

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16993

研究課題名（和文）上皮系毛包幹細胞の単離培養法の確立と熱傷・皮膚潰瘍に対す再生治療法の開発

研究課題名（英文）Two Isolation methods for follicular stem cells of human hair follicles

研究代表者

加藤 晴之輔（Kato, Harunosuke）

自治医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：30444087

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：毛包バルジ部に存在する毛包幹細胞（follicular stem cell; FSC）は、皮膚の付属器も含めたすべての構造を再生できる、能力の高い上皮系幹細胞であるが、効率の良い単離培養法が確立しておらず、研究が進んでいない。本研究では、既存法を改変することで、より効率の良いFSC単離培養法の開発を行った。ヒトFSCは、酵素法、及びエキスプラント法により高効率に単離培養できることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、広範囲重症熱傷の治療に導入されている培養表皮は、表皮前駆細胞（基底角化細胞 basal keratinocyte; BK）に由来するものが使用されている。BKは、上皮化能が小さく、3度熱傷をそれ単独で上皮化することができないため、植皮術との併用が必要である。

本研究では、上皮系幹細胞で、BKよりも能力が高いことが想定されるFSCを安定的に調製する方法の開発に挑戦し、概ね確立することができた。今後は、上皮表皮化能などに関してBKと比較する。培養表皮の細胞源としてFSCが利用可能であれば、臨床的な貢献度は高いと言える。

研究成果の概要（英文）：Follicular stem cell (FSC) is a one of epithelial stem cells, which is localized in other root sheath of hair follicle. In this study, I established two methods for effective isolation and expansion of human FSCs from hair follicles.

研究分野：形成外科学

キーワード：再生医療 毛包幹細胞 毛根鞘細胞 上皮系幹細胞 幹細胞

1．研究開始当初の背景

培養表皮の歴史は古く、30 年以上前のことである。現在、広範囲重症熱傷患者に保険適応になっている上皮化再生医療として、上皮系前駆細胞（表皮基底細胞 Basal Keratinocytes; BK）を用いた自家培養表皮（ジェイス®）がある。平均約 1000 万円と極めて高額にも関わらず、その効果は急性期の一時しのぎに過ぎず、植皮術との併用が避けられないという現状がある。皮膚欠損治療の多くは、いまだに昔ながらの植皮術が広く行われているが、熱傷よりも条件の悪い、難治性潰瘍においては、植皮術でも効果がない（＝生着しない）。これは、材料として使用している培養 BK の能力の限界に由来するところが大い。したがって、BK を上回る上皮再生能（生着率、表皮厚、バリア機能）を持ち、迅速に創を塞ぐことが可能な治療法の開発が急務である。

毛包に存在する上皮系毛包幹細胞（Follicular epithelial stem cells; FSC）は、BK に比べてはるかに能力が高いことが知られている。しかし、ヒト毛包組織は入手が極めて困難であるため、研究者がほとんど居ないのが現状である。さらに FSC を安定的に調製する方法も確立しているとは言えず、その高い潜在性にも関わらず、研究は全く進んでいない。

FSC は、*in vivo* では、G1/G0 期の状態が長く続き細胞周期が遅い幹細胞である (Cotsarelis G, *et al.*, Cell, 1990) が、発生期、創傷治癒期、毛周期の進展など、必要時では高い細胞増殖能を持つ。また、毛包バルジ部に存在する FSC は皮膚の付属器を含む全ての構造を再生できる高い分化能も持つことが知られている。

FSC 調製法は、組織分散に使用する酵素の種類や回収法（エキスプラント法、シングルセル化法）の異なるものが、複数のグループより報告されている（Moll I *et al.*, Arch Dermatol Res, 1996 等）。これらで共通する問題として、なんらかの理由により FSC の回収効率は高く無く、例えば 10 本の毛包組織を同じように処理しても、細胞回収に至る毛包組織は 1～2 本に限られる。

2．研究の目的

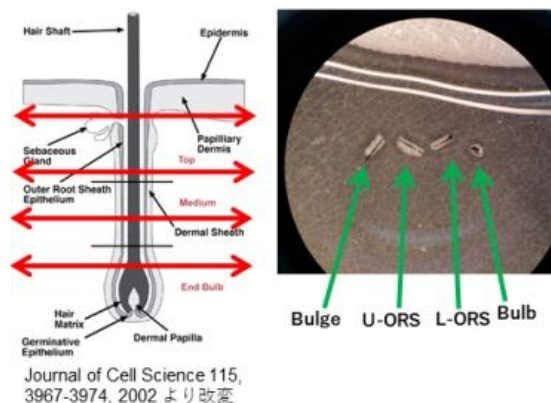
FSC は、初代細胞が少数であっても、1 回の継代で 10 倍は増殖するため基礎研究を行うには十分な細胞数を確保できるが、広範囲重症熱傷の治療のように細胞を多数必要とする自家細胞移植治療の細胞とするには不十分である。本研究では、まずはどの患者の毛包組織からも安定的に初代 FSC を回収する方法を確立する。

3．研究の方法

まずは、初代 FSC を安定的に回収する方法の確立を目指した。既に報告されている方法を、改変する形で、複数のエキスプラント法、及び酵素処理法を同ドナーで比較し、ドナー特性に依らず、安定的に初代 FSC を回収できる方法を検討した。

エキスプラント法は、回収後の組織を培養皿へ固定する方法などの条件を振った。

酵素法は、トリプシン、コラゲナーゼ、ディスパーゼ等の複数の消化酵素について、酵素濃度、反応時間、反応温度の条件を振った。さらに、ヒト毛包の採取部位の最適化を行うために、毛包組織の 4 領域バルジ膨大部（Bulge）、外毛根鞘上部（U-ORS）、外毛根鞘下部（L-ORS）、バルブ毛球部（Bulb）ごとに FSC の回収も行った【図 1】。

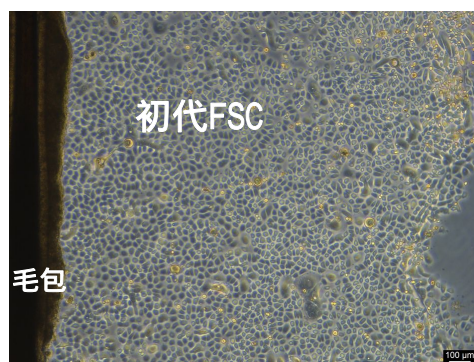


【図 1】毛包の4領域

4．研究成果

エキスプラント法による FSC の調製：

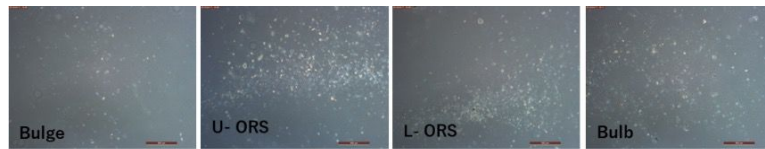
エキスプラント法による調製では、皮膚組織から実体顕微鏡下で段階的に外毛根鞘を単離する際に、外毛根鞘周囲の細胞外マトリクスを注意深く除去する操作、及び外毛根鞘を培養皿に接着させるための重石として、スライドガラス片で固定する操作で、初代 FSC を効率よく回収できるようになった【図 2】。



【図 2】エキスプラント法によるFSCの調製
ヒト毛包組織からoutgrowthしたFSCの検鏡像

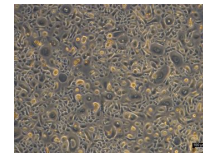
酵素法による FSC の調製：

酵素法による調製では実体顕微鏡下で単離した外毛根鞘をある酵素条件（詳細情報は、論文投稿前のため非開示）で、酵素処理してシングルセル化した後に培養皿へ播種する操作により、初代 FSC を安定的に回収できるようになった。【図 1】で示した毛包 4 領域（Bulge、U-ORS、L-ORS、Bulb）を分離後、各部位ごとに FSC の調製を行った【図 3】。初代 FSC は、一般的な培養細胞と同様に、継代培養が可能だった【図 4】。FSC の凍結保存も問題なく、起眠後も継代培養が可能だった。



【図 3】ヒト毛包組織からの FSC の調製

各部位由来の FSC を単離培養し 2 日後の顕微鏡像を示す。



【図 4】FSC の継代培養

以上から、本研究により、初代 FSC を安定的に回収し、培養 FSC を維持する手法が概ね確立した。当初は、培養 FSC を用いた動物実験を計画していたが、初代 FSC の調製法の最適化に時間が掛かり、FSC 調製法の開発が本研究での成果となった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------