

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560222

研究課題名(和文) 幹細胞の多層ビーズ封入技術と完全生体外での毛髪再生への新展開

研究課題名(英文) Hair follicle tissue engineering by fully-in vitro process using multi-layered gel bead culture

研究代表者

宮田 昌悟 (Miyata, Shogo)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号：70376515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では細胞の空間的配置を制御することで生体外で毛髪再生を実現することを目的としている。そこで毛包構造を再現するために、2種の細胞が多層構造を成すコラーゲンゲル培養法の開発を実施した。

具体的には、マウスES細胞を毛乳頭細胞の代替源として第1細胞層とし、その上層をマウス表皮細胞層で覆うコラーゲンゲルビーズの作製法を開発した。同技術を用いて作製した多層ゲルビーズを生体外で培養したところ、毛包構造およびその周辺組織である立毛筋の再構築を認めた。

以上、新たに構築した多層ゲルビーズ培養法を用いることでこれまでに実現し得なかった生体外プロセス単独での毛包構造の再生を実現した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to regenerate hair tissue in vitro by controlling three-dimensional cellular organization. To simulate hair follicle structure, collagen gel including two kinds of cells was multi-layered to construct three-dimensional structure.

In this study, mouse embryonic stem cells (mESCs) suspended in collagen gel were micro-spotted and over-layered by mouse fetal epidermal cells suspended in collagen. After the gel beads spotting, cell-seeded collagen gels were cultured in vitro. As the results, hair follicle was regenerated in vitro using our novel culture method. Moreover, arrector pili muscle-like tissue was also regenerated.

In conclusion, three-dimensional culture method simulating hair follicle structure was newly developed. Using our novel method, micro-spotted gel-cultured specimen indicated capability to regenerate follicle by fully-in vitro culture process.

研究分野：再生医工学

キーワード：毛髪再生 生体組織工学 三次元培養 共培養 再生医療

### 1. 研究開始当初の背景

再生医療の第一義の治療対象は生命活動に関わる器官(血管や心筋組織)および日常活動に深く寄与する組織(骨、軟骨、皮膚)であり、毛髪再生に関する研究事例は少ない。これは毛髪の欠如が直接、生命活動の維持やQOL(Quality of Life)に影響を与えないことに起因すると推測される。一方で、毛髪に関わる疾患には先天的無毛症や創傷による治癒痕で毛髪を失う瘢痕性無毛症などが存在し、高度に社会化されたヒトの日常生活ではQOLを著しく損ねるものと言える。

このような状況を鑑みて、医薬品による毛髪再生補助や毛根由来細胞を酵素的に抽出して生体外で培養後に体内に戻す細胞療法に注目が集まっているが、無毛症の場合には医薬品による効果は極めて乏しく、また、生体外での毛乳頭細胞の培養では採取可能な細胞数に限界がある上、培養過程において細胞が機能を失活してしまうことから、毛髪の再生は難しく、効果的な毛髪組織の再建手法が存在しないのが現状である。

上述のように、毛髪再生の研究領域は再生医療分野においてこれまで注力され難い対象ではあったが、治療に対する社会的ニーズは極めて高い。すなわち、毛髪再生分野では、幹細胞を潤沢なセルソースとした、完全生体外再生型の毛髪再生技術の確立が強く望まれている。

### 2. 研究の目的

著者らはこれまでに再生医工学分野での研究を遂行する過程で機械工学およびMEMS技術を活用したマイクロスケールでの三次元細胞培養に関する研究を進めてきている。この知見を基盤として、『生体物理学的観点と機械工学的手法を融合した、多層に構成された細胞封入型のゲルビーズの創製と完全生体外での毛髪再生』を目的とした。

そこで、本課題では①毛髪系細胞とES/iPS細胞をマイクロスケールのコラーゲンゲルビーズに位置制御された形態で封入する技術の確立と、②同技術を用いた生体外プロセス単独での毛髪組織再生を実施した。

### 3. 研究の方法

(1)マイクロインジェクションを用いた細胞封入型コラーゲンマイクロビーズ作製装置の開発

本研究では、1~50  $\mu\text{L}$  で吐出可能なマイクロインジェクタを用いて、細胞を包含するコラーゲンゲルを多段階で連続的にスポットニングするゲルビーズ作製デバイスを開発した(図1)。これにより、2種の細胞を図2に示すように多層構造を成すように構成した微細培養体(多層ゲルビーズ培養体)の創製を可能とした。

(2)多層ゲルビーズ培養体を用いた毛髪組織の生体外再構築とその生化学的評価

項目(1)で開発した多層ゲルビーズ作製用



図1. 多層ゲルビーズスポットニング装置

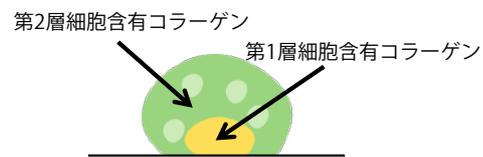


図2. 多層ゲルビーズ構造培養体

デバイスを用いて、マウスES細胞を第1層、マウス胎児由来表皮細胞を第2層とする多層ゲルビーズ培養体を作製した。多層ゲルビーズの1個あたりの体積は8~10  $\mu\text{L}$  で、これを複数個作製して試料群を構成し、温度 37  $^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$  濃度 5%、湿度 95%の環境で21~49日間培養を行った。

培養を行った試料は、4%パラホルムアルデヒド溶液による組織固定を施した後に、薄切切片を作製して組織学的評価を実施した。組織学的評価は、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、また、サイトケラチン、平滑筋アクチンを対象とする免疫染色にて行った。

### 4. 研究成果

培養過程における、試料の形態を図3に示す。培養によって生体外での組織構築が進行し、コラーゲンゲルの分解とリモデリングによる組織収縮が認められた。一方で、培養全期間において培養体からの毛髪生成は認められなかった。

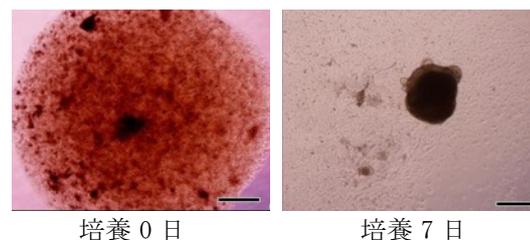


図3. 多層コラーゲンゲルビーズの培養過程における形態変化. Scale bar = 500  $\mu\text{m}$ .

培養試料内部での組織再構築の評価を目的として実施した培養試料およびマウス胎児表皮組織の HE 染色像を図 4 に示す。培養試料では中心部に角化構造を認める同心円を成す構造体が複数認められた(図 4a)。本構造は、図 4b に示すマウス胎児表皮内部の毛包組織構造と比較して類似性が高く、毛包組織の生体外構築が行われたと推測される。

また、同構造体に対して実施した免疫染色では、同心円構造体の中心部にサイトケラチン陽性(図 5a)、外縁部に平滑筋アクチン陽性(図 5b)を認めた。これは、同心円構造体中心部に毛髪由来のケラチン、外縁部には毛髪を支える立毛筋組織が再構築されていることをしめすものと考えられる。

以上より、本研究では生体外培養試料から毛髪自体の創製までには至らなかったが、これまで実現することのできなかつた生体外プロセスのみでの毛包組織の再構築を実現することができた。本課題で開発された多層ゲルビーズ培養技術による毛包組織の再生では細胞源として ES 細胞を用いるが、多能性幹細胞として iPS 細胞の利用も計画している。これにより、本課題で開発した培養手法を用いることで、大量に毛包組織を生体外で再構築することが可能となり、毛髪組織を対象とする再生医療の臨床展開への貢献が期待できる。

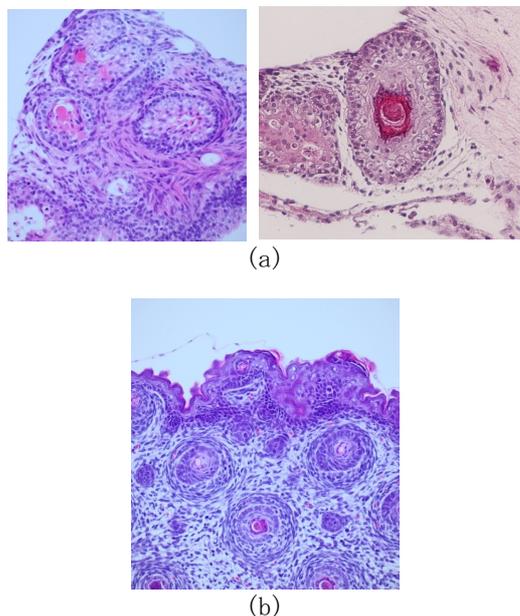


図 4. (a) 生体外プロセス単独で再生した毛包構造および(b)マウス胎児皮膚組織の HE 染色像

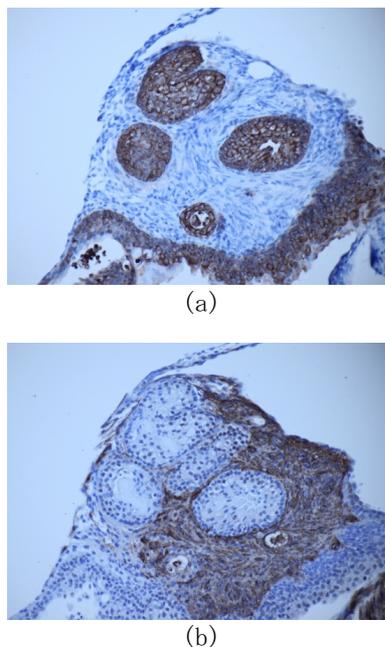


図 5. ゲルビーズ培養体の免疫染色像。(a) サイトケラチン、(b) 平滑筋アクチン。

## 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 Kaori SHIKANO, Keisuke CHIBA, Shogo MIYATA, “Response of human skin fibroblasts to mechanical stretch in wound healing process analyzed using a three-dimensional culture method” Advanced Biomedical Engineering, 査読有, Vol.4, pp.170-178, 2015.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 須見隆弘, 宮田昌悟, “生理活性物質の拡散現象を活用する三次元培養デバイスの開発” 日本機械学会関東学生会第 55 回学生院卒業研究発表講演会, 2016 年 3 月 10 日, 東京工業大学(東京都・目黒区).
- ② 菅野亜紀, 宮田昌悟, 佐藤有里, 矢澤華子, 武永美津子, 井上肇, “ES 細胞と表皮細胞の二層ゲルビーズ培養を用いた三次元培養皮膚モデルも高次構造化”, 2015 年 3 月 20 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).
- ③ 菅野亜紀, 宮田昌悟, 佐藤有里, 矢澤華子, 武永美津子, 井上肇, “細胞配置の制御技術の開発と生体外での毛髪再生への応用”, 2014 年 10 月 9 日, キッセイ文化ホール(長野県・松本市).

[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

<http://www.miyata.mech.keio.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮田 昌悟 (MIYATA, Shogo)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号：70376515

### (2) 研究分担者

該当なし.

### (3) 連携研究者

該当なし.