

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08658

研究課題名（和文）培養毛包iFollicleによる発毛メカニズムの解析とWntシグナルの意義

研究課題名（英文）Effects of Wnts on hair follicle formed by organ culture

研究代表者

王寺 幸輝（Ouji, Yukiteru）

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50343421

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：皮膚の付属器官である毛は、様々な役割を果たしている。近年、科学技術の進歩により、毛の発生を一部再現可能となったが、その『制御』は、いまだ実現できない。そこで、本研究では、毛の発生・制御を詳細に解析することで、発毛制御を試みる目標を立て、その実現のための細胞ツールを開発した。それを用いて毛の発生を精査した結果、Wntシグナルにより発毛を制御可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、発毛というイベントにおける細胞の追跡を可能とする「材料」を開発することに成功した。その成果は、発毛メカニズムを詳細に解析することのみならず、様々な条件変更により、発毛効率も比較することが可能となった。そのため、発毛に適した薬剤選択や、基礎的データの蓄積により、今後、脱毛治療などの発毛再生医療分野において、福音をもたらすと考える。

研究成果の概要（英文）：Hair, an appendage of the skin, plays a variety of roles. Recent advances in cell science and technology have made it possible to partially reproduce hair development. However, control of hair development has yet to be realized. Therefore, in this study, I developed cellular tools to analyze hair development and control in detail. Examination of hair development using these tools suggested that hair growth can be regulated by Wnt signaling.

研究分野：発毛再生医学

キーワード：発毛 細胞培養 幹細胞 毛包 遺伝子工学 再生医学 Wntシグナル 分化誘導

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

毛(毛髪)は哺乳類の特徴というべき皮膚の付属器官である。機械的刺激、紫外線、低温などから体を保護する以外に、老廃物排出、皮脂分泌、皮膚再生など大切な役割も果たす。近年、発展の目覚ましい細胞生物学的、分子生物学的解析より毛の発生を再現できることが可能となりつつあるが、毛の『制御』という意味ではいまだ実現できていないのが現状である。本研究では、毛の発生・制御を詳細に解析する細胞ツールを開発し、それを用いて毛の発生を精査することで、毛の“成り立ち”やその動態・メカニズムの解明を目指す。

2. 研究の目的

本研究計画では、毛の発生・制御を詳細に解析可能とする細胞ツールを樹立し、それを用いて毛の発生から移植毛までを精査・解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 分化モニター可能な細胞株の樹立

ケラチン遺伝子プロモーターとその下流に赤色蛍光タンパク質(DsRed)を組み込んだ plasmid (pK-DsRed) の構築を行った。次に、毛乳頭細胞特異的に GFP を発現可能な Tg マウス (Versican-Tg GFP マウス) の皮膚細胞 (V-SPC) を単離し、構築した pK-DsRed を遺伝子導入後、VK-SPC を樹立した。

(2) *in vitro* 分化誘導

VK-SPC を用いて、*in vitro* 分化誘導を行った。また、発毛に深く関わるとされる各種 Wnt を添加培養し、それらの影響を精査した。分化の成績は、培養後の total RNA を抽出後、real time RT-PCR により遺伝子発現を解析した。

(3) 幹細胞 (ES 細胞) を用いた毛包形成の条件検討

未分化幹細胞である胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いて、Lee らの方法に従い (*Nature*, 2020)、毛包細胞、毛包組織への分化誘導を行った。さらに、各種 Wnt を添加培養することで、分化誘導への影響を調べた。

(4) 分化した人工毛包の解析

VK-SPC、あるいは ES 細胞を用いて、3 次元的な培養により形成された毛包 (人工毛包) を形態学的に解析し、更に、固定後、凍結切片により組織学的に解析した。

4. 研究成果

(1) 分化モニター可能な細胞株の樹立

まず、発毛プロセスを可視化するために、表皮細胞に高発現する Keratin ファミリー遺伝子を解析・選択し、その遺伝子プロモーターのサブクローニングを行った。種々のプロモーター上流域を含む遺伝子の単離を行い、下流に DsRed 遺伝子を組み込んだ plasmid の構築を行い、Versican-Tg マウスより単離した細胞 (V-SPC) に遺伝子導入することで double Tg reporter 細胞株 (VK-SPC) を樹立し、3 つの細胞株を得ることができた。

(2) *in vitro* 分化誘導

次に、VK-SPC を用いて細胞培養により毛包の誘導を行った。培養開始から蛍光実体顕微鏡により上皮系細胞 (DsRed) や毛乳頭細胞 (GFP) に分化した細胞を連続的に追跡し、発毛発生をリアルタイムでモニターすることを可能とした (図 1)。更に、各種 Wnt を添加培養した成績では、分化マーカーの発現を促進する条件を認めた (図 2)。

図 1

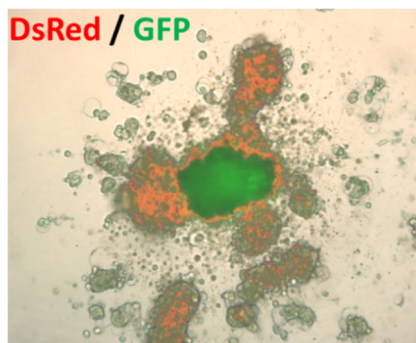
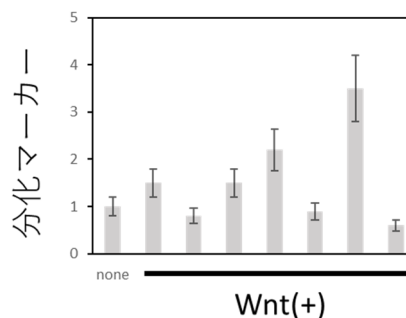


図 2



(3) ES 細胞を用いた毛包形成の条件検討

未分化 ES 細胞を用いて、毛包発生の再現性を試みた。既報を参考に分化誘導を試み、出現率に差はあるものの、毛包様構造を認めた (図 3)。さらに、各種 Wnt の影響を調べたところ、分化誘導の抑制、促進を認めた (図 4)。

図 3

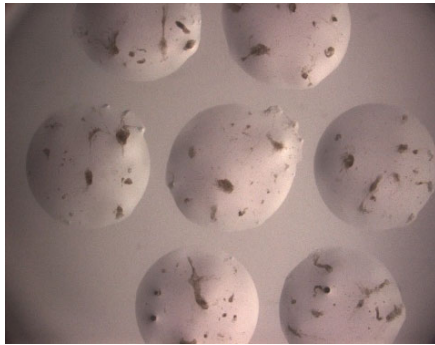
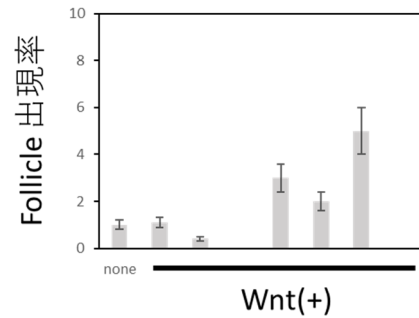


図 4



(4) 分化した人工毛包の解析

VK-SPC、あるいは ES 細胞より誘導した人工毛包の組織学的解析では、成熟した細胞 (AE13、AE15 陽性細胞など) を認め、分化誘導の条件 (各種 Wnt の添加) により発現率が異なることが明らかとなった (図 5)。

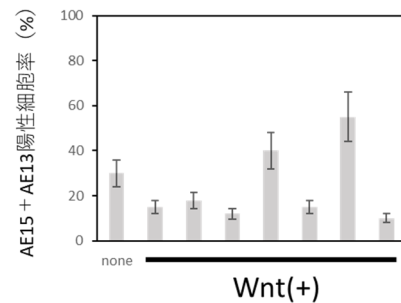
(5) 結論

発毛プロセスを可視化可能な細胞株の樹立に成功し、それらの分化をダイレクトに評価しながら、条件検討を行うことが可能となった。

(6) 展望

今後は、更なる条件検討を行うことで、高効率な人工毛包の創出を行い、NGS 解析等を組み合わせることで、それらの分化・発生プロセスを解析することが可能と考える。

図 5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ouji Y, Misu M, Kitamura T, Okuzaki D, Yoshikawa M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Impaired differentiation potential of CD34-positive cells derived from mouse hair follicles after long-term culture.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 11011
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-15354-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ouji Y, Hamasaki M, Misu M, Kitamura T, Hamano S, Yoshikawa M.	4. 巻 235
2. 論文標題 Schistosoma mansoni larvae in vitro cultures using Biomphalaria glabrata extracts.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Tropica.	6. 最初と最後の頁 106636
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.actatropica.2022.106636.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kim TK, Takeshima Y, Ouji Y, Nishimura F, Nakagawa I, Park YS, Yoshikawa M, Nakase H.	4. 巻 14
2. 論文標題 Expression and distribution of generated neurons and endogenous precursors in rat cerebral cortical venous ischemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 IBRO Neurosci Rep.	6. 最初と最後の頁 50-56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ibneur.2022.12.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Misu M, Yoshikawa T, Sugimoto S, Takamatsu Y, Kurosu T, Ouji Y, Yoshikawa M, Shimojima M, Ebihara H, Saijo M.	4. 巻 14
2. 論文標題 Rapid whole genome sequencing methods for RNA viruses.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Front Microbiol.	6. 最初と最後の頁 1137086
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2023.1137086.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Osaki D, Ouji Y, Sakagami M, Kitamura T, Misu M, Kitahara T, Yoshikawa M.	4. 巻 135
2. 論文標題 Culture of organoids with vestibular cell-derived factors promotes differentiation of embryonic stem cells into inner ear vestibular hair cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Biosci Bioeng.	6. 最初と最後の頁 143-150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-15354-9.	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 -

1. 著者名 西村知子、渡部一貴、中谷敏也、菊池英亮、三須政康、北村知嵩、根津大樹、山戸一郎、高濱峯、笠原敬、王寺幸輝、吉川正英	4. 巻 33
2. 論文標題 肝被膜下出血,その後好酸球増多,蕁麻疹出現を認めた肝蛭症の1例	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Parasitology	6. 最初と最後の頁 79-83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 王寺幸輝、濱崎めぐみ、三須政康、北村知嵩、尾崎大輔、島田賢子、濱野真二郎、吉川正英	4. 巻 32
2. 論文標題 蛍光標識住血吸虫による貝感染におけるリアルタイム可視化の試み	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Parasitology	6. 最初と最後の頁 34-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Misu M, Hirai N, Kitamura T, Ouji Y, Yoshikawa M, Kasamatsu T, Yoshihara S, Furukawa R, Nishimura T, Okuda N, Imakita N, Fukumori M, Fujikura H, Nishihara Y, Sekine T, Ogawa Y, Ogawa T, Mikasa K, Kasahara K, Sato M, Maeda K.	4. 巻 71
2. 論文標題 Two case of Taeniasis infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Nara Medical Association	6. 最初と最後の頁 59-63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 吉川 正英, 一色 厚志, 王寺 幸輝, 平位 暢康, 北村 知嵩, 三須 政康, 西村 知子	4. 巻 31
2. 論文標題 文献調査からみたわが国の糞線虫症の現況 2013年6月から2020年2月までの文献報告例の検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Parasitology	6. 最初と最後の頁 28-33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 王寺幸輝、三須政康、北村知嵩、吉川正英
2. 発表標題 長期培養した毛包由来CD34陽性細胞のキャラクターゼーション
3. 学会等名 第22回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北村知嵩、王寺幸輝、三須政康、吉川正英
2. 発表標題 肺由来無細胞化マトリックスシートを用いるES細胞から肺細胞への分化誘導
3. 学会等名 第22回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 王寺幸輝、濱崎めぐみ、北村知嵩、三須政康、島田賢子、中村梨沙、濱野真二郎、吉川正英
2. 発表標題 感染能を有する住血吸虫卵保存法の開発
3. 学会等名 第92回 日本寄生虫学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 王寺幸輝、北村知嵩、三須政康、西村知子、島田賢子、濱崎めぐみ、中村梨沙、濱野真二郎、吉川正英
2. 発表標題 貝を用いないin vitro住血吸虫培養システムの開発
3. 学会等名 第91回 日本寄生虫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ouji Y, Misu M, Kitamura T, Yoshikawa M.
2. 発表標題 Characterization of mouse hair follicle stem cells under long-term culture conditions
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三須政康、吉河智城、黒須剛、高松由基、王寺幸輝、下島昌幸、吉川正英、海老原秀喜、西條政幸
2. 発表標題 RNAウイルスをターゲットとした迅速、且つ簡便で正確な全ゲノム配列決定法の開発
3. 学会等名 第69回 日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉川正英、渡部一貴、中谷敏也、菊池英亮、西村知子、三須政康、北村知嵩、根津大樹、山戸一郎、高濟峯、笠原敬、王寺幸輝
2. 発表標題 肝被膜下出血およびその後の好酸球増多が診断の契機となった肝蛭症の1例
3. 学会等名 第33回 日本臨床寄生虫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 王寺幸輝、吉川正英
2. 発表標題 Wntシグナルによる発毛制御の試み
3. 学会等名 第21回 日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾崎大輔、王寺幸輝、阪上雅治、三須政康、北村知嵩、北原紘、吉川正英
2. 発表標題 前庭由来細胞培養上清と3次元培養によるES細胞から内耳有毛細胞への分化誘導
3. 学会等名 第21回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 王寺幸輝、濱崎めぐみ、三須政康、北村知嵩、尾崎大輔、島田賢子、濱野真二郎、吉川正英
2. 発表標題 蛍光標識住血吸虫による貝感染におけるリアルタイム可視化の試み
3. 学会等名 第90回 日本寄生虫学会・第32回 日本臨床寄生虫学会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三須政康、吉河智城、黒須剛、高松由基、王寺幸輝、下島昌幸、吉川正英、西條政幸
2. 発表標題 迅速、簡便かつ正確なRNAウイルスの全ゲノム配列決定法の確立
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 王寺幸輝、三須政康、北村知嵩、阪上雅治、尾崎大輔、島田賢子、吉川正英、濱崎めぐみ、濱野真二郎
2. 発表標題 住血吸虫をモデルとした人工in vitroライフサイクルの実現に向けて
3. 学会等名 第89回 日本寄生虫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 王寺幸輝、三須政康、吉川正英
2. 発表標題 プロスタミド誘導体の発毛促進作用とin vitro解析
3. 学会等名 第28回 毛髪科学研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 王寺幸輝、三須政康、北村知嵩、尾崎大輔、吉川正英
2. 発表標題 プロスタミド誘導体の発毛促進におけるWntシグナルの影響
3. 学会等名 第20回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 王寺幸輝、濱崎めぐみ、三須政康、北村知嵩、尾崎大輔、島田賢子、濱野真二郎、吉川正英
2. 発表標題 蛍光標識住血吸虫による貝感染におけるリアルタイム可視化の試み
3. 学会等名 第90回 日本寄生虫学会・第32回 日本臨床寄生虫学会 合同大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計6件

1. 著者名 王寺幸輝、吉川正英	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 5
3. 書名 医学のあゆみ 別冊“古くて新しい”住血吸虫症	

1. 著者名 吉川正英、王寺幸輝	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 7
3. 書名 医学のあゆみ 別冊“古くて新しい病気”トキソカラ症 温故知新	

1. 著者名 吉川正英、北村知嵩、王寺幸輝	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本臨牀社	5. 総ページ数 5
3. 書名 別冊日本臨牀 呼吸器症候群（第3版）IV その他の呼吸器疾患を含めて 呼吸器感染症 イヌ回虫症	

1. 著者名 Yoshikawa M, Nishimura F, Ouji Y, Nasase H.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 3
3. 書名 Clinical cases in tropical medicine: A 64-year-old Japanese man with generalized tonic-clonic seizures	

1. 著者名 王寺幸輝、吉川正英	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 5
3. 書名 医学のあゆみ “古くて新しい” 住血吸虫症	

1. 著者名 吉川正英、王寺幸輝	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 7
3. 書名 医学のあゆみ “古くて新しい病気” トキソカラ症 温故知新	

〔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
---------	---------