

令和 4 年 4 月 13 日現在

機関番号：32607  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2019～2021  
課題番号：19K08781  
研究課題名(和文) 自己毛包幹細胞由来幹細胞含有バイオマテリアルを用いた脊髄損傷部と心不全の再生医療

研究課題名(英文) Regenerative medicine of spinal cord injury and heart failure using biomaterial including hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells

研究代表者  
天羽 康之 (Amoh, Yasuyuki)  
北里大学・医学部・教授

研究者番号：10306540  
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)：本研究期間中にまず我々はラット毛包幹細胞からのドパミン産生細胞の分離に成功した。我々はマウス毛包幹細胞をneural-induction mediumで培養することにより、毛包幹細胞からtyrosine hydroxylase陽性のドパミン産生細胞が分化することを確認した。マウス心筋細胞への分化能を応用した研究では、イソプロテレノールの添加が心筋細胞への分化を促進する因子であることを明らかにした。さらにイソプロテレノールに加え、アクチビンA、BMP4、塩基性線維芽細胞増殖因子を添加し培養することにより、心筋細胞への分化が誘導され、拍動する心筋細胞のシートが形成された。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
ラット上唇髭毛包幹細胞の多分化能を証明し、脊髄損傷部の再生に成功した。さらに、毛包幹細胞由来の拍動する心筋シート作成に成功した。これらの成果は、第45回日本研究皮膚科学会総会等で発表した。今後は作成した心筋シートの生着能を確認予定。毛包幹細胞は腫瘍化のリスクが低く、ES細胞のような倫理面の問題もない。毛包幹細胞は有効な治療法の少ない脊髄損傷患者や重症心疾患患者への有効な治療法になると考える。

研究成果の概要(英文)：The bulge area of the hair follicle contains hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells. We implanted mouse green fluorescent protein-expressing HAP stem cell colonies enclosed on polyvinylidene fluoride membranes (PFM) into the severed thoracic spinal cord of nude mice. After implantation, we found the differentiation of HAP stem cells into neurons and glial cells. Our results also showed that PFM-captured GFP-expressing HAP stem-cell colonies assisted complete reattachment of the thoracic spinal cord. Moreover, we succeeded establishing the beating cardiac tissue sheets from the upper parts of mouse vibrissa hair follicles by this culture system. HAP stem cells have great potential to form the beating cardiac tissue sheets.

研究分野：再生医療

キーワード：幹細胞 再生医療 毛包 皮膚

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々は世界に先駆けて皮膚毛包に分布している毛包幹細胞を発見し、心筋細胞・神経細胞・グリア細胞・角化細胞等に分化することを明らかにした。さらに神経細胞の一部はドパミン産生細胞になることや (1)、PFM膜に定着させた毛包幹細胞が脊髄損傷部を再生することを明らかにした (2)。

### 2. 研究の目的

毛包幹細胞を用いた再生医療は、倫理面や拒絶反応の問題がなく、他部位の成体組織幹細胞と比較して、患者への採取リスクが低いことから、早期の臨床応用が期待される。本研究期間に我々は、自己毛包幹細胞由来の心不全に対する心筋シート移植、さらに末梢神経と脊髄損傷部への毛包幹細胞含有神経再生シート移植による再生医療の実現を目標にする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 動物

トランスジェニック C57BL/6J-EGFP マウス (GFP マウス) は大阪大学微生物病研究所 (Osaka University, Osaka, Japan) から入手した。C57BL/6J マウスはCLEA ジャパンから入手した (Tokyo, Japan)。Crlj: nu/nu マウス (ヌードマウス) はオリエンタルバイオサービス (Tokyo, Japan) から入手した。全ての動物に対する手順はアメリカ国立衛生研究所 (National Institutes of Health; NIH) のガイドラインに従い、北里大学医学部の動物実験倫理委員会による承認されている。動物の苦痛を最低限にし、使用する動物の数を減らすことに尽力した。

#### (2) ヒゲ毛包の分離

我々は過去の論文で示したように C57BL/6J マウスからヒゲ毛包を分離した。移植に用いるヒゲ毛包を右もしくは左側より分離するのは、過去に示したように双眼顕微鏡下で解剖した。

#### (3) PFM 上で培養し定着した HAP 幹細胞の移植

GFP もしくは非 GFP-C57BL/6J マウスより分離したヒゲ毛包の上部を 10% ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum; FBS), 50mg/ml ゲンタマイシン (GIBCO, NY, USA), 2mM L-グルタミン (GIBCO), 10mM HEPES (MP Biomedicals, CA, USA) を加えた DMEM (Sigma-Aldrich, MO, USA) 培養液内で 4 週間培養した。増殖した HAP 幹細胞を分離し、2% B-27 (GIBCO, NY, USA), 5ng/ml 線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor; bFGF) (Millipore, CA, USA) を加えた DMEM/F12 (GIBCO, NY, USA) 培養液に移動した。1 週間後、移動した細胞は HAP 幹細胞コロニーを形成した 6, 19。HAP 幹細胞コロニーはその後、PFM (Millipore, Darmstadt, Germany) 上に定着させ DMEM 培養液内で 5 日間培養した。

#### (4) 脊髄損傷モデルと移植

マウスの胸髄損傷は局所麻酔下で行った。マウスの背部に対し約 1.0cm の縦方向切開を行い、胸椎を露出した。剪刀によって第 10 椎弓を切除し、胸髄の硬膜を露出した。20 分間 20g の重りをつけた 18 ゲージ針で圧迫して胸髄を損傷した。HAP 幹細胞コロニーが定着した PFM を 3mm の円盤状にカットし、損傷胸髄に移植した。コントロール群は PFM のみを損傷胸髄に移植したマウスと、脊髄損傷のみ行ったマウスの 2 群とした。切開線はナイロン糸を用いて閉創した。移植後、切除した椎弓の部位は傍脊柱筋群と筋膜で被覆した。その際筋膜と皮膚はそれぞれ縫合した。7 週間後、HAP 幹細胞コロニーを移植した損傷胸髄を摘出し、蛍光顕微鏡を用いて直接観察した。更にその神経サンプルは HE 染色と免疫染色を行った。

#### (5) ラット由来毛包幹細胞の多分化能証明

ラット上唇髭毛包を採取し、毛包幹細胞領域を含む毛包上部を DMEM-10%FBS で培養し、増殖した細胞が、神経細胞、グリア細胞、ケラチノサイト、平滑筋細胞、心筋細胞に分化することを確認した。

#### (6) 毛包幹細胞由来心筋シートの作成

毛包幹細胞領域を含む毛包上部を isoproterenol、basic fibroblast growth factor、activin A、bone morphogenetic protein 4 添加 DMEM-10%FBS で 2 週間培養し、毛包間に拍動する心筋シートを作成した。シート内に心筋細胞が分化増殖していることを免疫染色 (抗トロポニン T (cTnT) 抗体陽性) で確認した。さらに、心筋細胞拍動に伴う細胞内カルシウム濃度変化を共焦点レーザー顕微鏡で確認 (Ca イメージング) した。

### 4. 研究成果

#### (1) HAP 幹細胞コロニーは PFM 上で神経細胞とグリア細胞に分化する (3)

免疫蛍光染色では、PFM 上で培養し定着した HAP 幹細胞コロニーが神経細胞とグリア細胞に分化していることを示した。

(2) PFM 上で培養し定着した HAP 幹細胞をヌードマウスの損傷した脊髄内に移植すると、神経細胞とグリア細胞に分化する (3)

HAP 幹細胞が定着した PFM を径 3mm の円盤状にカットし、マウスの損傷胸髄内に移植した。移植 7 週間後、ヌードマウスの損傷胸髄を蛍光顕微鏡で直接観察したところ、GFP を発光する HAP 幹細胞が PFM から進展し、損傷胸髄を接合する所見を認めた。免疫蛍光染色も同様に損傷脊髄が接合し、HAP 幹細胞は神経細胞とグリア細胞への分化を示した。

(3) PFM 上で培養し定着した HAP 幹細胞コロニーを損傷脊髄に移植すると再接合を促進する (3)  
C57BL/6J マウスの損傷胸髄に対して、PFM 上で培養し定着した HAP 幹細胞コロニーを移植したところ、7 週間後に胸髄は再接合した。HE 染色では胸髄の損傷部位に多数の紡錘形細胞が増殖していた。免疫染色では移植した HAP 幹細胞は神経細胞とグリア細胞に分化していた。一方、PFM のみ移植したマウス、移植なしのマウスはともに胸髄の損傷部位に肉芽組織がみられた。免疫染色上、その肉芽組織内では神経細胞とグリア細胞への分化が確認できなかった。

(4) マウスに移植した HAP 幹細胞は運動機能の回復を促進した (3)

C57BL/6J マウスの損傷胸髄に塊状にした HAP 幹細胞コロニーを移植後、7 週間にわたり BMS スコアでマウスの運動機能を定量化した。BMS スコアは幹細胞移植後 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 日目にそれぞれ評価した。我々は PFM 上で培養し定着した HAP 幹細胞を移植したマウス、PFM のみ移植したマウス、移植なしのマウスでそれぞれ BMS スコアを比較した。

HAP 幹細胞移植群 vs. PFM 移植群の比較では 35 日目 ( $P = 0.042$ ), 42 日目 ( $P = 0.042$ ), 49 日目 ( $P = 0.030$ ) でそれぞれ有意差を認めた ( $P < 0.05$ )。HAP 幹細胞移植群 vs. 移植なし群の比較では 28 日目 ( $P = 0.032$ ), 35 日目 ( $P = 0.032$ ), 42 日目 ( $P = 0.013$ ), 49 日目 ( $P = 0.015$ ) でそれぞれ有意差を認めた ( $P < 0.05$ )。

(5) ラットからの心筋誘導研究では、しっかりした心筋線維構築を持つ心筋シートを作成することに成功した (4)

現在、前記の動物モデルの移植実験に加えて、人の毛包からの心筋線維の作製、ドパミン産生細胞の誘導を行っている。作成が成功すれば免疫不全動物への移植に移行する予定である。

(6) ラット由来毛包幹細胞の多分化能の証明 (4)

ラット上唇髭毛包を採取し、毛包幹細胞領域を含む毛包上部を培養した。増殖した細胞が、神経細胞、グリア細胞、ケラチノサイト、平滑筋細胞、心筋細胞に分化することを確認した。

毛包幹細胞由来心筋細胞に isoproterenol、propranolol を各々加え、isoproterenol で拍動増加、propranolol で拍動減少を確認し、受容体の存在を明らかにした。

毛包幹細胞領域を含む毛包上部を isoproterenol、basic fibroblast growth factor、activin A、bone morphogenetic protein 4 添加 DMEM-10%FBS で 2 週間培養し、毛包間に拍動する心筋シートを作成した。シート内に心筋細胞が分化増殖していることを免疫染色(抗トロポニン T (cTnT) 抗体陽性)で確認した。さらに、心筋細胞拍動に伴う細胞内カルシウム濃度変化を共焦点レーザー顕微鏡で確認 ( $Ca^{2+}$ イメージング)した。

<引用文献>

① Michiko Yamane, Nanako Takaoka, Koya Obara, Kyoumi Shirai, Ryoichi Aki, Yuko Hamada, Nobuko Arakawa, Robert M. Hoffman, and Yasuyuki Amoh

' Hair-Follicle-Associated Pluripotent (HAP) Stem Cells Can Extensively Differentiate to Tyrosine-Hydroxylase-Expressing Dopamine-Secreting Neurons '

Cells 2021; 10 (4), 864

② Koya Obara, Natsuko Tohgi, Kyoumi Shirai, Sumiyuki Mii, Yuko Hamada, Nobuko Arakawa, Ryoichi Aki, Shree Ram Singh, Robert M. Hoffman, Yasuyuki Amoh

' Hair-Follicle-Associated Pluripotent (HAP) Stem Cells Encapsulated on Polyvinylidene Fluoride Membranes (PFM) Promote Functional Recovery from Spinal Cord Injury. '

Stem Cell Reviews and Reports 2018, 15(1):59-66

Koya Obara, Kyoumi Shirai, Yuko Hamada, Nobuko Arakawa, Michiko Yamane, Nanako Takaoka, Ryoichi Aki, Robert M. Hoffman, and Yasuyuki Amoh

' Chronic spinal cord injury functionally repaired by direct implantation of encapsulated hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells in a mouse model: Potential for clinical regenerative medicine ' PLoS One 2022; 17(1), e0262755

Nanako Takaoka, Michiko Yamane, Koya Obara, Kyoumi Shirai, Ryoichi Aki, Yuko Hamada, Nobuko Arakawa, Robert M. Hoffman, and Yasuyuki Amoh

' New method making the longest myocardial fibers induced by rat hair-follicle associated pluripotent (HAP) stem cells ' Medical Molecular Morphology submitting

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Koya Obara, Natsuko Tohgi, Sumiyuki Mii, Yuko Hamada, Nobuko Arakawa, Ryoichi Aki, Shree Ram Singh, Robert Hoffman, Yasuyuki Amoh	4. 巻 9
2. 論文標題 Hair-follicle-associated pluripotent stem cells derived from cryopreserved intact human hair follicle sustain multilineage differentiation potential	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9326
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-45740-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kyoumi Shirai, Koya Obara, Natsuko Tohgi, Aiko Yamazaki, Ryoichi Aki, Yuko Hamada, Nobuko Arakawa, Shree Ram Singh, Robert M. Hoffman, Yasuyuki Amoh	4. 巻 59
2. 論文標題 Expression of anti-aging type XVII collagen (COL17A1/BP180) in hair follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells during differentiation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tissue and Cell	6. 最初と最後の頁 33-38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tice.2019.06.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nanako Takaoka, Michiko Yamane, Kohya Obara, Kyoumi Shirai, Yuko Hamada, Nobuko Arakawa, Ryoichi Aki, Robert M Hoffman, Yasuyuki Amoh
2. 発表標題 Hair-follicle associated pluripotent (HAP) stem cells from rat differentiate to beating cardiac tissue sheets.
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Michiko Yamane, Nanako Takaoka, Koya Obara, Kyoumi Shirai, Ryoichi Aki, Yuko Hamada, Nobuko Arakawa, , Robert M. Hoffman, Yasuyuki Amoh
2. 発表標題 Hair follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells can differentiate to dopaminergic neurons
3. 学会等名 第28回毛髪科学研究会 (28th SHSR) 学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Koya Obara, Aiko Yamazaki, Natsuko Tohgi, Kyoumi Shirai, Sumiyuki Mii, Yuko Hamada, Nobuko Arakawa, Ryoichi Aki, Robert M. Hoffman, Yasuyuki Amoh
2. 発表標題 Hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells captured on polyvinylidene fluoride membranes promote functional recovery of spinal cord injury
3. 学会等名 11th World Congress for Hair Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuko Hamada, Kyoumi Shirai, Sumiyuki Mii, Ryoichi Aki, Nobuko Arakawa, Robert M. Hoffman, Yasuyuki Amoh
2. 発表標題 Hair follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells can differentiate to dopaminergic neurons
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology
4. 発表年 2019年

〔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