

機関番号：12605

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20380171

研究課題名（和文）犬の毛包幹細胞の同定と再構築ならびに創傷治癒への応用

研究課題名（英文）Identification of canine hair follicle stem cells, reconstruction of hair follicle and its application to wound healing

研究代表者 岩崎 利郎 (IWASAKI TOSHIROH)  
東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：50262754

## 研究成果の概要（和文）：

本研究は、犬の皮膚の再生に重要であると考えられる幹細胞が毛包膨大部に存在することを始めて明確にし、つぎに幹細胞の特徴である高い増殖能とともに通常は増殖が遅いことを明らかにした。犬の毛包を免疫染色し、ケラチン 15, follistatin の発現が毛包膨大部で強く認められ、それらの細胞には SOX9, LHX2, TCF3, NFATC1 の遺伝子が見られた。さらに毛包幹細胞と真皮細胞を用いてヌードマウス皮膚に毛包が再構成されることを明らかにした。これらの研究は犬のみにとどまらず、ヒトの皮膚再生医学に進展を与えるものである。

## 研究成果の概要（英文）：

This research project demonstrated that canine hair follicle stem cells are located in a bulge area of hair follicles and high proliferation potency in the hair follicle stem cells. Stem cell marker proteins, K15, follistatin were stained intensely in the bulge area and related genes such as SOX9, LHX2, TCF4 and NFATC1 were expressed in hair follicle cells of bulge area. *In vivo* transplant of canine hair follicle stem cells with dermal papilla cells to nude mice successfully reconstituted the hair follicle and its adnexa in nude mouse skin. These results may give a new insight not only to canine hair follicle biology but also to human medicine.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2009 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

研究分野：獣医内科学

科研費の分科・細目：畜産獣医学・臨床獣医学

キーワード：犬、幹細胞、皮膚

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 犬の腫瘍切除後の創傷治癒あるいは瘢痕性脱毛の理想的かつ根本的な治療は皮膚の完全な再生であり、皮膚の再生医学は犬の

みならず人でも非常に重要である

(2) この目的に合致するのは犬の皮膚の幹細胞を用いた治療である

(3) 毛包幹細胞の増殖速度は非常に早く、

手術時に表皮細胞の自家移植が可能である

(3) マウスやヒトでは皮膚の毛包膨大部に増殖の非常に緩徐な毛包幹細胞のあることが知られている

(4) 犬や猫では毛包幹細胞に関する研究は非常に少なく、犬の毛包細胞に CD34 マーカーが有用かどうかを見た一報告のみである

(5) 犬の毛包の成長速度は早く、人にも構造が近いために、マウスモデルよりも人モデルとして活用できる可能性がある

## 2. 研究の目的

(1) 犬の毛包膨大部にヒトやマウスの毛包幹細胞と同じ性質を有する細胞が存在するかどうかを検討する

(2) それら細胞に特異的なマーカーが存在するかどうかをしらべる

(3) 毛包膨大部の細胞の増殖能についてしらべる

(4) 毛包膨大部の細胞の多分化能について検討する

## 3. 研究の方法

### (1) 毛包幹細胞マーカーの探索

ヒトやマウスにおいては毛包膨大部領域に存在する幹細胞の生物学的特徴が明らかにされつつあり、幹細胞を含む毛包膨大部の細胞に特異的なマーカーがいくつか明らかになっている。犬においても、ヒトやマウスで報告されている  $\alpha 6$  integrin、Keratin15(K15)、CD34(イヌバルジに発現ありの報告が一報のみあり)、CD200 などのマーカーが毛包膨大部に発現しているかについて免疫組織化学的手法を用いて検討した。

### (2) 毛包幹細胞の局在の同定

幹細胞の生物学的特徴を持った細胞が犬の毛包に存在するか否かについて、label retaining cells(LRCs)の方法を用いて検討した。同法は *in vivo* で幹細胞を同定するための最も信頼性のある手法とされ、幹細胞が通常の状態では細胞周期が遅いという特徴を利用し、細胞分裂時に核に取り込まれる BrdU などの物質を保持し続ける細胞 (LRCs) として幹細胞を検出する方法である。

犬の皮膚をヌードマウスに移植し、BrdU を一定期間投与し分裂した細胞をラベルした。そして一定の無投与期間の後、毛包におけるラベルを保持し続けた細胞 (LRCs) を検出した。その後さらに同定された犬毛包幹細胞の局在・部位についてヒトやマウスで得られている知見と比較し、検討したバルジ領域の細胞マーカーのうち使用可能なものがあるかどうか検討した。

(3) 犬毛包幹細胞の分離技術を確立するために、CD34 などの細胞表面マーカーを利用し、FACS sorting を用いて犬の毛包幹細胞を単離した。また毛包膨大部をマイクロダイ

セクションにより分離し、毛包膨大部の細胞を含んだ細胞集団を分離した。次に分離した細胞集団の生物学的特徴について colony forming assay を用いて解析した。毛包より分離した細胞集団のコロニー形成能を *in vitro* の培養系において、幹細胞としての特徴を持っているか評価した。

(4) 毛包、表皮および付属器の再構成  
得られた細胞集団の多分化能を評価するために *in vivo* での毛包、表皮、脂腺の再構成を試みた。雄の犬の毛包膨大部から採取したバルジ細胞と胎児マウスの真皮細胞を混合し、ヌードマウスの皮下に移植した。移植した皮膚は2週間後に回収し、組織学的に毛包および脂腺、表皮の再構成を観察した。また、形成された毛包のきつ限を明らかにするために、毛包の組織から DNA を採取し、Y 染色体特異的な配列を用いて PCR を行った。また得られた RNA から犬特異的なプライマーを用いてバルジ細胞マーカーである K15 および CD200、脂腺系マーカーである PPARG の発現について知るために RT-PCR を行った。

## 4. 研究成果

(1) 最初に犬の毛包上皮細胞を顕微鏡下でマイクロダイセクションにより4つの部分に区分し、各部分のケラチノサイトを分離培養した結果、いわゆる毛包膨大部と呼ばれる中間よりやや上で脂腺開口部付近からえられたケラチノサイトは、表皮ケラチノサイトと比較して、幹細胞の特徴の一つであるホロクロンを形成する率が高かった。これらの部分の細胞に BrdU を用いた免疫組織染色を行ったところ、これも幹細胞の特徴の一つである他の部分から得られた細胞より増殖が遅いことが示唆された。さらに犬の表皮ケラチノサイトと毛包膨大部のケラチノサイトを継代培養したところ、表皮ケラチノサイトでは5~6代しか継代できなかったのに対し、毛包膨大部細胞は15~17代の継代が可能であった。

(2) さらに、人およびマウスの幹細胞の細胞表面マーカーである CD34 あるいはケラチン 15 の免疫染色を上記4つの部位について実施した結果、中間部分である毛包膨大部細胞に強い陽性染色の結果が得られた。また、それらの細胞には人やマウスで報告されていた毛包幹細胞のマーカー遺伝子である SOX9, LHX2, TCF3, NFATC1 の遺伝子が強く発現していた。以上のことから犬の毛包膨大部には人やマウスで認められるのと同様な毛包幹細胞の特徴を備える細胞が存在する可能性があると考えられ、CD34 あるいはケラチン 15 などのマーカーを用いることにより、これらの細胞を毛包上皮細胞から分離することが可能であると推察した。

(3) 犬の毛包バルジ細胞が幹細胞の特徴の一つである多分化能を有するかどうかについて検討した。雄の犬のバルジ細胞と胎児マウスの真皮細胞を混合し、ヌードマウスの日かに移植したところ、2週間後に完全な毛包の形成が見られた。組織学的には毛包および脂腺、表皮の再構成が見られた。形成された毛包から得られたDNAからはPCRにより犬のY染色体特異的な配列が増幅された。また得られたRNAから犬特異的なプライマーを用いてRT-PCRを行ったところ、バルジ細胞マーカーであるK15およびCD200、脂腺系マーカーであるPPARGの発現が確認された。以上より犬のバルジ細胞が毛包および脂腺の再構成に関与したものと考えられた。

(5) 得られた成果の国内外の位置づけとインパクト

犬の毛包幹細胞についてはいままで全くというほど知られておらず、毛包幹細胞の分離・同定から毛包再構成の可能性を評価した成果は大きい。これにより、毛包幹細胞が得られれば、増殖の速いこれらの細胞を用いた創傷治癒への応用、脱毛症などへの応用が容易になると考えられた。また、犬の性質がマウスよりも人に近いために、これらの成果は人の幹細胞研究にも大影響を与えた。その証左として、3年間に発表された論文はいずれも獣医が買うあるいは人皮膚科学で一流の雑誌に掲載あるいは掲載の予定になっている。また世界獣医皮膚科学会においてこのテーマは招待講演として、世界中の獣医皮膚科研究者に評価された。現在も、創傷治癒への応用研究を実施中であり、引き続き優れた成果が期待される。

#### 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 3件)

1. Kobayashi T, Fujisawa A, Amagai M, Iwasaki T, Ohyama M: Molecular biological and immunohistological characterization of canine dermal papilla cells and the evaluation of cutaneous conditions. *Veterinary Dermatology*, 2011, in press 査読あり
  2. Kobayashi T, Iwasaki T, Amagai M, Ohyama M: Canine follicle stem cell candidates reside in the bulge and share characteristic features with human bulge cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 130: 1988-1995, 2010 査読あり
  3. Kobayashi T, Shimizu A, Nishifuji K, Amagai M, Iwasaki T, Ohyama M: Canine hair-follicle keratinocytes enriched with bulge cells have the highly proliferative characteristic of stem cells. *Veterinary Dermatology*, 20:338-346, 2009 査読あり
- [学会発表] (計 7件)
1. Kobayashi T, Iwasaki T, Ohyama M: Recent advances in canine hair follicle stem cell biology: 2011 Annual Meeting of Australian College of Veterinary Sciences. June 30-July 2, 2011, Gold Coast, Australia
  2. Kobayashi T, Iwasaki T, Amagai M, Ohyama M: Canine bulge cells share intrinsic properties with human bulge cells and provide a novel model for human hair follicles stem cell research. 6<sup>th</sup> World Congress for Hair Research, June 10-12, 2010, Cairns, Australia
  3. 小林哲郎、西藤公司、天谷雅之、岩崎利郎、大山 学: 犬の毛包幹細胞の同定および生物学的特徴の解析。第149回日本獣医学会学術集会シンポジウム: 再生医療の最前線~獣医臨床応用に向けた課題、2010年3月27日、東京。
  4. 小林哲郎、岩崎利郎、西藤公司、大山学: 犬の毛包幹細胞の同定および生物学的特徴の解析。第148回日本獣医学会学術集会、2009年9月25日-27日、鳥取。
  5. 小林哲郎、岩崎利郎、天谷雅之、大山学: 犬毛包はヒト毛包幹細胞研究に有用であるーバルジ細胞の類似性を中心にー。第15回毛髪科学研究会、2008年11月9日、福岡。
  6. Kobayashi T, Nishifuji K, Iwasaki T, Amagai M, Ohyama M: Identification and isolation of highly proliferative canine hair follicle bulge cells: promising candidate for stem cells. The 6<sup>th</sup> World Congress of Veterinary Dermatology, November 18-22, 2008, Hong Kong
  7. Kobayashi T, Iwasaki T, Nishifuji K, Amagai M, Ohyama M: Identification of human bulge cell counterpart in canine hair follicles: A valuable material for

stem cell investigation. International  
Investigative Dermatology Meeting, May  
14-17, Kyoto

〔図書〕(計 0 件)  
〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩崎利郎 (IWASAKI TOSHIROH)  
東京農工大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：50262754

### (2) 研究分担者

西藤公司 (NISHIFUJI KOJI)  
東京農工大学・大学院農学研究院・  
准教授  
研究者番号：20365422

大山 学 (OHYAMA MANABU)  
慶応義塾大学・医学研究科・講師  
研究者番号：10255424

### (3) 連携研究者

なし

研究者番号：