

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：82610

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670756

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞から人工毛乳頭細胞(iDP細胞)の作製

研究課題名(英文) Induction of dermal papilla cells from human iPS cells

研究代表者

大河内 仁志 (Okochi, Hitoshi)

独立行政法人国立国際医療研究センター・その他部局等・部長

研究者番号：30185235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト毛乳頭細胞はSox2, Klf4, c-Mycを発現しているため、ヒトiPS細胞と毛乳頭細胞の類似性に着目し、ヒトiPS細胞においてOct3/4をshRNAを用いてノックダウンすると毛乳頭細胞への分化が促進されるか検討した。ヒトiPS細胞(253G株)に対してOct3/4の遺伝子発現を低下させても、versicanなどの毛乳頭細胞に発現する遺伝子への影響は認められなかった。一方で毛乳頭細胞の培養において、FGF2を添加すると毛乳頭細胞はPDGF受容体の発現が亢進し、FGF2とPDGFAAの添加により毛乳頭細胞の増殖に相乗効果を見いだしたので、論文にまとめた。

研究成果の概要(英文)：Human dermal papilla cells (hDPC) were reported to express Sox2, Klf4, c-Myc which are key components for generating or maintaining iPS cells. Based on the similarity between hDPC and iPS cells, I hypothesized that suppressing the expression of the Oct3/4 gene in iPS cells may facilitate the differentiation of DPC from iPS cells. After I designed three different shRNA against Oct3/4 gene and applied them to the hiPS cells (253G: a gift from CiRA), I confirmed the expression level of the Oct3/4 gene was less than 30% of control group. Although I detected the expression of several genes specific for ectoderm, mesoderm and endoderm, I could not detect the up-regulation of DPC specific gene expression, such as versican. On the other hand I found the synergistic effect of FGF2 and PDGFAA for the growth of DPC, because addition of FGF2 to the culture media of DPC up-regulated the expression of PDGF receptor. These results were published in Journal Dermatological Science.

研究分野：再生医学

キーワード：毛乳頭細胞

## 1. 研究開始当初の背景

脱毛症の治療として自己の毛包を植毛することが実際に行われているが、毛を脱毛部に移し替えているだけで毛の本数を増やしている訳ではない。究極の脱毛症治療は新規の毛包を増やすことであり、そのためには毛乳頭細胞を体外で増やして移植することが必要になる。ところがヒト毛乳頭細胞は培養すると速やかに増殖能と毛包誘導能が失われてしまう。多能性幹細胞である ES/iPS 細胞は無限に増殖できることから、毛乳頭細胞の細胞源になりうるのではないかと期待されている。ヒト毛乳頭細胞は Sox2, Klf4, c-Myc を発現していることが報告されているので (1)、iPS 細胞の樹立に必要な 4 因子のうち、3 因子をすでに発現していることになる。そこでヒト iPS 細胞と毛乳頭細胞の類似性に着目し、ヒト iPS 細胞において Oct3/4 の発現を要請すると毛乳頭細胞への分化が促進されるのではないかと考えた。同時にヒト毛乳頭細胞の培養法の改善も必要と考えた。

## 2. 研究の目的

ヒト iPS 細胞から毛乳頭細胞の作製を目的とする。また毛乳頭細胞の性質を維持できる培養法の検討を行う。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞 (253G, 454E2 : 京都大学 Cira より譲渡) を Essential 8 という無フィーダー培地と Vitronectin でコーティングされたディッシュを使用して未分化状態を維持した。ヒト iPS 細胞を 10 $\mu$ M の Y27632 で 30 分処理を行い、PBS で培地を洗い、PBS/EDTA で 10 分間培養して細胞を 6cm ディッシュから剥離した。その後ヒト iPS 細胞を 1 平方 cm 当たり 10 万個の密度で 6 ウェ

ルのマルチプレートに播種して Essential 8 で培養し、50% Confluence に到達した時点で培地を DMEM/FBS に交換した。

Oct3/4 のノックダウン実験に用いる dsRNA は Invitrogen 社の Stealth siRNA のカスタム合成品とし、種類と配列は下記の通り: #1 GAAGGAAUUGGGAACACAAAGGGUG, #2GGGCAACUGGUUGGAGGGAAGGUG A

#3:GCCCCGAAACCCACACUGCAGCAGAU 上記の siRNA を 60nM の濃度になるように Lipofectamin RNAimax を使って導入した。ポジコンに GAPDH の siRNA、ネガコンに GC コンテンツ 60%程度のネガコン siRNA (両方とも Invitrogen 製品) を 60nM の濃度で導入した。siRNA が導入されてから 48 時間後に細胞の外見変化を確認し、qPCR によって細胞内の Oct3/4、Nanog、Versican、Sox17、Brachyury、N-cadherin の遺伝子発現変化を確認した。

(2) 毛乳頭細胞の培養法として細胞成長因子の添加を検討した。特に FGF2 と PDGFAA に注目し、まずヒト毛乳頭細胞を市販されている HFDPC 培地で培養し、FGF2(塩基性線維芽細胞増殖因子)を 10ng/ml または 50ng/ml 添加した。4 日後に RNA を回収して RT-PCR を行うとともに培養細胞に対して抗 PDGFreceptor 抗体を用いて免疫染色を行った。PDGF:血小板由来増殖因子

毛乳頭細胞に FGF2 10ng/ml と PDGFAA の濃度を変えて添加した場合の細胞増殖を経時的に細胞数を計測することで検討した。

## 4. 研究成果

(1) ヒト iPS 細胞 (253G, 454E2) に対して shRNA を用いてノックダウンすると確かに Oct3/4 の遺伝子発現はコントロールに比較して 30%以下に低下させることができた。同時に Sox17、Brachyury、N-cadherin の遺

伝子発現が増加して外胚葉、中胚葉、内胚葉への分化が始まったが、versicanなどの毛乳頭細胞に発現が認められる遺伝子発現への影響は認められなかった。培地中に毛乳頭細胞の培養液を添加する実験も行ったが、特にversicanなどの遺伝子発現は亢進しなかった。

(2)毛乳頭細胞の培養過程において、FGF2を添加すると毛乳頭細胞はPDGF $\alpha$ 受容体の発現が亢進し、PDGF受容体の発現は変化しないことを見いだした(図1)。

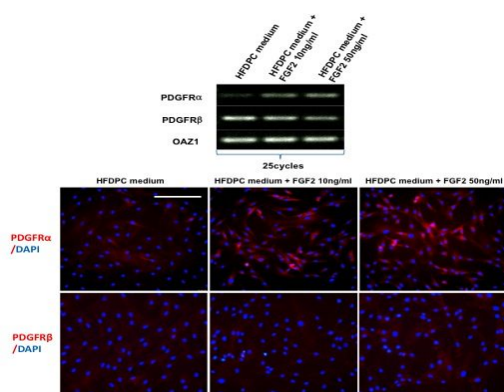


図1 ヒト毛乳頭細胞のPDGF受容体の発現

実際にFGF2とPDGFAAを培地に添加すると毛乳頭細胞の増殖が亢進することを証明した。

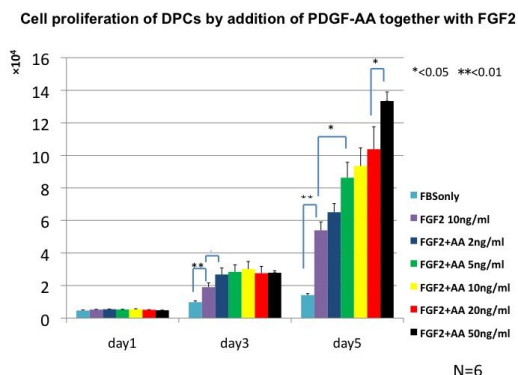


図2 FGF2とPDGFAAによる細胞増殖与える相乗効果

さらにマウスの毛乳頭細胞では両者の添加により毛包誘導能も維持できることが分かった。

以上より毛乳頭細胞の培養においてはFGF2の添加のみならずPDGFAAも添加することで、PDGF受容体の増加によって相乗効果的に毛乳頭細胞の増殖が亢進することが示された。

<引用文献>

(1) Tsai SY, Bouwman BA, Ang YS, Kim SJ, Lee DF, Lemischka IR, Rendl M. Single transcription factor reprogramming of hair follicle dermal papilla cells to induced pluripotent stem cells. Stem Cells. 2011 Jun;29(6):964-71.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Kiso M, Hamazaki TS, Itoh M, Kikuchi S, Nakagawa H, Okochi H. Synergistic Effect of PDGF and FGF2 for Cell Proliferation and Hair Inductive Activity in Murine Vibrissal Dermal Papilla In Vitro. J Dermatol Sci in press

〔学会発表〕(計 1件)

Kiso M, Hamazaki TS, Itoh M, Kikuchi S, Nakagawa H, Okochi H. Platelet-derived Growth Factor-AA: A Key Molecule for Cell Proliferation and Hair Inductive Activity in Murine Vibrissal Dermal Papilla Cell Culture, 44th Annual ESDR Meeting, Copenhagen, Denmark. September, 2014

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

大河内 仁志（OKOCHI, Hitoshi）

国立国際医療研究センター 研究所

細胞組織再生医学研究部 部長

研究者番号：30185235