富んではいないことが想定されてきた。多分化能をもつケラチノサイト幹細胞に富んだ CD200 陽性バルジ細胞と毛誘導能を最適化した (特願 2008-213845) 毛乳頭細胞を用いて毛嚢再構成を行うという本研究のアプローチは未だ試みられたことがなく独創的で、将来のヒト毛嚢再生技術確立に向けての一助となると思われる。

現在のところ本技術では完全な毛嚢構造の再現は実現できていない。今後、さらに再現実験を繰り返し技術の安定化をはかる必要がある。また、ヒト由来の細胞を用いた研究では利用可能な細胞数がどうしても限られる。実験の遂行に必要な細胞数を確保するためには培養操作が必須である。今後は、ヒト毛乳頭細胞の培養条件のさらなる適正化を試みるとともに、本研究で用いたアプローチを利用して、CD200 バルジ細胞の特性を維持する培養条件を確立することが必要となる。また、毛嚢立体構造の再現は、現在のところ細胞のもつ組織再構築力にたよっているが、ヒト毛嚢はマウスに比べ大きく複雑な構造をもつため、バイオマテリアルの足場を利用するなど立体構築の再現にも今後工夫が必要であろう。

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 6件)

Ohyama M, Zheng Y, Paus R, Stenn, KS. The Mesenchymal component of hair follicle neogenesis: Background, methods and molecular characterization. *Exp Dermatol*, in press. 査読有

Kiso T, Tanaka S, Saba R, Matsuda S, Shimizu A, Ohyama M, Okano HJ, Shirotori T, Okano H, Saga Y. The disruption of Sox21-mediated hair shaft cuticle differentiation causes cyclic alopecia in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, in press. 査読有

Miura M, Dekio I, Yamasaki Y, Ohyama M. Sparing of the bulge area could preserve intact lower portion of hair follicles in a case of tufted folliculitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 23(1): 87-89 (2009)、査読有

Ohyama M Advances in the study of stem-cell enriched hair follicle bulge cells: A review featuring characterization and isolation of human bulge cells. *Dermatology*, 214(4):342-351 (2007)、査読無

Ohyama M Hair follicle bulge: A fascinating reservoir of epithelial stem cells. *J Dermatol Sci*, 46(2):81-89 (2007)、査読有

Ohyama M, Vogel JC, Amagai M. Gene ontology analysis of human hair follicle bulge molecular signature. *J Dermatol Sci*, 45: 147-150 (2007)、査読有

[学会発表](計 5件)

Ohyama M "Use of canine hair follicle epithelial hair follicle stem cells for the exploration of novel regenerative medicine approaches", BCRT/BMBF Workshop, "Exploitation of hair follicle stem cells in skin defect healing" Berlin, Germany (2008.6.19)

Kobayashi T, Shimizu A, Amagai M, Iwasaki T, Ohyama M. Identification of human bulge cell counterpart in canine hair follicles: A valuable model for stem cell investigation. International Investigative Dermatology 2008, Kyoto, Japan (2008.5.17)

Ohyama M, Shimizu A, Kobayashi T and Amagai M. Microarray analysis of freshly microdissected intact human dermal papilla identified upregulation of

genes that could contribute to biological distinctiveness. International Investigative Dermatology 2008, Kyoto Japan (2008.5.16)

Ohyama M. "Dissecting out molecular signatures of hair follicle key components: Implication of human hair follicle regeneration" Satellite Symposium on Hair Research, International Investigative Dermatology 2008 Kyoto, Japan (2008.5.13)

大山 学、清水 篤、天谷雅行. ヒト毛乳頭の molecular signature の解析 - 毛乳頭細胞の何が特別なのか? - 第14回分子皮膚科学フォーラム 松山、(2007.9.15)

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: 特許権

発明者: 大山 学、天谷雅行

権利者: 学校法人慶應義塾

種類: 特許出願

番号: 2008-213845

出願年月日: 2008年8月22日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ

http://web.sc.itc.keio.ac.jp/derma/r_research/project4.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

大山 学 (MANABU OHYAMA)

慶應義塾大学・医学部・講師

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

石河 晃 (AKIRA ISHIKO)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号: 10202988

齋藤 昌孝 (MASATAKA SAITO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 30306774

(3)連携研究者

岩崎 利郎 (TOSHIRO IWASAKI)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・

教授

研究者番号: 50262754