

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591661

研究課題名(和文) In vitro 発毛システムを用いた発毛現象の解明とWntシグナルの役割について

研究課題名(英文) Elucidation of trichogenous using in vitro hair-culture system

研究代表者

王寺 幸輝 (Ouji, Yukiteru)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：50343421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：発毛現象の解明には、細胞動態をリアルタイムで観察可能な系が求められる。その実現に向けて、発毛の鍵となる2つの細胞(皮膚上皮幹細胞EpSCsと毛乳頭細胞DPCs)の長期的培養法の確立と、それらを用いた新生毛の誘導(in vitro発毛システム)を検討した。EpSCsを種々のWntにより培養したところ、Wnt-3aのみが長期的な培養を可能にし、その多分化能(毛包細胞への分化能)も維持された。またDPCsは、Wnt-10bが特異的に長期培養を可能にすることが明らかとなった。EpSCs/DPCsの混合培養により毛包様構造が生じ、それらの誘導にWntシグナルが関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Observation of real-time cell dynamics is needed for evaluation of trichogenesis. In this study, I developed long-term cultivation method of two type cells, epithelial stem cells (EpSCs) and dermal papilla cells (DPCs), which are essential for trichogenesis by using Wnt proteins. EpSCs proliferated markedly in the presence of Wnt-3a, maintained undifferentiated epithelial cell marker expression, and promoted hair follicle development in vivo. DPCs cultured with Wnt-10b were promoted their proliferation and maintained their hair follicle induction ability. These results strongly suggested the important roles of specific Wnts in the maintenance of EpSCs and DPCs. Furthermore, mixtures of EpSCs and DPCs differentiated into the structures with immature hair in vitro.

研究分野：医歯薬学

キーワード：発毛 Wntシグナル 幹細胞 上皮 毛乳頭 再生医学 細胞移植

1. 研究開始当初の背景

これまでに、完全なる *in vitro* で、成熟毛包を新生・再生させた報告はない。*In vivo* での発毛を実現している既報 (Toyoshima *et al.*, *Nature Commun.*, 2012 など) から判断すると、未熟な毛包由来細胞や幹細胞を用いて“成体内移植すること”が、毛包組織構築には必要条件である。しかしながら、これらの条件では実験動物と成体への移植実験が必要であり、大量スクリーニングに適さないなどデメリットも多い。しかし、発毛プロセスを完全に *in vitro* で実現することができれば、その解析も容易になり、発毛過程をリアルタイムで観察することさえも可能になると予想される。そこで、発毛に必要な細胞材料 (上皮系細胞・間葉系細胞) を用いることで、完全なる *in vitro* での発毛を実現できる系の開発が望まれた。その実現には、毛包組織内に存在する 2 種の細胞 (皮膚上皮幹細胞: epithelial stem cells; EpSCs、毛乳頭細胞: dermal papilla cells; DPCs) を採取し、長期的に維持可能な系を確立することが必須である。

また、Wnt シグナル伝達系は、種々の発生・分化に関わるシグナル伝達系として、近年注目されており、発毛発生においても例外ではない。私はこれらの細胞 (EpSCs と DPCs) を維持可能な因子として着目し、種々の Wnt を用いて長期培養系の確立および維持メカニズムについて精査し、それらを用いて *in vitro* で発毛を実現するシステム「*in vitro* 発毛システム」の開発に着手することとした。

2. 研究の目的

In vitro 発毛システムの開発を念頭に、その細胞源となる皮膚上皮幹細胞 (EpSCs) と毛乳頭細胞 (DPCs) の長期培養系を確立し (①)、それらの細胞における種々の Wnt 応答性を精査し (②)、それらの細胞を用いて *in vitro* 発毛システムにより新生する毛を創生する (③)、以上の 3 点について検討することを本研究計画の目的とした。

3. 研究の方法

(1) EpSCs の単離・培養

EpSCs の単離は、成体マウスの背中皮膚をトリプシン処理にて真皮と上皮に分離し、上皮細胞分画を、CD34、CD49f 抗体により免疫染色後、ソーター (FACSARIA) により単離した。単離後の EpSCs は、基本培地として上皮細胞培地 Epilife を用いて接着培養を行った。解析は、細胞増殖、遺伝子発現、免疫染色等により行い、その未分化性を確認した。

(2) DPCs の単離・培養

成体マウス口髭からマイクロダイセクションにより毛乳頭を単離し、培養後に増殖した細胞を回収することで、実験に供した。単

離後の DPCs は、DMEM を基本培地として接着培養を行った。解析は、細胞増殖、遺伝子発現、免疫染色等により行った。さらに、DPCs の細胞活性は、マーカーとされる versican のプロモーターを用いた Tg マウスから単離した毛乳頭を用いることでリアルタイムに評価した。

(3) *In vivo* 移植実験

ヌードマウス (BALB/C -nu/nu) にグラフトチャンバー法、あるいは Patch 法を用いて EpSCs/DPCs を移植し、移植後組織解析することで、EpSCs と DPCs の多分化能、発毛誘導能を評価した。

(4) *In vitro* 発毛システム

継代培養された EpSCs と DPCs を用いて *in vitro* での発毛を試みた。浮遊系あるいは接着系培養により新生する毛包を評価した。

4. 研究成果

(1) *In vitro* 培養 EpSCs に対する Wnt の影響

単離後の EpSCs を種々の Wnt により培養したところ、Wnt-3a のみが未分化分画を維持可能なことが明らかとなった (図 1)。また、種々の Wnt シグナルの影響を詳細に調べた結果、Wnt-3a による未分化状態の維持は、特異的であることが明らかとなった。

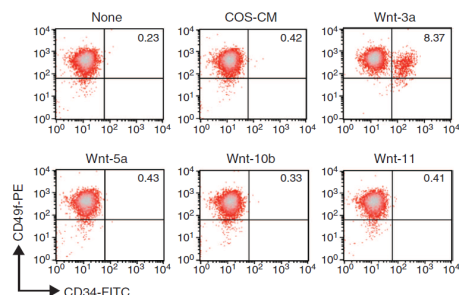


図 1

(2) EpSCs の長期的 *in vitro* 培養系の確立

EpSCs は、Wnt-3a 添加によって *in vitro* 培養が可能であることが明らかとなったため、長期的な培養を試みた。その結果、15 回の継代後 (150 日間) も EpSCs の特性を保持可能であった (図 2)。また、Wnt-3a による EpSCs の維持には、TOPFLASH assay により canonical signal pathway が関わっていることも明らかとなった (図 3)。

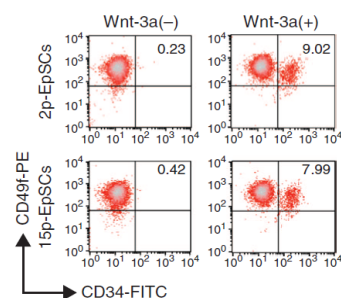


図 2

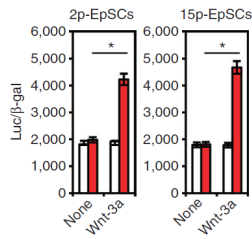


図 3

(3) *In vitro*培養DPCsに対するWntの影響

DPCsの長期的な*in vitro*培養は、Wnt-10bを添加した培養系で、10継代(100日間)に渡る長期培養が可能であり、その発毛誘導能も維持可能であることを我々は報告している(*Cell Transplant.*, 2012)。そこで、DPCsに対する他のWntに関する情報を得るため、DPCsに種々のWntを添加培養したところ、Wnt-10bが特異的に増殖活性を亢進させた(図4)。更に、Versican-Tgマウス由来DPCsを用いた実験により、その活性が維持されていることが実証された(図5)。

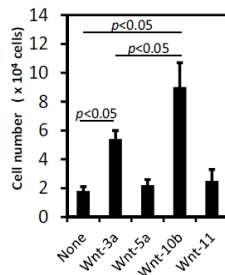


図 4

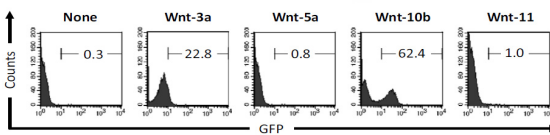


図 5

(5) *In vitro*での発毛と解析

成体マウス由来EpSCsおよびDPCsを単離・培養後、共培養(接着・浮遊培養)を行った結果、毛様構造体が出現した(図6)。ただし、成体由来毛包構造と比較して、未熟な構造体であり、更なる条件検討が必要と考えられた。

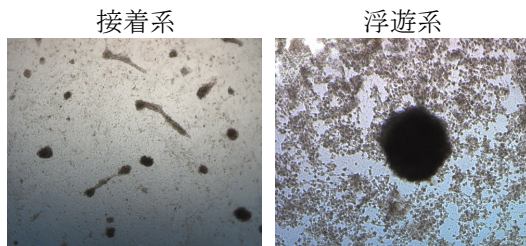


図 6

(6) 結論と今後の展望

*In vitro*発毛システムに必須の細胞材料(EpSCsとDPCs)の単離に成功し、長期的な*in vitro*培養には、Wntシグナルの特異的な作用が存在することが明らかとなった。また、EpSCsでは、Wnt-3aが、DPCsに対してはWnt-10bが長期培養維持を可能にした。更に、長期的に培養したこれらの細胞を用いて*in vitro*発毛システムにより発毛新生を試みた結果、毛様構造体が出現したため、EpSCs/DPCs培養系による発毛誘導が実証された。これらの成績は、発毛細胞材料源の維持や特性についての重要な知見を与えるばかりでなく、完全なる*in vitro*での発毛を実現する基礎的なデータとして十分意義あるものと考えられた。

今後は、EpSCsとDPCsを用いた*in vitro*発毛システムによる新生毛の出現条件を更に検討し、より成熟毛に近い環境の創生、ならびに出現プロセスを解明することで、発毛現象を解明し、更に種々のWntシグナルにより発毛の促進・抑制効果を調べることで、発毛再生医療への応用を目指したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

① Ouji Y, Ishizaka S, Nakamura-Uchiyama F, Okuzaki D, Yoshikawa M. Partial maintenance and long-term expansion of murine skin epithelial stem cells by wnt-3a in vitro. *J Invest Dermatol*

査読有
2015、135: 1598-1608
10.1038/jid.2014.510

② Misu M, Ouji Y, Kawai N, Nishimura F, Nakamura-Uchiyama F, Yoshikawa M. Effects of Wnt-10b on proliferation and differentiation of murine melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*

査読有
2015、in press

③ Nakazawa T, Nakamura M, Park YS, Motoyama Y, Hironaka Y, Nishimura F, Nakagawa I, Yamada S, Matsuda R, Tamura K, Sugimoto T, Takeshima Y, Marutani A, Tsujimura T, Ouji N, Ouji Y, Yoshikawa M, Nakase H. Cytotoxic human peripheral blood-derived γ δ T cells kill glioblastoma cell lines: implications for cell-based immunotherapy

for patients with glioblastoma.

J Neurooncol

査読有

2014、**116**: 31-39

10.1007/s11060-013-1258-4.

④

Ouji Y, Nakamura-Uchiyama F, Yoshikawa M. Canonical Wnts, specifically Wnt-10b, show ability to maintain dermal papilla cells.

Biochem Biophys Res Commun

査読有

2013、**438**: 493-499

10.1016/j.bbrc.2013.07.108.

⑤

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

Induction of inner ear hair cell-like cells from Math1-transfected mouse ES cells.

Cell Death Dis

査読有

2013、**4**: e700-710

10.1038/cddis.2013.230.

⑥

Yamada S, Matsuda R, Nishimura F, Nakagawa I, Motoyama Y, Park YS, Nakamura M, Nakase H, Ouji Y, Yoshikawa M.

Carnitine-induced senescence in glioblastoma cells.

Exp Ther Med

査読有

2012、**4**:21-25

⑦

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

2012、**3**: e314-e324

10.1038/cddis.2012.56.

[学会発表] (計 11 件)

①

王寺幸輝、中村 (内山) ふくみ、吉川正英
皮膚上皮幹細胞の長期培養条件における Wnt シグナルの機能解析

第 14 回 日本再生医療学会総会

2015 年 3 月 21 日、パシフィコ横浜 (横浜市)

②

Yukiteru Ouji, Nakamura-Uchiyama Fkumi,

Masahide Yoshikawa

Canonical Wnt-10b signaling exert an ability of maintaining mouse dermal papilla cells

第 39 回 日本研究皮膚科学会

2014 年 12 月 13 日、千里阪急ホテル (豊中市)

③

Yukiteru Ouji, Nakamura-Uchiyama Fkumi, Masahide Yoshikawa

Canonical Wnt-10b signaling play important roles in the maintenance of dermal papilla cells

第 37 回 日本分子生物学会

2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜 (横浜市)

④

Yukiteru Ouji, Fukumi Nakamura-Uchiyama, Masahide Yoshikawa

Canonical Wnt-10b signaling exert an ability of maintaining mouse dermal papilla cells

第 13 回 国際幹細胞学会 (ISSCR)

2014 年 6 月 19 日、バンクーバー (カナダ)

⑤

王寺幸輝、三須政康、中村 (内山) ふくみ、吉川正英

皮膚上皮幹細胞の長期培養における Wnt シグナルの意義第

13 回 日本再生医療学会総会

2014 年 3 月 5 日、京都国際会館 (京都市)

⑥

Yukiteru Ouji, Masahide Yoshikawa

Canonical Wnts, specifically Wnt-10b, exert an ability of maintaining dermal papilla cells

第 42 回 日本免疫学会学術集会

2013 年 12 月 11 日、幕張メッセ (幕張市)

⑦

王寺幸輝、中村 (内山) ふくみ、吉川正英
培養毛乳頭細胞に対する Wnt ファミリーの影響

第 12 回 日本再生医療学会総会

2013 年 3 月 21 日、パシフィコ横浜 (横浜市)

⑧

Yukiteru Ouji, Shigeaki Ishizaka, Fukumi Nakamura-Uchiyama, Akio Wanaka, Masahide Yoshikawa

Efficient induction of inner ear hair cell-like cells from Math1-transfected mouse ES cells

CiRA International Symposium 2013

2013 年 3 月 11 日、京都大学 (京都市)

⑨

Yukiteru Ouji, Shigeaki Ishizaka, Fukumi

Nakamura-Uchiyama, Akio Wanaka, Masahide Yoshikawa

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

第 35 回 日本分子生物学会年会
2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場 (福岡市)

⑩

Yukiteru O uji, Masahide Yoshikawa

Differentiation of mouse embryonic stem cells into inner ear hair cell-like cells using stromal cells

第 11 回 国際幹細胞学会 (ISSCR)
2012 年 6 月 15 日、パシフィコ横浜 (横浜市)

⑪

王寺幸輝、吉川正英

Wnt-10b による毛乳頭細胞の機能維持

第 11 回 日本再生医療学会総会
2012 年 6 月 12 日、シフィコ横浜 (横浜市)

〔図書〕 (計 1 件)

①

王寺幸輝、石坂重昭、中村 (内山) ふくみ、
吉川正英

シーエムシー出版

毛包再生に関わるシグナル伝達—Wnt-10b による毛乳頭細胞の毛包誘導維持—

2013 年、41-50

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・講師

研究者番号 : 50343421