

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390332

研究課題名（和文） 培養ヒト線維芽細胞・表皮角化細胞を用いた毛包再生

研究課題名（英文） Hair Regeneration using cultured human fibroblasts and keratinocytes

研究代表者

貴志 和生 (KISHI KAZUO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40224919

研究成果の概要（和文）：本研究は、これまで申請者らが行ってきたマウス胎仔の皮膚再生現象の解析、マウス線維芽細胞の非接着培養による毛包誘導能の獲得の研究で得られた知見を基に、ヒト由来培養線維芽細胞およびヒト由来培養表皮角化細胞を用いて、皮膚付属器を含めた完全なヒトの皮膚を再生させることを目的とした。毛包、皮膚付属器を含めた完全な皮膚を再生させる至適培養条件を確立し、また、その分子機構についての解明を行った。

研究成果の概要（英文）：The purpose of the present study is to regenerate complete skin including hair follicles and appendages using human fibroblasts and keratinocytes based on our previous study using mice. Also, the proper condition of cultivation for regeneration was determined, and molecular mechanisms were studied.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2011年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2012年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：再生医学・毛包

1. 研究開始当初の背景

ある発生段階までの哺乳類の胎仔は、皮膚を再生させる能力を有している。申請者らは、これまでにマウス胎仔の創傷モデルを用いて、皮膚再生現象の研究を行ってきた。その中でマウス胎仔の真皮の間葉系細胞が、胎仔の皮膚再生の中心的な役割を果たしていて、免疫不全マウスの皮膚全層欠損創に表皮細胞と共に混合移植すると、皮膚付属器を伴っ

て完全な皮膚が再生することを発見した。しかし、真皮由来細胞は通常の接着培養で培養を介すると皮膚再生能が完全に消失してしまった。その後、真皮の幹細胞と考えられる Skin-derived precursors (SKPs) の培養方法で、マウス胎仔真皮細胞を培養すると、細胞が凝集塊を形成し、数継代経過してもアポトーシスを起こさずに生存することを確認した。そこで申請者らはマウス胎仔皮膚から

SKPs を培養し、上記と同様に免疫不全マウスの背部皮膚欠損創で皮膚の再構築を試みたところ、5 継代培養した後も脂腺、毛根などの付属器を含めた皮膚が再生されることを発見した。申請者らは、この細胞凝集塊を形成するという現象が原因なのか、結果なのかという疑問に至った。前者の観点から申請者らは、細胞が培養皿底面に接着しないように、超親水性の培養皿を用いることでマウス間葉系細胞に強制的に細胞凝集塊を形成させて、毛包誘導の有無を確認した。そうすると、線維芽細胞を非接着性培養皿で培養を行うことで、成獣皮膚由来の線維芽細胞を用いて確認することが出来た。

このことは、つまり細胞が底面に接着せず、細胞凝集塊を形成させることで、表皮に反応して毛包を誘導できる状態、いわば未分化な状態に近い性質を持つに至ったのではないかと考えられる。驚くべきことに、この毛包誘導能は真皮由来線維芽細胞のみならず、10 継代以上培養を行った肺由来線維芽細胞を用いても可能であった。

一方でこれまで、多くの研究者が毛包再生の研究を行ってきたが、臨床につながる結果は未だに得られていない。その中で、最近毛乳頭細胞に細胞凝集塊を形成させると、培養後も毛包誘導能が向上するという報告がなされるようになってきた。申請者らは、これまでの胎仔の皮膚再生の研究、SKPs を用いた毛包誘導、非接着培養の培養期間の延長による毛包誘導効率の上昇という偶然の産物から、線維芽細胞を用いても毛包誘導が高率に可能であることを発見した。

申請者らは SKPs の性質を鑑みた際に真皮の中に特殊な幹細胞が存在するというよりは、真皮の細胞が培養皿底面に接着せず細胞凝集塊を形成することが、毛包誘導を引き起こす原因ではないかという大胆な仮説を

立てた。これは、ES 細胞、SKPs, neurosphere、さらには表皮幹細胞が存在するバルジや、毛乳頭細胞が細胞集塊を形成しているという形態的特徴や、非接着性培養皿や旋回培養を用いて、細胞同士を接着させると細胞は 2 次元培養と違った動態を示すという報告に基づいている。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト由来の培養真皮由来線維芽細胞、培養表皮角化細胞を用いて、免疫不全マウス背部皮膚全層欠損創へ混合移植することで、毛包、皮膚付属器を含めた完全な皮膚を再生させる至適培養条件を確立し、また、その分子機構についての解明を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

R I K E N より使用に制限のないヒト由来線維芽細胞 2 種類の譲渡を受け、10% F B S 入り D M E M 培地で、10-15 継代した後に、非接着性培養皿上での培地は、HamF-12, EGF(20ng/ml), bFGF(40ng/ml) の混合溶液を用いる。非接着培養皿としては、スミロンセルタイト X (住友ベークライト社) を用いて、3 週間の培養を行い、細胞凝集塊を形成させる。酵素処理により回収したマウス新生仔表皮細胞とともに、免疫不全マウス背部皮膚全層欠損層へ混合移植を行い、毛包誘導が可能か否かを検討する。

これまでのマウスを用いた研究の知見では、 1×10^7 個の線維芽細胞の凝集塊を形成し 3 週間の培養を行った後に、 1×10^7 個の表皮角化細胞とともに混合移植を行い良好な結果を得ていた。本研究では、培養期間を 1 週から 6 週まで変動させ、細胞数を $10^4 \sim 10^8$ まで変化させ、毛包誘導率が最も

優れている条件を確認する。各々10か所の免疫不全マウス皮膚欠損創に移植を行い、至適条件が決定した後に、その条件で再度30か所で移植を行い、毛包誘導効率の再確認を行なう。

表皮角化細胞をヒト由来の細胞に変えて、ヒト表皮角化細胞—ヒト線維芽細胞の混合移植で、毛包誘導を確認する。表皮角化細胞は、クラブウから市販されている正常ヒト表皮角化細胞を用いたが、この際継代は1回のみ行ったものを用いた。

決定された至適培養条件で、ヒト表皮角化細胞—ヒト線維芽細胞の組み合わせで、20例の患者から得られた培養表皮角化細胞、培養線維芽細胞を用いて毛包誘導の確認を行い、その差異の有無を検討する。

これまでのマウス細胞を用いた研究で、非接着培養皿で培養を開始すると、培養開始1週間でWntシグナルとNカドヘリンの発現が増強することが示された。Wntは毛乳頭の毛包誘導能を維持する働きがあり、毛包形成の中心的な役割を果たしている。非接着培養皿の培養を行うとNカドヘリンの増強とともに、 β -カテニンも劇的に増加し、核への集積も認められた。古典的Wntシグナルは、 β -カテニンの増加と核移行を介してシグナルが伝達されることを考えると、非接着培養皿の培養により、Nカドヘリンの発現が増強し、それに伴い古典的経路のWntシグナルが活性化され、毛包誘導能を獲得できたと考えられる。

さらに非接着培養による毛包誘導獲得のその他のメカニズムに迫るために、毛包誘導に関係していると考えられている、さまざまな因子につき、2次元培養と非接着培養での発現の差異をRT-PCRで観察その機能を解析する。

移植後1か月から12か月まで経時的に再

生皮膚を回収し、組織像から毛周期を観察する。また、フィラグリン、ロリクリン、ケラチン10、トランスグルタミナーゼ、p63、Ki-67などに対する抗体を用いることで、正常ヒト頭髪組織と比較して、表皮、毛包の正常な分化、分裂が起きているか否かを確認する。

4. 研究成果

毛包の発生では胎生期に表皮と真皮の相互作用により真皮凝集塊が形成され、この真皮凝集塊がその後毛乳頭細胞となり、毛包を誘導する。

マウスを用いて毛乳頭細胞と表皮細胞を混合移植することで毛包誘導が可能であったという報告は存在する。しかし毛乳頭細胞を通常の2次元培養で培養すると、毛包誘導効率が急速に悪化する。一方で、毛乳頭細胞に凝集塊を作らせると、毛包誘導効率が維持できるという報告がなされている。

Skpや、ES細胞、神経幹細胞は、培養下で凝集塊を形成している。in vivoでは、表皮幹細胞が存在するバルジや、毛乳頭細胞もそれぞれ凝集塊を形成している。これらの特徴からわれわれは、細胞が培養下で接着せず、細胞同士が凝集塊を形成することが、未分化な状態を維持し、毛包誘導に関与しているのではないかという仮説を立てた。

この仮説をもとに、マウス胎仔および新生仔の皮膚由来の線維芽細胞を用いて毛包誘導が可能かどうか検証した。まずマウス背部皮膚より採取した細胞を接着培養により数継代培養した後、非接着性の培養皿を用いて、細胞凝集塊を作成した。3週間培養を行ったのち、マウス胎児および新生児の表皮細胞を採取し、作成した真皮線維芽細胞凝集塊とともに、免疫不全マウス背部皮膚欠損創へ混合移植を行った。

そすると非接着培養で得られた真皮線維芽細胞凝集塊と、表皮細胞を混合移植した群では、移植後4週で、移植したC57blの黒い毛包の再生を確認できた。一方で、通常の接着培養を行った線維芽細胞と表皮細胞を混合移植した群や、表皮細胞のみを移植した群では、毛包の再生を認めなかった。再生した皮膚では、脂腺を含めた、ほぼ正常な毛包の形成が認められ、Loricrin、Filaggrin、Keratin10、およびTransglutaminaseが陽性であり、正常な表皮および毛包の分化が示された。同様の実験を、GFPマウス由来真皮線維芽細胞を用いて行ったものでは、再生した毛包の毛乳頭が、GFP陽性細胞で形成されていることが認められた。

ヒト皮膚由来の線維芽細胞を用いて、毛包の誘導が可能であるか否かを検討した。細胞は、RIKENより使用に制限のない3種類のヒト皮膚由来線維芽細胞を使用した。その後、非接着性培養皿を用いて、3週間培養を行った。表皮は、胎生17日から新生児のC57bl/6Jマウス皮膚から採取した表皮細胞を用い、得られた細胞凝集塊と混合し、scid背部皮膚欠損創へ移植した。移植細胞は、各々 1×10^7 個を使用した。

非接着培養で得られたヒト真皮線維芽細胞凝集塊と、マウス表皮細胞を混合移植した群では、白いscid mouseの皮膚の中に黒い毛包の再生を認めた。一方で、通常の接着培養を行った線維芽細胞と表皮細胞と混合移植した群では、毛包の再生を認めなかった。

ヒト線維芽細胞凝集塊を用いて再生した皮膚では、脂腺を含めたほぼ正常な毛包の形成が認められた。

再生した皮膚は、正常皮膚と同様にLoricrin、Filaggrin、Keratin10が陽性であり、正常な表皮の分化が示された。

Versicanは、毛乳頭細胞で発現していること

が報告されているが、再生した皮膚でVersicanの発現を調べたところ毛乳頭および結合織性毛包において細胞と細胞間質が陽性に染色されていた。

その後、クラブウからヒト培養表皮角化細胞を購入し、培養後に前述の培養線維芽細胞とともに、scid mouse およびNOGマウスへの移植を試みた。NOG mouseは飼育環境で良好に成育することは可能であったが、手術侵襲に弱く、10匹行った移植手術で、すべて術後早期に死亡した。scid mouseへの移植も行ったが、購入した培養表皮角化細胞は色素細胞を有していなかったため、再生毛包とマウス由来毛包の区別が困難であった。その後明らかかな毛包を有していないnude mouseへの移植を行ったが、nude mouseの環境下では、ヒト培養角化細胞とヒト皮膚由来線維芽細胞の組み合わせで毛包再生は見られなかった。

非接着培養皿で培養を開始すると、ヒト線維芽細胞においてもWntシグナルとNカドヘリンの発現が増強することが示された。またN-カドヘリンの増強とともに、 β -カテニンも劇的に増加し、核への集積も認められた。

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3件)

- 1: Kishi K, Okabe K, Shimizu R, Kubota Y. Fetal skin possesses the ability to regenerate completely: complete regeneration of skin. Keio J Med. 2012 Dec;61(4):101-8. PubMed PMID: 23324304. 査読有
- 2: Shimizu R, Kishi K. Skin graft. Plast Surg Int. 2012;2012:563493. doi:

10.1155/2012/563493. Epub 2012 Feb 6.
PubMed PMID: 22570780; PubMed Central
PMCID: PMC3335647.

査読有

3: Shimizu R, Okabe K, Kubota Y,
Nakamura-Ishizu A, Nakajima H, Kishi K.
Sphere formation restores and confers
hair-inducing capacity in cultured
mesenchymal cells. Exp Dermatol. 2011
Aug;20(8):679-81. doi:

10.1111/j.1600-0625.2011.01281.x. Epub
2011 Apr 27. PubMed PMID: 21521371.

査読有

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

貴志和生 (KISHI KAZUO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号: 40224919

(2) 研究分担者

坂本好昭 (SAKAMOTO YOSHIKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 10464835

久保田義顕 (KUBOTA YOSHIKI)

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号: 50348687

(3) 連携研究者

なし