

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14489

研究課題名(和文)毛包原基の大量調製と毛髪再生医療への応用

研究課題名(英文) Large-scale preparation of hair follicle germs and its application for hair regenerative medicine

研究代表者

福田 淳二 (Fukuda, Junji)

横浜国立大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：80431675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の自己組織化現象を利用した毛包原基大量調製法を確立し、毛髪再生医療に有用であることを示した。具体的には、上皮系細胞と間葉系細胞の懸濁液を混ぜて1つの凝集体を形成させ、培養初期は2種類の細胞がバラバラの状態に凝集体内に存在するものの、培養3日間のうちにそれぞれの細胞が自発的に分離して、毛包原基が形成されることを発見した。この方法で大量の毛包原基を作製するため、酸素透過性シリコンゴムに微細加工した大量培養器を設計・開発した。また、この自己組織化現象がカドヘリンの種類の違いにより引き起こされていることを示した。さらに、ヒト毛包由来細胞を用いて、この手法がヒトへ応用できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a large-scale preparation approach based on self-organization of two types of cells and demonstrated that this approach is beneficial for hair regenerative medicine. We mixed two types of hair follicle derived cells and let them form an aggregate. They are initially randomly distributed in the aggregate but then spontaneously separated each other during 3 days of culture, resulting in the formation of hair follicle germs. Furthermore, we developed a microdevice in which a large number of hair follicle germs were formed through this self-organization. We demonstrated that this approach is applicable to human hair follicle derived cells as a proof of concept.

研究分野：生物工学

キーワード：毛髪 再生医療 毛包 毛包原基 マイクロデバイス

1. 研究開始当初の背景

脱毛症は生命維持には関係しないものの、ヒトの見た目の印象に大きく影響する。病気やけが、先天的要因、抗がん剤使用後の再生不全など、様々な要因で毛髪の悩みを抱えている人は多く、国内だけでも薄毛に悩む人は1,000万人以上と推定されている。脱毛症の現在の治療法は、植毛による治療、薬による治療の大きく2つに分けられる。植毛治療は、患者自身の後頭部の毛髪を毛包組織ごと引抜き、脱毛部に移植することで、治療する手法である。移植した毛髪は、正常な毛の生えかわり（毛周期）を再び繰り返すが、後頭部から取り出せる毛髪本数に限りがあり、実際は毛の位置を移し替えているのみであるため、頭部全体では毛髪数を増やすという根本的な問題解決には至らない。また、薬による治療は、有効な薬剤も開発されてきており、早期治療を行えば、脱毛の進行を抑制するだけでなく、発毛も期待できる。しかし、治療効果の維持には内服又は塗布を続ける必要があること、症状が進行した患者への効果は限定的であること、更には勃起不全などの副作用の可能性があることなどが、発毛・育毛薬には課題が多い。

近年、再生医療技術の急速な発展に伴い、細胞そのものを用いた毛髪の再生医療が、脱毛症の新たな治療法として注目を集めている。既往の研究では、毛の発生期に生じる毛包原基を生体外で構築する技術を開発し、これをヌードマウスに移植することで毛包を新たに効率的に生み出すことに成功している。この方法では、毛包細胞を増殖させ、これを用いて毛包原基を作製することで、毛髪数を増加させることができるため、末期の脱毛症を含む幅広い患者を治療できる画期的な方法である。しかし、この実現には、ヒトの治療に必要な数千個の毛包原基を大量に調製できる技術が必要であるが、これまでにそのような技術は確立されておらず、技術的な大きなハードルとなっていた。

2. 研究の目的

既往の研究（理化学研究所、辻ら）では、毛包原基は上皮系細胞と間葉系細胞のペレットを遠心機でそれぞれ作製し、ゲル内に隣接するように配置する必要がある。つまり、数万本の毛髪を再生することを考えると多大な労力が必要となる。

申請者らは、上皮系細胞と間葉系細胞の懸濁液を混ぜて1つの凝集体を形成させると、培養初期は2種類の細胞がバラバラの状態で見られるものの、培養3日間のうちにそれぞれの細胞が自発的に分離して、毛包原基が形成されることを発見した（図1）。この手法は、2種類の細胞懸濁液を混合して播種するといった非常に簡便な操作のみで毛包原基が構築できるため、大量調製に適し

た手法といえる。本研究では均一な性質の毛包原基を簡易かつ大量に構築する基盤技術を開発し、毛髪再生医療への有用性を示すことを目的とした。

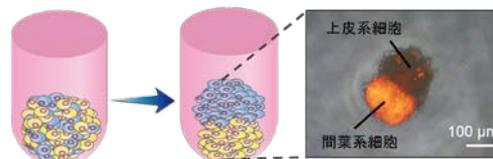


図1 自発的な毛包原基形成

3. 研究の方法

(1) 毛包原基アレイデバイスの作製

申請者らの毛包原基調製法は、上皮系細胞と間葉系細胞を混合した球状組織を構築するプロセスから始まる。そのため、毛包原基の大量調製には、球状組織を大量に調製する培養器があれば良い。特に、毛包原基の作製に利用する際には、球状組織の粒径を均一に制御することが、再現性の高い毛髪再生に重要である。また、大量培養中の毛包原基への酸素供給は、当然ながら培養液中の酸素濃度勾配の影響を受けるため、隣接する球状組織との距離や培養液と空気との気液界面の大きさや球状組織までの距離、培養液の流動の有無も重要である。

以上を踏まえて、微細加工を用いてシリコーンゴムからなる独自の培養容器（毛包原基アレイデバイス）を作製した。オレフィン樹脂に直径1.0mm、深さ500μmの丸底微小ウェルを約100wells/cm²の規則的間隔で切削した。これをエポキシ樹脂に転写後、さらに酸素透過性シリコーンゴムであるポリジメチルシロキサン（PDMS）に転写することで、酸素透過性に優れた微小ウェルアレイデバイスを作製した（図2）。

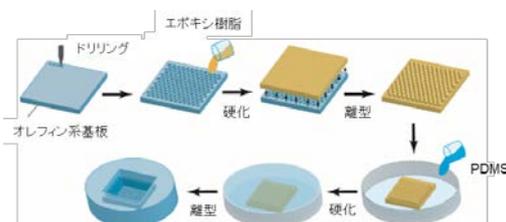


図2 毛包原基アレイデバイスの作製

(2) 毛包原基の大量調製

胎齢18日齢のC57BL/6マウス胎児より採取した上皮系細胞と間葉系細胞を1:1の割合で混合した懸濁液を、細胞非接着処理を施した毛包原基アレイデバイスに播種し、3日間培養することで毛包原基の大量調製を検討した。培地は間葉細胞培養培地（DMEM（Sigma）+10%ウシ胎児血清+1%ペニシ

リン)と上皮細胞培養培地(KG-2(クラボウ))の1:1混合培地を用いた。

(3) 毛包原基の移植

調製した毛包原基の毛髪再生能を評価するため、ヌードマウスの皮下に毛包原基を移植し、経過観察を行った。具体的には、ヌードマウスにイソフルラン吸引麻酔を施し、背部をイソジン液で消毒したのち、Vランスマイクロメス(日本アルコン社製)を用いて皮膚表皮層から真皮層下部に至る移植創を形成し、毛包原基を各移植創に1つずつ注入した。移植3週後に再生した毛髪は、毛髪移植部の皮膚切片のHE染色、免疫染色(パーシカン:毛乳頭細胞マーカー、CD34:毛包上皮幹細胞マーカー)、アセチルコリンを用いた立毛試験により生体毛髪と比較した。

(4) ヒト細胞を用いた毛包原基の大量調製

毛髪再生医療の細胞源には、患者本人の毛包から間葉系細胞である毛乳頭細胞および上皮系細胞である毛包上皮幹細胞を分離して用いるアプローチが最も有力である。前述した実験は、マウスの細胞を用いており、今後のヒト臨床を考えると、当然ながらこれをヒト成人細胞に置き換えて再現する必要がある。そこでまず、2種類の細胞のうち1種類をヒト毛乳頭細胞に置き換え、再現性が得られることを確認した。つまり、マウス上皮系細胞とヒト毛乳頭細胞を1:1の割合で混合した懸濁液を、細胞非接着処理を施した毛包原基アレイデバイスに播種し、3日間培養することで毛包原基の大量調製を検討した。培地は毛乳頭細胞培養培地(PromoCell社製)と上皮細胞培養培地(KG-2(クラボウ社製))の1:1混合培地を用いた。また、調製した毛包原基の毛髪再生能を評価するため、ヌードマウスの皮下に毛包原基を移植し、経過観察を行った。

(5) 血管付き毛包原基の調製

毛髪再生効率の向上を目的として、内部に血管網を形成した毛包原基を調製した。つまり、マウス上皮系細胞とヒト毛乳頭細胞とヒト血管内皮細胞を4:4:1の割合で混合した懸濁液を、細胞非接着処理を施した毛包原基アレイデバイスに播種し、3日間培養することで毛包原基の大量調製を検討した。培地は毛乳頭細胞培養培地(PromoCell社製)と上皮細胞培養培地(KG-2(クラボウ社製))と血管内皮細胞増殖培地の1:1:1混合培地を用いた。また、調製した毛包原基の毛髪再生能を評価するため、ヌードマウスの皮下に毛包原基を移植し、経過観察を行った。

4. 研究成果

(1) 毛包原基アレイデバイスの作製

微細加工技術により作製したモールドを

用いて毛包原基アレイデバイスを作製した(図3)。この培養容器は、ウェルの間隔を頭部の毛髪と同じ密度で配置しているため、毛髪再生部位と同じ面積の培養器で移植用の毛包原基を調製できる。そのため、インキュベータさえあれば、複雑な装置や実験者の技量が必要ないことも実用化に向けた大きな利点といえる。

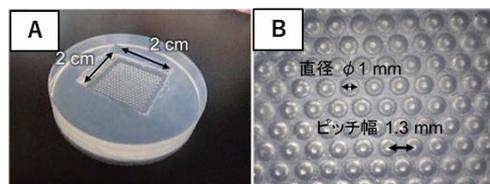


図3 毛包原基アレイデバイス(A)とマイクロウェル構造(B)

(2) 毛包原基の大量調製

毛包原基アレイデバイスに上皮系細胞と間葉系細胞の細胞懸濁液を播種すると、細胞は重力により、各ウェル内にほぼ均一に入り、数時間で自発的に均一な粒径をもつ細胞凝集体を形成した。その後、3日間の培養でそれぞれの細胞種が自発的に分離し、すべてのウェル内で毛包原基を形成した(図4 iii)。作製したデバイスは、培地表面からの酸素供給に加えて、酸素透過性の高いPDMS膜を介した底面からも酸素供給が生じる(図4 i)。このため、培養液中の酸素濃度勾配の変化が最小限に抑えられ、大量培養で問題となる細胞の低酸素障害が抑えられ、毛包原基の大量調製の実現に繋がったと考えられる。実際に、毛包原基の形成は同様の構造を持つアクリ

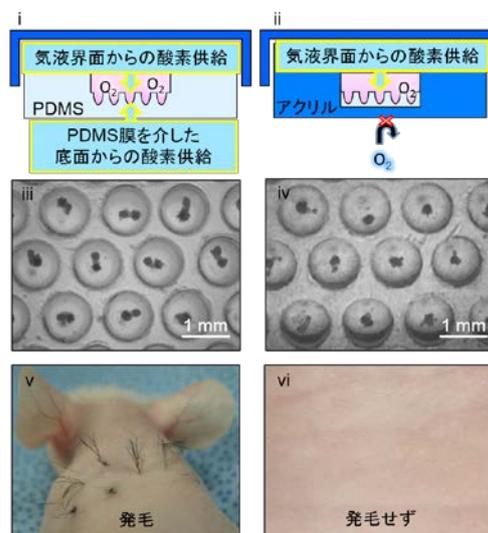


図4 毛包原基アレイデバイスの酸素供給と毛髪再生への影響, (i, ii) 酸素供給の状態, (iii, iv) 形成した毛包原基, (v, vi) 移植後の毛髪再生

ル製デバイス（非酸素透過性、図 4 ii）を用いた場合は見られず（図 4 iv）、PDMS 製デバイスでのみ観察され、また発毛も PDMS 製デバイスを用いた場合のみ観察された（図 4 v, vi）。

(3) 毛包原基アレイデバイスの作製

次に、毛包原基アレイデバイスで作製した毛包原基を移植し、形成された毛包の組織切片を作製して免疫染色したところ、毛包領域の毛乳頭細胞とバルジ領域の毛包上皮幹細胞が観察された（図 5 A, B）。これらはいずれも毛髪サイクルにおいて重要な役割を果たす細胞である。また実際に、毛髪サイクルを観察したところ、毛髪の成長と脱毛が繰り返される様子が観察された。再生した毛髪は毛髪特有のキューティクル構造が観察された（図 5 C）。また再生毛髪は刺激に応答し、立毛することが観察されたことから、立毛筋との接続がなされていることも確認された（図 5 D）。以上の結果より、本手法を用いて再生した毛包および毛髪は生体に近い構造および機能を有していることが示された。

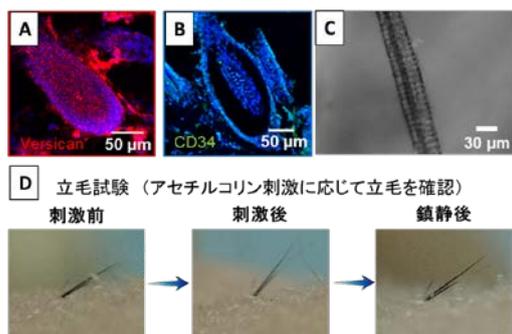


図 5 再生した毛髪の機能解析 (A)毛乳頭細胞の免疫染色像 (B)毛包上皮幹細胞の免疫染色像 (C)特異的なキューティクル構造 (D)立毛機能の確認

(4) ヒト細胞を用いた毛包原基の大量調製

さらに、ヒト培養毛乳頭細胞とマウス上皮系細胞を毛包原基培養器に播種し、マウス細胞を用いた場合と同様に毛包原基が自発的に形成されること、ヌードマウス皮下へ移植すると毛髪が再生することを確認した。再生した毛髪は毛の生え変わりを繰り返し、組織学的にも正常な毛包を形成している様子が確認された。極最近のデータでは、2 種類ともヒト毛乳頭細胞、ヒト上皮幹細胞を用いても毛包原基の構造が形成されることも確認している。

(5) 血管付き毛包原基の調製

毛包のニッチ環境を再現するアプローチとして、血管内皮細胞の導入が毛包原基の生着率向上に貢献することを見出した。上皮系細胞と間葉系細胞と血管内皮細胞の細胞混合液を播種したところ、各細胞がすべてのウェル内で自発的に1つの凝集体を形成した後、3 日間の培養で上皮系細胞と間葉系細胞がその内部で分離し、なおかつ血管内皮細胞が間葉系細胞の凝集体内で毛細血管を形成した（図 6 A, B）。この毛包原基を、ヌードマウスの皮膚に移植すると、血管を持たない毛包原基よりも発毛効率が向上した（図 6 C）。

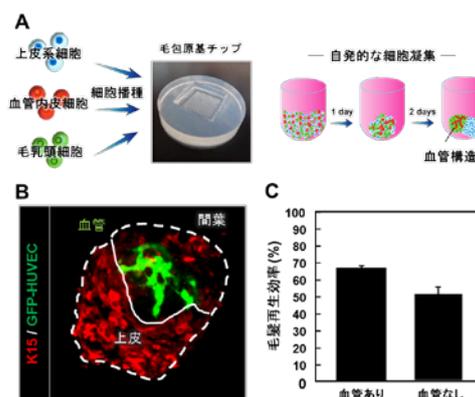


図 6 血管を有する毛包原基の大量調製 (A)血管を有する毛包原基の形成メカニズム (B)チップ内で形成した血管を有する毛包原基、(C)移植 18 日目の毛髪効率

以上より、高い酸素透過性を有する PDMS で作製した毛髪再生アレイデバイスを用いることで、大量細胞培養で課題となる細胞の低酸素障害を抑え、毛包原基の大量培養を実現することができた。

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 3 件)

1. T. Kageyama, T. Osaki, J. Enomoto, D. Myasnikova, T. Nittami, T. Hozumi, T. Ito, and J. Fukuda, In situ cross-linkable gelatin-CMC hydrogels designed for rapid engineering of perfusable vasculatures, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2 (6), 1059–66 (2016) DOI: 10.1021/acsbomaterials.6b00203 査読有
2. T. Osaki, T. Kageyama, Y. Shimazu, D. Mynikova, S. Takahashi, S. Takimoto, J. Fukuda, Flatbed *epi* relief-contrast cellular monitoring system for stable cell culture, *Scientific Reports* (IF=5.23), 7, 1897 (2017) doi:10.1038/s41598-017-02001-x 査読有

3. T. Kageyama, C. Yoshimura, D. Myasnikova, K. Kataoka, T. Nittami, S. Maruo, and J. Fukuda, Spontaneous hair follicle germ (HFG) formation in vitro, enabling the large-scale production of HFGs for regenerative medicine, *Biomaterials* (**IF=8.402**), 154, 291-300 (2018) doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.10.056 査読有

[学会発表] (計 10 件)

1. 景山達斗、吉村知紗、片岡健、福田淳二、酸素透過性マイクロウェルアレイチップを用いた毛包原基の大量調製、第 67 回日本生物工学会大会、2016 年、富山国際会議場
2. 景山達斗、福田淳二、微細加工技術を用いた毛包原基大量調製容器の開発、第 21 回日本臨床毛髪学会学術集会、2016 年
3. Tatsuto Kageyama and Junji Fukuda, Large-scale preparation of hair follicle germs using oxygen-permeable PDMS microarray chips, 3rd International Conference on Biomaterial Science in Tokyo 2016 (ICBS2016) (国際学会), 2016 年
4. Junji Fukuda、Engineering Tissue Fabrication Processes for Regenerative Medicine、TERMIS-AP 2017 (招待講演) (国際学会)、2017 年
5. Akihiro Shimizu, Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda、Long-term culture of hair follicle germs formed through cell self-organization, 10th WCHR 2017 (国際学会)、2017 年
6. Chisa Yoshimura, Tatsuto Kageyama, Akihiro Shimizu, Lei Yan, Sugi Hirano, Yoshiki Tate, Keiichiro Kasai, Junji Fukuda、Large-scale production of hair follicle germ (HFG) using spontaneous HFG formation in vitro, 10th WCHR 2017 (国際学会)、2017 年
7. 清水亮啓、景山達斗、片岡健、平川聡史、福田淳二、脱毛症治療のための in vitro 毛髪再生、第 90 回日本組織培養学会、2017 年
8. 清水亮啓、景山達斗、平野杉、福田淳二、毛包原基を用いた発毛剤スクリーニングツールの開発、化学工学会第 49 回秋季大会、2017 年
9. 平野杉、景山達斗、福田淳二、Novel approach for expansion of hair follicle stem cell by using PDMS microwell plate、化学工学会第 83 年次会、2018 年
10. 楯芳樹、景山達斗、福田淳二、Engineering skin tissue constructs with hair follicle germ、化学工学会第 83 年次会、2018 年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 5 件)

名称：毛髪再生用細胞包埋ビーズ及びその製造方法

発明者：福田淳二、景山達斗

権利者：横浜国立大学

種類：特許

番号：特願 2016-120808

出願年月日：2016 年 06 月 17 日

国内外の別：国内

名称：毛細血管構造を有する再生毛包原基の集合体の製造方法

発明者：福田淳二、景山達斗

権利者：横浜国立大学

種類：特許

番号：特願 2016-226344

出願年月日：2016 年 11 月 21 日

国内外の別：国内

名称：毛髪再生用キット及び発毛促進又は抑制物質をスクリーニングする方法

発明者：福田淳二、景山達斗、清水亮啓

権利者：横浜国立大学

種類：特許

番号：特願 2017-159661

出願年月日：2017 年

国内外の別：国内

名称：再生毛包原基を有する培養皮膚の製造方法及びその使用

発明者：福田淳二、景山達斗、楯芳樹

権利者：横浜国立大学

種類：特許

番号：特願 2017-217654

出願年月日：2017 年

国内外の別：国内

名称：色素の蓄積を制御する候補化合物をスクリーニングする方法及びキット

発明者：福田淳二、景山達斗、清水亮啓

権利者：横浜国立大学

種類：特許

番号：特願 2018-004432

出願年月日：2017 年

国内外の別：国内

○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
<http://www.fukulab.ynu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

福田 淳二 (FUKUDA, JUNJI)
横浜国立大学 大学院工学研究院 教授
研究者番号：80431675

(2)研究分担者

片岡 健 (KATAOKA, KEN)
岡山理科大学 理学部 教授
研究者番号：10293317

鈴木 敦 (SUZUKI, ATSUSHI)
横浜国立大学 大学院工学研究院 准教授
研究者番号：60467058