

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：57403

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06820

研究課題名(和文)低酸素環境が毛乳頭細胞スフェロイドの毛包誘導力に与える効果

研究課題名(英文)Effect of hypoxia culture on hair follicle induction ability of human dermal papilla spheroid

研究代表者

本田 晴香(古賀晴香)(HONDA, Haruka)

熊本高等専門学校・生物化学システム工学科・助教

研究者番号：90756983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、生体外における毛髪再生技術が注目されている。毛髪生産において重要な役割を果たす細胞の一つが「毛乳頭細胞(DP細胞)」である。申請者は、ヒト由来DP細胞の「スフェロイド+低酸素」培養を行うことで、生体外でDP細胞の毛髪生産能力を高めることが出来ると発想した。そこで本研究では、(1)ヒト由来DP細胞スフェロイド形成技術の確立、および(2)DP細胞への低酸素培養の効果を検証した。その結果、微細加工技術を利用することで、効率的にスフェロイドを形成可能な技術を確立した。一方、今回の低酸素培養条件では、ヒト由来DP細胞に対する低酸素培養の効果を見出すことが出来なかった。今後詳細な検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Recently, hair regeneration technique in vitro has attracted attention. "Dermal papilla cell (DP cell)" is one of the cells that play an important role in the hair production. Purpose of this study, human DP cell culture system using "spheroid and hypoxia culture" are developed to increase the hair induction ability of Human DP cells in vitro. In this study, (1) Establishment of Human DP cell spheroid formation technique and (2) Effect of hypoxia environment on hair follicle induction ability of Human DP cell were evaluated. From these results, Human DP cell spheroid formation technique could be established using microfabrication technique. However, hair follicles induction activity of Human DP cells did not significantly change under the hypoxia culture.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ヒト由来毛乳頭細胞 スフェロイド 低酸素培養 微細加工技術

1. 研究開始当初の背景

毛髪は、保温や紫外線からの保護などの機能面だけでなく、精神面にも影響を与える重要な器官である。近年、生体外における「毛髪再生」の実用化に向けた研究が、国内外で盛んに取り組みられている。

「毛包」は毛髪の生産において要となる部位であり、毛包を効率的に再構築することが毛髪再生のカギを握っているとも言える。この毛包形成を司っているのが毛乳頭細胞（以下 DP 細胞）であり、毛包再生研究の重要な細胞源として利用されている。

DP 細胞を用いた毛髪再生の実現のためには、大きく分けて3つのステップをクリアする必要がある。1つ目は生体外で DP 細胞を必要量まで増やすこと、2つ目は増やした DP 細胞の毛包誘導力を高めること、そして3つ目は、毛包誘導力を高めた細胞を移植する方法の確立である。申請者はこの中で、2つ目の「生体外で DP 細胞の毛包誘導力を高める」技術の確立が、毛包再生に向けて最も解決すべき課題であると考えた。

そこで申請者は、DP 細胞の毛包誘導力を高めるため「スフェロイド培養」が有効であると考えた。スフェロイドとは、ばらばらの細胞が集合した、いわば細胞の塊である(図1)。細胞培養で一般的に行われる単層培養法は、細胞が基板に接着して二次元的に広がり、生体内と全く異なる状態となってしまう、本来持っている機能を失ってしまう。一方、DP 細胞は生体内で「スフェロイド」のような三次元的な立体構造になっていると考えられている。生体外でスフェロイド状態を再現することによって、生体に近い機能、すなわち毛包誘導力の向上が期待できる。

申請者は、DP 細胞のスフェロイド化のみならず、さらに毛包誘導力を促進させる培養環境を作れないかと考え、「低酸素環境」に着目した。いくつかの細胞は、低酸素環境下で VEGF (vascular endothelial growth factor、血管新生因子) などのタンパク質を多量に分泌することが知られている。DP 細胞は、毛包の成長期に VEGF を分泌して DP 細胞自身の毛包誘導力を高め、さらに分泌された VEGF は、周囲の血管新生を促し、毛包の形成を促進すると言われている。そこで、「スフェロイド化」+「低酸素環境」で DP 細胞を培養することにより、DP 細胞の毛包誘導力を引き出すことができるのではないかと発想した。

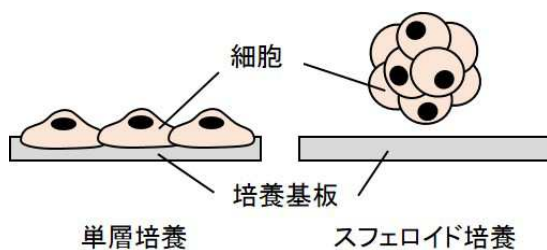


図1. 単層培養とスフェロイド培養

2. 研究の目的

本研究では、背景で述べた着眼点をふまえ、(1)ヒト由来 DP 細胞スフェロイドを効率的に形成できる培養基板の作製と、スフェロイド形成法の確立、および(2)ヒト由来 DP 細胞への低酸素環境の効果を評価することを大きな目的とした。

3. 研究の方法

DP 細胞のスフェロイドを効率的に形成する技術として、「微細加工技術」を利用したスフェロイド形成基板の設計を行った。

また、DP 細胞を低酸素環境下で培養後、タンパク質の分泌量を評価し、「低酸素環境」が細胞に与える効果を評価した。以下2つの項目について、具体的な実験方法を述べる。

(1)微細加工技術を用いた

DP 細胞スフェロイド形成技術の確立

まず、微細加工機を用いてアルミ板に直径 500 μ m、深さ 500 μ m の円筒状の微細孔を、一基板あたり 400 個切削し、一次鋳型を作製した。この一次鋳型にシリコンを流し込んで二次鋳型を作製後、二次鋳型上に、溶解したアガロースゲル(アガロース濃度: 2%)を流し込み、4 $^{\circ}$ Cでゲル化させた(図2 (A) (B))。

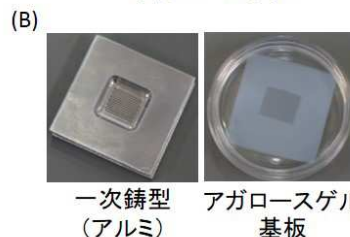
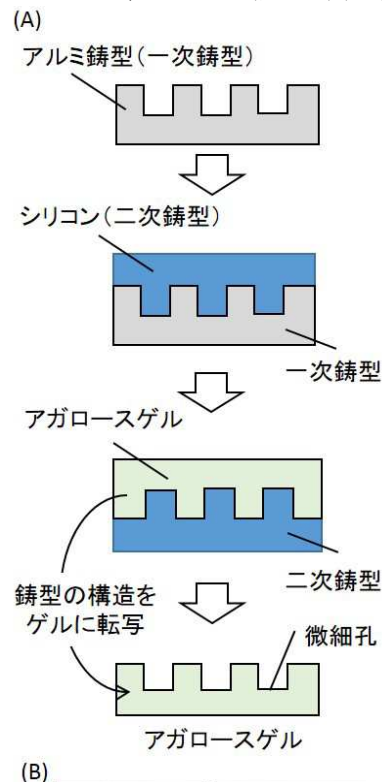


図2. (A) 微細加工を用いたスフェロイド形成基板の作製手順、(B) 作製したアルミ製の一次鋳型とアガロースゲル基板の外観

アガロースゲルは細胞非接着性を有する材料であるため、細胞が基板に接着することなく、細胞同士が凝集したスフェロイドを形成させることが可能である。また、鋳型に微細孔を多数設けることで、同じサイズのスフェロイドを同一基板上に多数形成させることが可能となる。

(2) DP 細胞スフェロイドの特性評価

(1)で作製したスフェロイド形成基板上にヒト由来 DP 細胞を播種し、DP 細胞スフェロイドの形成が可能か確認を行った。その後、培養日数に伴うスフェロイドのサイズや細胞数の変化、スフェロイド内部の生死状態を評価した。さらに、単層培養とスフェロイド培養のタンパク質の分泌量を比較し、スフェロイド培養の有効性を評価した。今回は遺伝子発現レベルよりも、タンパク質発現レベルで、DP 細胞のタンパク質分泌量の向上が見られるかについて重きをおき、検討を行った。

(3) 低酸素環境下での DP 細胞の培養

簡易的に低酸素環境を作るため、酸素吸収剤と密封バックを用いた低酸素培養キットを利用した。あらかじめ、培養ディッシュに播種して接着させた状態の DP 細胞（前培養）を、酸素吸収剤と共にバックに入れた。今回は、前培養の日数の違いと、低酸素培養の日数を変え、下記の条件下で培養を試みた。

- (I) 前培養 1 日後の DP 細胞を、約 2% の酸素濃度下で 1 日培養
- (II) 前培養 5 日後の DP 細胞を、約 2% の酸素濃度下で 1 日培養
- (III) 前培養 1 日後の DP 細胞を、約 10% の酸素濃度下で 3 日培養

培養後、バックからディッシュを取り出し、DP 細胞の形態観察、および細胞数と VEGF 分泌量を評価した。

4. 研究成果

(1) 微細加工技術を用いた

DP 細胞スフェロイド形成技術の確立

通常の培養ディッシュ上では、ヒト由来 DP 細胞は接着、伸展した形状となった (図 3 (A))。一方、微細孔を有するアガロースゲル基板上に細胞を播種すると、細胞は均一に各孔に沈降し、微細孔内で DP 細胞が集合・凝集してスフェロイドを形成した (図 3 (B))。

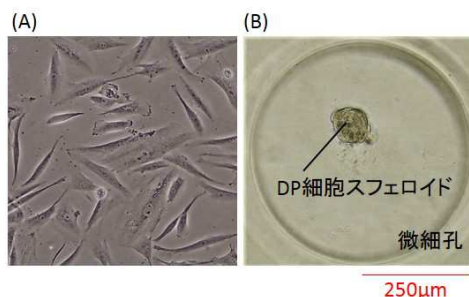


図 3. 培養 1 日目のヒト由来 DP 細胞の形態写真。(A) 単層培養、(B) スフェロイド培養

しかし、一部の微細孔では、細胞が十分に集まりきれず、ひとつの微細孔内に、サイズのバラバラな複数のスフェロイドが形成されてしまった。

そこで微細孔の底面を U 字型にしたところ、孔の中心に細胞が集まりやすくなり、「ひとつの微細孔にひとつのスフェロイド」が形成され、サイズの均一化を図ることが出来た (図 3 (B) は、微細孔の底面が U 字型の基板を用いた際のスフェロイドの形態を示している)。そこで以降の実験では、微細孔の底面が U 字型のものをを用い、スフェロイドを形成させることにした。

(2) DP 細胞スフェロイドの特性評価

(2)-①. DP 細胞スフェロイド培養条件の確立

単層培養では、DP 細胞は培養日数とともに増殖し、培養 5 日目にはディッシュの全面を覆うほど細胞数が増加していた。一方、スフェロイド培養では、培養日数経ってもスフェロイドのサイズはほとんど変化しなかった。また、細胞数を測定しても、培養 1~5 日目にかけて変化があまり見られなかった。つまり、DP 細胞はスフェロイド化することにより、細胞増殖性が抑制される傾向にあると考えられる。

また、ひとつの微細孔に入る細胞数を変えて細胞を播種し、形成されるスフェロイドのサイズを変化させた。これらのスフェロイドの生死染色を行い、生細胞を緑、死細胞を赤で染め分けて蛍光顕微鏡で観察した。緑と赤の面積をそれぞれ画像解析で求め、死細胞の割合とスフェロイドの直径の相関を見たところ、スフェロイド直径が約 160 μm 以上となると、死細胞の割合が 50% 以上になることがわかった (図 4)。

これらの死細胞は中心部に存在していることから、スフェロイドが大きくなりすぎると、スフェロイド中心部まで酸素や栄養素が届きにくくなるためであると考えられる。そこで、死細胞の割合が低い、直径 80~100 μm のスフェロイドを最適条件とし、以降の実験を行った。

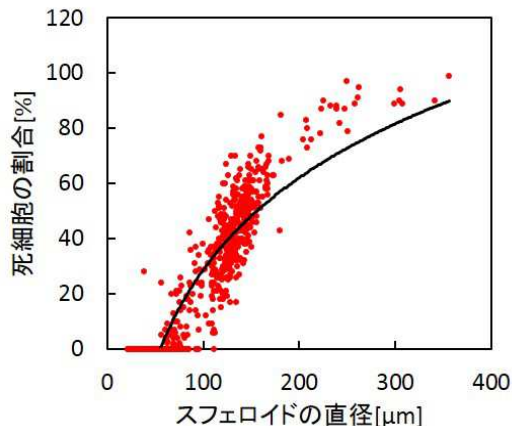


図 4. スフェロイドの直径と死細胞の割合の相関

(2)-②. タンパク質分泌量の評価

培養ヒト由来 DP 細胞がどのようなタンパク質を分泌しているか、すなわち、発想で述べた通り VEGF を生体外でも分泌しているのか調べるため、培養 1、3、5 日目の培地を採取した。

DP 細胞が分泌していると言われている 3 つのタンパク質；HGF (Hepatocyte Growth Factor、肝細胞増殖因子)、FGF-7 (Fibroblast Growth Factor、線維芽細胞増殖因子)、そして VEGF 量を測定した。

その結果、培養ヒト由来 DP 細胞は、単層培養、スフェロイド培養に関わらず、VEGF を最も多く分泌していることがわかった。HGF と FGF-7 の分泌量はごくわずかであった。そこで今回は VEGF の量を DP 細胞の毛包誘導力の指標とし、単層培養とスフェロイド培養の VEGF 分泌量を比較した。スフェロイド培養では、細胞数がほとんど変化しないことを考えると、スフェロイド培養の方が VEGF を多く分泌している傾向があり、スフェロイド培養が有効であることが示唆された。

(3) 低酸素環境下での DP 細胞の培養

単層培養での低酸素環境の効果を評価した結果、条件 (I) (前培養 1 日後の DP 細胞を、約 2% の酸素濃度下で 1 日培養) では、細胞数、VEGF の分泌量ともに、若干上昇する傾向が見られたが、大きな変化は見られなかった (図 5)。

同様に、条件 (II)、および (III) においても、細胞増殖性はコントロール群とほとんど変化がなかった。このことから、DP 細胞は低酸素環境下でも、比較的良好に増殖することがわかったが、期待したような VEGF 分泌量の大幅な向上は見られなかった。特に (II) では VEGF 分泌量が低下する傾向が見られた。よって、低酸素環境に置く前に、前培養の日数を長くすると、VEGF の分泌量が低下する可能性が示唆された。

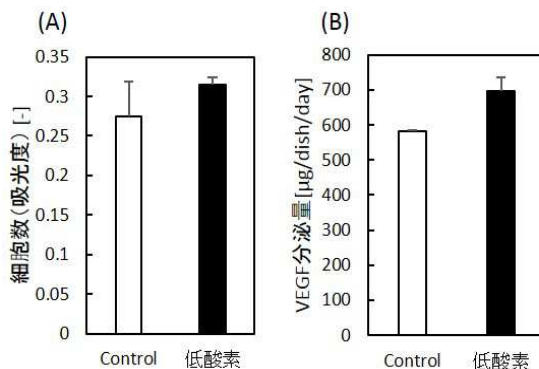


図 5. 条件 (I) での培養における、(A) 低酸素培養下での細胞数、(B) VEGF の分泌量

以上の結果より、サイズの均一なヒト由来 DP 細胞スフェロイドを効率的に形成可能な技術を確立することが出来た。これまで、DP

細胞スフェロイドを形成するには、播種や培地交換などの操作性が煩雑なものが多かったが、本技術により多数のスフェロイドを簡便な操作で得ることが可能となった。本技術は、DP 細胞スフェロイドの培養技術として、幅広く利用することが可能である。

また、培養ヒト由来 DP 細胞は、遺伝子発現レベルではなく、タンパク質発現レベルで VEGF を活発に分泌していることが明らかとなった。スフェロイド培養により、そのタンパク質分泌量が向上していることも示唆された。

しかしながら、今回の低酸素培養条件では、期待したような VEGF 分泌量の大幅な向上は見られず、低酸素培養の有効性を示すことは出来なかった。一方、DP 細胞は 2%~10% 程度の低酸素濃度下 (通常酸素濃度は 20% 程度) でも良好に増殖したことから、もともと低酸素環境に耐性を持っている可能性も考えられる。DP 細胞の特性と種々の培養環境の関係について、今後も引き続き詳細な検討を行っていきたいと考えている。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

① 本田晴香、古川優輝、ヒト毛乳頭細胞のスフェロイド培養、シンポジウム 細胞アッセイの現状と未来、2017 年 1 月 31 日、東京大学生産技術研究所コンベンションホール (東京)

② 本田晴香、古川優輝、効率的に毛乳頭細胞スフェロイドを形成する培養基板の開発、第 26 回九州沖縄地区高専フォーラム、2016 年 12 月 3 日、熊本高等専門学校八代キャンパス (熊本)

③ 古川優輝、吉田圭吾、宮本憲隆、本田晴香、微細加工技術を用いた毛乳頭細胞スフェロイド形成方法の開発、化学工学会第 48 回秋季大会、2016 年 9 月 7 日、徳島大学常三島キャンパス (徳島)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 晴香 (HONDA, Haruka)

熊本高等専門学校・生物化学システム工学科・助教

研究者番号：90756983