

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791738

研究課題名 (和文) 培養細胞を用いた毛髪再生医療の開発

研究課題名 (英文) Development of cultured cell-transplantation
for hair regeneration therapy.

研究代表者

飯田 拓也 (IIDA TAKUYA)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00398603

研究成果の概要 (和文)：胎児や新生児の表皮細胞を使用しない、侵襲の少ない、簡便であるといった要件を満たした、臨床で施術可能な毛包再生のための培養毛乳頭細胞の移植法を動物モデルで確立した。また、毛乳頭細胞の毛包誘導を促進する培養法について、活性型ビタミン D を使用する方法を開発した。

研究成果の概要 (英文)：We established a clinically applicable transplantation method using expanded culture dermal papilla cells for hair regeneration therapy in animal model. This method is less invasive, simple and not required to use embryonic or neonatal keratinocyte. Thus, it is appropriate for clinical use. Furthermore, we developed culturing method to promote hair follicle induced potential of expanded dermal papilla cells by $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 -pretreatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
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

キーワード：毛髪再生・毛包再生・細胞移植・ビタミン D・毛乳頭細胞

1. 研究開始当初の背景

薄毛や禿髪は遺伝子的、外傷、ホルモン、薬物治療などさまざまな原因で発生し、多数の人が治療を希望されているが、いまだ有効といえるものは数えるほどしかない。外科的な治療にかぎっていえば、単位毛包移植術が有効な治療法であるが、採取できるドナーが限られているという欠点がある。増毛治療は生活の QOL を上げるためのものであるため身体に対する侵襲を最小限にしたものが社会的に求められている。

2. 研究の目的

毛乳頭細胞と毛球部の結合組織性毛根鞘の毛包誘導能を利用して、培養によって数千から数万倍に増殖させた細胞を用いて毛包再生する治療の開発に取り組むことにした。

3. 研究の方法

1) 培養細胞の移植法の開発

まず、ラットの髭由来の新鮮毛乳頭組織を臨床で使用可能な 5 種類の方法で移植を行い、毛包誘導能を評価する。その後、もっとも優れた方法で、培養毛乳頭細胞を移植する。毛包誘導を厳密に評価するために、移植床はラットの足底無毛部を使用する。毛包誘導能

の統計学的評価は線形回帰分析によって行う。

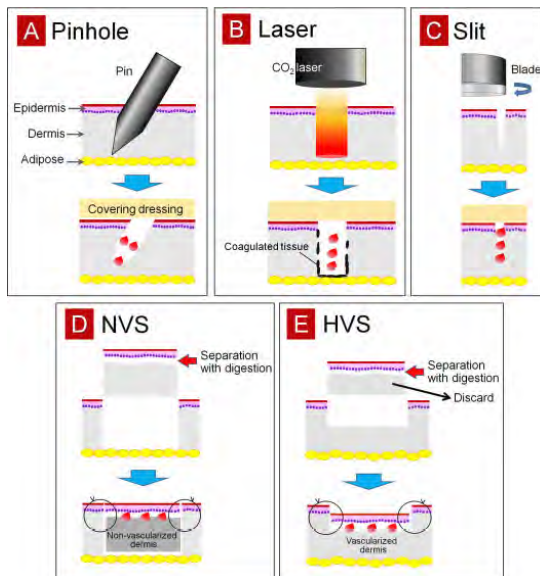
2) 培養細胞の毛包誘導能を増加させる培地の開発

培養毛乳頭細胞は継代をつづけると線維芽細胞に近づき、毛包誘導能を失ってしまう。これを維持するものとして表皮細胞の培養上清が知られているが、我々はこの成分の中の活性型ビタミンDに着目した。活性型ビタミンD (VD₃) の培養ヒト毛乳頭細胞に与える効果をBrdUや免疫染色、qRT-PCRで検討し、毛包誘導能を増加させる因子となるかどうかを動物モデルで検討する。

4. 研究成果

1-1) 5種類の移植法と結果

ラットの足底無毛部に新鮮毛乳頭細胞を図1に示す5種類の方法で移植した。A) Pinhole法：0.7mmの針で穴をあけ、その穴に移植した。B) Laser法：炭酸ガスレーザーで0.9mmの穴をあけ、その穴に移植した。C) Slit法：メスで200-400μmの深さのスリットを作り、その切れ目に移植した。D) NVS (=non-vascularized sandwich) 法：メスで分層皮膚を150-300μmの厚さでスライスし、切り取った皮膚をDyspaseで酵素処理して表皮と真皮を分離後、その間に移植体をはさんでもとの足底部に戻した。E) HVS (=Hemi-vascularized sandwich) 法：C)と同様に分層皮膚を切り取って酵素処理した後、分離した表皮と足底に残った真皮とで移植体をはさんだ。どの方法も最後にドレッシング材を使用して創部を被覆した。



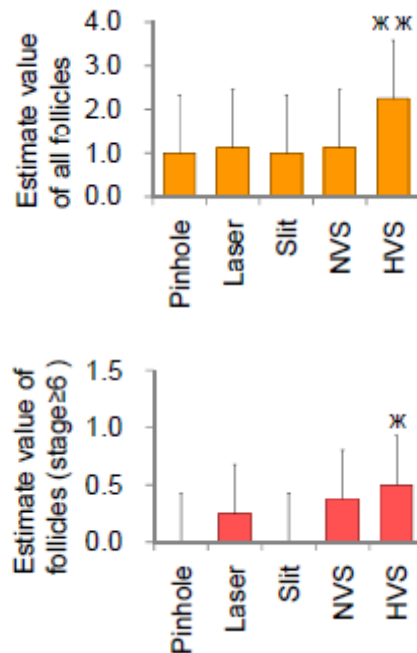
【図1】

8週間後の評価ではHVS法のみ肉眼的発毛を認めた。【図2】



【図2】 bar=0.5mm

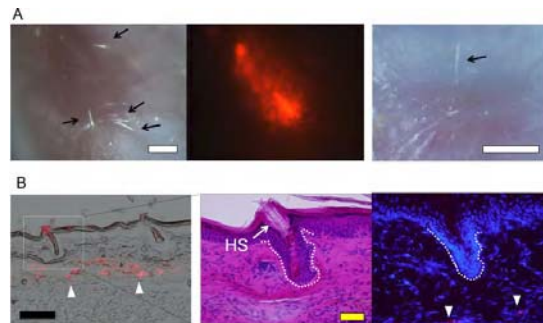
サンプルの切片を組織学的に評価すると1サンプル当りの再生毛包数、stage6以上の成熟毛包数はHVS法が統計的に優位差をもって多かった。【図3】



【図3】 ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

1-2) 培養毛乳頭細胞の移植

5種類の移植法でもっとも毛包誘導の成績がよかったHVS法をもちいて培養毛乳頭細胞をシートの状態で移植した。移植細胞にはDiIで色素標識した。



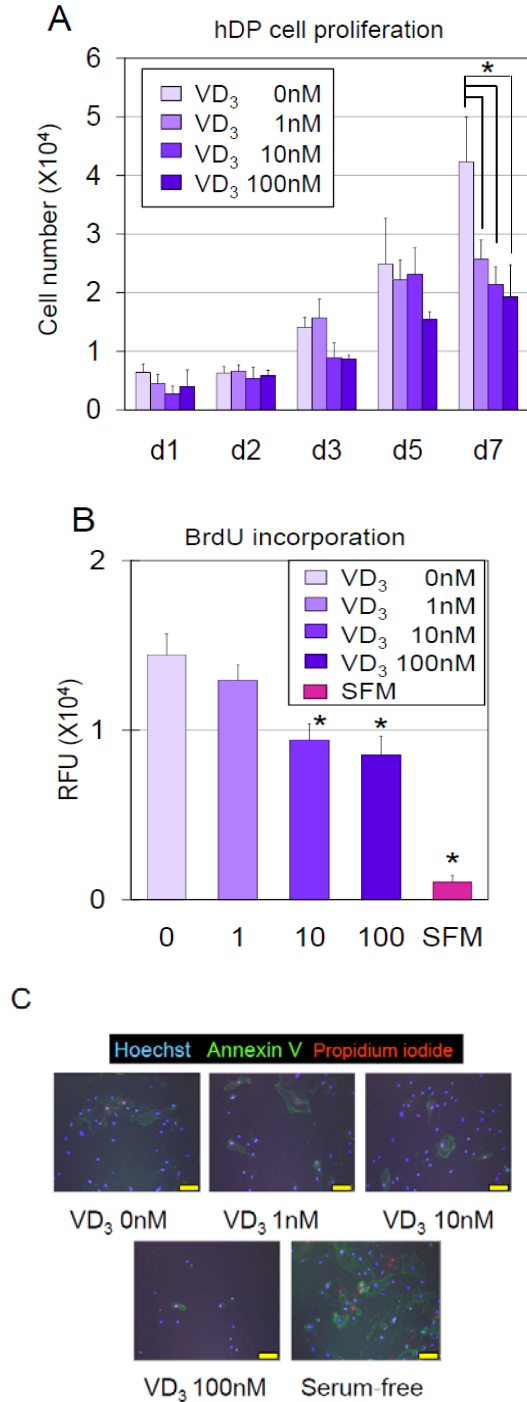
【図4】

図4に示すようにミニチュアサイズながら、

多数の発毛に成功した。

2-1) 活性型ビタミン D の培養ヒト毛乳頭細胞への効果

まず、活性型ビタミン D を各濃度 (0~100 nM) 添加して細胞の増殖能を調べたところ、濃度依存的に細胞増殖抑制効果を確認した。【図 5A】



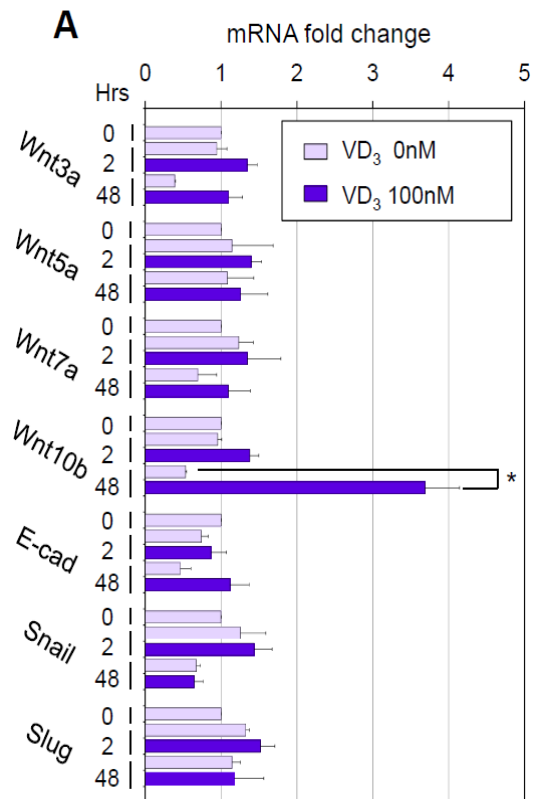
【図 5】

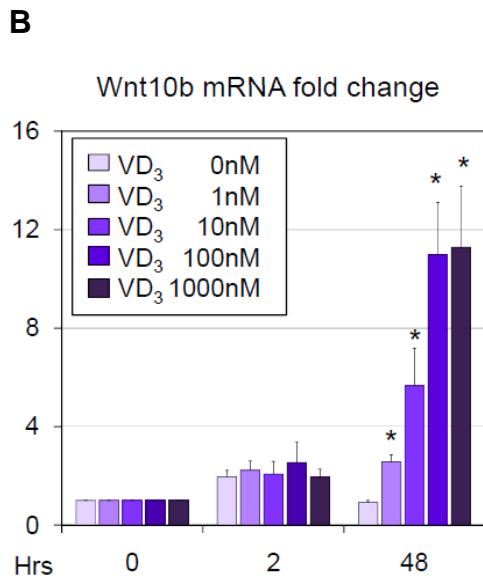
BrdU の取り込みを調べても同様の効果がみられた。【図 5 b】一方で細胞免疫染色ではビ

タミン D の細胞毒性は認めなかった。

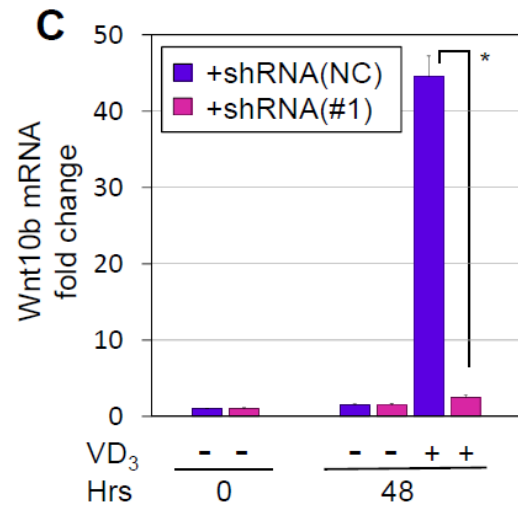
2-2) 次に活性型ビタミン D の添加によって毛包関連遺伝子発現の変化を q RT-PCR によって調べたところ Wnt10b の mRNA が 48 時間後で優位に増加した。【図 6A】また、Wnt10b の発現増加は活性型ビタミン D を 100 nM 添加したときにもっとも増加した。【図 6B】

このビタミン D の毛乳頭細胞に対する効果はビタミン D レセプターを介した genomic な作用なのか、細胞膜レセプターなどを介した non-genomic な作用なのかを検証するため、VDR の mRNA を阻害する実験を行った。まず作成した 6 つの shRNA をを HEK293 細胞に lipofection して Western blotting で VDR の Knockdown 効率を調べた。【図 7A】 #2 以外の shRNA であれば VDR の Knock down は良好であった。その後、ヒト毛乳頭細胞に control vector と #1-shRNA の挿入された Vector を retrovirus を用いて遺伝子導入して調べた。【図 7】その結果、Vitamin D に直接反応する酵素である 24(OH)ase の Knock down が確認でき、かつ Wnt10b の遺伝子発現の上昇は活性型ビタミン D を投与しても上昇しなかった。このことから、Wnt10b 遺伝子の発現上昇は Vitamin D-VDR Pathway を介して生じていることが分かった。

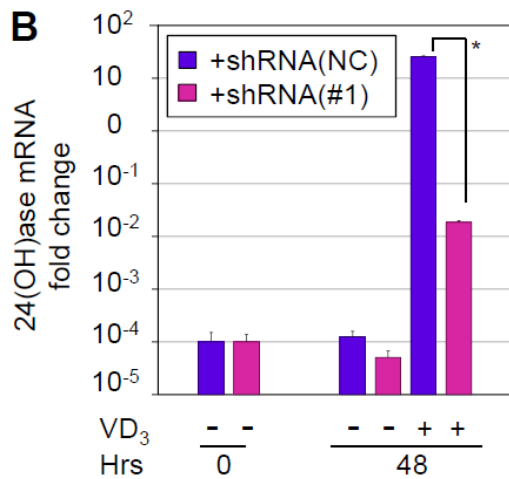
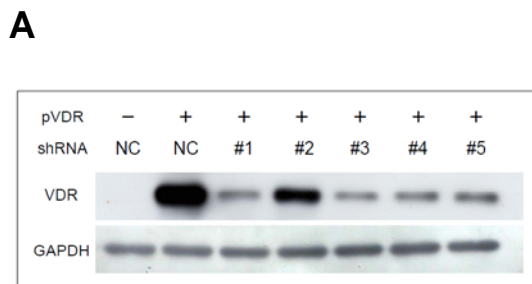




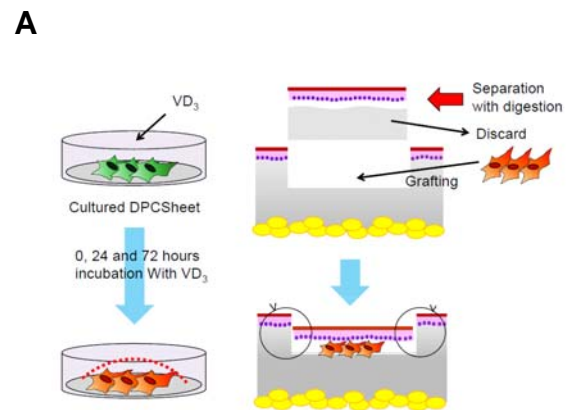
【図 6】



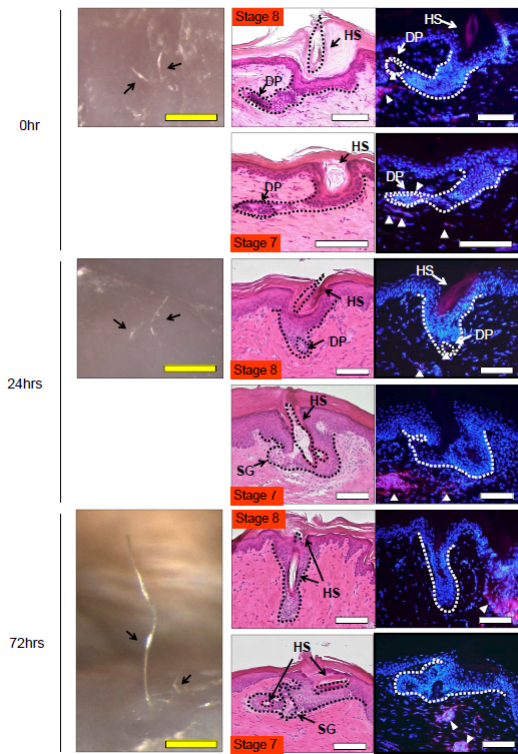
【図 7】



2-3) 最後に活性型ビタミン D を移植前に培地に添加することで毛包誘導に差がでるかどうかを調べた。【図 8A】に示すように移植前の培養ラット毛乳頭細胞に 0, 24, 72 時間ビタミン D100 nM を培地に添加した。移植法は前述した HVS 法で行い、レシピエントはラットの測定無毛部を使用した。移植後 8 週間後に組織を回収して評価した。【図 8B】に示すように活性型ビタミン D を 72 時間添加したものが肉眼的にもっとも質の良い毛髪が再生した。

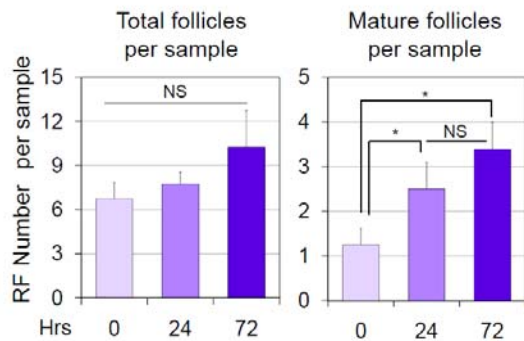


B

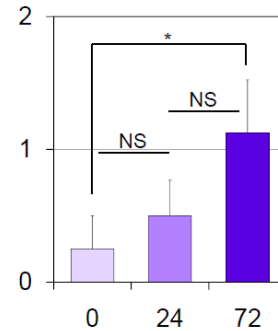


【図 8】

組織切片をHE染色とHoechst33342による核染色にて評価した。誘導毛包の数はビタミンD添加群と非添加群で統計学的な優位差がなかったが、stage6以上の成熟毛包数や肉眼的発毛数はビタミンD添加群が優位に高かった。【図9】活性型ビタミンDを添加することで再生毛包の質を高める効果があることが明らかになった。ビタミンDの分化を促進する効果は毛乳頭細胞に対しても認められた。Wnt10bにはこれまでの報告で毛包再生を促進する効果が知られており、活性型ビタミンDはVDRを介してWnt10bを上昇させ、毛包誘導を促進すると考えられた。



Outgrowing hair number per sample



【図 9】

3) まとめ

動物実験を通じて、臨床で施術可能でかつ胎児や新生児の表皮細胞などを使用しない移植法の開発を行った。さらに活性型ビタミンDが毛包誘導を高める培地の成分となり得ることを明らかにした。これらの実験は治験前の基礎データとなり、現在治験の準備を進めているところである。今後、細胞移植による禿髪の治療が実現することが期待される。

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)

1) Aoi N, Inoue K, Kato H, Suga H, Higashino T, Eto H, Doi K, Araki J, Iida T, Katsuta T, Yoshimura K. Clinically applicable transplantation procedure of dermal papilla cells for hair follicle regeneration. J Tissue Eng Regen Med, 2010. In press.
査読あり

[学会発表] (計3件)

1) 発表者: 青井 則之
発表表題: 培養細胞移植による毛包再生: 移植法および培養法の最適化にむけて
学会名: 第19回日本形成外科学術集会
発表年月日: 2010年9月16日
発表場所: 横浜

2) 発表者: 青井 則之
発表表題: Optimization of cell construct grafting procedure for hair regeneration therapy
学会名: 6th WORLD CONGRESS FOR HAIR RESEARCH

発表年月日：2010年6月17日
発表場所：Cairns, Australia

- 3) 発表者：青井 則之
発表表題：1.25-dihydroxy vitamin D and
All-Trans Retinoic Acid
synergistically enhance Expression
of wnt10b and alkaliphosphatase
in human dermal cells
via vitamin D receptor pathway
学会名：6th WORLD CONGRESS FOR
HAIR RESEARCH
発表年月日：2010年6月17日
発表場所：Cairns, Australia

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計1件)

名称：毛髪再生用細胞移植方法
発明者：吉村浩太郎 井上啓太 佐藤隆博
権利者：株式会社バイオマスター
種類：特開 2010-082339 番号：
取得年月日：2010年4月15日
国内外の別：国内

[その他]

なし

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 拓也 (IIDA TAKUYA)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00398603

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし