

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：12701

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18971

研究課題名(和文)酸素透過性マイクロデバイスを用いた毛包組織の形態形成メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of morphogenic mechanisms of hair follicle using oxygen-permeable microdevice

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) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、酸素透過性シリコンゴムを用いて培養器を作製し、ここで上皮系細胞と間葉系細胞を培養すると、培養3日間のうちに毛包原基が形成されることを示してきた。本研究では、この毛包原基形成およびその後の毛幹形成メカニズムの解析を目的とした。毛包原基形成には、上皮系と間葉系細胞に発現するカドヘリンの種類の違いが関与した。また、毛幹構造の形成には様々なシグナル因子が関与した。毛幹は培養23日目には200 μm に達したが、形成効率は1%以下であった(a few/300 HFGs)。本研究で得られた知見から培養条件を最適化したところ、これが90% (275/300 HFGs)以上に向上した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

毛包形成や脱毛症が生じる分子メカニズムには不明な部分も多く、副作用のない脱毛症治療薬の開発が進まない要因となっている。そこで本研究では、本デバイス上の毛包原基を生体外毛包モデルとして利用し、形態形成メカニズムの解析に取り組んだ。本研究では、メカニズム解明のみならず、毛髪再生に関与する成長因子の添加により毛幹様構造の形成効率が飛躍的に向上することも示した。このようにして、毛包形成メカニズムの解明と創薬スクリーニングへ適用することで、毛包などの発生に関する基礎的理解から脱毛症治療への応用まで、幅広い波及効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Hair follicle morphogenesis is triggered by interactions between epithelial and mesenchymal germ layers during embryogenesis. We fabricated a microdevice with oxygen-permeable silicone rubber, wherein epithelial and mesenchymal cells spontaneously formed hair follicle germ (HFG)-like aggregates in 3 day of culture. In this project, we analyzed mechanisms underlying in vitro HFG formation and following hair shafts generation. The HFG formation was attributed to different types of cadherin expressed on epithelial and mesenchymal cells. Various signaling factors were involved in the in vitro hair shaft generation. Hair shafts sprouted at 12 day of culture and reached $\sim 200 \mu\text{m}$ in length at 23 days of culture. However, only less than 1% of HFGs (a few/300 HFGs) generated hair shafts. Based on our findings, we optimized culture conditions, with which the efficiency of hair shaft generation was significantly increased ($\sim 90\%$, 275/300 HFGs).

研究分野：生物工学、再生医療

キーワード：毛包 毛包上皮幹細胞 毛乳頭細胞 ティッシュエンジニアリング 三次元培養 マイクロデバイス

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

毛髪は生命維持に必須ではないものの、個人の見た目の印象を大きく左右するため、老若男女問わず脱毛症治療のニーズは大きい。「脱毛症治療のガイドライン」によると、脱毛症治療では現時点では医薬品を用いた治療が最も推奨されている。現在、日本で脱毛症のための医薬品として認可されているものは三種類のみであり、それらはいずれも初期脱毛症の進行を抑制する効果しかなく、また副作用の問題がある。したがって、より効果および安全性の高い発毛剤が求められている。

創薬プロセスでは、生体内とは大きく異なる培養環境下におかれた細胞を用い評価する。しなしながら、この非生理的な環境が効果的な薬剤の発見を阻害している可能性がある。実際、様々な薬剤において細胞試験で得られた結果がその後の動物試験や臨床試験の段階では確認されないことが多い。そこで、細胞組織工学と呼ばれる分野が注目され、培養細胞を用いて組織モデルを構築し、これを使って創薬を行うというコンセプトが提案された。毛髪を作り出す毛包は、比較的小さな組織であり、また毛周期と呼ばれる一定の間隔で発生期と同様の形態形成を繰り返す。そのため、生体外で形態形成を誘導し組織モデルを構築するには適しており、本研究の対象とした。研究代表者らは、研究開始時点までに、生体外培養系で毛包組織を再構築し毛幹が伸長することを示してきた。

2. 研究の目的

毛包組織は、胎児期において皮膚の上皮系細胞と間葉系細胞の相互作用により発生する。まず間葉系細胞からのシグナルにより上皮系細胞が集まり、そこに間葉系細胞が集まることで雪だるま状の原始毛芽で

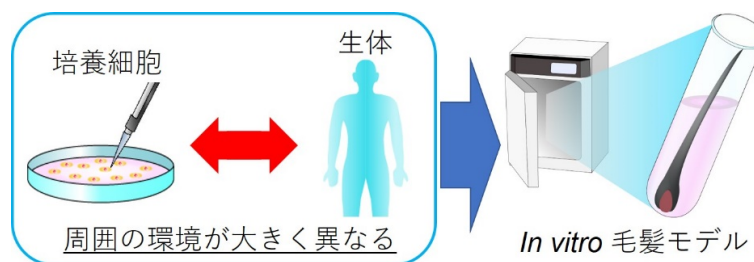


図1 本研究の目的

ある毛包原基を形成する。次に毛包原基内で、シグナル分子または細胞の直接接触により上皮-間葉間で密接な相互作用を生じる。これにより、細胞のさらなる分化や移動、組織形成を引き起こし、毛包が形成されるとともに毛幹が皮膚外へ伸長する。これまで研究代表者らは、上皮系細胞と間葉系細胞を用いて毛包原基を調製する技術を開発し、これを移植することで毛周期を繰り返す毛髪を再生できることを報告した。本研究では、毛包原基を長期培養して *in vitro* 毛髪モデルを構築し、その形態形成メカニズムを理解することを目的とした(図1)。

3. 研究の方法

妊娠 18 日目マウス(C57BL/6)の胎児の背中皮膚より上皮系細胞と間葉系細胞を単離し、それぞれを 1:1 の細胞比で混合し、全細胞数 10×10^3 cells/well となるように 96 well U プレートに播種した。そして、これらの細胞が凝集する様子、さらに自発的に分離する様子を観察した。この毛包原基形成メカニズムを解明するために、細胞接着タンパクであるカドヘリンの種類ごとの特異的阻害剤を添加し、カドヘリンがこの形態形成に関与しているかどうか評価した。さらにこの時、阻害剤の有無による毛髪形成能の違いを評価した。創薬および再生医療のための毛髪モデル構築には、高効率で生体外にて毛髪を形成させなければならない。そこで本研究では、解明した形態形成メカニズムをもとに生体外で毛包組織を形成させる培養条件を最適化した。特に、生体内での液性因子による刺激と細胞マトリックスからの長期的な刺激に着目して研究を進めた。

4. 研究成果

播種した上皮系および間葉系細胞は、培養 1 日目にはそれぞれの細胞がバラバラに混合された状態で 1 つの凝集体を形成した。しかしその後、培養 3 日目には同種の細胞同士が自己組織化し、それぞれが分離された毛包原基様の構造を形成した。その後、更に培養を続けたところ、培養 12 日目に毛幹構造が観察され、培養 23 日目には 200 μm まで伸長した。この毛幹構造を透過型電子顕微鏡にて観察を行ったところ、生体の毛髪を持つマイクロフィブリルやコルテックスを有しており、本培養系で生体外において毛髪の発生の再現が可能である可能性を示した。ただし、このように毛幹構造が形成されるのは、毛包原基 300 個中 1 個の割合であった。

このような形態形成を誘導する因子を評価するために、様々な成長因子や細胞外マトリックスを含む基底膜由来マトリゲルを添加して培養をおこなった。培養 1 日目には、マトリゲルを添加しなかった場合と同様に 2 種類の細胞が混ざり合った 1 つの凝集体を形成した。しかし、培養 3 日目には同種の細胞どうしが自己組織化して内部が上皮系細胞、外側が間葉系細胞のコアシェル型の細胞凝集体を形成した。さらに培養 6 日目には毛包原基 200 個中 182 個という 90 %以上の効率で毛幹構造の形成が観察された。そして、培養 18 日目には 1 mm まで伸長していく様子が確認された(図2)。この毛幹構造を走査型電子顕微鏡にて観察を行ったところ、毛幹表面にキューティクル構造が観察された。

マトリゲルはラミニン、エンタクチン、コラーゲン IV などの細胞外マトリックスで構成されている。そこで、これら主要成分のみで同様の評価を実施した。その結果、ラミニンとエンタクチンの混合物、またはコラーゲン IV を用いた場合には、マトリゲルと同様に高効率で生体外にて毛幹伸長が確認された。

形成された毛包組織をさらに詳しく評価したところ、毛幹にメラニン色素を付与するメラノソームや、毛包を構成する肝細胞である毛包幹細胞および毛乳頭細胞が組織内で局在していることが示された。

以上、本研究の毛髪モデルは創薬や毛髪再生医療のための組織モデルになりうると考えられる。

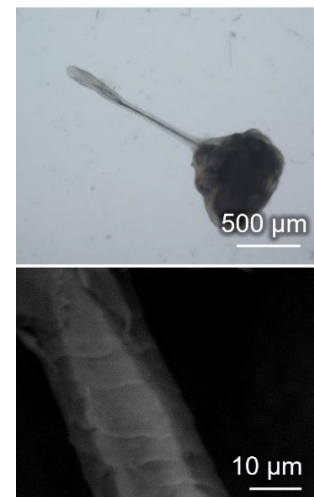


図2 伸長した毛幹(上)、
キューティクルの SEM 写
真(下)

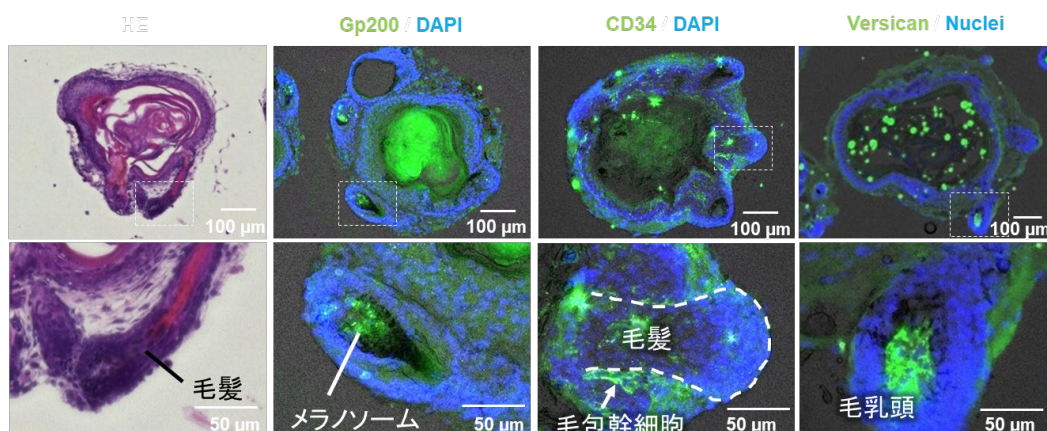


図3 形成された毛包組織モデルの断面の蛍光免疫染色写真(毛包組織に存在する幹細胞)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kageyama Tatsuto, Yan Lei, Shimizu Akihiro, Maruo Shoji, Fukuda Junji	4. 巻 212
2. 論文標題 Preparation of hair beads and hair follicle germs for regenerative medicine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 55 ~ 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.05.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kageyama Tatsuto, Yoshimura Chisa, Myasnikova Dina, Kataoka Ken, Nittami Tadashi, Maruo Shoji, Fukuda Junji	4. 巻 154
2. 論文標題 Spontaneous hair follicle germ (HFG) formation in vitro, enabling the large-scale production of HFGs for regenerative medicine	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 291 ~ 300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.10.056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Myasnikova Dina, Osaki Tatsuya, Onishi Kisaki, Kageyama Tatsuto, Zhang Molino Binbin, Fukuda Junji	4. 巻 9
2. 論文標題 Synergic effects of oxygen supply and antioxidants on pancreatic α -cell spheroids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1038/s41598-018-38011-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計28件（うち招待講演 6件/うち国際学会 9件）

1. 発表者名 Rikuma Nakajima, Akihiro Shimizu, Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda
2. 発表標題 In vitro hair shaft generation from 3D cell aggregates for hair regenerative medicine
3. 学会等名 2019 MRS fall meeting & exhibit (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sugi Hirano, Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda
2. 発表標題 Expansion of hair follicle stem cells using oxygen-permeable culture vessel for hair regenerative medicine
3. 学会等名 ISSCR 2019 Annural Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda
2. 発表標題 Dermal papilla cells-encapsulated hair beads for hair regenerative medicine.
3. 学会等名 ISSCR 2019 Annural Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatsuto Kageyama, Chisa Yoshimura, Sugi Hirano, Keiichiro Kasai, Junji Fukuda
2. 発表標題 Hair follicle germ formation on oxygen-permiabile microwell array chips for hair regenerative medicine
3. 学会等名 11th world congress hair research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南茂彩華、景山達斗、福田淳二
2. 発表標題 毛髪再生医療のための毛包原基のバイオプリンティング
3. 学会等名 第19回再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中嶋陸満、清水亮啓、景山達斗、福田淳二
2. 発表標題 In vitro毛幹形成技術を用いた毛髪の再生医療
3. 学会等名 第19回再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田淳二
2. 発表標題 毛髪再生医療のための細胞培養技術
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会第9回九州ブロック講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南茂彩華、景山達斗、福田淳二
2. 発表標題 毛髪再生医療のための毛包原基のバイオプリンティング
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 景山達斗、福田淳二
2. 発表標題 薬剤スクリーニングのための毛包オルガノイド
3. 学会等名 第29回日本色素細胞学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中嶋陸満、清水亮啓、景山達斗、福田淳二
2. 発表標題 In vitro毛幹形成技術とこれを利用した毛髪再生医療
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sugi Hirano, Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda
2. 発表標題 Expansion of hair follicle stem cells using oxygen-permeable microwell culture plate
3. 学会等名 TERMIS-WC 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Junji Fukuda
2. 発表標題 Engineering small and large tissues based on oxygen supply
3. 学会等名 TERMIS-WC 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda
2. 発表標題 Large-scale preparation of hair follicle germs using hydrogel bioprinting.
3. 学会等名 International Conference on Biofabrication 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sugi Hirano, Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda
2. 発表標題 Expansion culture of hair follicle stem cells while maintaining hair regeneration ability
3. 学会等名 International Conference on Biofabrication 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chisa Yoshimura, Tatsuto Kageyama, Keiichiro Kasai, Junji Fukuda
2. 発表標題 Large-scale preparation of hair follicle germ (HFG) using PDMS spheroid chips for regenerative medicine
3. 学会等名 2018 MRS fall meeting & exhibit (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 景山達斗、福田淳二
2. 発表標題 毛包ピースを用いた毛髪再生技術
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉村知紗、景山達斗、笠井敬一郎、福田淳二
2. 発表標題 毛髪再生医療の実現に向けた毛包原基大量調製デバイス
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 楯芳樹, 景山達斗, 福田淳二
2. 発表標題 毛包を有する皮膚組織の作製
3. 学会等名 第80回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福田淳二
2. 発表標題 血管を含む立体組織をつくるアプローチ
3. 学会等名 第80回日本生物工学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 景山達斗, 福田淳二
2. 発表標題 毛の種を大量につくるバイオ技術
3. 学会等名 第8回CSJ化学フェスタ2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉村知紗, 景山達斗, 笠井敬一郎, 福田淳二
2. 発表標題 毛髪再生医療の実現に向けた毛包原基大量調製技術の開発
3. 学会等名 第56回人工臓器学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 景山達斗, 福田淳二
2. 発表標題 Large-scale preparation of hair follicle germs for hair regenerative medicine.
3. 学会等名 第40回バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 楯芳樹, 景山達斗, 福田淳二
2. 発表標題 毛包原基を用いた皮膚組織の作製
3. 学会等名 第40回バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平野杉, 景山達斗, 福田淳二
2. 発表標題 創薬のための毛包幹細胞の大量培養技術
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会 第31回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福田淳二
2. 発表標題 発毛剤評価ツールおよび毛髪再生医療のための3D培養
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会 第31回大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水亮啓、景山達斗、福田淳二
2. 発表標題 毛包原基の長期培養による毛髪モデルの開発
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会 第31回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 景山達斗、福田淳二
2. 発表標題 毛包原基の大量調製および毛髪再生医療への応用
3. 学会等名 日本医工学治療学会第35回学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田淳二
2. 発表標題 細胞凝集塊の大量培養による毛髪再生
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 南茂彩華，景山達斗，福田淳二	4. 発行年 2020年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 5
3. 書名 月刊「細胞」 Hair on a chip のための生体外における毛包誘導技術	

1. 著者名 中嶋陸満、景山達斗、福田淳二	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 283
3. 書名 毛髪科学の新展開 第11章 毛包原基の大量調製技術の開発	

1. 著者名 平野杉、景山達人、福田淳二	4. 発行年 2019年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 420
3. 書名 再生医療の開発戦略と 最新研究事例集 1節 毛髪再生医療の現状と実用化へ向けた課題	

1. 著者名 吉村知紗、景山達斗、福田淳二	4. 発行年 2018年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 203
3. 書名 再生医療・創薬のための3次元細胞培養技術 第3章 毛髪再生医療のための毛包原基の大量調製技術	

〔出願〕 計5件

産業財産権の名称 再生毛の色制御方法、毛の再生方法及び毛包原基の製造方法	発明者 福田 淳二、景山 達斗、吉村 知紗、 中嶋 陸満	権利者 横浜国立大学、 神奈川県立産業 技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、2018-94498	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 細胞含有ハイドロゲル体及びその製造方法	発明者 福田 淳二、景山 達斗	権利者 横浜国立大学、 神奈川県立産業 技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、2018-94499	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 間葉系細胞の培養方法、活性化間葉系細胞の製造方法、毛包原基の製造方法、間葉系細胞の活性化方法、及び上皮系細胞の活性化方法	発明者 福田淳二、景山達斗、 エンライ、チャンピ ンビン	権利者 横浜国立大学、 神奈川県立産業 技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、2018-201545	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 毛包原基の製造方法、及び毛包原基に含まれる細胞の活性化方法	発明者 福田淳二, 景山達斗, 楯芳樹	権利者 横浜国立大学、 神奈川県立産業 技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、2018-210524	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 培養容器、及び細胞 - 担体複合体の製造方法	発明者 福田淳二, 景山達斗, エンライ	権利者 横浜国立大学、 神奈川県立産業 技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、2019-047298	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----