

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293246

研究課題名(和文)毛誘導に向け最適化したヒトiPS細胞由来上皮・間葉系細胞による毛包再生の試み

研究課題名(英文) Attempt to regenerate hair follicles using human iPSC cell-derived epithelial and mesenchymal cells optimized for trichogenicity

研究代表者

大山 学 (Ohyama, Manabu)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：10255424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、毛包の二大構成要素である上皮系・間葉系細胞をヒトiPS細胞から作成し、それらを用いて毛包構造の再現を目指した。上皮系は幹細胞マーカーを発現する細胞を含む分画を安定して作成可能になった。毛包の誘導に重要な間葉系細胞については、多分化能を備えた間葉系幹細胞の特性をもつ細胞の誘導に成功し、それをさらに毛誘導能をもつ毛乳頭細胞に近づけることができた。作成した細胞を正常上皮細胞と混合し免疫不全マウスに移植したところ頻度は低いものの毛包様構造が得られた。しかし、主として誘導効率の問題から全てがヒトiPS細胞由来の毛包構造の再生は困難で今後の改善が望まれた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to generate hair follicle structure using human induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived epithelial and mesenchymal components optimized for trichogenicity. With regards to epithelial cells, a stable protocol to induce keratinocytes containing stem cell marker expressing cells was established. For trichogenic mesenchymal component preparation, an approach to generate multipotent mesenchymal stem cell-like cells was developed. The resultant cells are further programmed to acquire hair inductive property of dermal papilla cells. When co-grafted with normal human keratinocytes into immunodeficient mice, those cells gave rise to hair follicle-like structures with moderate reconstitution efficiency. However, regeneration of hair follicle structure exclusively consisted of human iPSC-derived cells is still technically very challenging, mainly because of relatively low efficiency and adjustment of the timing in the production of both iPSC-derived subsets.

研究分野：皮膚科学

キーワード：毛包再生 ヒトiPS細胞 分化誘導 上皮-間葉系相互作用

1. 研究開始当初の背景

毛包は大きく分けてケラチノサイト(上皮系)と毛乳頭細胞、毛根鞘細胞(間葉系)により構成される皮膚付属器である。本体はケラチノサイトの鞘状構造からなり、その周囲を間葉系の細胞が包むように取り囲み、基部に毛乳頭と呼ばれる細胞塊をもつ。間葉系の毛乳頭から上皮系の毛母細胞に成長因子、シグナルが送られ毛幹(毛髪)が作り出される。また、毛周期を繰り返し自己再生する。その際には毛包の中間部のバルジに存在する上皮幹細胞と毛乳頭細胞が相互作用する。

毛包構造が失われるような難治性の脱毛症では毛包を再生し移植することが唯一の治療法である。マウスではケラチノサイトと毛乳頭細胞を混合し免疫不全マウスなどの体内に移植すると毛包が再生されるが、ヒトでは胎児や新生児由来の可塑性に富む細胞を使用してようやく再生が可能になる。

その理由として器官再生に必要な上皮-間葉系相互作用を十分に惹起できていないことがあげられる。上皮系幹細胞または幼若な間葉系細胞を用いることで、この相互作用が増強されることが示唆されるもののヒト成人からこうした細胞を採取することは困難であり代替の細胞供給源が求められていた。

2. 研究の目的

本研究の目的はヒト iPS 細胞からの分化誘導を利用して上皮・間葉系細胞の特性を毛誘導に向けて最適化し、それらを組み合わせ上皮-間葉系相互作用を増強することでヒト毛包の再生を試みることである。ヒト iPS 細胞から毛包幹細胞の特性をもつ細胞を誘導。並行して iPS 細胞から間葉系前駆細胞を誘導し、申請者らが開発した毛誘導能を再獲得させる条件下で毛乳頭細胞類似の毛誘導能を与え、両者を *in vivo* 環境に導入し毛包構造の再現を目指す。

3. 研究の方法

本研究は大きく下記の5段階からなる。

(1) ヒト iPS 細胞からの毛包幹細胞の特性を有する細胞への分化誘導

申請者らが既に確立したレチノイン酸と BMP4 を用いてヒト iPS 細胞から毛包上皮となるケラチノサイトを誘導する方法に最近報告された EGF を用いる手法を組合せ毛包幹細胞の特性を有する細胞を誘導する。

(2) ヒト iPS 細胞から間葉系幹細胞の特性を有する細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞から間葉系幹細胞への分化誘導技術は確立されていない。ヒト iPS 細胞から直接毛乳頭細胞へ分化誘導するのは技術的に困難であることが予想されるため、まず間葉系細胞への多分化能を有する間葉系幹細胞を作成する。毛乳頭細胞は毛包の再生の司令塔となる細胞でありその誘導は本計画の

鍵となる。

(3) ヒト iPS 細胞由来間葉系細胞からの毛乳頭類似細胞への分化誘導

前段階で得られた多分化能を有する間葉系細胞を WNT、BMP、FGF シグナルの活性化因子を含む毛乳頭細胞の特性を有する培地で処理し毛乳頭細胞の特性を付与する。

(4) 免疫不全マウスを用いた毛包再構成系の改良とその応用

従来から用いられてきた上皮系、間葉系細胞を単に *in vivo* の環境に混合移植するだけの系では十分な相互作用を惹起できない可能性があるためコラーゲンを有する細胞凝集を取り入れた新たな手法を開発する。

(5) ヒト iPS 細胞由来による毛包類似3次元構造の再現

複雑なヒト毛包の構造の再生のために *in vitro* で3次元構造体を作成しその移植を試みる。

4. 研究成果

(1) ヒト iPS 細胞からの毛包幹細胞の特性を有する細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞からレチノイン酸と BMP4 を用いてケラチノサイトへの分化誘導を促す際に高濃度の EGF を用いるとケラチン 15 に代表される毛包幹細胞マーカーを発現する細胞が効率良く作成されるとの報告があったことから、申請者らの確立した方法 (Veraitch et al. J Invest Dermatol 2013) と EGF を用いる方法の比較検討を試みた。

後者では分化誘導の初期からケラチノサイトの形態をとる細胞が見られる(図1)反面、予想外に多数の細胞死がみられ毛包再生実験に十分な数を得ることは困難であった(図2)。これまで継代培養後にケラチン発現を評価していなかった従来法でも正常成人ケラチノサイトと比較してケラチン 15 を発現する細胞を多く見た(図3)。

ただし従来法では継代後に重層扁平上皮に分化が進み角化する細胞が多いため、iPS 細胞から分化誘導した細胞を継代し増幅するためにカルシウム濃度の低い培地での培養が適していることも明らかになった。この方法により毛包再構成のための上皮細胞を準備することとした。

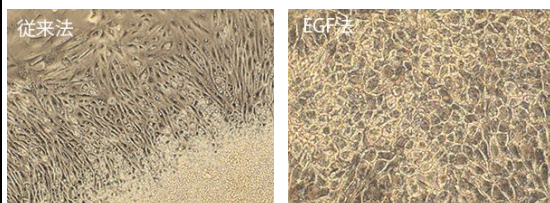


図1. ヒト iPS 細胞から上皮系細胞への分化誘導 初期では EGF を用いた方法(右)の方が分化誘導効率が良い(左下の凝集塊はまだ未分化のヒト iPS 細胞)

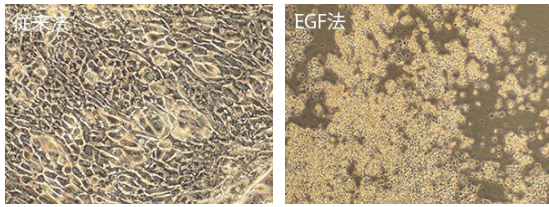


図 2 . 分化誘導途中経過 EGF 法では細胞死が多く見られるが従来法では良好な分化誘導が得られている。

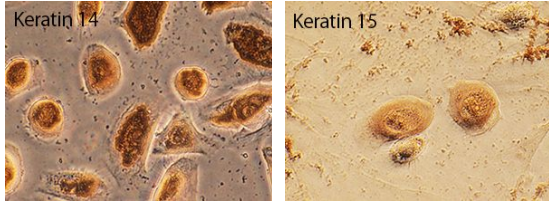


図 3 . ヒト iPS 由来ケラチノサイト 分化誘導して得られた細胞はケラチン 14 だけでなく毛包幹細胞マーカーであるケラチン 15 陽性細胞も含む (左、DAB 発色)。

(2) ヒト iPS 細胞から間葉系幹細胞の特性を有する細胞への分化誘導

間葉系細胞への分化誘導は各種方法を試行の後、PDGF、TGF、FGF 含有の血清無添加間葉系幹細胞培地とヒト細胞外基質でコーティングした培養ディッシュを用いる方法を確立した。胚様体形成は 2 日間、胚様体を培地で 9 日間誘導することで初代のヒト間葉系細胞を得た。さらに細胞純度を増すため 2-3 代にわたり間葉系幹細胞培地にて培養した (図 4)。

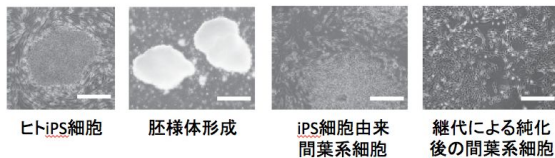


図 4 . 本研究で確立したヒト iPS 細胞から間葉系細胞への分化誘導法

本法で得られた細胞はヒト骨髄由来間葉系幹細胞で発現がみられる幹細胞のマーカーを発現しており (図 5)、また間葉系の 3 系統

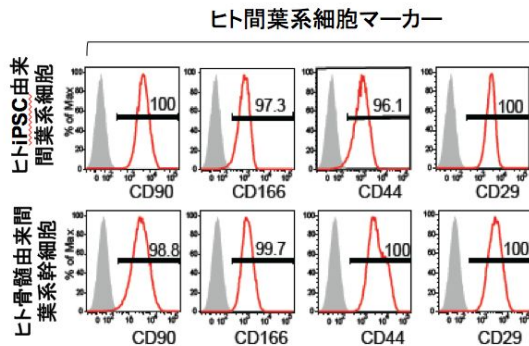


図 5 . ヒト iPS 由来間葉系細胞における間葉系幹細胞マーカーの発現 骨髄由来幹細胞と同等の発現様式を示す。

(骨、脂肪、軟骨) に分化したことから多分化能を有する間葉系幹細胞類似の特性を持つことが明らかとなった (図 6)。

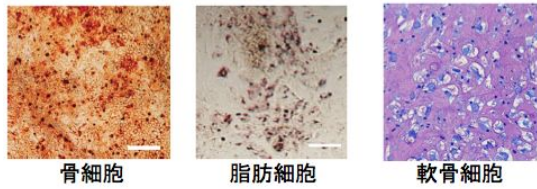


図 6 . ヒト iPS 細胞由来間葉系細胞が示した多分化能

CD271(LNGFR)+CD90(THY-1)+のヒト骨髄由来間葉系幹細胞分画は特に多分化能に富むことが報告されている。ヒト iPS 細胞から誘導して得た間葉系細胞を解析したところ、同様の細胞が含まれることが明らかになった (図 7)。

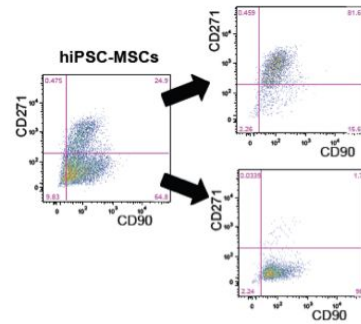


図 7 . ヒト iPS 細胞から得た間葉系細胞に含まれる CD271(LNGFR)+CD90(THY-1)+分画

これらの細胞はより可塑性に富むことが予想され、毛乳頭細胞の特性を備えた細胞への誘導に適している可能性が考えられた。

(3) ヒト iPS 細胞由来間葉系細胞からの毛乳頭類似細胞への分化誘導

申請者らによりヒト毛乳頭細胞の特性を失った細胞の特性を回復する *in vitro* の培養条件が確立されている (Ohyama et al. J Cell Sci 2012)。本研究でヒト iPS 細胞由来間葉系細胞をこの条件でさらに分化させたところ分化前と比較して異なった遺伝子発現プロファイルを示し、形態学的にもヒト毛乳頭細胞に類似した形態を示すことが明らかとなり、得た細胞を毛乳頭類似細胞: induced Dermal Papilla Substitute Cells (iDPSC) と称することとした (図 8)。

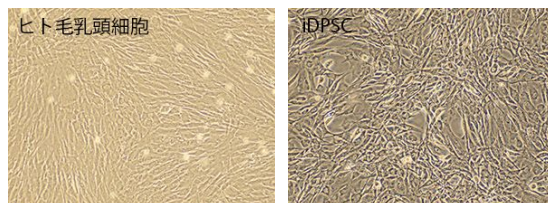


図 8 . 毛乳頭の特性を付加する培養条件にて誘導して得られた iDPSC やや多角形の形態を示し線維芽細胞とは形態学的に異なる。

さらに前述の CD271(LNGFR)+CD90(THY-1)+分画を用いて iPSC を作成したところ、誘導前と比較して毛乳頭細胞の活性の指標となるアルカリフォスファターゼを強く発現し WIF1、HEY1、WNT5A、IGF1、RGS2、LRP4 などのヒト毛乳頭細胞のマーカースも発現していた。

さらに iPSC の機能を検討するためヒト成人ケラチノサイトと共培養したところ、ヒト毛乳頭細胞と同等にケラチノサイトにおいて LEF1、TRPS1、MSX2 などの毛母細胞関連遺伝子の発現を増強し、上皮細胞と相互作用を示すことが示された。

以上より、iPSC はヒト毛乳頭細胞の特性の少なくとも一部を備えている可能性が示された。

(4) 免疫不全マウスを用いた毛包再構成系の改良とその応用

毛乳頭細胞の最も特徴的な機能は上皮細胞に働きかけて毛を誘導する能力（毛誘導能）である。当然、iPSC が毛誘導能を持つかどうかを検討する必要がある。そのためには安定したヒト毛包再構成系の確立が必要である。

これまで毛包再構成の実験は主としてマウスの細胞を用いて行われてきた。様々な方法が考えられてきたが、結局のところ基本原理はどの方法も同じであり、上皮系細胞と毛誘導能を有する細胞を混合移植することにある。ところが、同様の方法で細胞を混合した培養液を皮下などに移植してもヒト細胞では安定して毛包を再生することは困難であることが知られている。それには幾つかの理由があるが、一つには単に細胞を混合しただけでは上皮系細胞と間葉系細胞が一定の立体的位置関係をとることができずに両者がうまく相互作用できない可能性が考えられる。

そこで申請者らは理研 CDB 辻グループの報告(Toyoshima et al. Nat Commun 2012)を参考に、シリコン板とマトリゲルを用いた細胞移植系を考案した。この系では実際の毛包での位置関係を踏襲した形でゲルに高密度で封入したヒト毛乳頭細胞の上を同様にゲルに封入したヒトケラチノサイトで覆う(図9)。

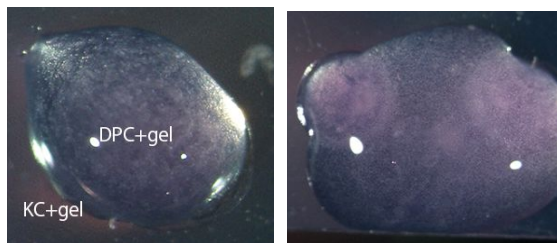


図9. 毛包再構成のためのヒト細胞とゲルよりなる構造体 シリコン板に毛乳頭細胞(DPC)をゲル封入したものをのせ、その上にケラチノサイトを含むゲルを被せる(左)。微細環境のヒト化のため線維芽細胞で覆い(右)シリコン板ごとマウス皮下に移植する。

またマウスの体内環境をよりヒトに似せるためさらにその外側をヒト線維芽細胞を含むマトリゲルにてカバーし免疫不全マウスの皮下に移植し、5-6 週後に採取し毛包構造の再生を確認した。すると皮下には囊腫様構造が認められ、その構造を実体顕微鏡したで解体したところ、完全な毛包ではないが毛包様構造が認められた(図10)。

成功率は約 70%であり申請者らの施設で行った従来法による正常ヒトケラチノサイトと毛乳頭細胞の単純混合移植系ではごく稀にしか同様の構造を認めなかったことから、実体顕微鏡下での構造確認にはかなりの労力を要するものの、再生効率の観点からは安定した実験系であると考えられた。

そこでヒト iPS 由来細胞による毛包再構成実験にはこの新たに確立した系を用いることとした。

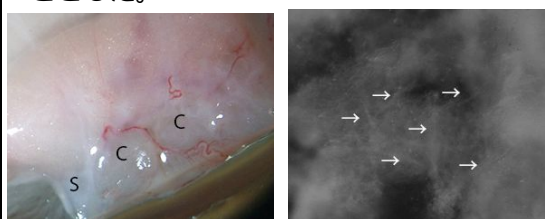


図10. 本研究で確立したヒト細胞を用いた毛包再構成系 図9で示した構造体を免疫不全マウスの皮下に移植後 5-6 週でシリコン板(S)上に囊腫様構造(C)が形成される。それを実体顕微鏡下で解体すると毛包類似構造()の形成をみる。

次いで本実験系を用いたヒト iPS 細胞から誘導した毛包細胞による毛包構造の再生を試みた。ヒト iPS 細胞から同時に上皮・間葉系の細胞を誘導することは分化誘導のタイミングを合わせる必要性、再構成実験に必要な細胞数を十分に確保するための実験スケールの大きさなどの観点から技術的に極めて困難であり、iPS 細胞由来の上皮細胞が毛包構造の少なくとも一部となりうることは申請者らにより既に示されている(Veraitch et al. J Invest Dermatol 2013) いること、毛誘導の要となるのは間葉系の細胞であることから、iPSC が毛誘導能を示すかどうかを検証することが本研究の焦点となった。

そこで、ヒト正常ケラチノサイトとヒト iPS 細胞由来間葉系細胞 CD271(LNGFR)+CD90(THY-1)+分画から作成した iPSC を用いて上記の方法で毛包再構成実験を行った。陽性コントロールとして iPSC の代わりに培養ヒト毛乳頭細胞を用いた。

陽性コントロール、iPSC とも上記のケラチノサイト、ヒト線維芽細胞との立体的位置関係を維持した移植実験においてシリコン板状に囊腫様構造を形成した。実体顕微鏡下に囊腫様構造を摘出し、慎重に構造を解体したところ、iPSC を用いたサンプル群でも検

出効率は陽性コントロール群の約半分（約35%）と劣りはするものの同様の毛包様構造を形成した（図11）。

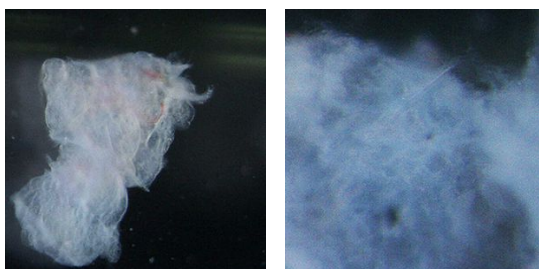


図11. iDPSC とヒトケラチノサイトにより再構成された毛包様構造 実体顕微鏡下で微細な針で囊腫構造（左）を解体すると毛構造が見える（右）。

図からも明らかのようにこの系で再構成される毛包類似構造は全長が2mmにも満たない微細構造であり光学顕微鏡下での形態学的検討は困難であった。そこで、得られた構造を走査型電子顕微鏡でさらに解析した。すると囊腫壁に囲まれた索条の構造物が確認され毛幹（毛髪）に特徴的な毛小皮に類似する構造も確認された（図12）。毛乳頭細胞または iDPSC を含まない群ではこのような構造は見られなかった。また、再生された構造からヒト毛包特異的な遺伝子の発現が検出された。

以上よりヒト iPS 細胞由来の iDPSC も不完全ながら毛誘導能を示すことが示唆された。

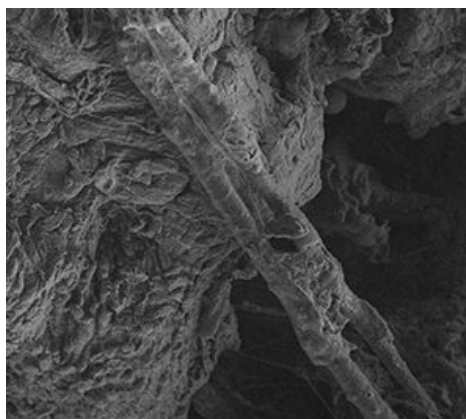


図12.ヒト iDPSC が誘導した構造体の走査型電子顕微鏡による解析

(6) ヒト iPS 細胞由来による毛包類似3次元構造の再現

前述のように毛包再構成を目的とする移植実験は正常コントロールを含めると5種類の細胞を約2か月にわたり分化誘導・培養し移植後も解析まで約2か月を要する実験系であることから、より簡便にヒト iPS 由来細胞の特性を評価可能であり、かつ毛包再構成実験にも応用可能な技術の開発が望まれた。ヒトケラチノサイトと毛乳頭細胞を Hang-drop 法という特殊な3次元培養法で共

培養すると約2週間程度で毛包の発生過程を再現したような間葉系細胞塊と上皮細胞よりなる構造を得ることができる（図13）。十分な追試はされていないが、正常細胞を用いて作成した類似の立体構造は免疫不全マウスへの移植実験により毛包様構造を再現するとの報告がある。そこでヒト通常および iPS 細胞由来ケラチノサイト、毛乳頭細胞または iDPSC を用いて類似の実験を試みたが細胞がうまく凝集せず同様の結果をえることは困難であった。おそらく毛誘導能の維持に必要な条件下では、細胞接着因子の発現低下などが生じ細胞凝集の妨げている可能性が考えられた（図13）。

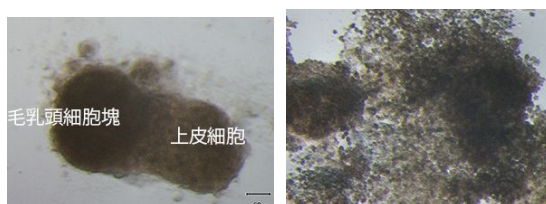


図13.ヒト細胞の3次元培養による毛包構造再現の試み Hang-Drop 法にて毛包に類似した構造を作成可能（左）だが毛乳頭の特性を維持する条件では細胞凝集が起きない。

以上より本研究課題で得られた主な成果をまとめると以下ようになる。

- ヒト iPS 細胞からの比較的安定した毛包上皮コンポーネントの供給系の確立
- ヒト iPS 細胞からの多分化能に富む間葉系幹細胞の特性を有する細胞への誘導法の確立
- ヒト iPS 細胞由来間葉系細胞で毛乳頭細胞の特性を誘導（iDPSC の作成）
- ヒト細胞を用いた毛包再構成系の改良
- ヒトケラチノサイトと iDPSC の免疫不全マウスへの移植による毛包様構造の再現

これらのうち主たる知見はすでに論文としてまとめ現在投稿中である。

また、想定外に得られた新知見として

- 我々の試みでは、EGF を用いたヒト毛包幹細胞の特性をもつ細胞を誘導する方法は分化誘導の効率は良いが細胞の生存率が低く実用化が困難であったこと
- 毛包のコンポーネントを全て iPS 細胞由来の細胞で賄おうとすると分化誘導の時期をあわせることなどが技術的に困難であること
- 毛乳頭の特性を維持する条件では3次元構造を作成するのが困難であること

などがあった。ケラチノサイトに関しては比較的容易に培養することが可能であることを合わせて考えると、今後はより高い毛誘導

能をもつ間葉系細胞をヒト iPS 細胞から誘導するための技術改良が最も重要な解決すべきトピックとなるだろう。

本研究で得られた毛包様構造は再構成される頻度も低く、きわめて微細であり現状ではこれ以上の解析が困難である。iDPSC の毛乳頭マーカーの発現レベルはヒト毛乳頭細胞と比較して弱いことを考慮すると再生された構造がどの程度「毛」を再現しているのか検討することは今後の課題である。

本研究で得たヒト iPS 細胞由来間葉系細胞に関しては今後、毛包再生以外にも再生医療への応用の可能性がある。また、遺伝子やマーカーの発現などの観点から少なくともいくつかの毛包細胞の特性を有する細胞をヒト iPS 細胞から誘導したことは今後の再生医療の発展に意義のあることと考えられた。

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5件)

Ouchi T, Morikawa S, Shibata S, Fukuda K, Okuno H, Fujimura T, Kuroda T, Ohyama M, Akamatsu W, Nakagawa T, Okano H. LNGFR+THY-1+ human pluripotent stem cell-derived neural crest-like cells have the potential to develop into mesenchymal stem cells. Differentiation e-pub ahead of print (2016) 査読有

pii:S0301-4681(15)30062-1.

doi:10.1016/j.diff.2016.04.003.

大山 学 iPS 細胞の毛包への誘導 日本臨床増刊号「再生医療」73 :193-198 (2015) 査読無

Ohyama M, Okano H. Promise of human induced pluripotent stem cells in skin regeneration and investigation. J Invest Dermatol 134: 605-609 (2014)

doi: 10.1038/jid.2013.376 査読有

[学会発表](計10件)

Ohyama M. “Recent progress on hair bioengineering” World Congress of Dermatology 2015, バンクーバー(カナダ) (2015.6.10) 招請講演

Ohyama M. “Current strategies for human hair follicle regeneration using stem or progenitor cells”, World Congress of Dermatology 2015, バンクーバー(カナダ) (2015.6.9) 招請講演

Veraitch O, Macubhi Y, Matsuzaki Y, Sasaki T, Tsukashima A, Amagai M, Okano H, Ohyama M: Use of human induced pluripotent stem cell-derived CD271+CD90+ mesenchymal stem cells for the generation of hair inductive dermal cells. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 大阪

(2014.12.12)

Veraitch O, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Amagai M, Okano H, Ohyama M. Induction of dermal papilla properties in highly potent CD271+CD90+mesenchymal stem cells generated from human-induced pluripotent stem cells. 94th Annual Meeting The British Association of Dermatologists, グラスゴー(英国) (2014.7.3)

Ohyama M. “Current strategy to enhance epithelial-mesenchymal interactions for human hair follicle bioengineering” 8th World Congress of Hair Research, 済州島(韓国) (2014.5.17) 招請講演

Ohyama M. “Promise of human iPS cells for hair follicle regeneration” 8th World Congress of Hair Research, 済州島, (韓国) (2014.5.15) 招請講演

Ohyama M. “Advantages of using human iPS cells for hair follicle bioengineering” British Society for Investigative Dermatology Meeting 2014, ニューキャッスル(英国) (2014.4.9) 招請講演

[図書](計2件)

大山 学:第6章 毛を増やす-再生医療
板見 智編 薄毛の科学 p111-40 (全160頁) 日刊工業新聞社、東京 (2016)
ISBN: 978-4-526-07528-5

[その他]

ホームページ等

“毛髪保存・再生プロジェクト”

<http://www.derma.med.keio.ac.jp/derma/medic/project/03.html>

“iPS 細胞から毛包再生、重い脱毛症の人の力に”

<http://www.skip.med.keio.ac.jp/frontline/voice/01/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大山 学 (MANABU OHYAMA)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号: 10255424

(2)研究分担者

天谷雅行 (MASAYUKI AMAGAI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号: 90212563

久保亮治 (AKIHARU KUBO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号: 70335256

(3)連携研究者

岡野栄之 (HIDEYUKI OKANO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号: 60160694