

研究報告 2020 (KISTEC Annual Research Report,2020)

【研究開発部】

戦略的研究シーズ育成事業

研究テーマ：毛包原基の大量調製法を用いた毛髪再生医療

◆総括・業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 227

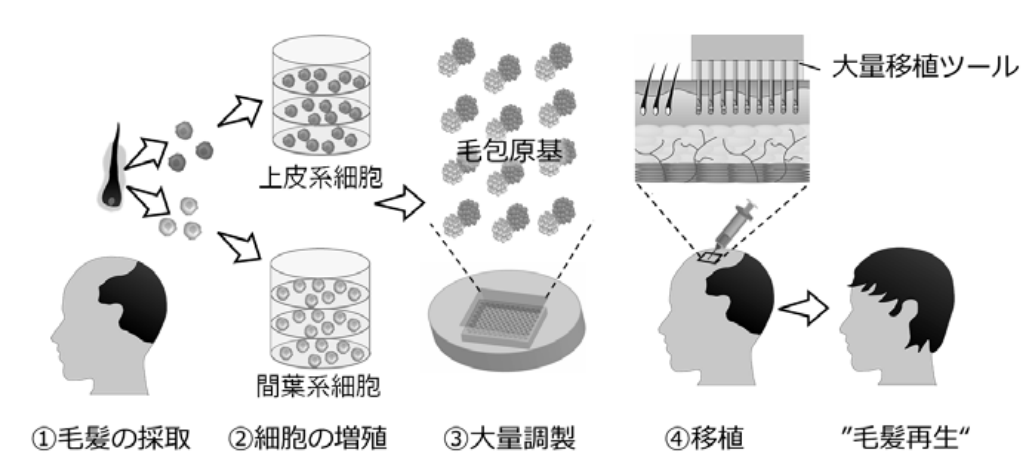
研究代表者：横浜国立大学 福田 淳二

毛包原基の大量調製法を用いた毛髪再生医療

研究代表者：横浜国立大学 福田 淳二

【基本構想】

近年、毛を作り出す器官である毛包を構成している細胞そのものを用いて、脱毛症の治療を行う毛髪再生医療に期待が寄せられている。この治療法は、患者本人の髪の毛数本を取り出し、その根本にある毛包組織から毛包の幹細胞を採取して例えば 100 本分に増殖させ移植するというものである。近年、毛包を構成する 2 種類の幹細胞を用い、それぞれの細胞凝集塊を作製して接合させた上で、移植するというアプローチが提案された。この毛包原基では、胎児期に見られる上皮・間葉相互作用を誘導できるため、移植後に毛包を効率よく再生できることが報告された。しかしながら、毛包原基は顕微鏡下で 1 つずつ接合することで作られており、この手法をヒト臨床に必要な数千個の毛包原基の作製に応用することは、現実的ではなかった。一方、本プロジェクトリーダーらは、上皮系細胞と間葉系細胞の懸濁液を混ぜて 1 つの凝集体を形成させると、培養初期は 2 種類の細胞がバラバラの状態に凝集体内に存在するものの、培養 3 日間のうちにそれぞれの細胞が自発的に分離して毛包原基と同様の凝集体が形成されることを発見し、これを応用して独自の細胞培養器を開発することで毛包原基を大量調製する技術を確認した。その成果は新聞・メディアでも大きく取り上げられ、国内外へ特許申請を済ませたところである。本研究提案では、この技術シーズをもとに、医療機関と連携してヒト患者細胞を用いて基盤技術の確立を行い、毛髪再生医療の実用化を目指す。



毛包原基の大量調製法を用いた毛髪再生医療

1. 研究目的

プロジェクト 2 年目となる令和元年度は、以下の各項目を重点項目として研究を進めた。また、動物実験については、横浜国立大学動物実験専門委員会の承認を得て実施し、患者組織の利用については、横浜国立大学倫理委員会（人を対象とする医学系研究）の承認を得て実施した。

(1) 毛包の幹細胞の採取・培養方法の検討

重点項目の 1 つ目は、毛包の幹細胞の採取方法の検討である。毛髪再生医療の細胞源には、患者本人の毛包から間

葉系細胞である毛乳頭細胞および上皮系細胞である毛包上皮幹細胞を分離して用いるアプローチが最も有力である。そこで、前年度に引き続き、クリニックより提供された毛包組織からそれぞれの細胞を高い生存率で回収・初代培養する条件の最適化を行った。

また、毛髪再生医療を実現するには、患者の毛包から得た幹細胞を、生体外で細胞数あたり 100 倍以上に増殖させる必要がある。しかしながら、この増殖培養中に細胞の毛髪再生能力が急激に低下するという課題がある。我々は、前年度の研究で、電気刺激を付与しながら培養する方法、

及び、ハイドロゲル内で三次元培養する方法が毛包幹細胞の機能維持培養に適していることをマウスの細胞を用いて示してきた。今年度は、初代培養を行った患者の毛包幹細胞について、これらの独自の継代培養法が適用できるかを評価した。

(2) 毛髪再生能の高い毛包原基の調製条件の検討

重点項目の2つ目は、毛髪再生能の高い毛包原基を調製する技術の開発である。前年度の検討で、毛髪周囲環境を模倣することを目的とし、血管内皮細胞、色素細胞、脂肪幹細胞、多血小板血漿を毛包原基作製時に組み込むことで毛髪再生能を向上させるアプローチを開発してきた。今年度は、毛髪再生能を向上させる毛包周囲のマトリクスについて検討を行った。

2. 研究成果

以下に、令和元年度の研究成果の一部を示す。

(1) 毛包の幹細胞の採取・培養方法の検討

患者の毛包組織から毛乳頭を分離し、培養ディッシュに接着させたのち、展開培養を行った。この際、培養ディッシュへのコーティング、培養液・添加因子の種類や濃度の組み合わせを検討することで、毛乳頭細胞の機能を維持しながら増殖する初代培養条件を見出した。この最適化した培養条件では、毛乳頭細胞はディッシュに接着した後、同心円状に広がるように増殖し、約1週間の初代培養で10本程度の毛髪から約 1×10^5 cells程度の細胞が回収できることが確認された(図1A)。一方、毛包上皮幹細胞は、毛乳頭を切除した毛幹から酵素処理により回収し、初代培養を行った。こちらも同様に、培養ディッシュへのコーティング、培養液・添加因子の種類や濃度の組み合わせを検討することで、毛包上皮幹細胞の機能を維持しながら増殖する初代培養条件を見出した。最適化した培養条件において、

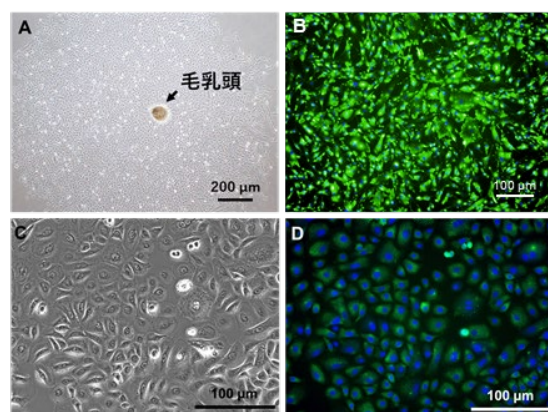


図1 毛乳頭細胞と毛包上皮幹細胞の培養 (A) 培養ディッシュに接着した毛乳頭と増殖した毛乳頭細胞、(B) 毛乳頭細胞の Versican 染色 (緑: Versican, 青: 細胞核) (C) 培養ディッシュに接着した毛包上皮幹細胞、(D) 毛包上皮幹細胞の CD200 染色 (緑: CD200, 青: 細胞核)

て、毛包上皮幹細胞は80%以上の生存率で回収することが可能であり、初代培養を行うことで10本程度の毛髪から約 2×10^5 cells程度の細胞が回収できることが確認された(図1C)。このようにして、初代培養した細胞の幹細胞性を確認するため、毛乳頭細胞マーカーである Versican と毛包上皮幹細胞マーカーである CD200 を染色したところ、いずれも陽性細胞が多く存在することが観察された(図1B, D)。

続いて、毛乳頭細胞および毛包上皮幹細胞の継代培養を行うための培養方法の検討を行った。毛乳頭細胞は、継代培養技術の開発が比較的進んでおり、培地も専用品がいくつか開発されている。しかしながら、実際にこの培地で継代培養を行うと、4回程度の継代培養であっても毛乳頭の機能が急激に低下することが明らかになった(図2)。

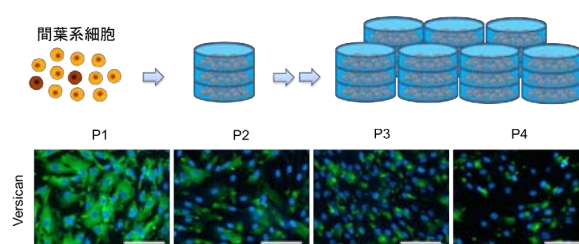


図2 毛乳頭細胞の継代培養

そこで、新たな培養方法として、電気刺激を与えながら培養を行う培養技術を開発した(PCT/JP2019/038934)。この技術では、電極上に接着させた毛乳頭細胞にパルス電流を印加することで(図3)、毛乳頭細胞の毛髪再生に関わる遺伝子発現を通常の継代培養と比較して2倍以上向上させることが可能である。最近では、患者由来の毛乳頭細胞に電気刺激を適用しても、毛髪再生能の向上が遺伝子レベルで向上することを確認している。この開発により、毛乳頭細胞は、機能を維持した状態で増殖培養することが可能になると考えている。

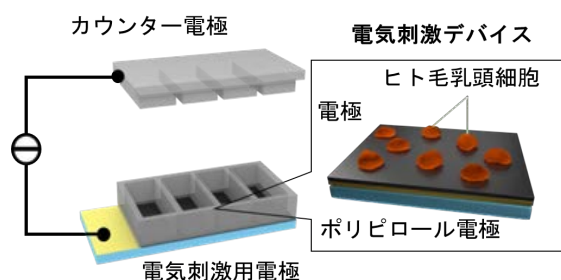


図3 毛乳頭細胞の電気刺激培養方法

一方、毛包上皮幹細胞は、通常の培養ディッシュ上での増殖培養中に脱分化しやすいために、幹細胞性を維持しながら、大量培養を行うことが毛髪再生医療の実現に向けた大きな課題の1つとなっている。そのため、培地も最適化されたものがなく、自ら調製する必要があった。そこで、培地の種類、添加因子の最適化を行った結果、平面培養に

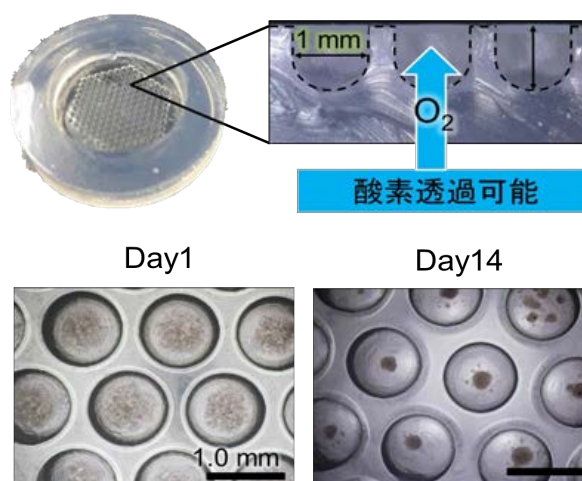


図4 毛包上皮幹細胞の培養
スフェロイドアレイ培養器と培養 1、14 日目の毛包上皮幹細胞スフェロイド

においても、上皮系細胞の幹細胞性を急激に落とすことなく増殖可能な培地条件を見出した。一方、前年度行ったマウスの細胞を用いた検討では、独自のスフェロイドアレイ培養器（図4）で毛包上皮幹細胞の三次元培養を行うことで、平面培養よりも有意に幹細胞性を維持しながら、細胞増殖できることを示してきた（PCT/JP2019/003903）。そこで、この三次元培養系で細胞をヒト毛包上皮幹細胞に置換し、上述の最適化した培地で培養を行ったところ、マウスの結果と同様に幹細胞性を示すマーカー遺伝子の発現が2次元培養と比較して有意に高値を示すことが確認され、毛包上皮幹細胞の維持培養に有効な結果が示された。

(2) 毛髪再生能の高い毛包原基を調製する条件の検討

毛髪再生医療を実現するためには、いかに毛髪再生能が高い移植組織を作製するかが重要となる。我々は、これまでに微細加工技術を用いて作製した独自のマイクロウェルアレイ培養器を用いて、毛包原基を均一かつ大量に作製し（図5i）、これを移植することで、生体と同等の毛髪を再生させる技術を開発してきた（JP6425319B2）。また、マウス細胞で得られた結果がヒト細胞を用いても再現できるかを確認するため、ヒト毛包組織から初代培養した毛乳頭細胞と毛包上皮幹細胞を培養器に播種したところ、マウス細胞を用いた場合と同様に毛包原基が自発的に形成されること、ヌードマウス皮下へ移植すると毛髪が再生することを確認している。

続いて、より再生効率を向上させることを目的とし、毛包原基を作製するためのいくつかのアプローチを開発した。発生過程の細胞周囲環境の再現は、生体外でより毛髪再生能の高い良質な毛包原基を構築するために有効なアイデアであろう。例えば、毛包原基は上皮の陥入後にコラーゲンを豊富に含む真皮層に間葉系細胞が凝集する過程を経ることが知られている。我々は、コラーゲンを含む間葉凝集塊を毛包原基の構成成分とすることで、毛髪再生能の向上が期待できるのではないかと考えた。これを培養液に懸濁し浮遊培養を行うと、発生初期でみられるような凝集プロセスが確認された（図5ii）。つまり、細胞けん引力によりゲルビーズの直径が3日間の培養中に約3~4分の1まで収縮し、コラーゲン濃度及び細胞密度が培養初期に比べて大幅に増加する様子が観察された。続いて、このビーズと上皮系細胞塊を三次元培養することで毛包原基構造を構築し、毛髪再生能をPCR法による遺伝子発現解析とヌードマウスへの移植実験より評価した。その結果、VersicanやWnt10bなどの毛髪再生能に関連する遺伝子の発現は、独自の培養器で調製した毛包原基と比較して有意に向上し、移植後の再生毛髪数も2倍程度向上することが確認された（T. Kageyama et al. Biomaterials, 2019,

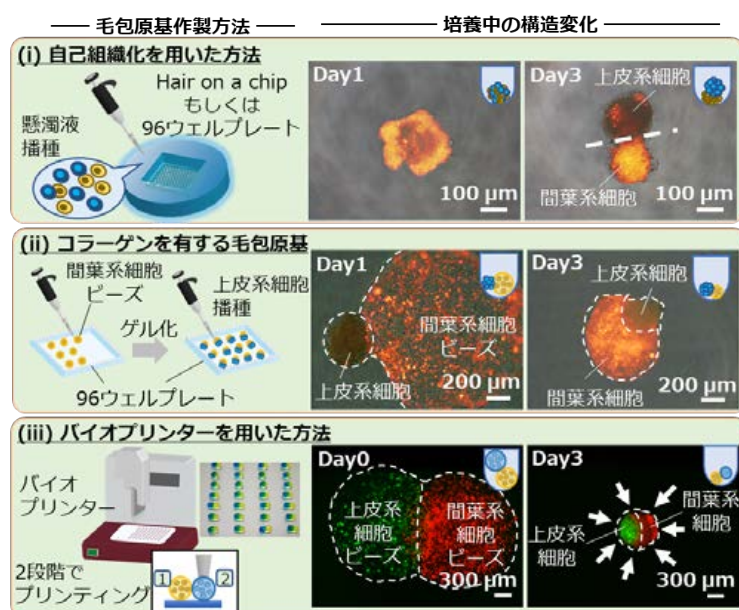


図5 毛包原基の大量調製方法 (i) マイクロウェルアレイ培養器内で自発的に形成させる方法、上皮系細胞と間葉系細胞の懸濁液を播種すると、培養1日目に細胞はランダムに1つの凝集体を形成し、3日間の培養中に同種の細胞同士が凝集しあうことで毛包原基構造を形成する (ii) コラーゲンビーズを利用した方法、間葉系細胞を包埋した微小コラーゲングルと上皮系細胞の懸濁液を丸底ウェル内で培養すると、3日間の培養中に間葉ビーズが収縮し、上皮系細胞塊と融合することで毛包原基構造を形成する (iii) バイオプリンティングを利用した方法、間葉系細胞および上皮系細胞を包埋した微小コラーゲングルを隣接させて、毛包原基構造を形成する。

PCT/JP2017/021770)。また、このアプローチにおいて、上皮系細胞もゲルビーズに置き換え、バイオプリンティング技術を用いることで、毛包原基の大量調製も実現している。つまり、上皮系及び間葉系細胞をそれぞれコラーゲンゲルに懸濁し、バイオプリンターを用いて撥水性表面にドロップレットとして隣接するように打ち出すことで、毛包原基様構造を作製した(図 5iii)。この方法では、24 個のノズルを並列に設置したバイオプリンターを用いることで、毛包原基 100 個あたりを約 15 秒で作製でき、わずか 10 分程度で数千個の均一な毛包原基を大量調製可能である。作製した毛包原基を 3 日間培養すると、自身の細胞けん引力により、長径約 3.5 mm から約 0.8 mm にまで収縮し、細胞が自発的に高濃度にコラーゲンを含んだ組織体を形成した。さらに、この毛包原基をヌードマウスへ移植すると、一定の毛周期を繰り返す毛髪を再生することを確認した(PCT/JP2019/016332)。

また、我々は生体外で毛包組織そのものを再生し、これを植毛と同様に移植するアプローチについても開発を進めてきた。上述の毛包原基をそのまま長期間培養すると、培養系において毛幹様の構造が徐々に伸長する現象を発見した(図 6A, B)。培養 23 日目の毛幹様構造の電子顕微鏡像からは、生体の毛幹の基本的な構造であるマイクロフィブリルも確認されている(図 6C)。また、美容クリニックで発毛効果が認められ使用されている Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) を培養液に添加したところ、FGF-2 を添加した場合は添加しなかった場合と比べて、毛幹様構造の形成効率が約 6 倍向上することが分かった。

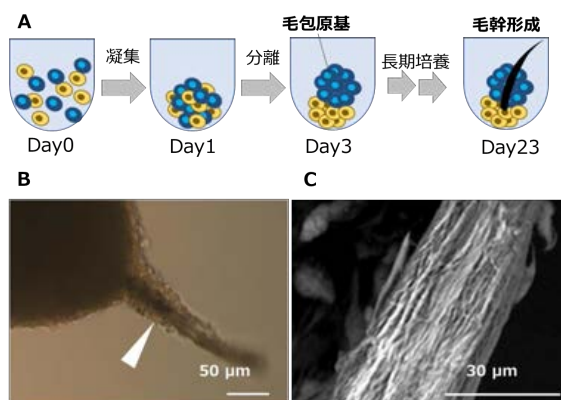


図 6 毛包原基の長期培養による生体外毛髪再生 A：自己組織化を利用した毛包原基作製法 B：形成された毛幹様構造，C：毛幹様構造のコルテックス

さらに、毛包原基を様々な成長因子を含む培地で長期間培養することで、in vitro で毛髪を再生できる条件を見出し、これを移植することで高効率に毛髪を再生させる技術を開発した(PCT/JP2019/031142)。この技術では 2 種類の細胞は、数時間で 1 つの凝集体を形成した後、2 日間の培養中に各種細胞が自発的に分離することで毛包原基を形成し、培養 4 日目に毛髪を形成した。さらに培養を行うと

この毛髪が伸長する様子が観察され、形成した毛髪は特徴的なキューティクル、コルテックス、メラニンなどの毛髪の基本構造を有していた(図 7)。

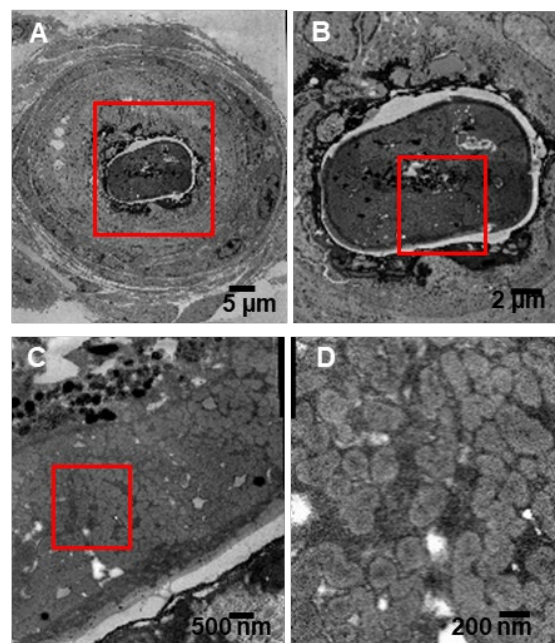


図 7 再生毛髪断面の走査型電子顕微鏡画像 A：全体図 B：A の赤枠の拡大図，C：B の赤枠の拡大図，D：C の赤枠の拡大図

そこで、この再生毛包組織をヌードマウスの背部に移植したところ、移植 8 日後には、移植部位から毛髪の再生が確認され(図 8)、その毛髪再生効率は 8-9 割程度と、単に毛包原基を移植する場合と比較して優位に向上していた。このように、移植組織の作製方法を最適化することで、現在の植毛治療の再生効率に匹敵するレベルまで再生効率を改善することができた。



図 8 生体外再生毛髪の移植により再生した毛髪

業 績

【原著論文】

1. Tatsuto Kageyama, Lei Yan, Akihiro Shimizu, Shoji Maruo, Junji Fukuda, Preparation of hair beads and hair follicle germs for regenerative medicine, Biomaterials, 212, 55-63, 2019

【書籍】

1. 平野杉, 景山達斗, 福田淳二, 毛髪再生医療の現状と実用化へ向けた課題, 再生医療の開発戦略と最新研究事例集, 第2章, 第1節, 技術情報協会, 2019
2. 中嶋陸満, 景山達斗, 福田淳二, 毛髪科学の新展開, 毛包原基の大量調製技術の開発, 第11章, 監修 岩渕徳郎, シーエムシー出版, 2019
3. 南茂彩華, 景山達斗, 福田淳二, Hair on a chipのための生体外における毛包誘導技術, 月刊「細胞」4月号, ニュー・サイエンス社, 2020

【口頭発表】

1. Tatsuto Kageyama, Chisa Yoshimura, Sugi Hirano, Keiichiro Kasai and J. Fukuda, Hair follicle germ formation on oxygen-permeable microwell array chips for hair regenerative medicine. 11th world congress hair research, Sitges, Barcelona, Apr. 2019
2. Tatsuto Kageyama and J. Fukuda, Dermal papilla cells-encapsulated hair beads for hair regenerative medicine. ISSCR 2019 Annual Meeting, Los Angeles, California, U.S. Jun. 2019
3. Sugi Hirano, Tatsuto Kageyama and Junji Fukuda, Expansion of hair follicle stem cells in microfabricated oxygen-permeable culture vessel for hair regenerative medicine. ISSCR 2019 Annual Meeting, Los Angeles, California, U.S. Jun. 2019
4. Rikuma Nakajima, Akihiro Shimizu, Tatsuto Kageyama and Junji Fukuda, In vitro hair shaft generation from 3D cell aggregate for hair regenerative medicine, 2019 MRS fall meeting & exhibit, Boston (USA), Dec. 2019
5. 景山達斗, 微細加工技術を用いた三次元組織構築技術の開発, 化学とマイクロナノシステム学会第39回研究会(受賞講演) 2019年5月
6. 景山達斗, 骨・毛髪再生医療のための細胞包埋ゲルビ

ーズ、ものづくりライフイノベーション・シンポジウム 2019 (招待講演) 2019年6月

7. 中嶋陸満, 清水亮啓, 景山達斗, 福田淳二, In vitro 毛幹形成技術とこれを利用した毛髪の再生医療, 第71回日本生物工学会大会 2019年9月
8. 南茂彩華, 景山達斗, 福田淳二, 毛髪再生医療のための毛包原基のバイオプリンティング, 第41回日本バイオマテリアル学会大会 2019年11月
9. 景山達斗, 福田淳二, 薬剤スクリーニングのための毛包オルガノイド, 第29回日本色素細胞学会(口頭) 2019年11月
10. 平野杉, 景山達斗, 福田淳二, 毛髪再生医療に向けた毛包幹細胞の増殖培養技術の開発, 第7回細胞凝集研究会 2019年11月
11. 景山達斗, 毛髪再生医療のための三次元培養技術の開発, 2019年度 材料技術研究協会討論会(招待講演) 2019年12月
12. 中嶋陸満, 清水亮啓, 景山達斗, 福田淳二, In vitro 毛幹形成技術を用いた毛髪の再生医療, 第19回日本再生医療学会総会 2020年5月
13. 南茂彩華, 景山達斗, 福田淳二, バイオプリンティング技術を用いた毛包原基作製, 第19回日本再生医療学会総会 2020年5月

【特許】

- (1) 国内特許出願 2件
- (2) 国外特許出願 5件