

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791753

研究課題名(和文)

非接着培養によるヒト線維芽細胞の毛包誘導

研究課題名(英文)

Fibroblast Aggregates Grown in Non-adhesive Culture Obtain Hair Inductive Ability

研究代表者

清水 瑠加 (SHIMIZU RUKA)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：50445392

研究成果の概要(和文):

毛包再生において、上皮と間葉の相互作用は重要である。マウス胎生期の真皮細胞は毛包誘導能を有していることが以前の実験で分かっているが、この性質は培養を行うと消失する。また真皮より分離され、培養中に凝集塊を形成する細胞(Skin derived precursors)も毛包誘導能を有している。このことから我々は、細胞が凝集塊を形成することが毛包再生と関わっているのではないかと考え、マウス皮膚・マウス肺・ヒト皮膚を用いて *in vitro* および *in vivo* での検討を行ってきた。免疫不全マウスへの細胞移植実験(*in vivo*)では、非接着培養により凝集塊を形成した細胞と表皮細胞との混合移植で、毛包の再生を認めた。

研究成果の概要(英文):

Interactions between epithelial and dermal cells are essential for hair follicle morphogenesis and maintenance. In experimental trials of hair regeneration, isolated dermal cells have been shown to possess hair-inducing capacity. However, dermal cells lose this potential immediately after cultivation. Sphere-forming multipotent cells derived from the dermis possess hair-inducing capacity. These previous findings raise the possibility that hair-inducing capacity depends on the process of sphere-formation. To address this issue, we compared the *in vitro* and *in vivo* characteristics of two-dimensionally cultured or thereafter sphere formation-induced dermal cells from fetal mice and human, and lung cells from adult mice. Sphere-forming cells but not two-dimensionally cultured cells possessed *in vivo* hair-inducing capacity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：毛包再生、非接着培養、線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

形成外科においては、熱傷や外傷受傷後の癒痕のために頭部禿創を生じ、これを悩む患者は多い。小さな範囲の病変であれば単純に切除が可能だが、頭皮という性質上、比較的

大きなものになると手術的にこれらを治療するのは困難である。自毛植毛という治療も行われているが、必ず donor site の犠牲が生じ、採取量にも限界がある。これら患者の QOL 増大のため、donor の犠牲を最小限に抑

えた毛髪の再生方法につき研究が必要であると考えた。

毛包の研究では、一般的に毛乳頭細胞が材料として用いられることが多いが、培養・継代を重ねていくと毛包誘導能が著しく悪化することが報告されている。したがって臨床の場での応用を考えた際には、より培養効率の高い方法を開発することが必須であると思われた。

2. 研究の目的

成獣の環境下での毛包再生を考える際、胎生期の毛包の発生と同様に上皮と間葉の相互作用が重要であるとされている。毛周期の誘導には一般的に毛乳頭細胞が必須であり、マウスにおいて毛乳頭細胞と表皮細胞を混合移植することで毛包誘導が可能との報告は多い。一方で我々はこれまでに、マウスの胎生期の真皮細胞や、skin derived precursors(以下 Skps)という多分化能を有する細胞が毛包誘導能を持つことを発見し、胎仔表皮細胞と免疫不全マウスの皮膚全層欠損層に混合移植することで、皮膚付属器を有した皮膚を再生することに成功している。しかしながら毛乳頭細胞を通常の二次元培養で培養すると、毛包誘導効率が悪化すると報告は多く、我々も胎仔由来の真皮細胞を一度でも接着培養にて継代を行うと、毛包誘導能が消失することを経験している。そこで我々は、細胞に強制的に凝集塊を形成させ、毛包誘導能がどう変化するかの研究を行ってきた。その根拠には、毛乳頭細胞に凝集塊を作らせることで、より効率よく毛包誘導効率が維持できるという近年の報告や、真皮より特殊な方法で培養された Skps は初代培養より細胞凝集塊を形成していることなどがある。つまり細胞が培養下で接着せず、細胞同士が凝集塊を形成することが、未分化な状態を維持し、毛包誘導能に関与しているのではないかという仮説を立てた。

3. 研究の方法

この仮説をもとに、マウス新生仔の皮膚由来の線維芽細胞を用いて毛包誘導が可能かどうか検証した。まずマウス背部皮膚より線維芽細胞を採取、酵素処理にて細胞を分離後、通常の10%ウシ胎仔血清の入ったDMEM培地で培養した。接着培養により数継代培養した後、寒天でコーティングした非接着性の培養皿を用いて、Skpの培養時と同様に、EGF、bFGF、B27入りのDMEM/HamF-12混合培地を用いて培養を行い、細胞凝集塊を作成した。非接着性培養皿にて3週間培養を行ったのち、同じく胎生17日-新生児のC57bl/6Jマウス皮膚から新たに表皮細胞を採取し、作成した真皮線維芽細胞凝集塊とともに、免疫不全マウス背部皮膚欠損創へ混合移植を行った。細

胞数は各々 1×10^7 個を使用した。コントロール群は、通常の接着培養を行った細胞と表皮細胞との混合移植群、もしくは表皮細胞のみの移植群とした。

次に、同実験をマウス成獣肺由来線維芽細胞、ヒト皮膚由来線維芽細胞を用いて行った。

4. 研究成果

真皮由来線維芽細胞は、非接着培養皿を使用すると細胞同士が接着し、 $50 \mu\text{m} \sim 200 \mu\text{m}$ の細胞凝集塊を形成した。これらの細胞集塊でのタンパク発現を調べたところ、sca-1、nestin、fibronectinが陽性であり、Skpsと類似したタンパク発現を認めた。Skpsの特徴として、神経細胞への分化を示すという点があるが、細胞集塊で同様の方法で神経細胞への分化誘導を行ったところ、一部でニューロンへの分化を認めたものの、Skpsほど高率には分化誘導できず、Skpsと同一の細胞であることは否定された。

細胞凝集塊移植4週後に組織を回収したところ、非接着培養で得られた真皮線維芽細胞凝集塊と、表皮細胞を混合移植した群では、白いscid mouseの皮膚の中に、移植したC57blの黒い毛包の再生を認めた。一方で、通常の接着培養を行い表皮細胞と混合移植した群や、表皮細胞のみを移植した群では、毛包の再生を認めなかった。組織像では、再生された皮膚において毛根や脂腺を含めた、ほぼ正常な毛包の形成が認められた。再生した皮膚は、正常皮膚と同様にLoricrin、Filaggrin、Keratin10、およびTransglutaminaseが陽性であり、正常な表皮および毛包の分化が示された。p63とKi67も正常皮膚と同様の分布を認め、再生した皮膚の表皮幹細胞が正常に分布し、細胞分裂が行われていることが示唆された。細胞をトレースするために、CMV early enhancer/chicken beta actin promoter-driven EGFP (CAG-EGFP) トランスジェニックマウス由来の真皮間葉系細胞を用いて同様の移植実験を行ったところ、GFP陽性細胞は毛乳頭と表皮直下の表皮が真皮側に陥入している部分に存在し、移植した間葉系細胞が毛包の再生に寄与していることが示唆された。

同実験をマウス成獣肺由来の線維芽細胞を用いて行ったところ、皮膚由来線維芽細胞同様、非接着培養にて凝集塊を形成したものとマウス胎仔表皮の移植群にて、毛包誘導が確認された。皮膚由来線維芽細胞のみならず、本来ならば毛包誘導能を有しない肺由来線維芽細胞を用いても同様の結果が得られたことは、細胞が凝集塊を形成することが毛包再生と関わっているのではないかという我々が立てた仮説を、大きく支持するものであった。

以上の結果を踏まえて、次にヒト真皮由来

線維芽細胞を用いて、毛包誘導が可能であるか否かを検討した。細胞は実験用に購入可能な細胞(クラボウ社製)を用い、まず10継代以上培養を行い十分な量の線維芽細胞を得た。その後、非接着性培養皿を用いて、3週間培養を行った。表皮は、胎生17日から新生児のC57bl/6Jマウス皮膚から採取した表皮細胞を用い、得られた細胞凝集塊と混合し、scid mouse背部皮膚欠損創へ移植した。移植細胞は、各々 1×10^7 個を使用した。4週間後組織を観察したところ、非接着培養で得られたヒト皮膚線維芽細胞凝集塊と、マウス表皮細胞を移植した群では、正常な付属器を伴った正常な毛包の再生を認めた。一方で、通常の接着培養を行った線維芽細胞と表皮細胞を混合移植した群では、毛包の再生を認めなかった。再生した皮膚は、正常皮膚と同様にLoricrin、Filaggrin、Keratin10が陽性であり、正常な表皮および毛包の分化が示された。また、毛乳頭細胞で発現が報告されているVersicanが、毛乳頭と結合織性毛包において発現していた。

毛乳頭細胞と異なり、皮膚線維芽細胞の場合には通常の二次元培養にて容易に増殖させることが可能であり、細胞の材料を得るといふ点では大きなadvantageとなる。また毛乳頭細胞ではなく、皮膚を含めた他の間葉系細胞から毛包誘導が可能であったことは、低侵襲な方法で毛包誘導が可能になると考えられる。ただし現段階では表皮側の条件として、マウス胎仔由来の表皮を用いた場合のみ移植実験が成功しており、更なる細胞培養方法、移植方法につき検討が必要である。

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1件)

Shimizu, Ruka; Okabe, Keisuke; Kubota,

Yoshiaki; Nakajima, Hideo;

Nakamura-Ishizu, Ayako; Kishi, Kazuo

“ Sphere formation restores and confers hair inducing capacity in cultured mesenchymal cells ”

Experimental Dermatology, [Epub ahead of print]

[学会発表](計6件)

ミニシンポジウム「非接着性培養法によるマウス皮膚線維芽細胞の毛包誘導能の

獲得」

清水瑠加

第29回日本臨床皮膚外科学会・

第16回日本臨床毛髪学会

2011年2月25日 沖縄

“ Fibroblast Aggregates Grown in Non-adhesive Culture Obtain Hair Inductive Ability :Cell Aggregation is a Key for Hair Regeneration ” (poster)

Shimizu R, Kishi K, Okabe K, Kubota Y

EMBO conference on Molecular & Cellular Basis of Regeneration & Tissue Repair

2010年9月26日 ポルトガル

「線維芽細胞の細胞凝集塊の形成と細胞の生存との関係」

清水瑠加、貴志和生、岡部圭介、久保田義顕

第19回日本形成外科学会基礎学術集会

2010年9月17日 横浜

「線維芽細胞の細胞凝集塊形成による未分化遺伝子の発現」

清水瑠加、貴志和生、岡部圭介、久保田義顕

第19回日本形成外科学会基礎学術集会

2010年9月17日 横浜

「頭部瘢痕に対する我々の治療法」

清水瑠加、貴志和生、岡部圭介

第2回日本創傷外科学会総会・学術集会

2010年7月30日 神戸

“ Fibroblast Aggregates Grown in Non-adhesive Culture Obtain Hair Inductive Ability :Cell Aggregation is

a Key for Hair Regeneration ”
Shimizu R, Kishi K, Okabe K, Kubota Y
#74 COEX MEETING
2010年5月21日 慶應義塾大学

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 瑠加 (SHIMIZU RUKA)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：50445392

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし