

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591653

研究課題名(和文) ヒト頭部皮膚由来毛包幹細胞を組み込んだ培養皮膚を用いた損傷皮膚の再生医療の確立

研究課題名(英文) Regeneration of the injured skin by the hair follicle stem cell

研究代表者

天羽 康之 (AMOH, YASUYUKI)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：10306540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：我々は世界に先駆けて、皮膚毛包から分離した毛包幹細胞が神経細胞・グリア細胞・角化細胞等に分化することを明らかにした。我々が開発した毛包幹細胞による再生医療は倫理面や拒絶反応の問題がなく、他部位の成体組織幹細胞と比較して、患者への採取リスクが低いことから、早期の臨床応用が期待されるため早急の研究開発が重要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have previously demonstrated that the stem-cell marker nestin is expressed in hair follicle stem cells. The hair-follicle stem cells are keratin 15-negative and CD34-positive and could differentiate to neurons, glia, keratinocytes, smooth muscle cells and melanocytes in vitro. Subsequently, we showed that the nestin-expressing stem cells could affect nerve and spinal cord regeneration after injection in mouse models. The method described here is appropriate for future use with human hair follicles to produce nestin-expressing hair follicle stem cells in sufficient quantities for nerve and spinal cord regeneration in the clinic.

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：再生医療 毛包 神経

1. 研究開始当初の背景

我々は世界に先駆けて、皮膚毛包から分離した毛包幹細胞が神経細胞・グリア細胞・角化細胞等に分化することを明らかにした。我々が開発した毛包幹細胞による再生医療は倫理面や拒絶反応の問題がなく、他部位の成体組織幹細胞と比して、患者への採取リスクが低いことから、早期の臨床応用が期待される。北里大学医学部皮膚科では、すでにヒト頭部皮膚からの毛包幹細胞分離に国内で初めて成功し、多くの研究成果を挙げ、国内外へ発信している。さらに、本大学の北里大学医療衛生学部人工皮膚研究開発センターでは培養皮膚、培養真皮の作成を行える組織を有し、常に培養真皮の作成を行っている。同センター長の黒柳能光教授とは培養皮膚作成に関する共同研究を行っている。また、我々は膠原線維結合能を有する basic fibroblast growth factor や VEGF 等の増殖因子を用いて、損傷皮膚再生能を明らかにしている。すでに損傷皮膚や鼓膜の再生医療に向けた研究が進んでいる。これらの研究基盤を利用して、皮膚由来毛包幹細胞を組み込んだ培養皮膚を用いた損傷皮膚の再生医療の確立に向けた検討を行った。

2. 研究の目的

我々は、神経系幹細胞の重要なマーカーとなる class IV 中間径フィラメント nestin 遺伝子のプロモーターを用いた GFP 遺伝子導入トランスジェニックマウスを作成し、皮膚毛包幹細胞に nestin が強発現していることを見い出すと共に、皮膚毛包から摘出した毛包幹細胞が神経細胞・グリア細胞・角化細胞等に分化することを明らかにした。また、毛包幹細胞をマウスの切断坐骨神経及び脛骨神経間へ移植した場合、末梢有髄神経の再生を確認した。さらに脊髄損傷部への毛包幹細胞移植により、運動機能を改善することも確認した。これらの結果、多分化能を有する毛包幹細胞の末梢、中枢神経再生医療への応用の可能性が示唆された。皮膚毛包由来毛包幹細胞を用いた再生医療は、神経や皮膚損傷患者自身の皮膚毛包からの幹細胞を用いる事で拒絶反応を考慮する必要がない。骨髄や中枢神経由来成体組織幹細胞と比して、毛包幹細胞の採取に於いて患者自身へのリスクが極めて少なく、単純な分離培養法で効率良く多くの幹細胞を取り出すことができる。近年話題になっている iPS 細胞や ES 細胞が、腫瘍化の危険から臨床応用が極めて難しいのと比較して、皮膚由来の幹細胞は腫瘍化等の危険性が極めて少なく、高い安全性が期待される。これらの点はこれまでの再生医療とは全く異なり、特色ある独創的研究である。従って、本研究は末梢神経と皮膚の損傷患者に対

し画期的な治療法となる可能性が高く、社会的貢献のある研究となることが期待される。また、本研究は国内外を問わず高い新規性を有した、臨床応用への可能性が非常に高い重要な研究と考えられる。

さらに最近我々は、ヒトにおいてもマウス同様に毛包幹細胞が多分化能を有することを、インフォームドコンセントに基づいて得られたヒト頭部皮膚を用いた検討で明らかにした。本研究期間内に我々は、毛包幹細胞による末梢神経や皮膚付属器の再生能を解明すると共に、創傷治療における毛包幹細胞による再生過程の詳細な解明を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) インフォームドコンセントに基づいて採取した患者様由来の頭部皮膚組織の生検材料から毛包を分離し、幹細胞領域を神経幹細胞培養液 (無血清培養用サプリメント B-27、basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor を加えた培養液) で培養し、毛包幹細胞のコロニーを形成させた。毛包幹細胞のコロニーを 10% FBS 含有 RPMI 1640 培養液に移し、その多分化能を確認した。毛包幹細胞が神経細胞、グリア細胞、ケラチノサイト、平滑筋細胞に分化することを、それぞれの細胞に特異的な一次抗体 (神経細胞は β III-tubulin、gamma aminobutyric acid、グリア細胞は glial fibrillary acidic protein, 2'-3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase、ケラチノサイトはケラチン 15、平滑筋細胞は平滑筋アクチン) と蛍光色素をつけた二次抗体を用いて免疫細胞染色を行った。

(2) 皮膚由来毛包幹細胞のコロニーをヌードマウスまたは SCID マウス座滅した末梢神経周囲に移植し、グリア細胞や神経系細胞への分化能を免疫組織染色法で確認する。神経細胞やグリア細胞への分化の確認は凍結切片を用いた免疫組織染色法を行い、ヒト HLA の *in situ* hybridization との 2 重染色から、移植した毛包幹細胞の再生能を確認する。末梢神経損傷部移植による機能回復は電気生理学的に明らかにする。腫瘍化の可能性については *in vivo* と *in vitro* で遺伝子異常の発現や組織学的な検討によって十分に検討して臨床応用に向け、安全性を詳細に確認する、本研究は今回の申請研究の基盤になるものである。

(3) 分層採取した皮膚に毛包幹細胞を移植し幹細胞による血管新生能を利用して、移植皮膚の生着率の向上を目的とした新しい植皮治療の確立を目指す研究として分層採取した皮膚に毛包幹細胞を組み込んでヌードマウスに移植し、生着率と血管新生能を in

vivo で詳細に解析する。我々はすでに毛包が強力な血管新生能を有し、創傷治癒において重要な役割を果たしていることを明らかにした。培養表皮と培養真皮を組み合わせた培養皮膚を本大学では 10 年以上前から開発している。しかし、培養皮膚は末梢神経をはじめとする皮膚付属器を全く有していないため、実用には難点があり、広く使用されてはいない。今回我々は、皮膚内に毛包幹細胞や毛包幹細胞から分化したグリア細胞を組み込んだ、感覚神経の再生能に優れた新しい皮膚潰瘍治療法を確立することを本研究期間内の目標とする。培養皮膚の作成時点で、毛包幹細胞そのものと、毛包幹細胞から分化したグリア細胞を組み込んだ培養皮膚を作成する。そして、この新しい培養皮膚をヌードマウスに移植し、末梢神経の再生能を確認する検討を行った。

4. 研究成果

(1) ヒトの頭部毛包における毛包幹細胞の分布を明らかにした。ヒトの頭部毛包における毛包幹細胞もマウスとほぼ同様の分布を示す。毛包脂腺付着部の毛包幹細胞領域には、ネスチンを強く発現し、ケラチン15陰性の多分化能を有する毛包幹細胞が分布する。毛包バルジ領域には、ケラチン15陽性、ネスチンを弱く発現するケラチノサイトの前駆細胞が分布する。ヒト毛包から分離したネスチンを強く発現し、ケラチン15陰性の毛包幹細胞は神経細胞、グリア細胞、ケラチノサイト、平滑筋細胞に分化した。さらに多分化能を有するヒト頭部皮膚由来毛包幹細胞をヌードマウスの切断または挫滅した坐骨神経間に移植したところ移植しないものがグリア瘢痕となって軸索がほとんど再生しないのと比較して有意に損傷部の軸索の再生が促進されることを確認した。また神経接合部の上流を電気刺激したところ、移植しないものと比較して有意に早期に腓腹筋収縮能が改善し、神経機能の改善を確認した。これらの結果からヒト頭部皮膚由来の毛包幹細胞は末梢神経損傷部の修復に有用である可能性が高いと考えた。

(2) 我々は、毛包幹細胞による挫滅損傷した末梢神経や皮膚付属器、筋肉組織の再生能を解明するため、毛包より効率よく毛包幹細胞を分離する手技を確立した。毛包幹細胞から分裂したばかりの未熟な細胞を効率よく大量培養する手法であり、論文として報告を行った。さらに本手法で分離した毛包幹細胞を挫滅損傷した末梢神経や皮膚付属器、筋肉組織、損傷精髓部に移植し、再生実験を行っており、すでに末梢神経や脊髄損傷部での高い再生能を確認しており、論文の作成を行っている。現在、毛包幹細胞の臨床応用へ向けた

前段期の検討として、毛包全体を保存する方法と幹細胞のコロニーを保存する方法を比較し、保存方法の確立の検討を行っている。(3) 培養皮膚への毛包幹細胞の組み込み実験は、幹細胞からの神経への分化が確認されたが、移植部局所のみにとどまっており、周囲組織に至る広範囲の組織修復は確認できなかったため、さらに移植条件を変えながら損傷皮膚の再生能力に関する検討を継続中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Yasuyuki Amoh, Ryoichi Aki, Yuko Hamada, Shiro, Niiyama, Koji Eshima, Katsumasa Kawahara, Yuichi Sato, Yoichi Tani, Robert M. Hoffman, Kensei Katsuoka, Nestin-positive hair follicle pluripotent stem cells can promote regeneration of impinged peripheral nerve injury, The Journal of Dermatology, 査読有、39巻、2012、33-38 DOI:10.1111/j.1346-8138.2011.01413.x.
Yasuyuki Amoh, Sumiyuki Mii, Ryoichi Aki, Yuko Hamada, Katsumasa Kawahara, Robert M. Hoffman, Kensei Katsuoka, Multipotent nestin-expressing stem cells capable of forming neurons are located in the upper, middle, and lower part of the vibrissa hair follicle, Cell Cycle, 査読有、11巻、2012、3513-3517 DOI:10.4161/cc.21803

[学会発表](計3件)

Yasuyuki Amoh, Sumiyuki Mii, Ryoichi Aki, Yuko Hamada, Katsumasa Kawahara, Robert M. Hoffman, Kensei Katsuoka, Upper part of hair follicle with can produce large numbers of cultured nestin-expressing stem cells for nerve repair demonstrating clinical potential, The seventh World Congress for Hair Research, 2013/5/4-6, Scotland
Yasuyuki Amoh, Sumiyuki Mii, Ryoichi Aki, Yuko Hamada, Katsumasa Kawahara, Robert M. Hoffman, Kensei Katsuoka, High-throughput production of hair-follicle nestin-expressing stem cells for regenerative medicine, The 42nd Annual Meeting of the European Society for Investigative Dermatology, 2012/9/19-22, Venice
Yasuyuki Amoh, Kenichi Tanabe, Sumiyuki Mii, Yuko Hamada, Kensei Katsuoka, ヒト頭部毛包における、バルジ領域と多分化能を有する毛包幹細胞領域における幹細胞遺伝子の発現、第19回毛髪科学学会、2011年11月26日、東京

〔図書〕(計1件)

監修：前田憲寿、シーエムシー出版、毛
髪再生の最前線、分担執筆：天羽康之、
第1編、第8章、毛包幹細胞の多分化能
と再生医療への臨床応用、2013、72-79

6．研究組織

(1)研究代表者

天羽 康之 (AMOH, Yasuyuki)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：10306540