

研究概要集2023 目次 【研究開発部】

有望シーズ展開事業

「再生毛髪的大量調製革新技術開発」プロジェクト

◆総括	47
◆毛髪再生のための毛乳頭細胞培養法の開発	50
◆薬剤スクリーニングのための毛包オルガノイド	52
◆業績	55

「再生毛髪的大量調製革新技術開発」プロジェクト

プロジェクトリーダー 福田 淳二

【基本構想】

現在、毛髪の再生医療をめぐるには、主に三つの手法が提案されている。1.「毛乳頭細胞」の移植、2.「毛包原基」の移植、3.「生体外で再生した毛包」の移植である。我々は、それぞれのアプローチにおいて、独自の特許技術を開発し、それを元に実用化を目指した研究開発を進めている（図1）。

「毛乳頭細胞」の移植に至っては、間葉系細胞の機能を維持しながら細胞数を増加させる重層化培養技術を開発した。この技術で増殖させた間葉系細胞を移植することで細胞移植による毛髪再生の治療効果を向上できる可能性がある。連携企業や医療機関等と協力し、早期の実用化を目指す。

「毛包原基」の移植に至っては、上皮系細胞と間葉系細胞から毛包原基を簡便かつ大量に作製する技術を開発した。脱毛症患者の細胞を用いて、上皮系細胞と間葉系細胞の増殖培養から移植に至るまで一連の技術を開発し、高効率に毛髪再生する手法を確立する。5年後の臨床試験開始を目標に研究開発を進める。

「再生毛包」の移植に至っては、生体外でほぼ100%の効率で毛髪を再生する技術をマウス細胞で確立し、再生毛包を移植すると皮下に生着し毛周期を繰り返すことを確認した。本手法を脱毛症患者の細胞に適用し、高効率で毛髪再生できる条件の探索を行う。10年後の臨床試験開始を目標に研究開発を進める。



図1 我々が進める3つの毛髪再生アプローチ

1. 2022年度の研究目的

プロジェクト4年目となる2022年度は、以下の各項目を重点項目として研究を進めた。ただし、動物実験については、横浜国立大学動物実験専門委員会および動物実験中央研究所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) 毛乳頭細胞の移植による毛髪再生
- (2) 毛包原基の移植による毛髪再生
- (3) 生体外再生毛包の移植による毛髪再生

(1)に関して、毛髪再生能の高い毛乳頭細胞を調製する技術として重層化培養を開発した。また、ヒト臨床への展

開を見据え、生物由来原料基準（生原基）対応培地への置換を進めた。(2)に関して、毛包原基の作製に用いる上皮系細胞の増殖培養技術を検討した。また、実用化を見据え、毛包原基を凍結保存する方法を検討した。(3)に関して、生体外で毛髪を再生する技術を開発し、この組織が毛髪再生医療へ利用可能か検討を行った。さらに、薬剤スクリーニングモデルとしての応用可能性についても検討した。

本報告書では、3つのアプローチの今年度の成果の概要を紹介する。また、(1)については、エン研究員が、(3)の生体外再生毛包の薬剤スクリーニングへの応用については、景山研究員が詳細を報告する。

2. 2022年度の研究成果

(1) 毛乳頭細胞の移植による毛髪再生

毛乳頭細胞は、脱毛症患者の頭皮に移植することで、毛髪の再生を促す能力を持ち、毛髪再生医療の細胞ソースとして世界的に注目されている。近年、同系統の細胞を用いて、資生堂と東京医科大により国内初の臨床試験も行われたが、毛髪再生効率は全体の5%増にとどまっている [1]。これは毛髪再生治療による見た目の変化はほとんど感じられないレベルである。原因の1つとして、移植に必要な細胞数まで毛乳頭細胞を増殖させるプロセスで、毛乳頭細胞の毛髪再生能が低下したことが考えられる。実際に、毛乳頭細胞は初代培養のみで遺伝子発現プロファイルを劇的に変化させ、毛髪再生能を失うことが報告されている [2]。そのためこの分野では、毛乳頭細胞の毛髪再生能を維持する技術の開発が精力的に進められており、培地の添加因子 (Wnt シグナルの活性化剤等) やスフェロイド培養法などの有力なアプローチも開発されてきた。我々も、毛乳頭細胞に電気刺激を印加しながら培養する方法を開発した [3]。この方法は電極表面に接着した毛乳頭細胞にパルス電流を数時間印加するものであり、従来のディッシュ培養と比較して毛包活性化機能が二倍向上する。また、PI3k/Akt パスウェイの活性化で毛包活性化機能がさらに向上することも確認している [4]。しかしながら、これらの培養技術をもってしても、生体の毛乳頭 (すなわち、培養前の組織) の毛髪再生能のレベルを維持することは現状難しかった。

このような背景から、我々は毛乳頭細胞を長期間 (30 日間) 平面培養することで、毛髪再生能を従来のスフェロイド培養よりも維持しながら、増殖培養する技術を開発した (特願 2022-031086)。この培養法では、毛髪再生能に関連する遺伝子 (ALP 遺伝子) の発現量はスフェロイド培養と比較して2倍以上増加しており、細胞数は30日間で20倍まで増加した。我々はこの培養法を重層化培養と名付け、実用化に向けた検討を進めている。重層化培養の実用化に向けた取り組みの一部として、企業との共同研究により、生原基に対応した培地への置換を進めている。我々が研究段階で使用していた培地にはウシ血清が含まれており、生原基に対応していなかった。詳細は省略するが、生原基対応培地の中で、従来の血清培地よりも重層化培養に適した培地を見出している。この培地で10日間培養した細胞は、血清培地で30日間培養した細胞と比較して、ALP 遺伝子の発現は同等まで達し、細胞数は3倍を超えていた。すなわち、最適化した生原基対応培地での重層化培養は培養期間の短縮 (30日⇒10日) も見込め、実用化する上で課題となる培養コストの大幅な削減につながる可能性がある。現在、これらの結果を踏まえ、臨床試験に向けたプロトコルの作成を進めている。患者ごとに生じる有効性の違いを、いかに軽減できるかなど、検討項目は残されているが、重層化培養した毛乳頭細胞の移植による毛髪再生について、早期の実用化を目指して研究開発を進めていきたい。

(2) 毛包原基の移植による毛髪再生

“毛髪の総本数の増加”を可能とする毛髪再生医療として、毛包原基の移植技術の開発も進めている。毛包は、上皮と間葉の相互作用によって毛包原基が形成されるプロセスを経て発生する。近年、この発生過程で生じる毛包原基を生体外で人工的に再現し、これを移植することで毛髪を再生する技術が注目を集めている。しかし、これまでに毛包原基を大量調製する手法は確立されておらず、ヒトの治療に必要な数千個の均一な毛包原基を大量に調製する技術の開発が、毛髪再生医療の実現に不可欠であった。我々は、毛包の幹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を形成する現象を発見し (特許第6425319号、日本、中国、米国で成立)、微細加工技術を用いて一定間隔でマイクロウェル構造を備えた培養器 [5] を開発することにより、毛包原基の大量調製を実現した。現在、脱毛症患者の細胞を用いて毛包原基を作製し、マウスへ移植する実験を進めている。実際に、移植した毛包原基から毛髪が再生する様子も確認できているが、その再生効率は実用化するにはかなり低い (10個移植して1個生える程度)。

今年度は、この再生効率の向上を図るために、マイクロウェルアレイチップの構造 [6] やコーティング剤の改良 [7] など毛包原基の作製プロセスの最適化を進めてきた。また、毛包原基を作製する際に必要な毛包の幹細胞の増殖技術も最適化した。特に、上皮系の幹細胞については、世界的に見ても増殖培養に成功した例が少なく、この技術の確立は毛髪再生医療の実現に不可欠となる。上皮系細胞は通常の培養基板上では強く接着・伸展し、強烈的な増殖スイッチが入ることで、毛髪再生能を失ってしまう。我々はヒト毛包の上皮系細胞を基底膜由来の細胞外マトリクス内でゲル包埋培養することで毛髪再生能をある程度維持したまま、細胞を緩やかに増殖させる技術を開発した [8]。しかし、これら技術をもってしても、ヒト細胞で効率的な毛髪再生を実現するには至っていない。

我々は、抜本的な改良が必要と考え、毛包原基作製に用いる細胞源 (特に上皮系細胞) を再考した。すなわち、上皮系細胞の中で、特に毛髪再生能に優れる細胞集団をシングルセル解析により見出し、その細胞のみを毛包原基の作製に用いることで、毛髪再生効率の改善を図ることとした。先行研究で報告のある毛髪再生能に優れる細胞集団の情報を元に機械学習を行い、シングルセルの結果から毛髪再生能に優れると予想される15種類のマーカー遺伝子の候補を抽出した。その中で11種類は先行研究での報告のない新規のマーカー遺伝子である。予備検討レベルではあるが、これらのマーカー陽性細胞をMACS法で選別し、その細胞の毛髪再生能を評価したところ、選別前の上皮系細胞よりも毛髪再生能が向上していた。今後、再現性を確認するとともに、この細胞を増殖する方法を検討し、移植実験を行うことで効率のよい毛髪再生が実現されるか検証

していく予定である。

凍結保存は、保存期間や輸送の観点から再生医療の実用化に適した方法と考えられており、承認済みの再生医療等製品である培養皮膚の保存には凍結保存が採用されている。また、脱毛症の進行前に作製した毛包原基を凍結保存できれば、それを患者の求めるタイミングで移植する治療も可能となる。このような観点から、我々は毛包原基を凍結保存する技術を開発した[9]。凍結保存方法や凍結保護剤の種類を検討した結果、凍結保護剤 DMSO で処理した毛包原基を液体窒素に直接浸漬し急冷するガラス化法が毛包原基の凍結に適していることが分かった。実際に凍結した毛包原基をマウスに移植して毛髪再生効率を評価すると、移植前と大差なく毛髪再生できることが確認された。我々はこれまでに毛包原基を把持・移植するマイクロピンセットを開発している[10]。このマイクロピンセットで毛包原基を把持し、ガラス化法で凍結し、解凍後移植するプロセスを経ても、毛包原基から毛髪が再生できることを確認している。今後、このマイクロピンセットを多連化し、ロボットアームで移植を行う技術が開発できれば、数千個の移植を容易かつ安定して行うことが可能になると思われる。

(3) 再生毛包の移植による毛髪再生

毛包原基は“毛の種”のようなものであり、皮膚という畑に移植することで毛包が再生するが、毛の再生方向（毛並み）まで制御することは難しく、ましてや移植した種から確実に毛包が再生するかは保証できない。生体外で毛包組織を再生できれば、畑に苗を移植するように、毛並みを揃えた毛髪をほぼ確実に再生することが可能となる。このようなコンセプトから、我々は生体外で毛包を再生する培養技術を開発した[11]。マウス毛包に存在する2種類の幹細胞（上皮系細胞と間葉系細胞）の自己組織化プロセスに着目し、培養初期に形成する凝集体の空間配置パターンを制御することで高効率（ほぼ100%）に成熟した毛包を再生することが可能となる。すなわち、培養2日目の凝集体の上皮系細胞と間葉系細胞の空間配置をダンベル型からコアシェル型に制御することが、生体外の毛髪再生の鍵であった[12]。このように自己組織化の挙動を制御する観点から毛髪再生に取り込む研究はこれまでになく、全く新しい独創的な方法論の提案といえる。再生した毛髪は30日間の培養で約5mmの長さまで達し、この毛包を移植すると移植部で生着し、毛周期を繰り返す様子が観察された。現在、臨床応用に向けた研究開発として、脱毛症患者の細胞を用いて生体外で毛髪再生する培養技術の開発を進めている。これまでの研究で、脱毛症患者の毛乳頭細胞と毛包上皮幹細胞を混合して凝集体を形成させると、組織構造としては未熟ではあるが、毛幹様構造が形成できることを確認している[13]。今後、培養方法を最適化することで、より成熟したヒト毛包を構築していきたい。

文献

- [1] R. Tsuboi, S. Niiyama, R. Irisawa, K. Harada, Y. Nakazawa, J. Kishimoto, Autologous cell-based therapy for male and female pattern hair loss using dermal sheath cup cells: A randomized placebo-controlled double-blinded dose-finding clinical study, *Journal of the American Academy of Dermatology* 83(1) (2020) 109-116.
- [2] C.A. Higgins, J.C. Chen, J.E. Cerise, C.A. Jahoda, A.M. Christiano, Microenvironmental reprogramming by three-dimensional culture enables dermal papilla cells to induce de novo human hair-follicle growth, *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(49) (2013) 19679-88.
- [3] L. Yan, T. Kageyama, B. Zhang, S. Yamashita, P.J. Molino, G.G. Wallace, J. Fukuda, Electrical stimulation to human dermal papilla cells for hair regenerative medicine, *JBiosci Bioeng* 133(3) (2022) 281-290.
- [4] M. Yamane, J. Seo, Y. Zhou, T. Asaba, S. Tu, A. Nanmo, T. Kageyama, J. Fukuda, Effects of the PI3K/Akt signaling pathway on the hair inductivity of human dermal papilla cells in hair beads, *JBiosci Bioeng* 134(1) (2022) 55-61.
- [5] T. Kageyama, C. Yoshimura, D. Myasnikova, K. Kataoka, T. Nittami, S. Maruo, J. Fukuda, Spontaneous hair follicle germ (HFG) formation in vitro, enabling the large-scale production of HFGs for regenerative medicine, *Biomaterials* 154 (2018) 291-300.
- [6] K. Suzuki, Y. Hiroi, T. Kageyama, J. Fukuda, Optimized Microwell Array Device for Preparation of Hair Follicle Germ-like Aggregates, *Alternatives to Animal Testing and Experimentation* 27(1) (2022) 14-23.
- [7] K. Suzuki, Y. Hiroi, N. Abe-Fukasawa, T. Nishino, T. Shouji, J. Katayama, T. Kageyama, J. Fukuda, Cell-repellent polyampholyte for conformal coating on microstructures, *Sci Rep* 12(1) (2022) 10815.
- [8] S. Hirano, T. Kageyama, M. Yamanouchi, L. Yan, K. Suzuki, K. Ebisawa, K. Kasai, J. Fukuda, Expansion Culture of Hair Follicle Stem Cells through Uniform Aggregation in Microwell Array Devices, *ACS Biomater Sci Eng* 9(3) (2023) 1510-1519.
- [9] M. Aoki, R. Yokota, S. Maruo, T. Kageyama, J. Fukuda, Cryopreservation of Engineered Hair Follicle Germs for Hair Regenerative Medicine, *Journal of Bioscience and Bioengineering* (2023).
- [10] S. Kozaki, Y. Moritoki, T. Furukawa, H. Akieda, T. Kageyama, J. Fukuda, S. Maruo, Additive Manufacturing of Micromanipulator Mounted on a Glass Capillary for Biological Applications, *Micromachines (Basel)* 11(2) (2020).
- [11] T. Kageyama, A. Shimizu, R. Anakama, R. Nakajima, K. Suzuki, Y. Okubo, J. Fukuda, Reprogramming of three-dimensional microenvironments for in vitro hair follicle induction, *Sci Adv* 8(42) (2022) eadd4603.
- [12] T. Kageyama, R. Anakama, H. Togashi, J. Fukuda, Impacts of manipulating cell sorting on in vitro hair follicle regeneration, *JBiosci Bioeng* 134(6) (2022) 534-540.
- [13] T. Kageyama, H. Miyata, J. Seo, A. Nanmo, J. Fukuda, In vitro hair follicle growth model for drug testing, *Sci Rep* 13(1) (2023) 4847.

毛髪再生のための毛乳頭細胞培養法の開発

「再生毛髪的大量調製革新技術開発」プロジェクト

YAN LEI

1. はじめに

毛乳頭細胞は、毛包の基部に局在する高度に特殊化された間葉系幹細胞である。毛包の形態形成と毛周期の制御において毛乳頭細胞は重要な役割を果たしている。毛髪の再生医療を実現するには、患者1名あたりに相当数の細胞が必要となる。例えば、現在想定される毛髪の再生医療では、まず患者から毛包を10本程度採取し、顕微鏡下で毛乳頭を分離する。そのため、限られた数の毛乳頭しか得られないため、生体外で増殖させる必要がある。ただし、培養中に毛乳頭細胞の特性が失われてしまうことが明らかとなっており、特に毛発誘導能が著しく低下することが報告されている[1]。このような継代培養における毛乳頭細胞の機能低下の問題を解決するために、さまざまなアプローチが報告されている。现阶段で一番効果があるのはスフェロイド培養法、ゴールドスタンダードと言われている。

スフェロイドとは、細胞同士が凝集して塊になったものを指し、数千個の細胞を凝集させ、3次元培養により球形に組織化されたものである。細胞低接着材料で作られたU底ウェルで簡単にスフェロイドは作成できる。通常の2次元細胞培養に比べて、スフェロイド培養法はより毛乳頭細胞が生体内の微小環境を再現でき、高い発毛機能発現を維持できることが知られている[2]。

本研究は毛乳頭細胞の毛髪再生能の向上に従来の考えられてない高密度重層化培養法が有効であることを発見したことが発端である。これにより、毛髪再生で重要な幹細胞の大量調製が準備可能となる。

2. 実験と結果

2.1. 毛乳頭細胞の重層化培養

私たちはヒト毛乳頭細胞で高密度重層化培養法の効果を確認した。高密度重層培養とスフェロイド培養を1ヶ月間にわたって観察した結果を図1に示した。ギムザ染色は細胞のコロニーを区別に用いられる。そして、高密度重層培養では、ギムザ染色による観察において毛乳頭細胞がコンフルエントになった後、一部の細胞が重層化して独特の様子が観察された。また、スフェロイド培養では、毛乳頭細胞の凝集体が培養の経過とともに直径が大きくなる様子が示された。リアルタイムグローを用いた細胞増殖率の結果を示した。一般に、培養細胞、特に

上皮系の細胞では、表面を覆いつくしてコンフルエントになると、接触阻害と呼ばれる現象が生じ細胞増殖は停止する。しかし、間葉系細胞である毛乳頭細胞は、培養5日目にコンフルエントに達した後、細胞の増殖は継続し次第に積層化した。培養5日目には播種細胞数の約5倍に増加し、培養30日目には約20倍に増加した。一方、スフェロイド培養では培養30日目で播種細胞数の約3倍程度の増殖に留まっていた。

さらに、リアルタイムPCRで細胞活性を評価したところで、発毛に強く関連することが知られているALP遺伝子の発現は、培養初期にはスフェロイド培養の方が高かったが、重層化が生じる培養7日目以降から高密度重層培養の方が高くなった。それ以外の毛髪関連遺伝子の発現についても、高密度重層培養の方が高いことが示された。

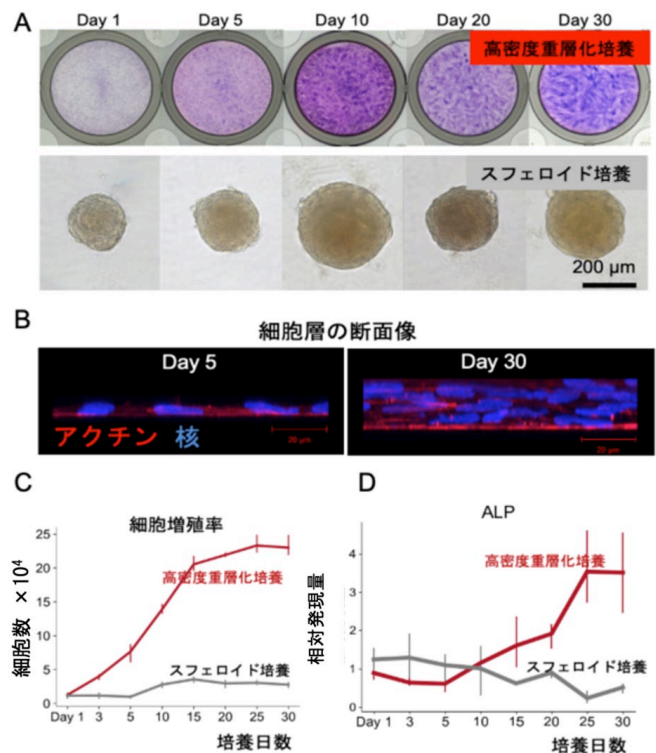


図1 購入凍結ヒト毛乳頭細胞を用いた重層化培養の in vitro 効果

- (A) 毛乳頭細胞の重層化培養&スフェロイド培養した様子、
- (B) 重層化培養した毛乳頭細胞の共焦点画像、(C) 細胞増殖率の比較、(D) ALP 相対発現量の比較

2.2. 毛乳頭細胞の重層化培養した細胞の *in vivo* 評価

重層化培養における毛乳頭細胞の *in vitro* での細胞増殖率及び機能性回復能力を示し、生体内での評価はパッチ法で行った。パッチ法は薬剤スクリーニングや、細胞活性の評価に毛の再生技術として有用性の高い評価方法である。

そして本実験は異なる手法で培養したヒト毛乳頭細胞を回収し、スフェロイド培養 5 日目と高密度重層培養 30 日目を比較しても 3 倍以上発毛本数が多いことが分かった(図 2)。

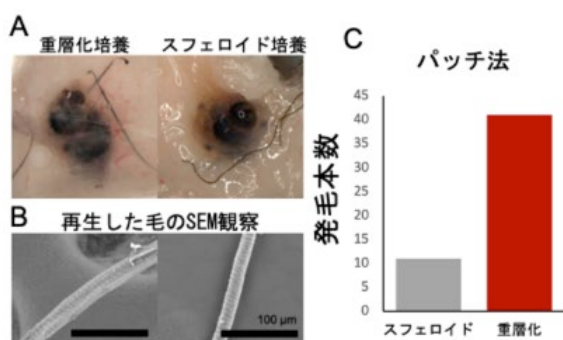


図 2 購入凍結ヒト毛乳頭細胞を用いた重層化培養の *in vivo* 効果

3. まとめと今後の展望

本稿では、私たちが新規開発した毛乳頭細胞の重層化培養を紹介し、この培養方法で培養した毛乳頭細胞生体外、生体内の効果を示した。これからは、事業化向きに使用して行くため、原理解明が必要なるが、今後の課題として検討する。

【参考文献】

- [1] M. Ohyama, T. Kobayashi, T. Sasaki, A. Shimizu, M. Amagai, Restoration of the intrinsic properties of human dermal papilla *in vitro*, *J. Cell Sci.* 125 (2012) 4114–4125. <https://doi.org/10.1242/jcs.105700>.
- [2] C.A. Higgins, J.C. Chen, J.E. Cerise, C.A.B.B. Jahoda, A.M. Christiano, Microenvironmental reprogramming by three-dimensional culture enables dermal papilla cells to induce *de novo* human hair-follicle growth, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 (2013) 19679–19688. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309970110>.

薬剤スクリーニングのための毛包オルガノイド

「再生毛髪的大量調製革新技術開発」プロジェクト
景山 達斗

1. はじめに

ヘアスタイルは人の印象を大きく左右する。そのため、白髪や薄毛治療に対する需要は老若男女すべての世代において大きい。化粧品・製薬業界ではこれら毛髪疾患の治療薬の開発が進められているが、高い有効性が認められた薬剤は極めて少ない。一因として、有効な薬剤候補を見出すための評価系が確立されていないことが挙げられる。現在、培養細胞を用いた薬剤スクリーニング研究が進められているが、培養細胞で得た効果が、その後の動物実験あるいはヒト臨床試験の段階では確認されないなどの不一致が生じる事例は数多く存在する。我々は近年、生体外でほぼ 100% の高効率で成熟した毛包を再生できる毛包オルガノイドの作製技術を開発した[1]。再生した毛包を切断してマウス皮膚に移植すると生着し、毛の生え代わりを繰り返すことから、毛髪再生医療への応用も期待できる。本研究では、この毛包オルガノイドが白髪や薄毛治療薬の薬効を簡便かつ正確に評価できる *in vitro* 培養モデルとして利用できるか検証した。

2. 実験と結果

2.1. 毛包オルガノイドの作製技術

私たちの体を構成する臓器・組織は、異なる種類の細胞からなる非常に複雑な構造を持っており、これらは発生過程において、上皮系細胞と間葉系細胞の相互作用によって形成される。しかし、上皮系細胞と間葉系細胞を生体から分離して試験管内で培養すると、目的細胞への分化に必要な相互作用が得られず、生体内とは異なる動態を示し、臓器・組織への形態形成が生じない。そのため、上皮系細胞と間葉系細胞が生体内と同様に自己組織化するような体外培養手法の研究が進められてきた。海外の研究グループの先行研究において、皮膚の上皮系細胞と間葉系細胞をオルガノイドにして毛包の前駆組織を誘導する研究が進められてきたが、成熟した毛包を形成することはできていなかった[2]。我々は、マウスの上皮系細胞と間葉系細胞が培養初期に形成する凝集体の空間配置パターンを制御することで高効率に成熟した毛包を再生することに成功した[1]。すなわち、凝集体の空間配置パターンが異種排他的なダンベル構造を形成する時には、毛包はほとんど再生しないのに対し、異種間の接着性が強いコアシェル構造を形成するとき、上皮-間葉相互作用が十分に作用し、毛包がほぼ 100% の効率で再生することを見出した (図 1)。この

方法では、上皮系細胞と間葉系細胞を 1 : 1 の比率で混合し、96 well 丸底プレートに播種したのち、2 v/v% マトリゲルを混合した培地で培養する。2 種類の細胞は培養 2 日目にコアシェルの凝集体 (上皮系細胞 : コア、間葉系細胞 : シェル) を形成し、培養 6 日目には毛包が生体外で再生した。形成した毛包オルガノイドには、生体の毛包に含まれる主要な細胞 (毛乳頭細胞や毛包上皮幹細胞、色素細胞など) の存在が観察され、再生した毛幹は組織特有のキューティクル構造を有していた。再生した毛髪は 30 日間の培養で約 5 mm の長さまで達し、この毛包を移植すると移植部で生着し、毛周期を繰り返す様子が観察された。

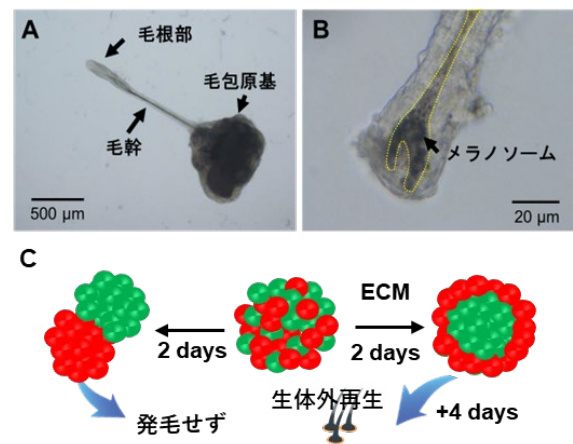


図 1 生体外で再生した毛包とその形成メカニズム

(A) 形成した毛幹、(B) 毛根部の拡大図 (C) 空間配置パターンが生体外での毛包再生に重要

マトリゲルはマウス肉腫由来の細胞外マトリクスであり、製品のロット差が生じる。我々は、ロット差の少ない材料を用いて、より安定して毛包オルガノイドを作製する条件も見出している。すなわち、合成化合物 (Y27632) もしくは低濃度コラーゲンを含む培地で上皮系細胞と間葉系細胞を培養すると、コアシェルの凝集体が形成され、そこから毛髪の再生が確認された[3]。このように自己組織化の挙動を制御する観点から毛髪再生に取り込む研究はこれまでになく、全く新しい独創的な方法論といえる。

2.2. 白髪治療薬の開発に向けた毛包オルガノイド

髪の色は若さと健康のシンボルであり、年齢とともに白髪が目立ち始める。30 代後半で白髪がある人は過半数

を超え、50代ではその量が全毛髪の半数まで達する。一方で、現時点で白髪を改善する方法は、カラーリング剤を用いて定期的に白髪染めを行う程度である。白髪染めの手間や頻度の多さを考えると、白髪を予防・改善できる薬の開発は大きなニーズを有している。

私たちの髪の色を決めるのは、毛球部の色素細胞でつくられる“メラノソーム”という数百nmサイズの生体微粒子である。メラノソームには2種類の色素（黒褐色のユーメラニンと赤褐色～黄色のフェオメラニン）が含まれ、その混合比率により髪色が決まる[4]。例えば、ユーメラニンの割合が多い場合は黒髪、フェオメラニンが多くなると金髪、ほとんどの色素がフェオメラニンの場合は赤髪となる。色素細胞で生成されたメラノソームは、隣接する毛母細胞に輸送され、髪に定着する。白髪はこれら一連のプロセスのいずれかに異常が生じた場合で発生する。

毛包オルガノイドから再生する毛髪は毛球部を先端にして伸長するという特徴がある。そのため、顕微鏡下で毛球部の細胞が増殖する様子や毛幹に色がつく様子をリアルタイムで観察できる。実際に、メラノソームの動態をタイムラプス顕微鏡で観察すると、数秒・数分レベルでメラノソームがダイナミックに輸送される様子が観察された。また、メラノソーム生成を促進する効果のあるメラノサイト刺激ホルモン(αMSH)を培養液に添加すると、目視でもわかるほどの毛髪が黒くなる様子が観察された(図2)。これらの結果は、毛包オルガノイドが白髪治療薬のスクリーニングモデルとして利用できる可能性を示唆している。今後、本培養系を用いて、白髪治療薬のスクリーニングを行う予定である。白髪を薬で予防できる未来を夢見て、研究開発を進めていきたい。

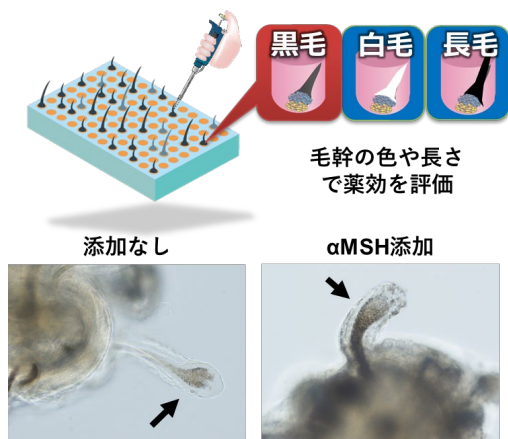


図2 白髪治療薬のスクリーニング

2.3. 脱毛症治療薬開発のための毛包オルガノイド

我々は、脱毛症治療薬のスクリーニングモデルとして、毛包オルガノイドが利用できるかの検討も進めている。この研究では、特に薬剤応答性が種差によって異なることを考慮し、ヒト細胞を細胞源に用いて、*in vitro* 培養モデルを

構築している。ヒト毛乳頭細胞およびヒト外根鞘細胞を1:1で混合した細胞懸濁液をスフェロイド培養プレートに播種し、マトリゲルをゲル化しない程の低濃度(2v/v%)で添加した培地で培養することにより、ヒト毛包オルガノイドを作製した[5]。2種類の細胞は最初に単一の凝集体を形成した後、培養4日目には凝集体から毛幹様構造が形成し、培養10日目にはその長さは約1mmまで伸長した。形成した毛幹様構造は未熟ではあるが、毛髪コルテックスタンパクを形成しているなど毛髪としての特徴の一部が再現されている。このヒト毛包オルガノイドに脱毛症治療薬の1つであるミノキシジルを添加すると、毛幹様構造の伸長速度が有意に増加した(図3)。毛幹伸長を観察するのみで薬効を評価できる簡便性は、網羅的なスクリーニングを行う上で圧倒的メリットであり、この要素を兼ね備えた毛包オルガノイドは薄毛治療薬の開発を加速させる *in vitro* 培養モデルとして期待できる。

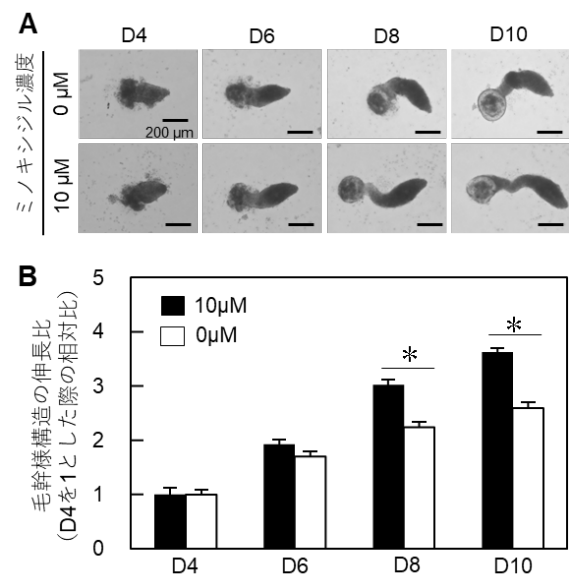


図3 毛包オルガノイドのミノキシジル添加実験

(A) ミノキシジル添加により毛幹様構造の長さが増加 (B) 毛幹様構造の平均伸長比

3. まとめと今後の展望

本稿では、毛髪を生体外で再生する技術とその薬剤スクリーニングへの応用について紹介した。現在、このモデルを用いて、新たな脱毛症治療薬の候補物質を見出し、その有効性を詳細に評価しているところである。しかし、現在のヒト毛包オルガノイドの構造は未熟であり、今後より生体に近い毛包を再生する技術の開発が薬効評価の精度を高め、白髪や脱毛症に対する治療薬の開発を加速させるだろう。今後、さらに毛包オルガノイドの培養条件の最適化を進めることで、本技術を薬剤評価の基盤技術へと成長させていきたい。

【参考文献】

- [1] T. Kageyama, A. Shimizu, R. Anakama, R. Nakajima, K. Suzuki, Y. Okubo, J. Fukuda, **Reprogramming of three-dimensional microenvironments for in vitro hair follicle induction**, *Sci Adv* 8(42) (2022) eadd4603.
- [2] M.X. Lei, L.J. Schumacher, Y.C. Lai, W.T. Juan, C.Y. Yeh, P. Wu, T.X. Jiang, R.E. Baker, R.B. Wideltitz, L. Yang, C.M. Chuong, **Self-organization process in newborn skin organoid formation inspires strategy to restore hair regeneration of adult cells**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(34) (2017) E7101-E7110.
- [3] T. Kageyama, R. Anakama, H. Togashi, J. Fukuda, **Impacts of manipulating cell sorting on in vitro hair follicle regeneration**, *J Biosci Bioeng* 134(6) (2022) 534-540.
- [4] M. d'Ischia, K. Wakamatsu, A. Napolitano, S. Briganti, J.C. Garcia-Borron, D. Kovacs, P. Meredith, A. Pezzella, M. Picardo, T. Sarna, J.D. Simon, S. Ito, **Melanins and melanogenesis: methods, standards, protocols**, *Pigment Cell Melanoma Res* 26(5) (2013) 616-33.
- [5] T. Kageyama, H. Miyata, J. Seo, A. Nanmo, J. Fukuda, **In vitro hair follicle growth model for drug testing**, *Sci Rep* 13(1) (2023) 4847.

業績

【原著論文】

(投稿掲載)

1. Tatsuto Kageyama, Akihiro Shimizu, Riki Anakama, Rikuma Nakajima, Kohei Suzuki, Yusuke Okubo and Junji Fukuda, Reprogramming of three-dimensional microenvironments for in vitro hair follicle induction, *Science Advances*, 8, 42, eadd4603 (2022)
2. Kohei Suzuki, Yoshiomi Hiroi, Natsuki Abe-Fukasawa, Taito Nishino, Takeaki Shouji, Junko Katayama, Tatsuto Kageyama, and Junji Fukuda, Cell-repellent polyampholyte for conformal coating on microstructures. *Scientific Reports*, 12, 10815 (2022)
3. Kohei Suzuki, Yoshiomi Hiroi, Tatsuto Kageyama, and Junji Fukuda, Optimized microwell array device for preparation of hair follicle germ-like aggregates. *AATEX: Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, 27, 1, 14-23 (2022)
4. Yinghui Zhou, Monami Yamane, Kohei Suzuki, Ayaka Nanmo, Shan Tu, Tatsuto Kageyama and Junji Fukuda, Effects of exosomes derived from dermal papilla cells on hair follicle stem cells and hair follicle organoids. *AATEX: Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, 27, 1, 1-13 (2022)
5. Seiya Kanno, Kashi Mizota, Yusuke Okubo, Tatsuto Kageyama, Lei Yan, and Junji Fukuda, Luciferase assay system to monitor fibroblast growth factor (FGF) signal disruption in human iPSCs. *STAR Protocols*, 3, 2, 101439, (2022)
6. Monami Yamane, Jieun Seo, Yinghui Zhou, Tomoki Asaba, Shan Tu, Ayaka Nanmo, Tatsuto Kageyama, Junji Fukuda, Effects of the PI3K/Akt signaling pathway on the hair inductivity of human dermal papilla cells in hair beads. *Journal of bioscience and bioengineering*, 134, 1, 55-61, (2022)
7. Tatsuto Kageyama, Riki Anakama, Hideru Togashi, and Junji Fukuda, Impacts of manipulating cell sorting on in vitro hair follicle regeneration, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 134, 6, 534-540 (2022)
8. Jieun Seo, Lei Yan, Tatsuto Kageyama, Ayaka Nanmo, Yang-Sook Chun, Junji Fukuda, Hypoxia inducible factor-1 α promotes trichogenic gene expression in human dermal papilla cells, *Scientific Reports*, 13, 1478 (2023)

9. Sugi Hirano, Tatsuto Kageyama, Maki Yamanouchi, Lei Yan, Kohei Suzuki, Expansion culture of hair follicle stem cells through uniform aggregation in microwell array devices, *ACS biomaterials science & engineering*, in press
10. Tatsuto Kageyama, Hikaru Akieda, Yukie Sonoyama, Ken Sato, Hiroshi Yoshikawa, Hitoshi Isono, Makoto Hirota, Hiroaki Kitajima, Yang-Sook Chun, Shoji Maruo, and Junji Fukuda, Bone beads enveloped with vascular endothelial cells for bone regenerative medicine, *Acta Biomaterialia*, in press
11. Ayaka Nanmo, Lei Yan, Tomoki Asaba, Licheng Wan, Tatsuto Kageyama and Junji Fukuda, Bioprinting of hair follicle germs for hair regenerative medicine. *Acta Biomaterialia*, in press

【書籍】

1. 南茂彩華、景山達斗、福田淳二、バイオプリンティングの技術と市場、Page(s) 80-87 (2022)
2. 南茂彩華、景山達斗、Yan Lei、福田淳二、毛髪再生医療のための細胞培養技術と臨床応用に向けた課題、月刊「PHARMSTAGE」11月号、page(s) 59-67 (2022)
3. 景山達斗、高効率に長毛を生む毛包オルガノイド、JST news1月、14 page(s) (2023)

【口頭発表】

1. 杉山衣蓮、景山達斗、福田淳二、マイクロ流路を用いた毛包原基様コラーゲンビーズの大量調製
化学とマイクロ・ナノシステム学会 第45回研究会、2022年5月21-22日、中央大学後楽園キャンパス/オンライン
2. 南茂彩華、景山達斗、福田淳二、Large-scale Preparation of Hair Follicle Germs using Bioprinting and Spontaneous Microgel Contraction、2022 MRS Spring Meeting & Exhibit、2022年5月24日、オンライン
3. 肥高龍彦、景山達斗、福田淳二、長い毛幹を有する毛包オルガノイド培養法の開発と毛髪再生への応用、日本動物細胞工学会 2022年度大会(ポスターセッション)、2022年7月26-27日、タワーホール船堀
4. 南茂彩華、景山達斗、福田淳二コラーゲンマイクロゲルの自己収縮による移植組織の作製と毛髪再生医療へ

- の応用第 71 回高分子討論会 (ポスターセッション)、
2022 年 9 月 7 日、北海道大学 札幌キャンパス
5. Tu Shan、景山達斗、福田淳二、
In vitro hair follicle models for development of grey hair therapy (白髪治療開発のための in vitro 毛包モデルの作製)、化学工学会第 53 回秋季大会、
2022 年 9 月 14 日、信州大学長野キャンパス/オンライン
 6. SEO JIEUN、福田淳二、A Multicellular 3D Culture System for Revealing the Mechanism of Metastatic Progression in the Tumor Microenvironment (がん微細環境での転移メカニズム解明のための 3 次元多細胞培養システム)
International Conference on Biofabrication 2022
2022 年 9 月 25 - 28 日 Montecatini, Italy
 7. 景山達斗、福田淳二、Engineering hair follicle organoids through microenvironmental reprogramming (細胞周囲環境のリプログラミングによる毛包オルガノイドの作製)、TERMIS-AP 2022、2022 年 10 月 5-6 日、island of Jeju, South Korea
 9. 青木美緒、景山達斗、福田淳二、毛髪再生医療の為に移植組織凍結保存法、第 60 回 日本人工臓器学会大会、2022 年 11 月 4 日、愛媛
 10. 山内万貴、景山達斗、大山智子、田口光正、笠井敬一郎、福田淳二、毛髪再生医療のためのヒト毛包幹細胞の増殖培養、第 60 回 日本人工臓器学会大会、2022 年 11 月 4 日、愛媛
 11. 鳴瀬絹子、景山達斗、福田淳二、毛髪再生医療に用いるヒト毛包上皮系細胞群の探索、第 60 回 日本人工臓器学会大会、2022 年 11 月 4 日、愛媛
 12. 伊藤直哉、景山達斗、福田淳二、遠心細胞充填を利用した毛包原基の迅速作製法の開発、第 60 回 日本人工臓器学会大会、2022 年 11 月 4 日、愛媛
 13. 山内万貴、景山達斗、笠井敬一郎、福田淳二、ヒト毛包幹細胞の機能維持培養法、第 74 回 日本生物工学会大会、2022 年 11 月 18 日、大阪/オンライン
 14. 景山達斗、福田淳二、Microenvironmental reprogramming of hair follicle germs for hair regenerative medicine (毛髪再生のための毛包原基の微小環境制御)、The 12th World Congress for Hair Research、2022 年 11 月 18-21 日、Melbourne Convention & Exhibition Centre, Australia
 15. Tu Shan、景山達斗、福田淳二、In vitro hair follicle models for development of grey hair therapy (白髪治療開発のための in vitro 毛包モデルの作製)、The 12th World Congress for Hair Research、2022 年 11 月 18-21 日、Melbourne Convention & Exhibition Centre, Australia
 16. 景山達斗、白髪治療に向けたメラニン微粒子の輸送システムの解明、第 45 回日本分子生物学会総会、2022 年 11 月 30 日、幕張メッセ
 17. 景山達斗、福田淳二、再生毛髪的大量調製革新技術
開発、第 1 回キングスカイフロントサイエンスフォーラム、2023 年 2 月 6 日、LiSE
 18. SEO JIEUN、福田淳二、YANG-SOOK CHUN、Lipid promotes metastasis of colon cancer via HIF-1 signaling pathway (脂質/HIF-1 シグナル伝達経路による結腸癌の転移促進メカニズム)、第 22 回日本再生医療学会総会、2023 年 3 月 23-25 日、国立京都国際会館
 19. 景山 達斗、福田 淳二、Hair follicle organoid for regenerative medicine and drug screening (毛髪再生医療や創薬のための毛包オルガノイド)、第 22 回日本再生医療学会総会、2023 年 3 月 23-25 日、国立京都国際会館

【特許】

- (1)国内特許出願 1 件
- (2)国際特許出願 1 件