

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 24 年 5 月 17 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791083

研究課題名（和文）In vitro 発毛システムの開発と Wnt シグナルによる発毛再生機序の解明

研究課題名（英文）Development of in vitro hair-culture-system using Wnt proteins
- Analysis of Wnt-dependent hair regeneration -

研究代表者

王寺 幸輝 (OUJI YUKITERU)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：50343421

研究成果の概要（和文）：

発毛には、皮膚上皮幹細胞 (EpSCs) と毛乳頭細胞 (DPCs) が必須であるが、これらの *in vitro* 培養系の確立はいまだ達成されていない。そこで、本研究では、それらの細胞の培養方法を確立し、*in vitro* 発毛システムに適用することで、試験管内における毛包の再生を検討した。

成体マウスから単離した EpSCs は、Wnt-3a により未分化な状態を維持できる可能性が示唆された。また、DPCs に対し Wnt-10b は、細胞増殖および発毛誘導能の維持に効果的であった。このようにして得られた EpSCs と DPCs の *in vitro* 共培養 (*in vitro* 発毛システム) を行った結果、毛様構造が認められた。

研究成果の概要（英文）：

Epithelial stem cells (EpSCs) and dermal papilla cells (DPCs) are essential for hair follicle morphogenesis. However, *in vitro* culture methods of those have not been established. In this study, I aimed to develop the isolation of mouse EpSCs and DPCs and their cultivation using Wnt proteins.

Mouse EpSCs were collected by sorting the cells positive for CD34 and CD49f. They could proliferate and maintain the expression of stem cell markers in the passaged cultures in the presence of Wnt-3a. The addition of Wnt-10b to the DPCs promoted their proliferation and maintained their hair follicle induction ability. These effects were observed even in DPCs after 10 passages in the presence of Wnt-10b. Furthermore, the hair-like structures were found in co-cultivation with EpSCs and DPCs *in vitro*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚炎症・再生学、毛包再生医学

【1. 研究開始当初の背景】

発毛には、少なくとも2種の細胞（上皮系細胞・間葉系細胞）が必須である。近年、毛包組織内の発毛に関わる細胞種として注目されている皮膚上皮幹細胞 (epithelial stem cells; EpSCs) は、毛乳頭を除く毛包組織を再構築することができるため、毛包の完全再生に必須の細胞と言える。さらに、毛乳頭細胞 (dermal papilla cells; DPCs) は、発毛を誘導する必須の細胞であって、*in vivo* で発毛が実現できる毛包再構築実験 (hair reconstitution assay) においても必須の細胞種である。しかしながら、これらの細胞 (EpSCs と DPCs) の単離および長期 *in vitro* 培養系はいまだ確立されておらず、これらの確立こそが「*in vitro* 発毛システム」の開発には必須と考えられた。

EpSCs の単離・培養はこれまで CD34 および CD49f を用いた cell sorting を行うことで培養系を確立しており、Wnt シグナルの Wnt-10b が細胞分化を促進することを明らかにした (Y. Ouji, et. al., *J. Biosc. Bioeng.*, **110**: 217-222. 2010.)。しかしながら、長期培養維持には、別の因子あるいはシグナルが必要と考えられたため、他の Wnt シグナルに注目し、未分化維持に効果的な因子の探索を試みることで、EpSCs の *in vitro* 培養系の確立が実現できると考えた。

一方で、DPCs は継代培養すると発毛誘導能の低下がおこり、その *in vitro* 培養系の確立には Wnt シグナルが重要であることが提唱されている (J. Kishimoto, et. al., *Genes Dev.*, **14**:1181-1185. 2000)。Wnt シグナルの特に Wnt-10b は、発毛初期に過剰発現し、毛乳頭の初発因子でもあることから (S. Reddy, et. al., *Mech. Dev.*, **107**:69-82, 2001)、Wnt-10b は DPCs の *in vitro* 培養系に効果的に働く候補因子と予想された。

以上のように本研究計画では、これらの2種の細胞の単離および *in vitro* 培養系を確立し、*in vitro* 発毛システムに適用することで、試験管内における毛包再生を実現することを目標とし、本研究を計画した。

【2. 研究の目的】

In vitro 発毛システムを開発するために、**①**細胞のソースとなる皮膚上皮幹細胞 (EpSCs) と毛乳頭細胞 (DPCs) の細胞単離系を確立し、**②***in vitro* 培養系の確立とキャラクターゼーションを行う。さらに、EpSCs と DPCs の混合培養系を用いることで、**③***in vitro* 発毛システムのパイロット試験を行う、

以上の3点について検討することを本研究の目的とした。

【3. 研究の方法】

(1) EpSCs の単離

成体マウス背中皮膚より皮膚組織を回収し、トリプシン処理後、上皮細胞粗分画を単離した。さらに、抗 CD34、抗 CD49f 抗体を用いた免疫染色により2重染色分画を cell sorting することで EpSCs を単離した。

(2) DPCs の単離

成体マウス口髭より毛包器官を単離し、10%FBS-DMEM 培地内で毛乳頭を静置し、初代培養を行った (図1)。初代培養後、細胞マーカーの遺伝子発現および ALP 染色を行い、DPCs の細胞活性を評価した。



図1

(3) DPCs の *in vitro* 培養と Wnt の影響

(1)の項目に従って得られた DPCs は、DMEM を基本培地とし、Wnt-10b 組み換えタンパク質を培養液に添加し、培養した。解析は、細胞増殖および RT-PCR による遺伝子解析の他、ALP 染色を行うことで細胞活性の維持を評価した。

(4) DPCs の *in vivo* 移植と発毛誘導能評価

ヌードマウス (BALB/C -nu/nu) を用いてグラフトチャンバーを埋め込み、C3H/HeN マウス由来上皮細胞と初代培養、あるいは継代培養した DPCs を移植した。移植から1ヶ月後の皮膚表面の評価 (マクロ解析) および皮膚組織を摘出し、組織学的な評価 (ミクロ解析) を行った。

(5) EpSCs および DPCs の *in vitro* 混合培養

(1), (2)の項目で得られた EpSCs と DPCs を基本培地 (DMEM/Epilife) 混合培養液にて *in vitro* 培養を行い、擬似的発毛を試みた。

【4. 研究成果】

(1) EpSCs の *in vitro* 培養

成体マウス背中皮膚組織より単離した EpSCs を種々の Wnt (Wnt-3a, 5a, 10b, 11) で添加培養した場合、Wnt-3a のみが未分化な分画を維持可能であった (図2)。

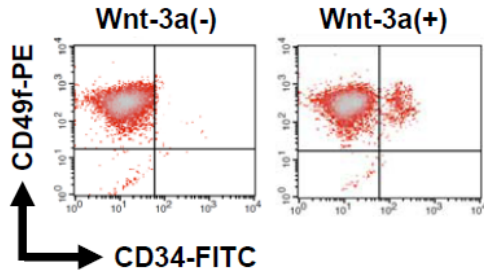


図 2

(2) DPCs の *in vitro* 培養

成体マウス口髭より単離した毛乳頭を 10%FBS-DMEM を用いて初代培養し、マーカー遺伝子 (versican) の発現および ALP 染色を行ったところ、何れも陽性であることを確認した (図 3)。

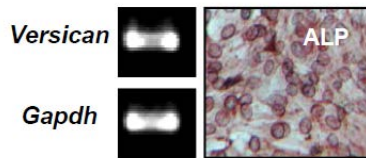


図 3

(3) 培養 DPCs における Wnt-10b の影響

培養 DPCs における Wnt-10b の影響を *in vitro* にて調べた結果、Wnt-10b は、DPCs の増殖を促進させ、versican の発現および ALP の活性維持に働くことを明らかにした (図 4)。

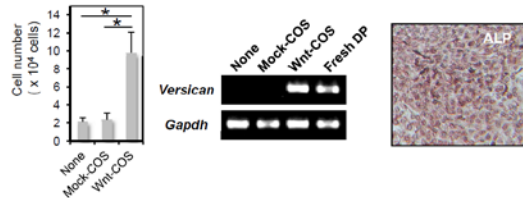


図 4

(4) DPCs の継代培養における Wnt-10b の影響

DPCs は、Wnt-10b により長期培養後 (約 100 日間) においても、versican の発現および ALP の活性を維持することが明らかとなった (図 5)。

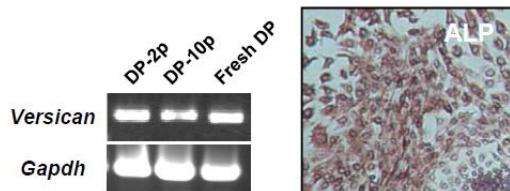


図 5

(5) DPCs の *in vivo* 移植と発毛誘導能評価

hair reconstitution assay により、Wnt-10b で培養した DPCs は、長期間培養後も発毛誘導能を維持可能であることを明らかにした (図 6)。



図 6

(6) EpSCs および DPCs の *in vitro* 混合培養

成体マウスの皮膚由来 EpSCs と DPCs との共培養を行った結果、*in vitro* にて毛様構造が出現した (図 7)。

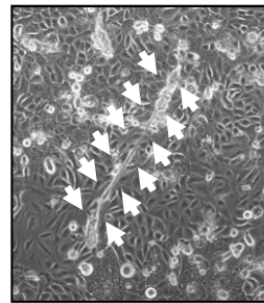


図 7

(7) 結論と今後の展望

発毛の鍵となる細胞 (EpSCs と DPCs) に着目し、*in vitro* 培養系の確立を行った。特に DPCs の培養系に着目し、Wnt シグナルの影響を調べたところ、Wnt-10b が DPCs の増殖や機能維持に重要な役割を果たしており、長期培養も可能であることを明らかにした。さらに、*in vitro* 発毛システムのパイロット試験では、毛様構造が認められた。これらの成績は、発毛現象に関わる毛包組織内の各種細胞の維持・分化プロセスの解明に重要な知見を与えるばかりでなく、Wnt による毛包細胞を用いた再生医療への基礎的な研究データとしても十分意義のあるものと考えられた。

今後は、EpSCs と DPCs の *in vitro* 混合培養で出現した“毛様構造物”を詳細に解析し、さらに培養条件を検討することで、*in vitro* 発毛システムの確立を目指し、更に、Wnt シグナルによる毛包構築の変化等を検討することで、Wnt シグナルの発毛現象における関わりを解明する。

【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 5 件)

①

Ouji Y, Yoshikawa M, Nishiofuku M, Ouji-Sageshima N, Kubo A, Ishizaka S. Effects of Wnt-10b on proliferation and differentiation of adult murine skin-derived CD34 and CD49f double-positive cell.

J. Biosc. Bioeng.

査読有

Vol. 110、2010、pp217-222.

DOI : 10.1016/j.jbiosc.2010.01.020

②

Ouji Y, Yoshikawa M, Nishiofuku M, Ouji-Sageshima N, Matsuda R, Nishimura F, Ishizaka S.

Isolation and characterization of murine hepatocytes following collagenase infusion into left ventricle of heart.

J. Biosc. Bioeng.

査読有

Vol. 110、2010、pp478-490.

DOI : 10.1016/j.jbiosc.2010.04.015

③

Nishiofuku M, Yoshikawa M, Ouji Y, Saito K, Moriya K, Ishizaka S, Nishimura F, Matsuda R, Yamada S, Fukui H.

Modulated differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells by coculture with hepatic stellate cells.

J. Biosc. Bioeng.

査読有

Vol. 111、2011、pp71-77.

DOI : 10.1016/j.jbiosc.2010.08.005

④

Ouji Y, Ishizaka S, Nakamura-Uchiyama F, Yoshikawa M.

In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells into inner ear hair cell-like cells using stromal cell conditioned medium.

Cell Death & Disease

査読有

in press、2012.

<http://www.nature.com/cddis/index.html>

⑤

Ouji Y, Ishizaka S, Yoshikawa M. Dermal papilla cells serially cultured with Wnt-10b sustain their hair follicle induction activity after transplantation into nude mice.

Cell Transplant.

査読有

in press、2012.

DOI : 10.3727/096368912X636867

〔学会発表〕 (計 6 件)

①

Ouji Y, Yoshikawa M, Ishizaka S.

Effects of Wnt-3a on proliferation and differentiation of murine skin epithelial stem/progenitor cells.

14th International Congress of Immunology
2010年8月23日、神戸

②

Ouji Y, Yoshikawa M, Ishizaka S.

The role of Wnt-3a on proliferation and differentiation of murine skin epithelial stem/progenitor cells

The 16th International Conference of the International Society of the Differentiation

2010年11月17日、奈良

③

Ouji Y, Yoshikawa M, Ishizaka S.

The role of Wnt-3a on proliferation and differentiation of murine skin epithelial stem/progenitor cells

第35回 日本研究皮膚科学会学術大会
2010年12月3日、和歌山

④

王寺幸輝、吉川正英、石坂重昭

皮膚毛包上皮幹細胞の長期培養法と Wnt シグナルの役割について

第10回 日本再生医療学会

2011年2月28日、東京

⑤

王寺幸輝、吉川正英

マウス毛乳頭細胞における Wnt-10b の影響

第40回 日本免疫学会総会

2011年11月29日、千葉

⑥

Ouji Y, Yoshikawa M.

Wnt-10b promotes the proliferation of
dermal papilla cells and maintains their
hair induction-ability

第 36 回 日本研究皮膚科学会学術大会

2011 年 12 月 9 日、京都

【6. 研究組織】

(1) 研究代表者

王寺 幸輝 (OUJI YUKITERU)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：50343421