

博士論文

毛髪再生医療を目指した
毛包原基の大量調製に関する研究

(Large-scale preparation of hair follicle germs for hair regeneration)

横浜国立大学大学院

工学府

景山 達斗

Kageyama Tatsuto

2017年3月

目次

第1章 序論

1.1 研究背景	9
1.1.1. 毛髪機能と構造	9
1.1.2. 脱毛症	10
1.1.3. 外科的治療	12
1.1.4. 薬物治療	14
1.1.5. 毛髪再生医療	15
1.2 本研究の目的	21
1.3 本論文の構成	21
参考文献	24
2.1 はじめに	27
2.2 自発的な細胞凝集現象を用いた毛包原基の調製法	27
2.2.1. マウス上皮系細胞及び間葉系細胞の採取	27
2.2.1.1 本項の目的	27
2.2.1.2 実験装置及び試薬	27
2.2.1.3 実験手順	28
2.2.1.4 実験結果と考察	29
2.2.1.5 本項のまとめ	30
2.2.2 毛包原基の調製	31
2.2.2.1 本項の目的	31
2.2.2.2 細胞選別	31
2.2.2.3 毛包誘導マーカー	32
2.2.2.4 実験装置及び試薬	32
2.2.2.5 実験手順	33
2.2.2.6 実験結果と考察	34

2.2.2.7 本項のまとめ.....	35
2.3 毛包原基の皮下移植による毛包再生.....	38
2.3.1 本節の目的.....	38
2.3.2 実験装置及び試薬.....	38
2.3.3 実験手順.....	39
2.3.4 実験結果と考察.....	40
2.3.5 本節のまとめ.....	41
2.4. ROCK 阻害剤 (Y-27632) での毛包原基形成阻害.....	43
2.4.1 ROCK 阻害剤 (Y-27632) を添加した培地での毛包原基調製.....	43
2.4.1.1 本項の目的.....	43
2.4.1.2 細胞選別現象によって形成される凝集体の構造.....	43
2.4.1.3 ROCK 阻害剤 (Y-27632).....	44
2.4.1.4 実験装置及び試薬.....	44
2.4.1.5 実験操作.....	45
2.4.1.6 実験結果と考察.....	48
2.4.1.7 本項のまとめ.....	49
2.4.2 ROCK 阻害剤 (Y-27632) を添加した培地で調製した毛包原基の毛包再生能.....	50
2.4.2.1 本項の目的.....	50
2.4.2.2 装置・試薬.....	50
2.4.2.3 実験操作.....	51
2.4.2.4 実験結果と考察.....	51
2.4.2.5 本項のまとめ.....	52
2.5 毛包原基培養日数と毛髪再生効率.....	52
2.5.1 本節の目的.....	52
2.5.2 実験装置及び試薬.....	52

2.5.3	実験操作	53
2.5.4	実験結果と考察	54
2.5.5	本項のまとめ	54
2.6	本章のまとめ	55
	参考文献	56
3.1	はじめに	58
3.2	自発的な凝集による毛包再生ビーズの調製	58
3.2.1	本節の目的	58
3.2.3	組織工学と細胞外マトリックス	59
3.2.4	装置・試薬	60
3.2.5	実験操作	61
3.2.6	実験結果と考察	62
3.2.7	本節のまとめ	63
3.3	毛包再生ビーズの ALP 活性評価	65
3.3.1	本節の目的	65
3.3.2	装置・試薬	65
3.3.3	実験手順	66
3.3.4	実験結果と考察	68
3.3.5	本節のまとめ	68
3.4	毛包再生ビーズの包埋細胞数の検討	69
3.4.1	本節の目的	69
3.4.2	装置・試薬	69
3.4.3	実験操作	69
3.4.4	実験結果と考察	70
3.4.5	本節のまとめ	70
3.5	毛包再生ビーズのコラーゲン濃度の最適化	71
3.5.1	本節の目的	71

3.5.2	装置・試薬	71
3.5.3	実験操作	72
3.5.4	実験結果と考察	74
3.5.5	本節のまとめ	74
3.6	毛包再生ビーズ培養時の細胞けん引力が毛包誘導能に与える影響	75
3.6.1	本節の目的	75
3.6.2	細胞牽引力	76
3.6.3	Blebbistatin	76
3.6.4	装置・試薬	76
3.6.5	実験操作	77
3.6.6	実験結果と考察	78
3.6.7	本節のまとめ	78
3.7	毛包再生ビーズの毛再生能の評価	79
3.7.1	本節の目的	79
3.7.2	毛包誘導能の <i>in vivo</i> assay (パッチ法)	79
3.7.3	装置・試薬	80
3.7.4	実験操作	80
3.7.5	実験結果と考察	81
3.7.6	本節のまとめ	81
3.8	毛包再生ビーズを用いた毛包原基の調製	83
3.8.1	本節の目的	83
3.8.2	装置・試薬	83
3.8.3	実験操作	83
3.8.4	実験結果と考察	84
3.8.5	本節のまとめ	84
3.9	本章のまとめ	84

参考文献	87
4.1 はじめに.....	88
4.2 大量培養時の酸素供給.....	88
4.2.1 移植技術への適用と大量培養の課題.....	88
4.2.2 マイクロアレイチップの酸素供給効率の改善.....	89
4.3 毛包原基チップの作製.....	90
4.3.1 本節の目的.....	90
4.3.2 装置・試薬.....	90
4.3.3 実験操作.....	90
4.3.4 実験結果と考察.....	91
4.3.5 本項のまとめ.....	92
4.4 毛包原基チップを用いた毛包原基の大量培養.....	94
4.4.1 本節の目的.....	94
4.4.2 装置・試薬.....	94
4.4.3 実験操作.....	95
4.4.4 実験結果と考察.....	96
4.4.5 本項のまとめ.....	97
4.5 毛包原基と酸素.....	100
4.5.1 本節の目的.....	100
4.5.2 装置・試薬.....	100
4.5.3 実験操作.....	100
4.5.4. 実験結果と考察.....	101
4.5.5. 本節のまとめ.....	101
4.6 毛包原基チップで調製した毛包原基の移植による毛包再生.....	102
4.6.1 本節の目的.....	102
4.6.2 装置・試薬.....	102
4.6.3 実験操作.....	102

4.6.4	実験結果と考察.....	103
4.6.5	本節のまとめ.....	104
4.7	<i>in situ</i> 架橋ハイドロゲルを用いた毛包原基転写シートの作製.....	106
4.7.1	はじめに.....	106
4.7.2	化学架橋ハイドロゲル.....	106
4.7.3	<i>in situ</i> 架橋 Gelatin-HA ゲル、 <i>in situ</i> 架橋 Gelatin-CMC ゲルの合成.....	108
4.7.3.1	本節の目的.....	108
4.7.3.2	EDC 試薬.....	109
4.7.3.3	過ヨウ素酸ナトリウム.....	109
4.7.3.4	装置・試薬.....	109
4.7.3.5	実験操作.....	110
4.7.3.6	実験結果と考察.....	112
4.7.3.7	本項のまとめ.....	113
4.7.4	<i>in situ</i> 架橋ハイドロゲルの物性評価.....	114
4.7.4.1	本節の目的.....	114
4.7.4.2	装置・試薬.....	115
4.7.4.3	実験操作.....	115
4.7.4.4	実験結果と考察.....	116
4.7.4.5	本項のまとめ.....	117
4.7.5	毛包原基チップで調製した毛包原基の <i>in situ</i> 架橋 gelatin-HA ゲルへの転写.....	117
4.7.5.1	本節の目的.....	117
4.7.5.2	装置・試薬.....	117
4.7.5.3	実験操作.....	118
4.7.5.4	実験結果と考察.....	118
4.7.5.5	本節のまとめ.....	119

4.8 本章のまとめ	119
参考文献	121
5.1 はじめに.....	123
5.2 ヒト毛乳頭細胞とマウス上皮系細胞の自発的な細胞凝集現象を用いた毛包原基の調製	123
5.2.1 本節の目的.....	123
5.2.2 装置・試薬.....	123
5.2.3 実験操作	124
5.2.4 実験結果と考察.....	124
5.2.5 本節のまとめ	125
5.3 ヒト毛乳頭細胞とマウス上皮系細胞からなる毛包原基移植による毛包再生	126
5.3.1 本節の目的.....	126
5.3.2 装置・試薬.....	126
5.3.3 実験操作	126
5.3.4 実験結果と考察.....	127
5.3.5 本節のまとめ	128
5.4 ヒト血管内皮細胞とヒト毛乳頭細胞とマウス上皮系細胞の自発的な細胞凝集現象を用いた血管付毛包原基の調製	129
5.4.1 本節の目的.....	129
5.4.2 装置・試薬.....	129
5.4.3 実験操作	130
5.4.4 実験結果と考察.....	131
5.4.5 本節のまとめ	131
5.5 血管付毛包原基移植による毛包再生.....	133
5.5.1 本節の目的.....	133
5.5.2 装置・試薬.....	133
5.5.3 実験操作	133

5.5.4 実験結果と考察.....	134
5.5.5 本節のまとめ	134
5.6. 本章のまとめ	135
謝辞.....	138

第一章

序論

1.1 研究背景

1.1.1. 毛髪機能と構造

毛髪は生命維持には必須ではないものの、ヒトの見た目の印象を大きく作用する体のパーツとして重要な役割を担っている。そのため、ヘアケアに関する関心は男女を問わず非常に高い。2015年度の国内ヘアケア市場規模（事業者売上高ベース）は4,383億円に達し、国内市場は人口の高齢化に加え、薄毛人口の増加、消費者のアンチエイジングに対する関心の高まりなどを背景に今後も拡大するものと考えられている [1]。

毛は出生後に唯一、身体の中で一生涯再生を続ける皮膚附属器官である。この毛を生み出す器官である毛包は発生の初期において、上皮と間葉の相互作用によって誘導される（図1-1） [2]。まず、胎生期の未成熟な表皮で上皮系細胞層が肥厚し、真皮の間葉系細胞集塊を包み込むことで、毛包発生の原始毛芽（毛包原基）を形成する。この毛包原基では、上皮系及び間葉系の細胞が互いに成長・増殖因子を提供しており、これにより各細胞が分化することで毛包を形成し、毛が成長する。

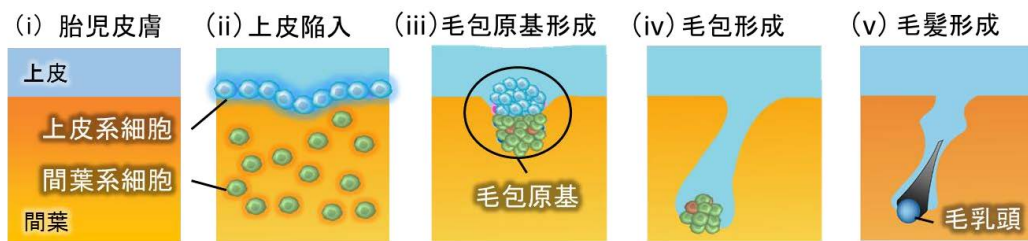


図 1-1 毛包の発生 (i) 胎生期の表皮および真皮、(ii) 胎生表皮の肥厚、(iii) 原始毛芽（毛包原基）、(iv) 毛杭、(v) 毛球を有する毛杭

また、胎生期に形成された毛は一生涯、毛周期と呼ばれる一定のサイクル（成長期⇒退行期⇒休止期）で生え変わる（図1-2） [3]。成長期では、毛根にある毛母細胞が活発に分裂を繰り返して細胞を押し上げることで、太く長い毛を成長させる。退行期では、この毛母細胞の細胞分裂が停止し、細胞のアポトーシスが誘導されることで毛母が萎縮し、これに伴い、毛包が変性し皮膚上層へ退縮する。休止期では、毛包の下端は立毛筋が付随するバルジの近くまで上昇し、毛包下端の毛乳頭がバルジの毛包上皮幹細胞を活性化させることで、毛乳頭

細胞と毛包上皮幹細胞が融合し、新しい毛包が形成され再び成長期が始まる。この際、古い毛は新しい毛に押し上げられることで脱落する。ヒトの頭髪の場合、成長期が2-6年、退行期が2-3週、休止期が3ヶ月と言われており、一斉に生え変わりする事がないように、それぞれの毛包で別々に毛周期を回っている。

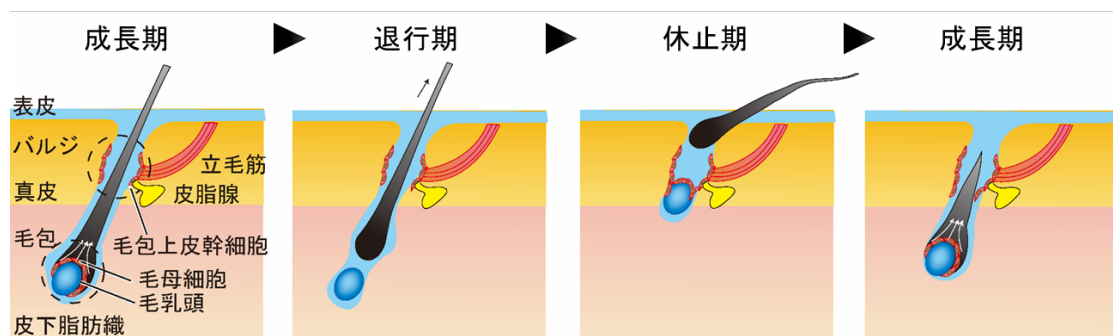


図 1-2 毛包の構造と毛周期 左から成長期、退行期、休止期、成長期

1.1.2. 脱毛症

毛包が退縮し、十分に毛が生えなくなった症状もしくは毛包が破壊され、全く毛が形成されなくなった症状を脱毛症と呼ぶ。2015 年の International society of hair restoration surgery の発表では、世界中で 105 万 5480 人が 1 年間で脱毛改善のために育毛剤や頭髪移植などの治療を受け、このうち 35 万 8109 人が手術的治療を受けたと推定された [4]。国内においても、男性の 4、5 人に 1 人は脱毛に悩んでおり、これが患者の Quality of Life (QOL) の低下に繋がることから、脱毛症はいまや社会的な問題であると言える。この脱毛症には、遺伝やホルモンなど原因や症状によって分類され、男性型脱毛症、びまん性脱毛症、円形脱毛症、瘢痕性脱毛症などが原因の薬物脱毛症などが挙げられる。

男性型脱毛症

Androgenic alopecia (AGA) と呼ばれるように「androgen (男性ホルモン)」と「genetic (遺伝)」によって引き起こされる脱毛症である。典型的な男性型脱毛症は、思春期以降の男性の前頭部の生え際の後退、あるいは頭頂部の髪の毛の

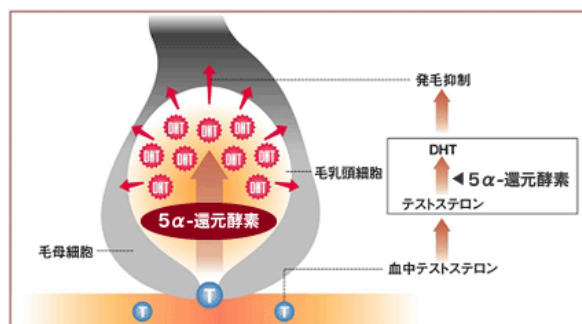


図 1-3 男性型脱毛症の発症メカニズム 参考文献 [6]

ボリュームの低下により進行が始まる [5, 6]。次第に毛の成長期が短縮し軟毛の割合が増え、長期間の経過のうちに毛根部が萎縮して発毛しなくなることが特徴である。この脱毛の原因は、ジヒドロテストステロン (DHT) と同定されている。DHT は男性ホルモンの 1 種である「テストステロン」を前頭部から頭頂部にある毛乳頭細胞や毛母細胞から産生される 5α 還元酵素により変換することで生成される (図 1-3)。生成された DHT はレセプターと結合し、毛母細胞の増殖を抑制することで 5α 還元酵素の活性や DHT への感受性が強い人ほど進行が進みやすい脱毛症である。

びまん性脱毛症

女性の脱毛症の一つであり、ストレスや出産、閉経などによる女性ホルモンの減少によって引き起こされる脱毛症である。症状が頭髪全体の密度が徐々に薄くなるのが特徴であり、そのためびまん性脱毛と呼ばれる。びまん性脱毛症の中でも、近年増加傾向にあるのが女性男性型脱毛症である。女性は女性ホルモンの分泌が盛んであり、血中テストステロン濃度が男性の 20 分の 1 と少ないため、男性ホルモンが原因で引き起こされる男性型脱毛症は引き起こされにくい。しかし、加齢やホルモンバランスが乱れると男性ホルモンの影響が強まり脱毛が誘発される。男性ホルモンの分泌量も少ないので進行速度が遅いのが特徴である。

円形脱毛症

円形脱毛症は、円形から斑状の脱毛斑が頭部のみならず毛髪が存在するあらゆる部位に生じるものである。一般に自覚症はないが、脱毛前や活動期に軽い痒みや違和感、

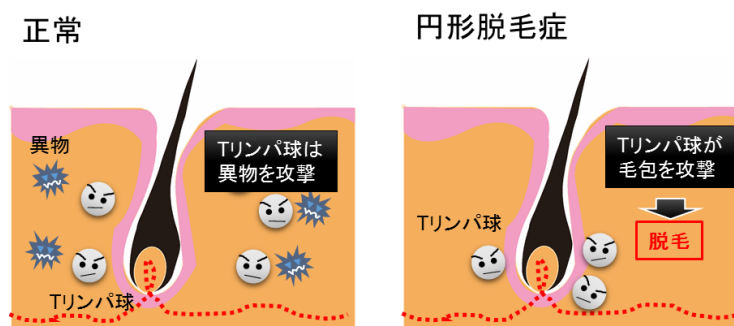


図 1-4 円形脱毛症の発症メカニズム

浮腫性の淡い紅斑をみることもある。重症になると、眉毛、睫毛、髭はもとより全身のあらゆる種類の毛が脱落する。長年、精神的なストレスによって引き起こされると言われてきたが、実際には、ストレスに加え、ウイルス感染、疲労、出産、外傷など様々な原因により発症する。そのため、円形脱毛症は、自らのリンパ球の一部が毛包を「異物」と勘違いし、攻撃してしまうことで起こる自己免疫疾患と考えられている (図 1-4)。浜松医科大学の伊藤らは円形脱毛症の病変部の毛包でインターフェロングammaが大量に産生され、これにより

CXCL10 というケモカインが発現し、これが T 細胞を引き寄せていることを明らかにした [7]。また、毛包をインターフェロン γ とともに培養すると、数日でアポトーシスに陥ることからも、円形脱毛症を強く誘導する因子はインターフェロン γ であると考えられている。また、円形脱毛症は自己免疫疾患であるため、他の脱毛症とは異なり、植毛治療は行われず、局所免疫療法もしくはステロイド局所注射が用いられる。

瘢痕性脱毛症

熱傷や外傷などで毛包および毛包を構成する幹細胞が障害を受けることで毛包の組織が欠落し、2 度と毛が生えてこなくなる症状である (図 1-5)。毛包が欠落するため、薬物治療を行うことができず、現状では、植毛が唯一の治療法である。また、真菌や細菌の感染による毛包の破壊が原因で頭皮が瘢痕化する場合もあり、その場合は、抗真菌薬の投与により脱毛の進行を食い止める必要がある。

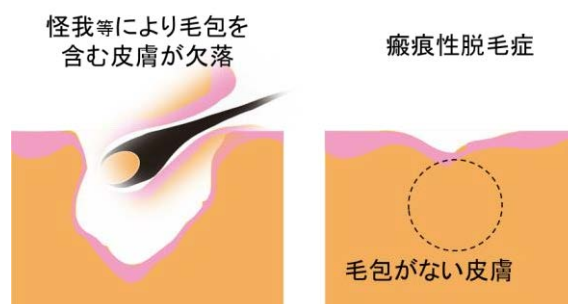


図 1-5 瘢痕性脱毛症の発症メカニズム

1.1.3. 外科的治療

脱毛症の中でも、男性型脱毛症や瘢痕型脱毛症は外科的な治療が可能であり、世界中で約 30 万人/年が治療を受けている。頭髮の移植では、自分の髪の毛を採取し、脱毛部に移植する自毛移植が行われる。移植された毛包は移植領域の頭皮の影響を受けることが少ないため、移植前のドナー領域の毛包が定着する。後頭部や側頭部の毛包は男性ホルモンの感受性が少なく (毛乳頭細胞が II 型 5α 還元酵素を持っていない)、これを移植すれば男性ホルモンによる脱毛が起きにくい毛が再生する。以上の理由から、植毛治療では、後頭部の毛包を採取し、脱毛部に移植する手法が一般的である。本節では、植毛法の中でも最も広く用いられている FUT 法及び FUE 法について紹介する (図 1-6)。

FUT (Follicular unit transplantation) 法

世界的に古くから行われている植毛法が、FUT (Follicular unit transplantation) 法である。自分の後頭部の頭皮を上下約 1 cm の幅で左右 20-30 cm の弧状でメスを使って採取して移植体として使用する。採取したドナー頭皮は実体顕微鏡で 1 つ 1 つ毛包単位ごとに

切り分ける。このようにして、毛包単位に切り分けた移植株を、頭皮に作製したスリットと
呼ばれる小さな切れ目に医師が手作業で植え込んでいく。

FUE (Follicular unit extraction) 法

近年、普及している FUE 法は、直径 1 mm 前後のキリ状の小さな穴をあけて、毛包単位
と周辺の皮膚を一緒にくり抜いて、これを 1 つずつ移植する方法である。この手法では頭
皮に直径 1 mm の穴が開くが縫合をする必要はなく、放置しておくとも自然治癒する。その
ため、FUT 法のように縫合操作が必要なく、傷口もほとんど残らない。近年、導入された
自動植毛装置 ATRAS もこの FUE 法を用いている。

いずれの手法においても、移植の仕上がりは移植希望範囲に開けるスリットの角度や間
隔によって、毛の生える方向や間隔が決まる。そのため、医師の手技によって仕上がりが左
右される。また、移植した毛髪の定着率は腕利きの医者が施術した場合でも 8 割程度であ
り、総毛髪数が減少することが問題点である。

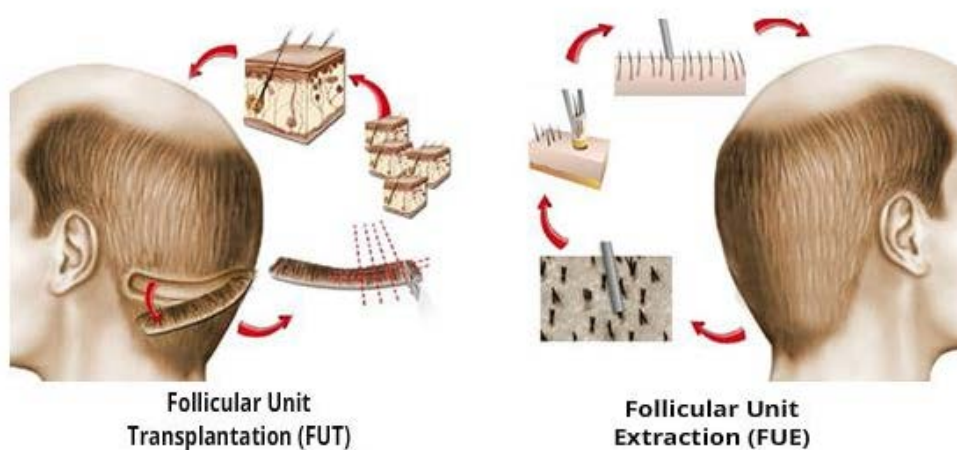


図 1-6 FUT 法および FUE 法による植毛治療 参考文献 [8]より引用

1.1.4. 薬物治療

男性型脱毛症には、有効な薬剤が開発されてきており、早期治療を行えば、脱毛の進行を抑制するだけでなく、発毛も期待できるようになってきた。医薬品の主薬として、ミノキシジル、フィナステリド、塩化カルプロニウム、t-フラバノンなどがあげられるが、日本皮膚科学会による「脱毛症治療ガイドライン 2010」で有効性が強く勧められるとされたものはミノキシジルとフィナステリドのみである（図 1-7） [9]。ミノキシジルは血管拡張薬として開発され、後に発毛効果があるとされ発毛剤に転用された。このミノキシジルは間葉系細胞（毛乳頭細胞）の増殖促進、上皮系細胞（毛母細胞）のアポトーシス抑制、毛包周辺組織への血流改善作用があるとされている。一方、フィナステリドは抗アンドロゲン薬の1つであり、テストステロンをジヒドロテストステロン（DHT）へ変換する酵素である5 α -還元酵素を阻害する。フィナステリドは2型5 α -還元酵素を阻害し、男性型脱毛症（AGA）の原因物質であるDHTの産生を抑えることで効果を発揮する。そのため、AGA治療薬としては有用であるが、他の脱毛症には効果を示さない。近年、より強力なAGA治療薬として、デュタステリドが認可された。2015年9月28日に厚生労働省より正式にAGA治療薬として認可され、医療機関にて11月より処方されている。デュタステリドは1型、2型5 α -還元酵素を阻害し、DHTの産生を抑えることで効果を発揮するため、発毛効果はフィナステリドよりも高いと期待されている。

Clinical Question	推奨度	
CQ1 男性型脱毛症にミノキシジルの外用は有用か？ (CQ1.1) 男性の男性型脱毛症 (CQ1.2) 女性の男性型脱毛症	A A	<p>A 行うよう強く勧められる（少なくとも1つの有効性を示すレベルⅠもしくは良質のレベルⅡのエビデンスがあること）</p> <p>B 行うよう勧められる（少なくとも1つ以上の有効性を示す質の劣るレベルⅡか良質のレベルⅢあるいは非常に良質のⅣのエビデンスがあること）</p> <p>C1 行うことを考慮してもよいが、十分な根拠がない（質の劣るⅢ～Ⅳ、良質な複数のⅤ、あるいは委員会が認めるⅥ）</p> <p>C2 根拠がないので勧められない（有効のエビデンスがない、あるいは無効であるエビデンスがある）</p> <p>D 行わないよう勧められる（無効あるいは有害であることを示す良質のエビデンスがある）</p> <p>ただし、本文中の推奨度が必ずしも上記の判断基準に一致しない場合がある。人種的差異、分野によるエビデンスの不足、日本の社会的特殊事情、さらにガイドラインの実用性を勘案し、エビデンス・レベルを示した上で推奨度を決定した。</p>
CQ2 男性型脱毛症に塩化カルプロニウムの外用は有用か？	C1	
CQ3 男性型脱毛症に医薬部外品・化粧品の育毛剤の外用は有用か？		
CQ3.1 t-フラバノン	C1	
CQ3.2 アデノシン	C1	
CQ3.3 サイトプリン・ペンタデカン	C1	
CQ3.4 セファランチン	C2	
CQ3.5 ケトコナゾール	C1	
CQ4 男性型脱毛症にフィナステリド内服は有用か？ (CQ4.1) 男性の男性型脱毛症 (CQ4.2) 女性の男性型脱毛症	A D	
CQ5 男性型脱毛症に植毛術は有用か？ (CQ5.1) 自毛植毛術 (CQ5.2) 人工毛植毛術	B D	

図 1-7 薬物による脱毛症治療ガイドライン 参考文献 [10]より引用

1.1.5. 毛髪再生医療

植毛治療や薬剤治療などの医療技術の進歩により、脱毛症の進行をくい止め、一部の脱毛症に対しては増毛を行うことも可能になってきている。しかしながら、これらの技術は

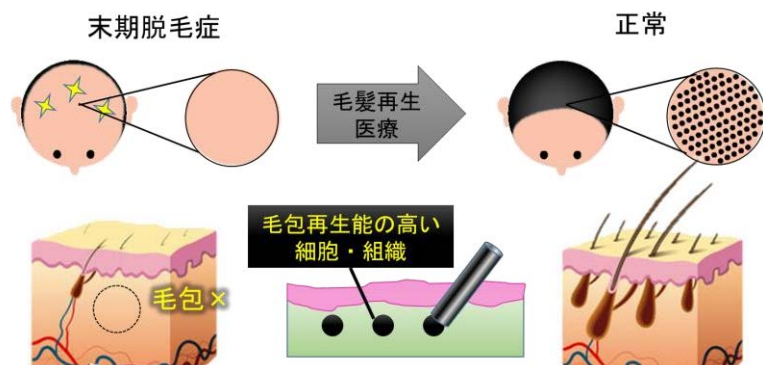


図 1-8 毛髪再生医療

いまだ対処療法にすぎず、毛髪を完全に再生するといった治療法には至っていない。近年、この課題を克服できる革新的治療として「毛髪再生医療」が期待を集めている (図 1-8)。毛髪再生医療とは、病気により弱った毛包や損傷した毛包に対して、細胞の機能を有効に活用して、組織・臓器を再生させる治療法である。本節では、毛髪の再生医療の既往のアプローチについて紹介する。

A. 毛髪再生のための細胞

R.F. Oliver らは上皮系細胞 (ケラチノサイトなど) と毛誘導能を有する間葉系細胞 (毛乳頭細胞など) を混合した細胞懸濁液を生まれつき毛の生えないマウス (免疫不全マウス) の皮膚に注入することで、毛が再生することを報告した [10]。この手法は、上皮系細胞と間葉系細胞を組み合わせ移植することで、自発的に毛包が再生するという現在の毛髪再生医療の基本原理となっている。その後、毛包誘導能を有する細胞および組み合わせの研究が、毛包誘導能の評価法であるチャンバー法およびパッチ法を用いて進められてきた [11, 12]。

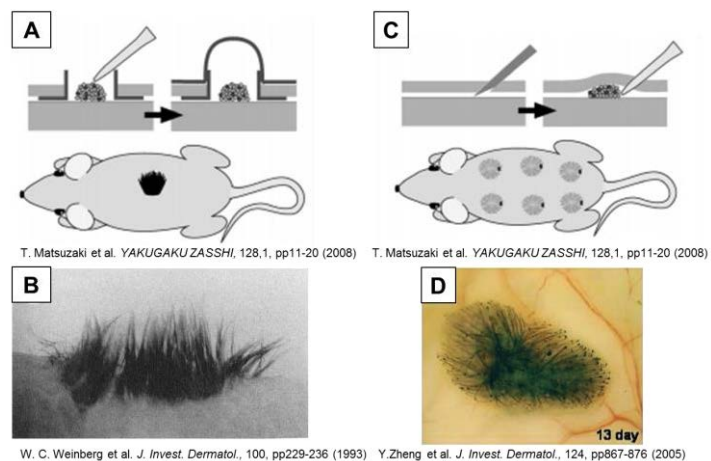


図 1-9 : チャンバー法およびパッチ法による移植 A : チャンバー法を用いた細胞移植、B : チャンバー法により免疫不全マウスから再生した毛、C : パッチ法を用いた細胞移植、D : パッチ法により免疫不全マウスから再生した毛、

チャンバー法 (図 1-9 A)

免疫不全マウスの背部皮膚を切り取り、そこにシリコン製のチャンバーを取り付けて移植スポットを作製し、そこに細胞を注入する方法である。注入された細胞はホストに定着し、毛包を含む皮膚の再構成をはじめ。細胞を注入して1週間後にチャンバーをはずし、飼育を続けると傷口が閉じ、再生した皮膚表面から発毛が観察される (図 1-9 B) [13]。

パッチ法 (図 1-9 C)

チャンバー法より簡便な毛包誘導能の評価方法として、現在ではパッチ法が広く用いられている。これは、免疫不全マウスの皮膚内 (間葉～脂肪組織の領域) にシリンジ等を用いてスペース (パッチ) を作製し、そこに細胞懸濁液を注入する方法である。注入された細胞はパッチ内で毛包を形成し、移植した部分の皮下から毛の形成が観察される [14]。黒毛マウスの細胞を注入すれば、ホストの皮膚から皮下に再生した毛髪が色の変化で確認できる。

このような既往研究により、毛包誘導能を有する細胞は、①胎児及び新生児の皮膚から採取した上皮系及び間葉系細胞、もしくは、②成体毛包の毛乳頭細胞及びバルジ領域の毛包上皮幹細胞が同定されており、これらの細胞懸濁液を免疫不全マウスに移植すると新しい毛包を形成できることが明らかになってきた [10, 13-16]。近年では、iPS 細胞から毛乳頭細胞や毛包上皮幹細胞を誘導する技術の研究開発も進んできており、次世代の細胞ツールとして期待されている [17, 18]。

B. 細胞移植を用いた毛髪再生アプローチ

細胞移植による毛髪再生研究はマウスを用いた評価系において広く展開されてきたものの、ヒトの毛包を再生する技術までには至っていない。この原因として以下の3点が考えられる。

①移植した細胞が皮下で分散するため定着率が悪く、効率よく毛包を誘導することが難しいこと、

②細胞を注入する深さを精密に制御することが難しいこと、

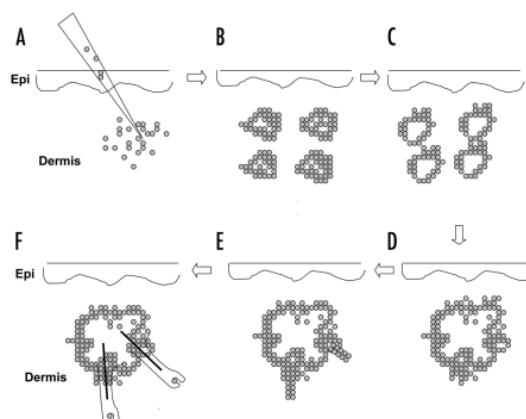


図 1-10 細胞移植による皮下での毛包再生
参考文献 [19]より引用

③毛穴が形成される前に移植創が修復してしまい、皮下で毛包を再生したとしても、表皮へ毛が突出しないこと（図 1-10）である。

そのため、細胞移植は毛包が全く存在しない皮膚へ毛包を「再生」する技術として実用化することは難しい。しかし、この細胞移植も弱った毛包を「活性化」する手法としては有用なようである（図 1-11）。資生堂は毛球部毛根鞘細胞を採取し、これを培養することで細胞数を増加させた後、脱毛部位に移植することで脱毛部位の損傷した毛包を再活性化させ、脱毛部位の健康な毛髪の成長を促す技術の開発を行い、これまでにその有用性を示してきた [20]。2016 年 6 月から東京医科大学、東邦大学と共同した臨床試験も開始され、早期の実用化が期待されている。

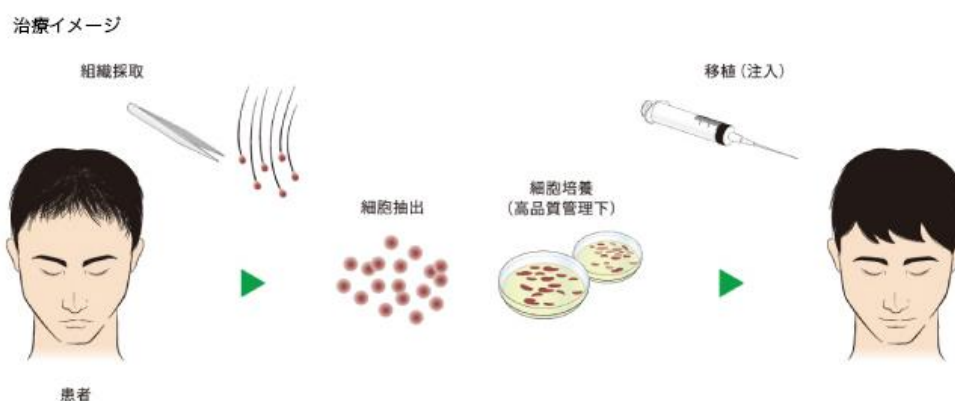


図 1-11 毛球部毛根鞘細胞移植による毛包再生 参考資料 [20] 資生堂 HP より引用

C. スフェロイド移植を用いた毛髪再生アプローチ

細胞を生体に近い環境で三次元構築する手法として、スフェロイド培養が用いられている。上皮系及び間葉系細胞もしくは成体毛包の毛乳頭細胞及びバルジ領域の毛包上皮幹細胞のスフェロイド培養は、従来の単層培養に比べ、細胞機能を長期間維持し、毛髪再生能を向上させることが可能であると報告されている [21-26]。このスフェロイド形成法には、様々な手法が開発されてきており、細胞非接着プレートを用いた培養、ハンギングドロップ培養、マイクロアレイチップ培養、攪拌培養などが挙げられる [27]。

細胞非接着プレートを用いた培養

通常、接着性細胞の培養には、表面を物理的親水処理することで細胞の初期接着性・増殖性を向上させた細胞培養プレートが用いられる。これに対して、非接着性の底面を持つ培養プレートを用いて細胞を培養すると、培地中で浮遊する細胞同士が接着しあうことで、細胞

はスフェロイドを形成する。C. M. Yen らは、細胞非接着コート剤である Poly (ethylene-co-vinyl alcohol) (EVAL) を表面に修飾した培養ディッシュに、ラット毛乳頭細胞とラット足裏皮膚ケラチノサイトを混合播種することで、毛乳頭細胞の周囲をケラチノサイトが覆ったヘテロスフェロイドを形成

できることを報告した (図 1-12)。これを免疫不全マウスにパッチ法により移植したところ、毛包の再生が観察された。この方法は、細胞を培養プレートに播種するだけで、一度に大量のスフェロイドが作製可能であるという利点がある。その反面、均一な形状や大きさのスフェロイドを作製することは難しい。近年では、細胞非接着処理を丸底ウェルに施した培養容器に細胞を播種することで、均一なサイズのスフェロイドを各ウェル内に 1 つずつ調製する手法が主流

となっており、各企業から 96 well のスフェロイド形成プレートなどとして販売されている。Y. Huang らは、PVA をコートした PCR チューブアレイに細胞を播種することで細胞数依存的かつ均一なサイズのスフェロイドを形成することを示した。これを免疫不全マウスに移植すると播種細胞数に依存して毛髪再生効率が向上する傾向が観察された (図 1-13)。

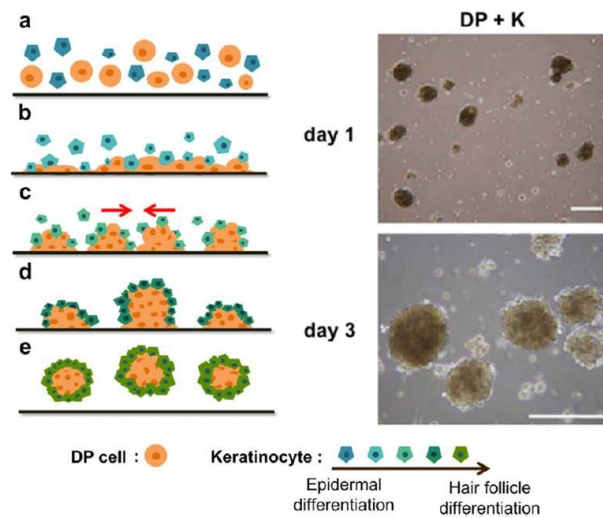


図 1-12 EVAL 修飾表面での毛乳頭細胞とケラチノサイト共培養によるスフェロイド形成 参考文献 [21] より引用

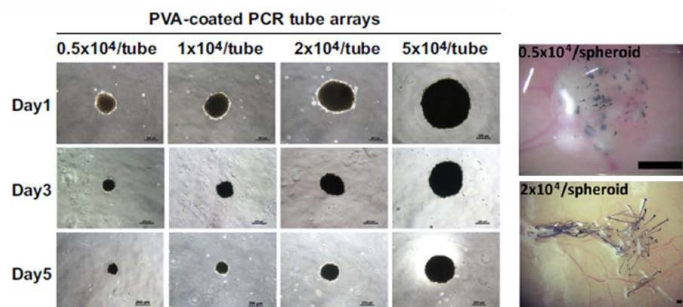
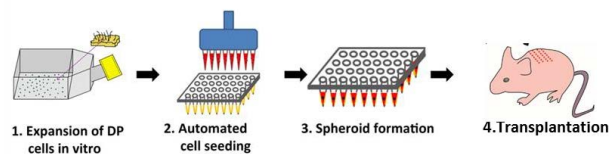


図 1-13 PVA をコートした PCR チューブアレイでの毛乳頭スフェロイド調製とパッチ法による毛包再生 参考文献 [23] より引用

ハンギングドロップ培養

ハンギングドロップ培養法は、培養液中に懸濁した細胞を培養プレートの蓋の内側に少量滴下し、培養プレートの蓋を逆さまにし培養する手法である（図 1-14）。細胞は重力で液滴の下方に集まり、そこで細胞同士が接着し、スフェロイドが形成される。この方法では、簡便かつスフェロイド当たりの細胞数が揃った均一なスフェロイドを形成させやすいといった利点がある。一方で、一滴の培地量が 30 μL 以下であること、培地交換が困難なことから、細胞への酸素・栄養供給を考えると長期的な培養には不向きという欠点がある。

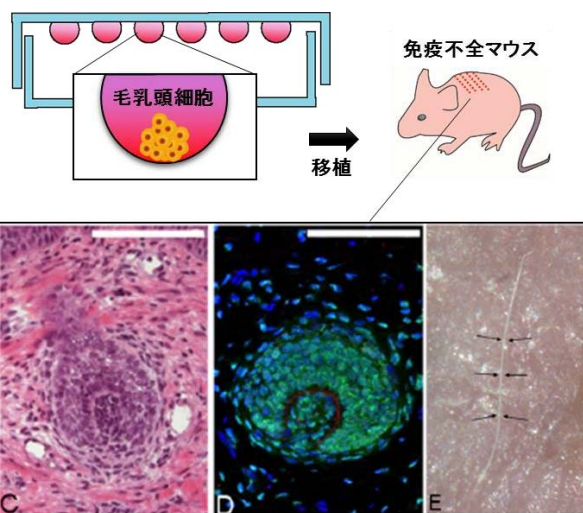


図 1-14 ハンギングドロップ法を用いたヒト毛乳頭スフェロイド調製と毛包再生 参考文献 [25] より引用

C. A. Higgins らは、ヒトの毛乳頭細胞を 30 時間ハンギングドロップ培養することでスフェロイドを形成し、これを免疫不全マウスに移植するとヒトの毛包を形成することを示した [25]。

マイクロウェルアレイチップを用いた培養

微細加工技術を用いて均一なサイズのマイクロウェルが多数並んだ培養プレートを作製し、そこに細胞懸濁液を注ぎ、培養を行うことで、大量のスフェロイドを調製する手法である。播種された細胞は各マイクロウェルに均一に分配され、その後ウェル内で 1 つのスフェロイドを形成する。そのため、スフェロイド 1 個当たりの細

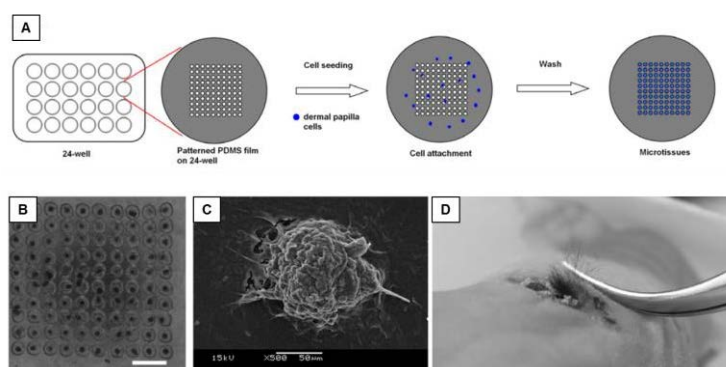


図 1-15 マイクロウェルアレイチップを用いた毛乳頭細胞スフェロイドの調製とそれを用いた毛包再生 参考文献 [26] より引用

胞数やサイズも均一であることが大きな特長である。C. Hsieh らは、PDMS フィルムをレーザー焼結することでマイクロパターンを形成し、これを 24 ウェルプレートに貼り付けた後、毛乳頭細胞を播種することで、スフェロイドの大量調製に成功した (図 1-15)。調製した毛乳頭細胞スフェロイドをマウス上皮組織とともに移植することで毛髪が再生することを示した。この手法は非常に簡便にスフェロイドを大量調製できるものの、高密度で細胞を培養するため、酸素消費量が非常に大きく、培養中の細胞の低酸素障害を誘発することが欠点である。

D. 毛包原基移植を用いた毛髪再生アプローチ

近年、発生過程で形成される毛包原基を生体外で作製し、これを移植することで毛包を再生するアプローチが辻らにより報告された [28]。上皮系及び間葉系細胞もしくは成体毛包の毛乳頭細胞及びバルジ領域の毛包上皮幹細胞の 2 種類の細胞を、コラーゲンゲル内で細胞を精密に区画配置する器官原基法により毛包原基を生体外で構築し、これに毛穴形成を誘導するガイドを挿入し、免疫不全マウスの皮膚に移植することで、移植部から毛包が再生され、毛が形成した (図 1-16)。再生した毛は神経や筋肉とつながり、抜けても生え替わる機能的な毛であることが確認され、再生効率も約 74%と大幅に向上した。この手法は、非常に有用であり、2016 年 7 月から京セラ及びオーガンテクノロジーズと共同した臨床試験も開始され、早期の実用化が期待されている。しかしながら、器官原基法は、上皮系細胞と間葉系細胞のペレットをそれぞれ作製しゲル内でピペットを用いて隣接させる作業が必要である。ヒトの治療に必要な数千～数万個の均一な毛包原基を大量に調製することを考えると多大な労力と時間が必要となる。例え、ロボティクス技術を駆使し高速に毛包原基を調製することができたとしても、医療機関へ導入するためには、莫大な費用がかかる。各医療機関で毛包原基を簡便に大量培養し、患者に安価に必要な毛包原基を提供する技術が、毛髪再生医療の普及には不可欠である。

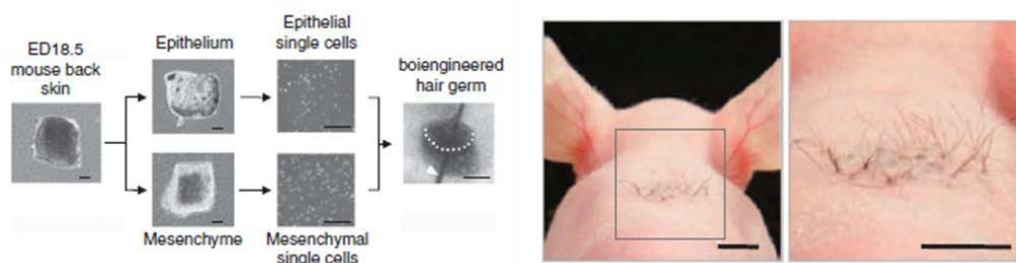


図 1-16 器官原基法を用いた毛包原基の調製と毛包再生 参考文献 [28] より引用

1.2 本研究の目的

以上の背景を踏まえ、毛髪再生医療実現のための技術課題の1つである毛包原基を大量に調製する技術の確立を目的とした(図 1-17)。これを達成するために、独自の酸素透過性マイクロアレイチップを開発し、そこに上皮系細胞と間葉系細胞を播種するのみで毛包原基を大量調製する手法を開発する。そして、作製した毛包原基は、免疫不全マウスの皮膚に移植することで、正常な毛周期を繰り返す毛包を再生するか評価する。さらに、ヒトへの応用展開の可能性を示すため、ヒト毛乳頭細胞を用いて本手法が適用可能か評価する。

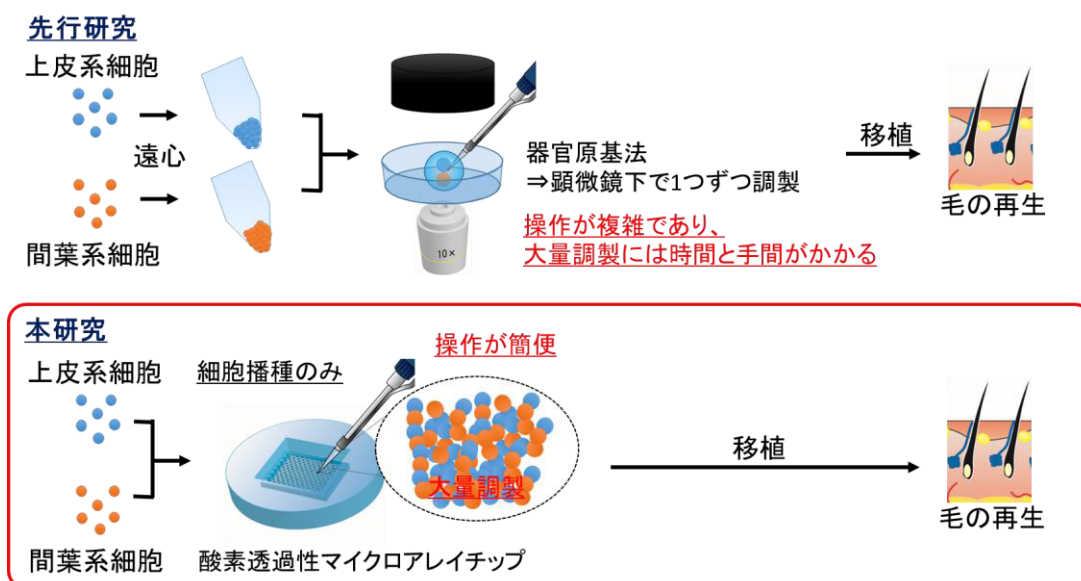


図 1-17 本研究の目的

1.3 本論文の構成

毛髪疾患の新しい治療法として、毛髪を生み出す毛包原基を生体外で構築し、これを移植する毛髪再生医療に期待が寄せられている。毛包は胎児期において、上皮系細胞と間葉系細胞の相互作用により、毛包原基が形成することで発生する。これを模倣し、毛包原基を生体外で構築して免疫不全マウス皮下に移植すると、正常な毛が再生されることが示されている。しかし、この手法では、上皮系細胞と間葉系細胞のペレットをそれぞれ作製し、微小ゲル内に顕微鏡下で、手作業で隣接配置するという手順が含まれている。ヒトの毛髪再生を考えると数万の毛包が必要であり、この手法をそのまま適用すると、多大な労力が必要となる。本研究では、独自に作製したマイクロアレイチップを用いて、毛包原基を大量に作製する技術を開発し、免疫不全マウスへの移植により毛髪再生を行った。本論文は六章から構成されており、各章の概要は以下の通りである(図 1-18)。

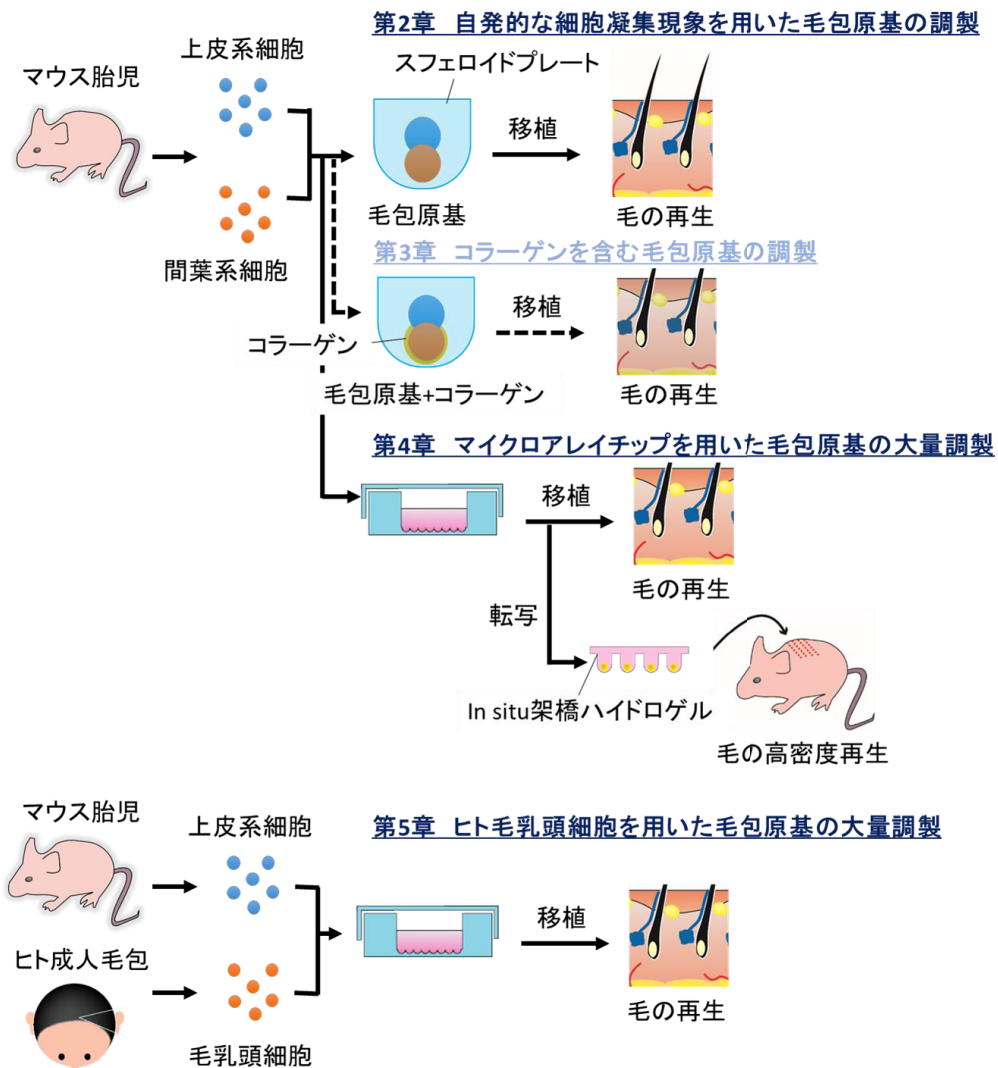


図 1-18 本論文の構成

第一章 序論

本章では、脱毛症に対する既往の治療法を紹介すると共に、最先端治療として期待されている毛髪再生医療のアプローチについて説明した。毛髪再生医療のアプローチとして、従来の細胞移植では再生効率が低いため、近年では、組織工学技術を用いて毛包原基を構築し、それを移植することで再生効率が上昇するようになってきた状況を示した。既往研究から、毛髪再生医療を実用化する上での問題点は毛包原基の簡便な大量培養技術の欠如であることを指摘し、これを克服する新規技術の開発を本研究の目的として明示した。

第二章 自発的な細胞凝集現象を用いた毛包原基の調製

本章では、本研究の基盤技術である自発的な細胞凝集現象を用いた毛包原基の調製法に

ついて詳しく述べる。これはマウス胎児の上皮系細胞と間葉系細胞の 2 種類の細胞混合液を混合して播種するといった非常に簡便な操作のみで毛包原基が構築でき、大量調製に適した手法である。調製した毛包原基を免疫不全マウスに移植することにより、移植部から毛髪の再生が観察され、再生した毛髪は正常な毛周期を繰り返した。

第三章 コラーゲンを含む毛包原基の調製

本章では、成長期の毛包に豊富に含まれるコラーゲンを含む毛包原基を用いた毛髪再生について述べた。生体内の細胞は細胞外マトリックスと接着した状態で存在しており、その結合が生体の様々なシグナル伝達や機能維持に関わっている。本研究では、間葉系細胞を包埋したコラーゲンマイクロゲルを調製し、上皮系細胞と混合して培養することでコラーゲンを含む毛包原基を調製した。調製した毛包原基を免疫不全マウスへ移植したところ、コラーゲンの作用により毛髪の再生本数が増加することが観察された。

第四章 マイクロアレイチップを用いた毛包原基の大量調製

本章では、微細なウェルを均一かつ規則的に複数配置したポリジメチルシロキサン (PDMS) 製のマイクロアレイチップを開発し、毛包原基を大量に調製する技術について述べた。作製したチップは、培地表面からの酸素供給に加えて、酸素透過性の高い PDMS 膜を介した底面からも酸素供給可能である。このため、細胞の大量培養で課題となる細胞の低酸素障害が抑えられ、毛包原基の大量培養を実現できた。2 種類の細胞混合液を作製したチップ上に播種すると、すべてのウェル内で毛包原基が形成された。さらに、作製した毛包原基をシートとして *in situ* 架橋ゲルに転写した後、免疫不全マウスにこのシートを移植することにより、免疫不全マウス皮下に高密度で毛を再生できることを明示した。

第五章 ヒト毛乳頭細胞を用いた毛包原基の大量調製

本章では、ヒト毛髪再生への応用に向けて、ヒトの毛根に存在する毛乳頭細胞を用いた毛包原基の大量調製について述べた。マウス胎児の上皮系細胞とヒト毛乳頭細胞を混合した懸濁液をチップに播種することで毛包原基を大量調製した。これを免疫不全マウスの皮膚に移植すると、正常な毛周期を繰り返す組織学的に正常な毛包を再生した。

第六章 結論

本章では、本論文を総括し、今後の展望について述べた。

参考文献

- [1] 矢野経済研究所 ヘアケア市場に関する調査
<http://www.yano.co.jp/press/pdf/1570.pdf>
- [2] S.E. Millar, Molecular mechanisms regulating hair follicle development, *Journal of Investigative Dermatology* 118(2) (2002) 216-225.
- [3] K.S. Stenn, R. Paus, Controls of hair follicle cycling, *Physiological Reviews* 81(1) (2001) 449-494.
- [4] Relevant Research, Inc., International Society of Hair Restoration Surgery: 2015 Practice Census Results
- [5] S. Inui, S. Itami, Molecular basis of androgenetic alopecia: From androgen to paracrine mediators through dermal papilla, *Journal of Dermatological Science* 61(1) (2011) 1-6.
- [6] 新宿ウエストクリニック HP <http://www.westel.com/edf/about-aga.html>
- [7] T. Ito, H. Hashizume, T. Shimauchi, A. Funakoshi, N. Ito, H. Fukamizu, M. Takigawa, Y. Tokura, CXCL10 produced from hair follicles induces Th1 and Tc1 cell infiltration in the acute phase of alopecia areata followed by sustained Tc1 accumulation in the chronic phase, *Journal of Dermatological Science* 69(2) (2013) 140-147.
- [8] therapie CLINIC <http://www.therapieclinic.com/hair-transplant-fue-technique/>
- [9] 坪井 良治, 板見 智, 乾 重樹, 植木 理恵, 勝岡 憲生, 倉田 荘太郎, 幸野 健, 齊藤 典充, 真鍋 求, 山崎 正視, 男性型脱毛症診療ガイドライン, 120 (5), 977-986, 2010
- [10] C.A.B. Jahoda, K.A. Horne, R.F. Oliver, INDUCTION OF HAIR-GROWTH BY IMPLANTATION OF CULTURED DERMAL PAPILLA CELLS, *Nature* 311(5986) (1984) 560-562.
- [11] 松崎貴, 毛の再生技術と創薬研究へのアプローチ, *YAKUGAKU ZASSHI*, 128(1) (2008) 11-20
- [12] M. Ohyama, Y. Zheng, R. Paus, K.S. Stenn, The mesenchymal component of hair follicle neogenesis: background, methods and molecular characterization, *Experimental Dermatology* 19(2) (2010) 89-99.
- [13] W.C. Weinberg, L.V. Goodman, C. George, D.L. Morgan, S. Ledbetter, S.H. Yuspa, U. Lichti, RECONSTITUTION OF HAIR FOLLICLE DEVELOPMENT INVIVO -

DETERMINATION OF FOLLICLE FORMATION, HAIR-GROWTH, AND HAIR QUALITY BY DERMAL CELLS, *Journal of Investigative Dermatology* 100(3) (1993) 229-236.

[14] Y. Zheng, X.B. Du, W. Wang, M. Boucher, S. Parimoo, K.S. Stenn, Organogenesis from dissociated cells: Generation of mature cycling hair follicles from skin-derived cells, *Journal of Investigative Dermatology* 124(5) (2005) 867-876.

[15] R. Ehama, Y. Ishimatsu-Tsuji, S. Iriyama, R. Ideta, T. Soma, K. Yano, C. Kawasaki, S. Suzuki, Y. Shirakata, K. Hashimoto, J. Kishimoto, Hair follicle regeneration and human cells using grafted rodent and human cells, *Journal of Investigative Dermatology* 127(9) (2007) 2106-2115.

[16] M. Ohyama, O. Veraitch, Strategies to enhance epithelial-mesenchymal interactions for human hair follicle bioengineering, *Journal of Dermatological Science* 70(2) (2013) 78-87.

[17] O. Veraitch, T. Kobayashi, Y. Imaizumi, W. Akamatsu, T. Sasaki, S. Yamanaka, M. Amagai, H. Okano, M. Ohyama, Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Ectodermal Precursor Cells Contribute to Hair Follicle Morphogenesis In Vivo, *Journal of Investigative Dermatology* 133(6) (2013) 1479-1488.

[18] R.F. Yang, Y. Zheng, M. Burrows, S.J. Liu, Z. Wei, A. Nace, W. Guo, S. Kumar, G. Cotsarelis, X.W. Xu, Generation of folliculogenic human epithelial stem cells from induced pluripotent stem cells, *Nature Communications* 5 (2014).

[19] K. Stenn, S. Parimoo, Y. Zheng, T. Barrows, M. Boucher, K. Washenik, Bioengineering the hair follicle, *Organogenesis*, 3(1) (2014) 6-13.

[20] 資生堂 HP <http://www.shiseidogroup.jp/rd/development/medicalcare.html>

[21] C.M. Yen, C.C. Chan, S.J. Lin, High-throughput reconstitution of epithelial-mesenchymal interaction in folliculoid microtissues by biomaterial-facilitated self-assembly of dissociated heterotypic adult cells, *Biomaterials* 31(15) (2010) 4341-52.

[22] Y. Miao, Y.B. Sun, B.C. Liu, J.D. Jiang, Z.Q. Hu, Controllable Production of Transplantable Adult Human High-Passage Dermal Papilla Spheroids Using 3D Matrigel Culture, *Tissue Engineering Part A* 20(17-18) (2014) 2329-2338.

[23] Y.-C. Huang, C.-C. Chan, W.-T. Lin, H.-Y. Chiu, R.-Y. Tsai, T.-H. Tsai, J.-Y. Chan, S.-J. Lin, Scalable production of controllable dermal papilla spheroids on PVA

surfaces and the effects of spheroid size on hair follicle regeneration, *Biomaterials* 34(2) (2013) 442-451.

[24] B. Lin, Y. Miao, J. Wang, Z. Fan, L. Du, Y. Su, B. Liu, Z. Hu, M. Xing, Surface Tension Guided Hanging-Drop: Producing Controllable 3D Spheroid of High-Passaged Human Dermal Papilla Cells and Forming Inductive Microtissues for Hair-Follicle Regeneration, *Acs Applied Materials & Interfaces* 8(9) (2016) 5906-5916.

[25] C.A. Higgins, J.C. Chen, J.E. Cerise, C.A.B. Jahoda, A.M. Christiano, Microenvironmental reprogramming by three-dimensional culture enables dermal papilla cells to induce de novo human hair-follicle growth, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(49) (2013) 19679-19688.

[26] C.-H. Hsieh, J.-L. Wang, Y.-Y. Huang, Large-scale cultivation of transplantable dermal papilla cellular aggregates using microfabricated PDMS arrays, *Acta Biomaterialia* 7(1) (2011) 315-324.

[27] 草森浩輔, 西川元也, 高橋有己, 高倉喜信, 細胞スフェロイド化技術の開発と細胞治療への応用, *Drug delivery system*, 28(1) (2013) 45-53

[28] K. Toyoshima, K. Asakawa, N. Ishibashi, H. Toki, M. Ogawa, T. Hasegawa, T. Irie, T. Tachikawa, A. Sato, A. Takeda, T. Tsuji, Fully functional hair follicle regeneration through the rearrangement of stem cells and their niches, *Nature Communications* 3 (2012).

第二章

自発的な細胞凝集現象を用いた毛包原基の調製

2.1 はじめに

毛包再生の実現には、上皮系細胞および間葉系細胞を用いて、毛包原基を簡便に調製する技術開発が不可欠であり、この毛包原基を皮下に移植して生着し、機能的な毛包が再生するかを評価する必要がある。本章では、本研究の基盤技術である自発的な細胞凝集現象を用いた毛包原基の調製法について、詳しく述べる。これはマウス胎児由来の上皮系細胞および間葉系細胞を1:1の比率で混合した細胞懸濁液を細胞非接着表面に播種することで、2種類の細胞が自発的に同種の細胞同士で凝集しあい、毛包原基を形成する現象である。調製した毛包原基は、免疫不全マウスへ移植することで、毛包再生能を評価した。また、毛包原基の形成原理を解析するために、N-カドヘリンの阻害剤を用いて毛包原基形成の原理を考察した。さらに毛包原基の培養日数の検討を行うことで、最適条件を決定した。

2.2 自発的な細胞凝集現象を用いた毛包原基の調製法

2.2.1. マウス上皮系細胞及び間葉系細胞の採取

2.2.1.1 本項の目的

本項の目的は、マウス胎児から上皮系細胞及び間葉系細胞を採取することである。採取した細胞を上皮系細胞マーカー（Cytokeratin）で染色することにより、目的細胞の採取を確認した。

2.2.1.2 実験装置及び試薬

以下に本実験に用いた装置・試薬を示す。

【装置】

- ・ 倒立型位相差顕微鏡, IX-71 : OLYMPUS
- ・ 倒立型蛍光顕微鏡, DP-71 : OLYMPUS

【動物、試薬】

- ・ マウス胎児 (C57BL/6jcl 胎齢 18 日) : 日本ク
レア
- ・ イソジン : Meiji Seika ファルマ
- ・ Cell strainers ϕ 40 μ m : CORNING

- Collagenase type I : WAKO
- Dispase II : ROCHE
- 細胞培養ペトリディッシュ (φ40mm) : TPP
- Dulbecco's modified eagle medium high glucose (DMEM) : SIGMA
- Fetal bovine serum (FBS) : SIGMA
- Penicillin-Streptomycin (P/S) : GIBCO
- HuMedia-KG2 : KURABO
- 0.25%トリプシン : Thermo Fisher Scientific
- Monoclonal Anti-Cytokeratin, pan antibody produced in mouse : SIGMA
- Goat anti-IgG (H+L) Alexa Fluor 488 highly cross-absorbed : Thermo Fisher Scientific
- 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) : WAKO
- Phosphate buffered saline (PBS) : Thermo Fisher Scientific
- Tween-20 : SIGMA
- Bovine serum albumin solution (BSA) : KPL

2.2.1.3 実験手順

全体的な操作の流れを以下に示す。本実験は横浜国立大学動物実験専門委員会の承認のもと行った。

ディスパーゼ処理

マウス胎児から採取した皮膚を 4.8 U/mL のディスパーゼで 1 時間 4℃、55 rpm で振盪しながら処理した。

上皮組織、間葉組織の分離

ピンセットを用いて上皮組織と間葉組織を分けた。

コラゲナーゼ処理

上皮組織および間葉組織の 100 U/mL コラゲナーゼ処理 (40分×2回, 37℃) を行った。

トリプシン処理

さらに上皮組織を 37℃ で 100 U/mL のコラゲナーゼを含む 0.25% トリプシンで 10 分処理したのち、上皮細胞と間葉細胞にそれぞれセルストレイナーを用いて単一化処理を行った。

細胞播種

単一化処理を施した細胞を遠心により回収し、培養ディッシュに播種し 3 日間培養を行った。間葉系細胞は 10% FBS 及び 1% P/S を含む DMEM 培地、上皮系細胞は KG-2 培地を用いた。

免疫蛍光染色

培養したサンプルを以下の手順で染色した。

- a) 細胞固定 形成した毛包原基を 4% パラホルムアルデヒドで固定した。
- b) 蛍光免疫染色

No.	試薬	時間	注
1	PBS	5分	
2	PBS	5分	
3	10% BSA	30分	ブロッキング
4	1次抗体*/DPBS	over night	4°C、シーソー型振盪装置
5	PBS-T (0.1% Tween-20)	10分	
6	PBS-T (0.1% Tween-20)	10分	
7	PBS-T (0.1% Tween-20)	10分	
8	2次抗体**/DPBS	60分	
9	PBS-T (0.1% Tween-20)	10分	
10	PBS-T (0.1% Tween-20)	10分	
11	PBS-T (0.1% Tween-20)	10分	
12	DAPI 溶液	9分	10 ng/ml (PBS)
13	PBS	5分	
14	PBS	5分	

* Monoclonal Anti-Cytokeratin, pan antibody produced in mouse

** Goat anti-IgG (H+L) Alexa Fluor 488 highly cross-absorbed

c) 位相差、蛍光顕微鏡観察

2.2.1.4 実験結果と考察

既存の細胞採取法を用いて、マウス胎児から上皮系細胞および間葉系細胞を採取した [1]。本採取法で上皮系細胞及び間葉系細胞が採取できたかを確認する為、採取した細胞をそれぞれ異なる培養 dish で3日間培養し、Cytokeratin の免疫蛍光染色を行った。Cytokeratin は上皮系の細胞に発現するタンパク質であり、採取した上皮系細胞を特異的に染色することが可能である。その結果、図 2-1 に示すように、間葉系細胞を培養したものでは、Cytokeratin 陽性細胞は全く見られず、上皮系細胞を培養したものでは、ほとんどの細胞が Cytokeratin 陽性細胞であると示された。

2.2.1.5 本項のまとめ

本項では、マウス胎児より採取した上皮系細胞が Cytokeratin 陽性、間葉系細胞が Cytokeratin 陰性を示し、本採取法により、上皮系細胞及び間葉系細胞を採取できることが示された。

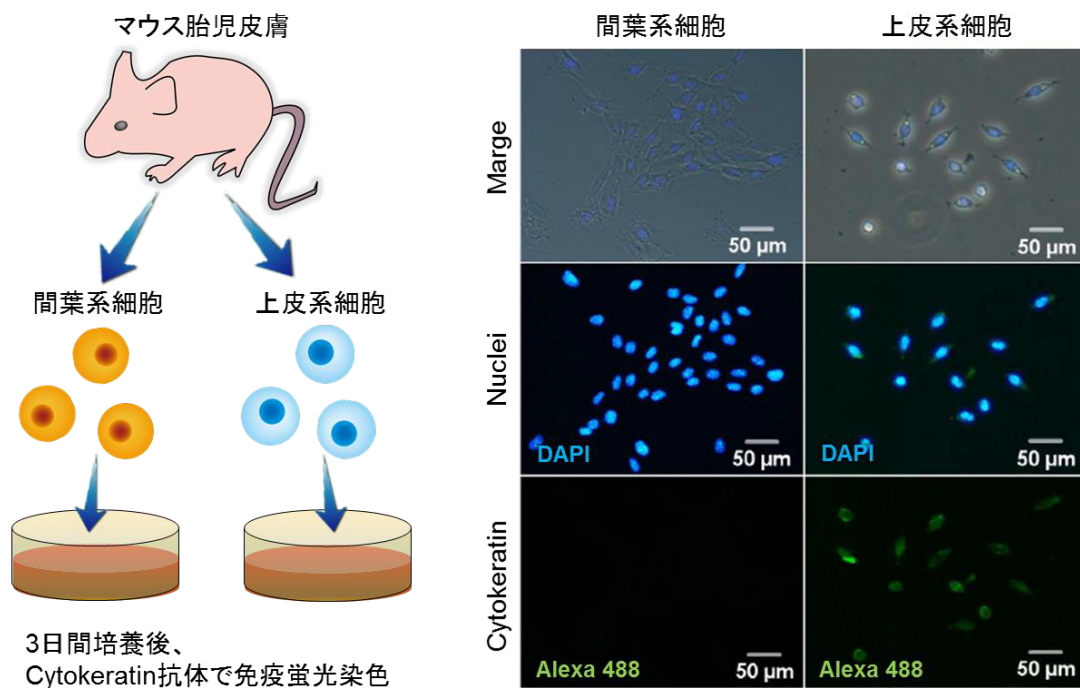


図 2-1 マウス胎児皮膚から採取した細胞の cytokeratin の免疫蛍光染色

2.2.2 毛包原基の調製

2.2.2.1 本項の目的

本項では、採取したマウス上皮系細胞と間葉系細胞を細胞非接着 96 well plate に 1:1 の細胞比率で混合した細胞懸濁液を播種し、培養を行った結果について述べる。

2.2.2.2 細胞選別

H. V. Wilson らは海綿の細胞を用いて、細胞選別現象を発見した [2]。属が異なり、色が違う 2 種の海綿の細胞浮遊液を混合したところ、初めに 2 種の細胞は 1 つの凝集塊を形成した後、次第にそれぞれの細胞は分離し別々の細胞集塊となり、同色の細胞のみで構成される凝集体を形成した (図 2-2)。同様の細胞選別現象は哺乳類で

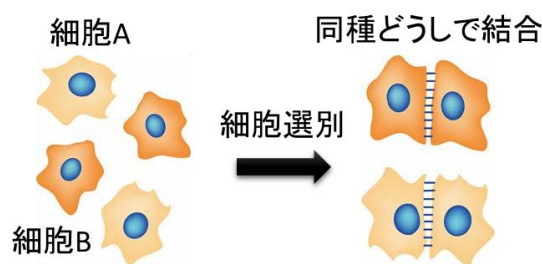


図 2-2 細胞選別現象

バラバラにされた各色の細胞は同色の細胞同士で再結合する

も観察され、この細胞選別現象が細胞のランダムな運動と、細胞特異的なカドヘリン分子の量的な差だけで起こるといふ基本原理が提唱されてきた [3, 4]。この細胞選別現象は細胞を単に播種するのみで自発的に組織を再構成するといった現象であり、細胞を用いて三次元組織を再構築する為に適した手法といえる。

細胞選別現象によるヘテロスフェロイドの形成

①上皮系細胞または血管内皮細胞と②間葉系幹細胞またはアストロサイトなどを混合し、スフェロイド培養を行うと、各種の細胞は 1 つの凝集体を形成した後、間葉系幹細胞またはアストロサイトなどをコアに上皮系細胞または血管内皮細胞をシェルにもつ

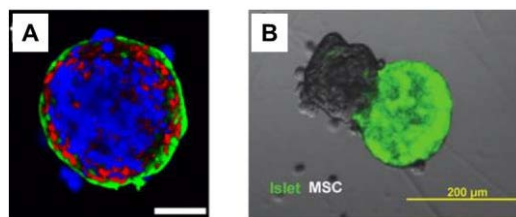


図 2-3 細胞選別現象を用いた組織形成
参考文献 [5, 9]より引用

A: 球状組織体の内核と外殻に選別
B: 同種の細胞同士で形成される 2 つの凝集体が融合した組織を形成

1 つの凝集体を形成した後、同種の細胞同士が凝集しあい 2 つの凝集体からなる図 2-3 B に

示すような組織体を形成した [8, 9]。この細胞選別は、発生期の外胚葉、中胚葉、内胚葉の由来に基づき選別される傾向がある。つまり、外胚葉由来の細胞と中胚葉由来の細胞を混合し培養を行うと、同じ胚葉由来の細胞が集合した組織を再構築する。本研究では、この細胞選別現象を用いて、毛包原基を自発的に形成できないかと発想した。つまり、マウス胎児の上皮系細胞と間葉系細胞を混合して培養することで、上皮系細胞と間葉系細胞が細胞選別され、毛包原基を形成できないかと考え、検討を行った。

2.2.2.3 毛包誘導マーカー

発生過程の毛包原基では、毛包誘導マーカーが間葉系細胞及び上皮系細胞のそれぞれにおいて発現する。これらのマーカーは生体毛包の幹細胞（毛乳頭細胞及び毛包上皮幹細胞）においても同様に発現が見られることから、毛包形成において非常に重要な因子と考えられている [10]。間葉系細胞では、アルカリホスファターゼ（ALP）、Versican、Vimentin、Nexin などが発現し（図 2-4） [11]、上皮系細胞では、cytokeratin15（K15）や CD34 などが発現する。

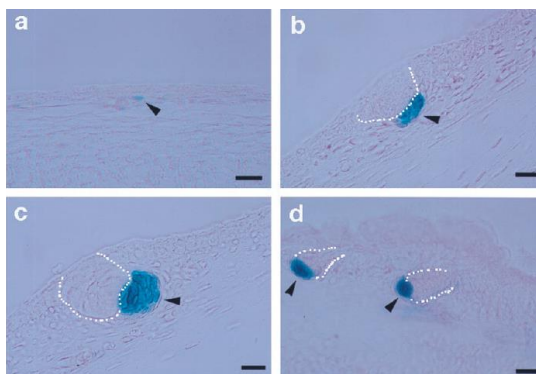


図 2-4 毛包発生過程の Versican 発現
参考文献 [11]より引用 a : E13.5、b : E14.5、c : E15.5、d : E17.5 のマウス

2.2.2.4 実験装置及び試薬

以下に本実験に用いた装置・試薬を示す。

【装置】

- ・ 倒立型位相差顕微鏡, IX-71 : OLYMPUS
- ・ 倒立型蛍光顕微鏡, DP-71 : OLYMPUS
- ・ 共焦点レーザー顕微鏡, LSM700 : Carl Zeiss
- ・ 走査型電子顕微鏡, Miniscope : 日立
- ・ 凍結乾燥機, FDU-1200 : EYELA

【試薬】

- ・ 妊娠マウス (C57BL/6jcl 妊娠 18 日) マウス : 日本クレア
- ・ Prime surface 96 U plate : 住友ベークライト
- ・ Dulbecco's modified eagle medium high glucose (DMEM) : SIGMA
- ・ Fetal bovine serum (FBS) : SIGMA
- ・ Penicillin-Streptomycin (P/S) : GIBCO
- ・ HuMedia-KG2 : KURABO
- ・ Vybrant™ Cell-labeling Solutions : Molecular probes

- FastBlue RR salt : SIGMA
- Naphthol AS-MX phosphate alkaline solution 0.25% : SIGMA
- Mayer's Hematoxylin solution : WAKO
- 4% formaldehyde in PBS : WAKO
- 20% glutaraldehyde Solution : WAKO
- 99.5%エタノール : WAKO
- t-ブチルアルコール : WAKO
- Phosphate buffered saline (PBS) : Thermo Fisher Scientific
- Tween-20 : SIGMA
- Bovine serum albumin solution (BSA) :
- Anti-Pancytokeratin (K15; rabbit, primary antibody) : ABCAM
- Anti-Vimentin (rabbit, primary antibody) : ABCAM
- Anti-Versican (rabbit, primary antibody) : MILLIPORE
- Goat anti-IgG (H+L) Alexa Fluor 488 highly cross-absorbed : Thermo Fisher Scientific
- 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) : WAKO

2.2.2.5 実験手順

全体的な操作の流れを以下に示す。

マウス胎児細胞の採取

間葉系細胞及び上皮系細胞をマウス胎児から採取した。

間葉系細胞の染色

間葉系細胞の 1 mL 懸濁液に Vybrant™ Cell-labeling Solutions を 5 μ L 加え、20 分間インキュベートした。

スフェロイド容器への播種

遠心後、新しい培地をそれぞれ添加し、間葉系細胞及び上皮系細胞を下記の細胞密度で Prime surface 96 U plate に播種した。播種密度を以下の表に示す。

全細胞数 (10 ³ cells)	1	2	4	8	16	32	64
間葉系細胞数 (10 ³ cells)	0.5	1	2	4	8	16	32
上皮系細胞数 (10 ³ cells)	0.5	1	2	4	8	16	32

培地は、間葉細胞培養培地 (DMEM+10%FBS+1%P/S) と HuMedia-KG2 の 1 : 1 混合培地を用いた。

顕微鏡観察

培養 1, 2, 3 日目に蛍光顕微鏡観察を行った。

ALP 染色

3 日間培養後のサンプルを、以下の手順で ALP 染色した。

a) Diazonium salt solution の調製 FastBlue RR salt カプセルを 48 ml の蒸留水 (室温 18-26°C) で溶解し、2 ml の Naphthol AS-MX phosphate alkaline solution を混合した。

b) サンプルの固定 サンプルをクエン酸緩衝アセトン液で 30 秒浸漬することで固定した。その後、脱イオン水 (milliQ) で 45 秒リンスした。

c) アルカリホスファターゼ染色 サンプルにアルカリ染色液を加え、遮光条件で 30 分染色した。その後、milliQ で 120 秒リンスした。

走査型電子顕微鏡観察

3 日間培養後のサンプルを、以下の手順で観察した。

a) サンプルの固定 5 v/v% グルタルアルデヒド及び 4 v/v% パラホルムアルデヒドを 1 : 1 で混合した溶液 (終濃度: 2.5 v/v% グルタルアルデヒド、2 v/v% パラホルムアルデヒド) にサンプルを浸し、1 時間室温でインキュベートした。

b) エタノール脱水 30 v/v%、50 v/v%、70 v/v%、90 v/v%、100 v/v%、100 v/v%、100 v/v% のエタノール溶液に順に 5 分ずつ浸し、サンプルの脱水を行った。

c) t-ブチルアルコール置換 t-ブチルアルコールに 1 時間浸した後 (4°C)、-80°C で一晩凍結した。

d) 凍結乾燥 サンプルは、脱気穴を開けたパラフィルムで覆った後、凍結乾燥機で 2 時間乾燥させた。

e) 観察 走査型電子顕微鏡を用いて、5-10 kV の電圧で観察した。

免疫蛍光染色

細胞数 8×10^3 cells cells の毛包原基を以下の手順で染色した。

a) 細胞固定 形成した毛包原基を 4 v/v% パラホルムアルデヒドで固定した。

b) 蛍光免疫染色 上述した手法で蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

2.2.2.6 実験結果と考察

マウス胎児 (胎齢 18 日) より背部皮膚を採取し、上皮系細胞と間葉系細胞を単離し、これを 1 : 1 の割合で混合し、96 well 細胞非接着プレートに播種した。図 2-5 に、3 日間培養後の結果を示す。播種した 2 種類の細胞は、1 つの凝集体を形成した後 (図 2-5 B (i))、3 日間の培養中に凝集体内で同種細胞どうしが集合しあうことで毛包原基を自発的に形成した (図 2-5 B (ii))。また、細胞混合比率を変更した場合においても、自発的な細胞分離が観察された (図 2-6)。先行研究において、辻らは器官原基法により調製した毛包原基が、成長期毛包で発現する毛包誘導マーカーであるアルカリホスファターゼ (ALP) を発現することを

報告している [12]。本手法により調製した毛包原基も同様に ALP を発現しており、毛包誘導能を有する機能的な毛包原基であるといえる (図 2-5 C)。さらに、調製した毛包原基を毛包幹細胞マーカー (K15、Vimentin、Versican) で染色した結果を図 2-6 に示す。上皮系の幹細胞である毛包上皮幹細胞のマーカー (K15) は Vybrant™ Cell-labeling Solutions で赤く染色した間葉系細胞集塊とは反対の上皮系細胞集塊に存在しており、間葉系の幹細胞である毛乳頭細胞のマーカー (Vimentin、Versican) は間葉系細胞集塊に存在していた。この結果より、調製した毛包原基は毛包形成に必須な 2 種類の幹細胞を含むことが示された。従来法では、2 種類の細胞をコラーゲンゲル内にピペットを用いて再配置することで毛包原基を形成していたが [12]、本手法の発見により、2 種類の細胞懸濁液を混合して播種するという非常に簡便な操作のみで毛包原基を構築することが可能となった。また、本手法は後述する毛包原基の大量調製法に最適な手法であると考えた。以上より、本論文では、自発的な細胞選別を用いて調製した毛包原基による毛髪再生について研究開発を進めることとした。

2.2.2.7 本項のまとめ

本項では、マウス胎児より採取した上皮系細胞及び間葉系細胞を 1 : 1 の比率で細胞非接着 96 well plate に播種することで、2 種類の細胞が凝集し、均一に分散した 1 つの凝集体を形成した後、同種の細胞同士がその中で自発的に分離することで、2 つの細胞集団に分かれた 1 つの毛包原基を形成することを見出した。また、調製した毛包原基が① ALP 活性を有しており、② 2 種類の毛包幹細胞を有する生体と類似した毛包原基を構築できることを示した。

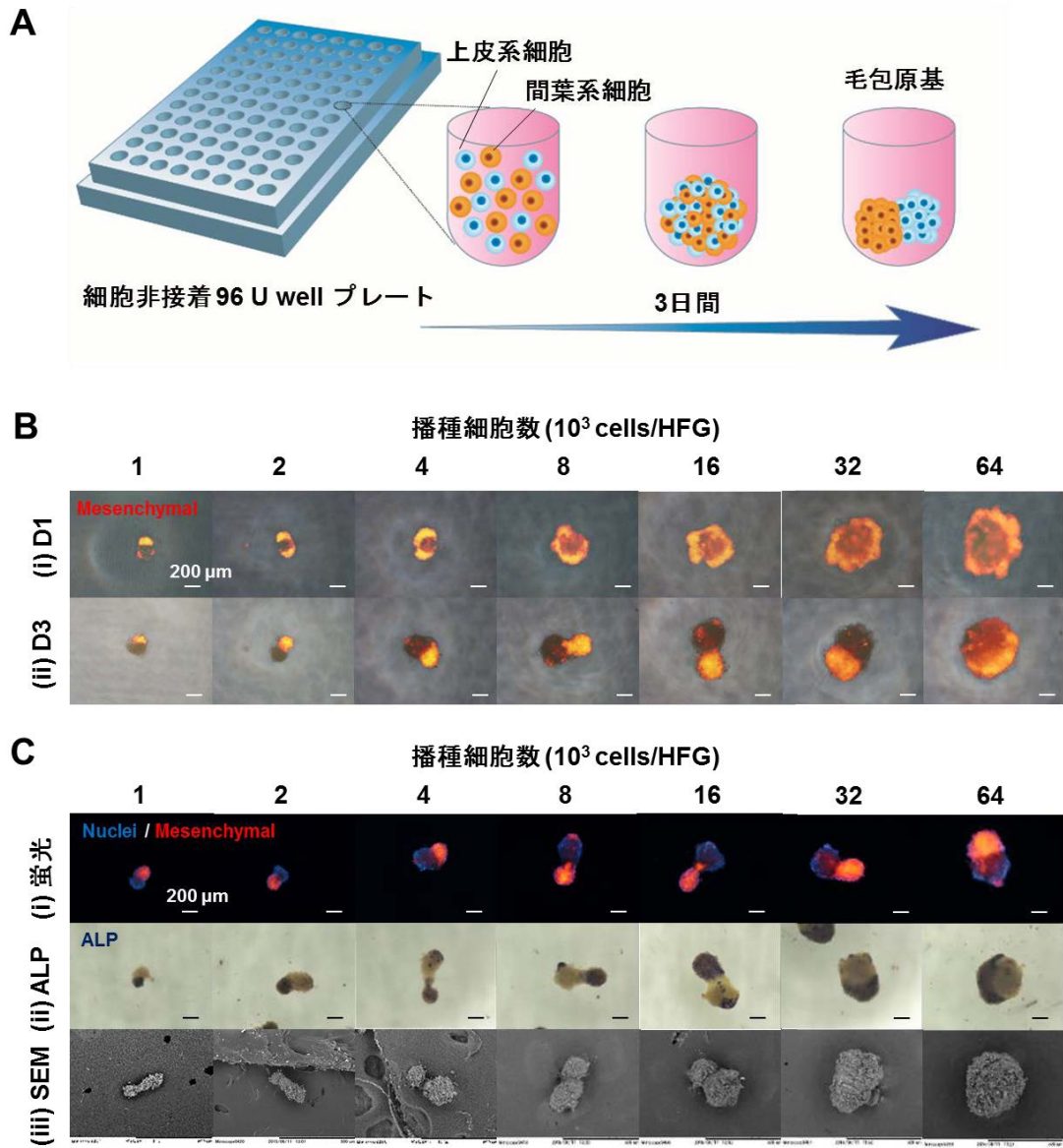


図 2-5 上皮系細胞と間葉系細胞の自発的な細胞選別による毛包原基の調製

A: 上皮系細胞と間葉系細胞の自己凝集による毛包原基形成の様子、B: 凝集体内の細胞の分布. (i) 培養 1 日目及び (ii) 培養 3 日目. 間葉系細胞は Vybrant™ Cell-Labeling Solutions (赤) で染色. C: 培養 3 日目の毛包原基

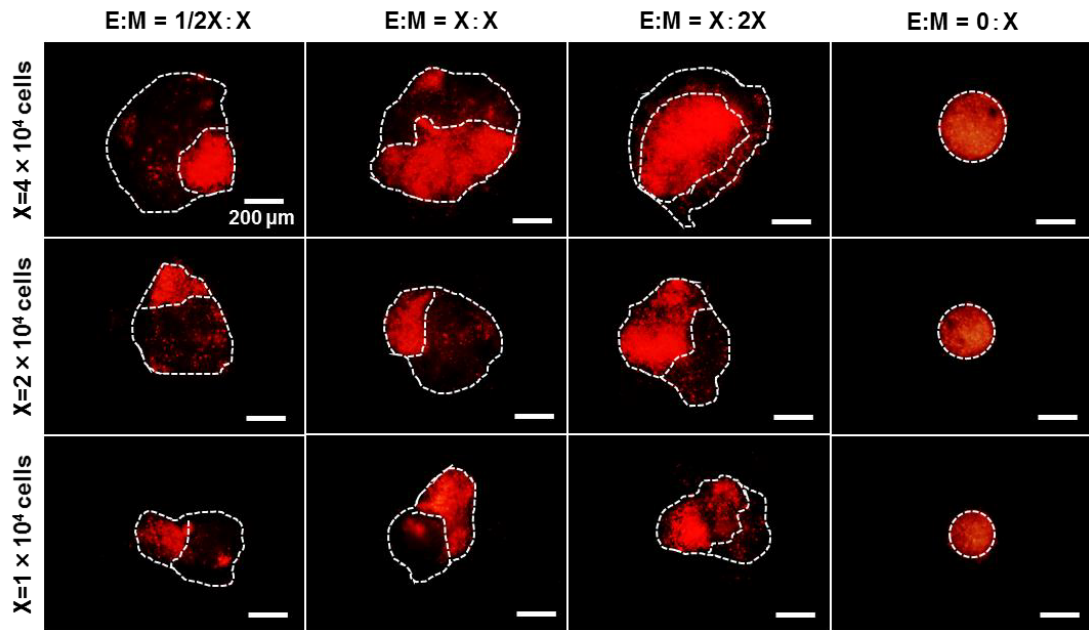


図 2-6 上皮系細胞と間葉系細胞の播種比率を変更した毛包原基（培養 3 日間）

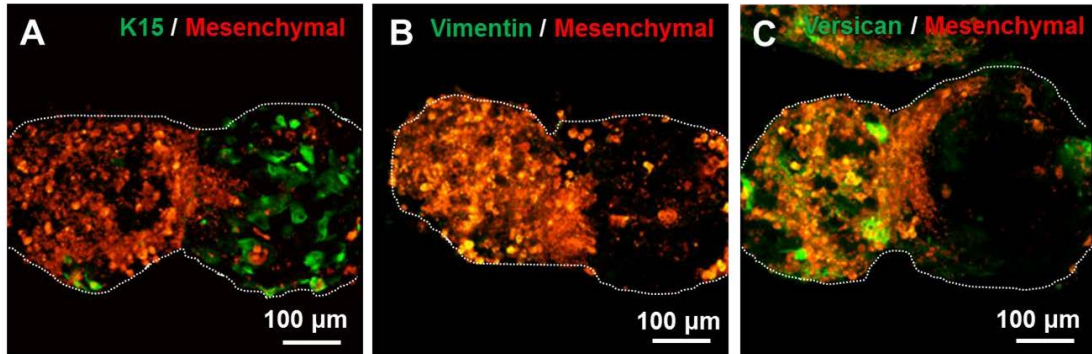


図 2-7 毛包幹細胞マーカーの免疫蛍光染色

A) 緑 : K15、赤 : Vybrant™ Cell-labeling Solutions で染色した間葉系細胞、B) 緑 : Vimentin、赤 : Vybrant™ Cell-labeling Solutions で染色した間葉系細胞、C) 緑 : Versican、赤 : Vybrant™ Cell-labeling Solutions で染色した間葉系細胞

2.3 毛包原基の皮下移植による毛包再生

2.3.1 本節の目的

本節の目的は、2.2 節で調製した毛包原基を免疫不全マウスの皮下に移植することで、毛包再生能を評価することである。毛包原基移植後の皮膚の経過観察、移植 18 日の皮膚切片の蛍光免疫染色及び HE 染色、再生毛の走査型電子顕微鏡観察を行うことで毛包再生効率、再生毛包の組織学的解析を行った。

2.3.2 実験装置及び試薬

以下に本実験に用いた装置・試薬を示す。

【装置】

- ・ 小動物用イソフルラン麻酔器：バイオリサーチセンター株式会社
- ・ デジタルマイクロスコープ：KEYENCE
- ・ 倒立型蛍光顕微鏡, DP-71：OLYMPUS
- ・ 回転式マイクロトーム：Leica
- ・ 走査型電子顕微鏡, Miniscope：HITACHI
- ・ クライオマイクロトーム：Leica

【試薬】

- ・ 妊娠マウス (C57BL/6jcl 妊娠 18 日) マウス：日本クレア
- ・ 10%中性緩衝ホルマリン液：WAKO
- ・ ICR ノードマウス 5 週目：オリエンタル酵母
- ・ スクロース：WAKO
- ・ 20 G オフサルミック V ランス：日本アルコン
- ・ OCT compound：サクラファインテック
- ・ Prime surface 96 U plate：住友ベークライト社製
- ・ Phosphate buffered saline (PBS)：Thermo Fisher Scientific
- ・ Dulbecco's modified eagle medium high glucose (DMEM)：SIGMA
- ・ Tween-20：Sigma Aldrich
- ・ Fetal bovine serum (FBS)：SIGMA
- ・ Anti-CD34 抗体 MEC 14.7 (ab8158)：Abcam
- ・ Penicillin-Streptomycin (P/S)：GIBCO
- ・ Anti-Versican Antibody, a.a. 1360-1439 of mouse versican：Millipore
- ・ HuMedia-KG2：KURABO
- ・ Rabbit anti-Rat IgG Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 conjugate：Life technology
- ・ ピクリン酸：WAKO
- ・ Goat anti-rabbit IgG Secondary Antibody, Alexa Fluor® 555 conjugate：Life technology
- ・ 20%ホルマリン液：WAKO
- ・ 酢酸：SIGMA
- ・ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)：WAKO
- ・ マイヤーヘマトキシリン染色液：WAKO
- ・ Mount-Quick：大道産業
- ・ エオシン Y 溶液：武藤化学

2.3.3 実験手順

全体的な操作の流れを以下に示す。

マウス胎児細胞の採取

間葉系細胞及び上皮系細胞をマウス胎児から採取した。

スフェロイド容器への播種

遠心後、新しい培地をそれぞれ添加し、間葉系細胞及び上皮系細胞を下記の細胞密度で

Prime surface 96 U plate に播種した。播種密度を以下の表に示す。

全細胞数 (10 ³ cells)	1	2	4	8	16	32	64
間葉系細胞数 (10 ³ cells)	0.5	1	2	4	8	16	32
上皮系細胞数 (10 ³ cells)	0.5	1	2	4	8	16	32

培地は、間葉細胞培養培地 (DMEM+10%FBS+1%P/S) と HuMedia-KG2 の 1 : 1 混合培地を用いた。

毛包原基の移植

ICR ノードマウス皮下に 20 G オフサルミック V ランスで移植穴をあけ、そこにマイクロピペット (10 -0.5 µL) で毛包原基を 1 つずつ移植した。

観察

毛包原基を移植したマウスは 2 日に 1 回肉眼観察を行い、移植 18 日目にマイクロスコープを用いて観察した。

HE 染色

移植 18 日目の移植部を以下の手順で HE 染色した。

a) 組織固定 ブラン固定液 (ピクリン酸飽和水溶液 15ml、20 ホルマリン 5ml、氷酢酸 1ml の混合溶液) に 1 日浸漬することで組織の固定を行った。

b) パラフィン包埋 70, 90, 100 v/v%エタノール, 100 v/v%エタノール-2-ブタノール 1 : 1 溶液, 2-ブタノール, 2-ブタノール-パラフィン 1 : 1 溶液, パラフィンに 1 時間ずつ浸した後、パラフィンブロックを作製した。

c) 切片作製 回転式マイクロトームを用いてパラフィン切片を作製した。

d) HE 染色 以下の手順で HE 染色を行った。

1	キシレン	30 分	11	90%エタノール	30 秒
2	キシレン	30 分	12	90%エタノール	1 分
3	100%エタノール	5 分	13	100%エタノール	1 分
4	100%エタノール	5 分	14	100%エタノール	5 分

5	90%エタノール	5分	15	100%エタノール	5分
6	70%エタノール	5分	16	キシレン	5分
7	蒸留水	3分	17	キシレン	5分
8	マイヤーヘマトキシリン溶液	3分	18	封入	
9	流水	13分			
10	エオシン Y	4分			

免疫染色

移植 18 日目の移植部の皮膚を以下の手順で CD34、Versican の蛍光免疫染色を行った。

- a) 細胞固定 20 %ホルマリンに 1 日浸漬することで組織の固定を行った。
- b) スクロース置換 10 w/v%、20 w/v%、30 w/v%スクロース溶液に 1 時間ずつ浸した。
- c) OCT compound 包埋 スクロース置換した切片を OCT compound 内に包埋した。
- d) 切片作製 クライオマイクロトームを用いて切片を作製した。
- e) 蛍光免疫染色 上述した方法で CD34、Versican の蛍光免疫染色を行った。

2.3.4 実験結果と考察

作製した毛包原基の毛包再性能を評価するために、現在の FUT 植毛治療で行われている手法と同様に毛包原基を免疫不全マウス皮下に移植した。つまり、図 2-8 に示すように免疫不全マウス皮下に 20 G オフサルミック V ランスを用いて皮膚に対して水平になるように移植穴を形成した後、作製した毛包原基をピペットを用いて 1 つずつ移植した。この時、毛包原基が移植穴から見える直前の位置に移植することが重要であり、これによりホストの上皮と毛包原基の上皮が表皮への毛再生効率は向上する。毛包原基移植 18 日後には、ホスト皮膚内に毛包原基が生着して毛成長する様子が観察された (図 2-8)。また、平均再生本数と平均再生効率は、毛包原基を構成する細胞数に依存して増加する傾向が見られた。同じ細胞数の間葉系細胞スフェロイドのみを移植したものと毛包原基を比較すると、毛包原基の毛再生効率が有意に高いことから (図 2-9)、移植した毛包原基はホストに定着した後、毛包、毛幹を形成したと推測できる。一方、生体の毛包は、毛包上皮幹細胞及び毛乳頭細胞という 2 種類の幹細胞が生涯毛の生え変わり (毛周期) を制御することが知られている [13, 14]。そこで、移植 18 日目の移植部周辺皮膚を採取し、凍結切片を作製した後、毛包再生に寄与する 2 種類の幹細胞特異的タンパク質に対する免疫染色を行ったところ、生体の毛包と同様に 2 種類の幹細胞の存在が観察され、組織学的にも正常な毛包を形成していることが示された (図 2-10 A, B)。また、再生した毛を長期的に観察したところ毛周期が観察

され (図 2-10 C)、再生した毛はマウス体毛と同様にキューティクル構造を有していた (図 2-10 D, E)。以上より、本手法で作製した毛包原基を免疫不全マウスに移植することで生体と同様の毛包を再生できる可能性が示された。

2.3.5 本節のまとめ

本節では、調製した毛包原基を免疫不全マウス皮下に移植することで、毛周期を繰り返す組織学的に正常な毛包を再生できることを示した。

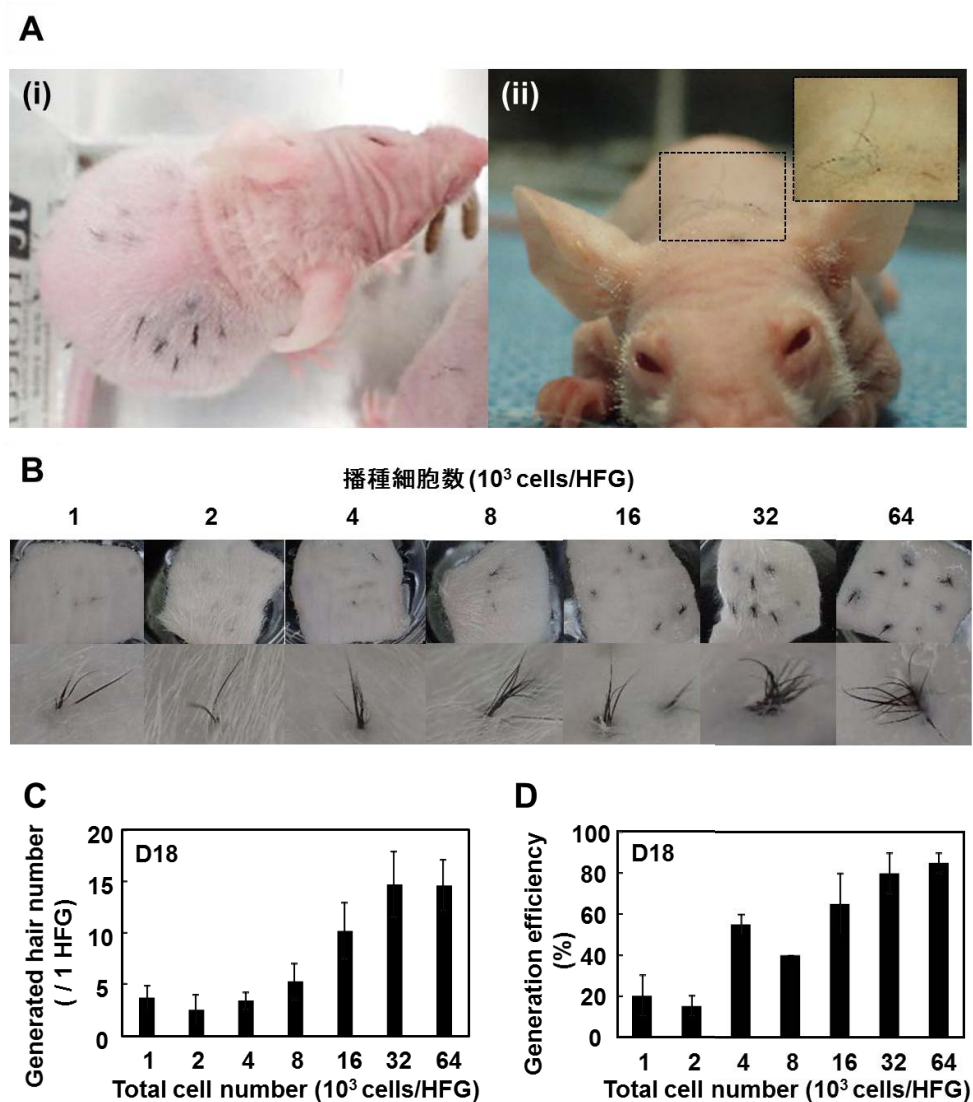


図 2-8 毛包原基移植による毛の再生

A : 毛包原基 (細胞数 8×10^3 cells/HFG) を移植後 18 日目の免疫不全マウス (i) 背部皮膚に移植、(ii) 頭部皮膚に移植、B : 移植後 18 日目の移植部の実体顕微鏡像、C : 1 毛包原基あたりの平均発毛数、D : 平均発毛効率 (発毛数 / 移植数)

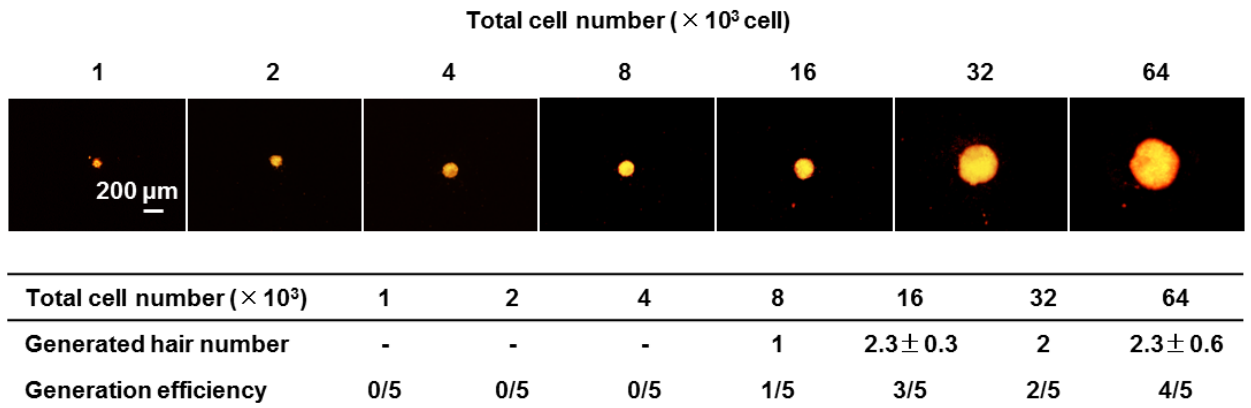


図 2-9 間葉系細胞スフェロイド移植による毛の再生

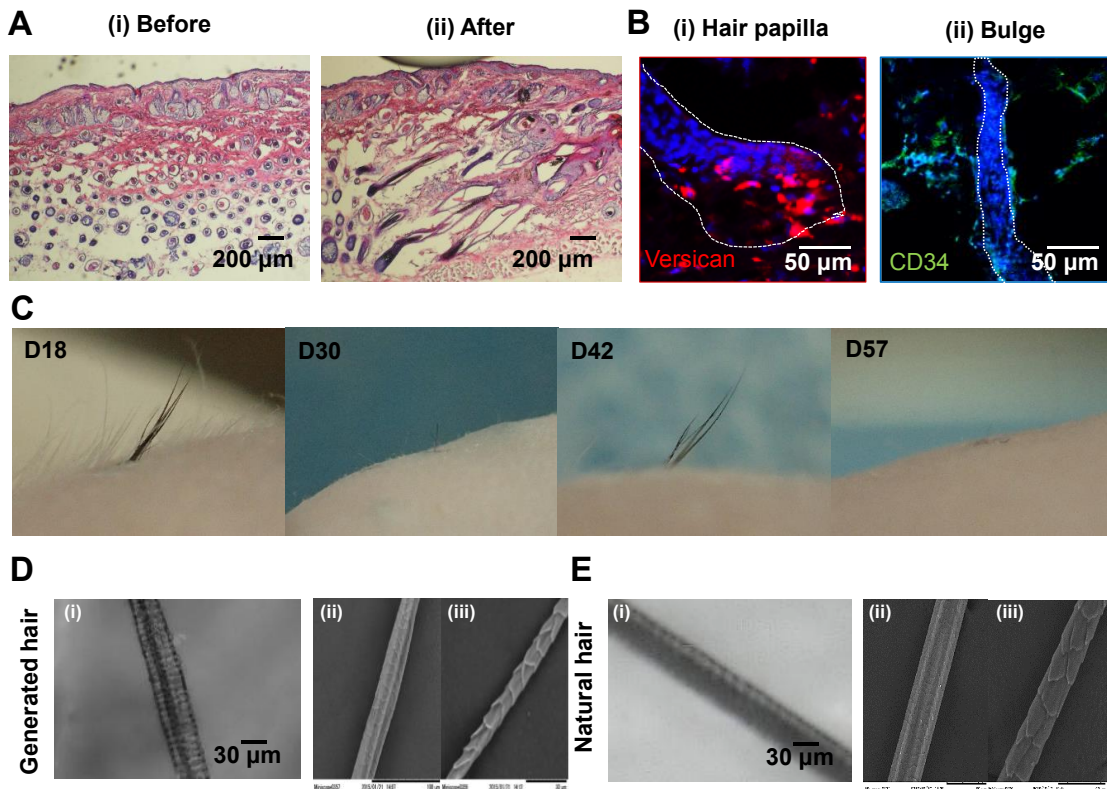


図 2-10 再生した毛包の組織学的解析

A: 移植後 18 日目の皮膚切片の HE 染色 (i) 移植無し、(ii) 毛包原基移植、B: 移植後 18 日目の皮膚切片の蛍光免疫染色 (i) Versican (毛乳頭細胞マーカー)、(ii) CD34 (毛包上皮幹細胞マーカー)、C: 移植後 18、30、42、57 日目の移植部の実体顕微鏡像、D: 再生した毛 (i) 実体顕微鏡像及び (ii, iii) 走査型顕微鏡像、E: マウス体毛 (i) 実体顕微鏡像及び (ii, iii) 走査

2.4. ROCK 阻害剤 (Y-27632) での毛包原基形成阻害

2.4.1 ROCK 阻害剤 (Y-27632) を添加した培地での毛包原基調製

2.4.1.1 本項の目的

本項では、毛包原基形成のメカニズムを理解するため、細胞接着分子カドヘリン遺伝子の発現に影響を与えることが知られている ROCK 阻害剤 (Y-27632) を添加した培地で培養を行った。3 日間の毛包原基形成を添加の有無で比較観察し、培養 3 日目の発毛マーカー蛋白質 (Versican, Nexin, Igfbp5, Tgfβ2) の RT-PCR 解析を行った。

2.4.1.2 細胞選別現象によって形成される凝集体の構造

一般に 2 種類の細胞を混合して播種した際に細胞凝集体がどのような形態をとるかは、それぞれの細胞間の細胞間接着の強さによって異なる事が報告されている [15]。一般に、2 種類の細胞間接着が強い場合はほぼランダムで 1 つの球状凝集体を形成し、中程度の場合、1 種類が球の内側 (コア)、もう 1 種類が球の外側 (シェル) のコア-シェル構造を形成し、弱い場合、今回の毛包原基のような 2 つの凝集体が融合したような構造を形成する (図 2-11)。

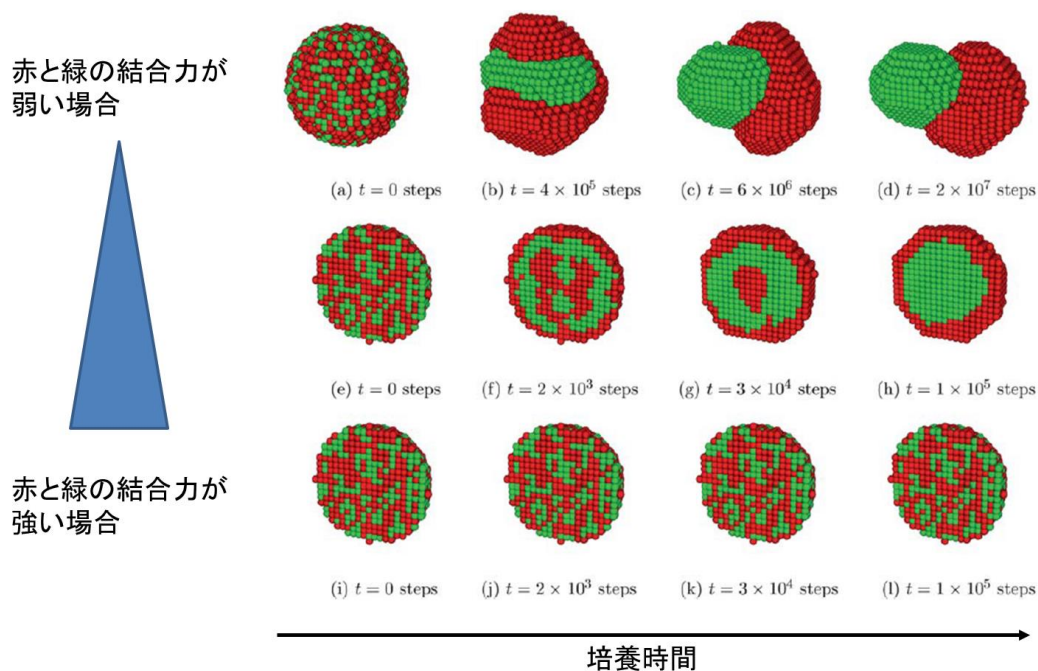


図 2-11 細胞選別現象によって形成される凝集体の構造：参考文献 [15]より引用

2.4.1.3 ROCK 阻害剤 (Y-27632)

ROCK 阻害剤は、一般に細胞の収縮、増殖、遊走などを抑制するのに用いられる阻害剤であり、血管平滑筋の弛緩、がん細胞の浸潤阻害、iPS 細胞の未分化維持など様々な目的で用いられる。興味深いことに、近年、間葉系幹細胞と膵島細胞をスフェロイド培養して形成される構造体の形態を変化させることにおいても効果を示すことが報告されている(図2-12) [9]。これは、ROCK 阻害剤が N-カドヘリン阻害剤として働き、間葉系幹細胞の N-カドヘリン発現を減少させることにより、同種間特異的な細胞接着を弱め、細胞選別を十分に行えなくする効果をもつためである。本研究においても、毛包原基の形成は細胞選別によるものと考えられ、自発的な同種細胞の凝集はそれぞれの細胞に特異的なカドヘリンに由来すると考えられる。つまり、ROCK 阻害剤を添加し、N-カドヘリンの発現減少による形態変化を観察することで、本手法の毛包原基形成原理について理解できるであろうと考え、ROCK 阻害剤 (Y-27632) を添加した培地での毛包原基の調製を行った。

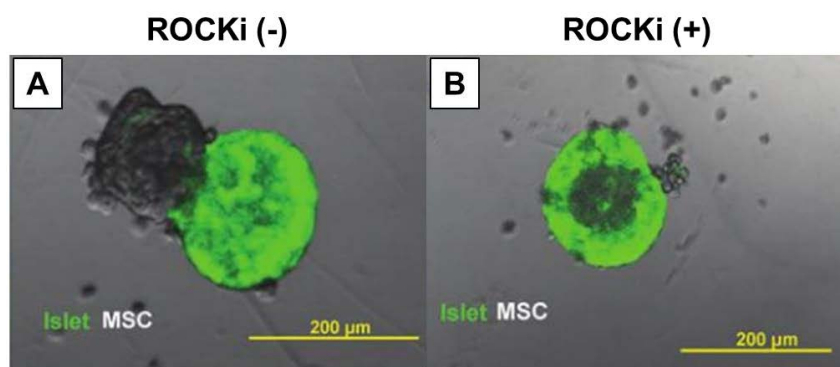


図 2-12 ROCK 阻害剤による細胞選別の阻害：参考文献 [9]より引用

A：ROCK 阻害剤添加無し培地で培養、B：ROCK 阻害剤添加培地で培養

2.4.1.4 実験装置及び試薬

以下に本実験に用いた装置・試薬を示す。

【装置】

- ・ 倒立型位相差顕微鏡：IX-71, オリンパス社製
- ・ 倒立型蛍光顕微鏡：DP-71, オリンパス社製
- ・ 実体顕微鏡：キーエンス社製
- ・ 共焦点レーザー顕微鏡：LSM700, Carl Zeiss 社製
- ・ Real time PCR system, Step One™：Applied Biosystems
- ・ 微量サンプル分光光度計：GE ヘルスケア

【試薬】

- 妊娠マウス (C57BL/6jcl 妊娠 18 日) マウス : 日本クレア
- Prime surface 96 U plate : 住友ベークライト社製
- Y-27632 : WAKO
- Dulbecco's modified eagle medium high glucose (DMEM) : SIGMA
- Fetal bovine serum (FBS) : SIGMA
- Penicillin-Streptomycin (P/S) : GIBCO
- HuMedia-KG2 : KURABO
- Buffer RLT、70%エタノール、Buffer RW1、Buffer RPE、RNase free water
- QIA Shredder スピンカラム (紫)、RNeasy スピ
ンカラム (ピンク)
- RNase free water
- Nuclear free water : Qiagen
- QuickGene : KURABO
- SYBR® Green Real-Time PCR Master Mixes : Thermo Fisher Scientific
- ピクリン酸 : WAKO
- 20%ホルマリン液 : WAKO
- 酢酸 : SIGMA
- マイヤーヘマトキシリン染色液 : WAKO
- エオシン Y 溶液 : 武藤化学
- 10%中性緩衝ホルマリン液 : WAKO
- スクロース : WAKO
- OCT compound : サクラファインテック
- Phosphate buffered saline (PBS) : Thermo Fisher Scientific
- Tween-20 : Sigma Aldrich
- Anti-CD34 抗体 MEC 14.7 (ab8158) : Abcam
- Anti-Versican Antibody, a.a. 1360-1439 of mouse versican : Millipore
- Rabbit anti-Rat IgG Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 conjugate : Life technology
- Goat anti-rabbit IgG Secondary Antibody, Alexa Fluor® 555 conjugate : Life technology
- 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) : WAKO
- Mount-Quick : 大道産業
- Anti-N-cadherin /CDH2 antibody (rabbit) : THERMO FISHER

2.4.1.5 実験操作

全体的な操作の流れを以下に示す。

【RT-PCR 解析】

マウス胎児の細胞採取

間葉系細胞及び上皮系細胞をマウス胎児から採取した。

間葉系細胞の染色

間葉系細胞の 1 mL 懸濁液に Vybrant™ Cell-labeling Solutions を 5 µL 加え、20 分間インキュベートした。

スフェロイド容器への播種

遠心後、新しい培地をそれぞれ添加し、下記の表の細胞密度で 96 U 非接着培養プレート

に播種した。培地は下記の2種類を用いた。

- 1) Y-27632 (+)...間葉細胞培地と上皮細胞培地の1:1混合培地 + Y-27632 (30 μM)
- 2) Y-27632 (-)...間葉細胞培地と上皮細胞培地の1:1混合培地

全細胞数 (10 ³ cells)	1	2	4	8	16	32	64
間葉系細胞数 (10 ³ cells)	0.5	1	2	4	8	16	32
上皮系細胞数 (10 ³ cells)	0.5	1	2	4	8	16	32

観察

培養 24, 48, 72 時間に細胞の様子を位相差顕微鏡で観察した

【RT-PCR 解析】

RNA 抽出

- a) 作製した毛包原基を 15 mL チューブに回収し、毛包原基が沈殿したら 1 mL の溶液となるよう上澄みの培地を捨てた後、1.5 mL マイクロチューブに回収した。
- b) 遠心分離機に a) のマイクロチューブを設置し、4°C、5000 rpm、3 min で遠心した。この操作は、残った培地を捨てるため細胞および毛包原基を沈殿させると同時に、遠心機内の予冷のために行った。
- c) 上澄みの培地を捨てた後、Buffer RLT を 350 μL マイクロチューブに入れ、よくピペッティングした。その溶液を QIA Shredder スピンカラム (紫) に回収し、4°C、10000 rpm、2 min で遠心した。
- d) QIA Shredder スピンカラム (紫) の上部を捨て、コレクションチューブ内の溶液に 70% エタノールを 350 μL 加え、RNeasy スピンカラム (ピンク) に移した後、4°C、10000 rpm、15 s で遠心した。
- e) コレクションチューブ内の濾液を捨て、Buffer RW1 を 700 μL 入れた後、4°C、10000 rpm、15 s で遠心した。
- f) コレクションチューブ内の濾液を捨て、Buffer RPE を 500 μL 入れた後、4°C、10000 rpm、15 s で遠心した。
- g) コレクションチューブ内の濾液を捨て、Buffer RPE を 500 μL 入れた後、4°C、10000 rpm、2 min で遠心した。
- h) 新しい 2 mL コレクションチューブにピンクのカラムを移し、4°C、10000 rpm、1 min で遠心した。
- i) 1 mL マイクロチューブにピンクのカラムを移し、RNase free water を 30 μL 入れた後、

4°C、10000 rpm、1 min で遠心した。

j) i)と同じ操作を行った。

分光光度計による RNA 濃度測定

a) Nano Vue の電源を付け、希釈率を 60.0 に設定した。希釈率は RNA 抽出における最終容量である。

b) 70%エタノールで拭いた後、RNase free water 2 μ L を測定板の中心に滴下し、(OA/100%T) のボタンを押し、ベースラインを得た。

c) サンプル 2 μ L を測定板の中心に滴下し、測定ボタンを押した。

d) サンプルを測定する前は、70%エタノールで拭いてから使用した。

逆転写

a) RNA を 65°C、5 分間、インキュベートし、その後氷上で冷却した。

b) マイクロチューブに下記の試薬を加え、透明フィルムで覆った。

試薬・試料	容量
Nuclear free water	12 μ L
5 \times RT Buffer	4 μ L
Primer mix	1 μ L
Enzyme mix	1 μ L
RNA	2 μ L
Total	20 μL

c) PCR 装置にセットし、37°C,15 分間,98°C,5 分間で逆転写を行った。

RT-PCR

a) マイクロチューブに下記の試薬を適量加え、透明フィルムで覆った。

試薬・試料	容量
SYBR Green master mix	10 μ L
Forward Primer	0.4 μ L
Reverse Primer	0.4 μ L
Dye	0.4 μ L
Nuclear free water	7.8 μ L
DNA サンプル	1 μ L
Total	20 μL

b) PCR 装置にセットし、95°C, 5 秒間, 60°C, 60 秒間)×45cycle で PCR を行った。

HE 染色

播種細胞数 8×10^3 cells/well の毛包原基を以下の手順で HE 染色した。

a) 組織固定 ブアン固定液（ピクリン酸飽和水溶液 15ml、20 ホルマリン 5ml、氷酢酸 1ml の混合溶液）に 1 日浸漬することで組織の固定を行った。

b) パラフィン包埋 70, 90, 100 v/v%エタノール, 100 v/v%エタノール-2-ブタノール 1 : 1 溶液, 2-ブタノール, 2-ブタノール-パラフィン 1 : 1 溶液, パラフィンに 1 時間ずつ浸した後、パラフィンブロックを作製した。

c) 切片作製 回転式マイクロトームを用いてパラフィン切片を作製した。

d) HE 染色 上述した手順で HE 染色を行った。

蛍光免疫染色

播種細胞数 8×10^3 cells/well の毛包原基を以下の手順で N-cadherin の免疫染色を行った。

a) 細胞固定 20%ホルマリンに 1 日浸漬することで組織の固定を行った。

b) スクロース置換 10 w/v%、20 w/v%、30 w/v%スクロース溶液に 1 時間ずつ浸した。

c) OCT compound 包埋 スクロース置換した切片を OCT compound 内に包埋した。

d) 切片作製 クライオマイクロトームを用いて切片を作製した。

e) 蛍光免疫染色 上述した手順で蛍光免疫染色を行った。

2.4.1.6 実験結果と考察

培養 1 日または 3 日目の間葉系細胞及び上皮系細胞の分布を図 2-13 A に示す。間葉系細胞は Vybrant™ Cell-labeling Solutions により赤色に染色した。Y-27632 を添加した培地での培養において、培養 1 日目では上皮系細胞及び間葉系細胞は、Y-27632 添加なしの場合と同様に 1 つの凝集体の中でバラバラに存在したが、培養 3 日目においても、各細胞は互いに凝集し合うことなく、すべての播種細胞数で細胞選別による毛包原基形成は観察されなかった。また、Y-27632 添加による毛包原基の発毛に関する遺伝子発現変化を RT-PCR により解析した結果を図 2-13 B に示す。Y-27632 添加培養、つまり毛包原基を形成しない組織体 (Y-27632 (+)) では、Y-27632 添加無しの毛包原基 (Y-27632 (-)) と比較して、発毛に関する遺伝子 (Versican, Nexin, Igfbp5, Tgfβ2) の発現が有意に抑制された。これは、自発的に毛包原基を形成する過程で、発毛に関する遺伝子の発現が増大し、移植体の発毛効率を向上させることに寄与したためと考えられる。Y-27632 添加培養 3 日後の組織体の組織切片の N-カドヘリン蛍光免疫染色を行った組織を図 2-14 に示す。Y-27632 (-) の場合、N-カドヘリンが毛包

原基の間葉系細胞の全体に発現していたのに対し、Y-27632(+)の場合、混合スフェロイドの切片でN-カドヘリンによる蛍光が観察されなかった。これは、Y-27632 添加により、同種細胞特異的な N-カドヘリン結合が確かに阻害され、毛包原基形成が阻害されたことを示している。

2.4.1.7 本項のまとめ

本項では、Y-27632 添加による毛包原基形成の阻害実験により、①毛包原基形成には、N-カドヘリンを含む同種細胞間の接着が関わっており、②この毛包原基の培養中に発毛に関する遺伝子が増加することを示した。

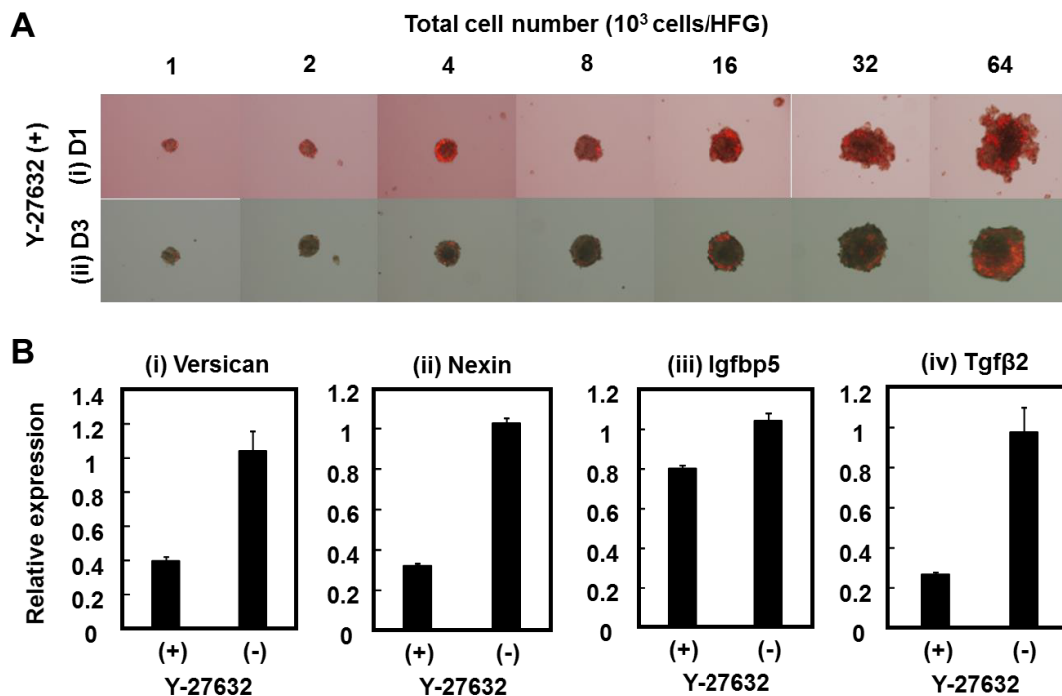


図 2-13 上皮系細胞と間葉系細胞の Y-27632 添加培地での共培養

A : Y-27632 添加培地培養による毛包原基形成の阻害 (i) 培養 1 日目及び (ii) 培養 3 日目、B : 毛包誘導遺伝子の相対発現比解析 (RT-PCR)

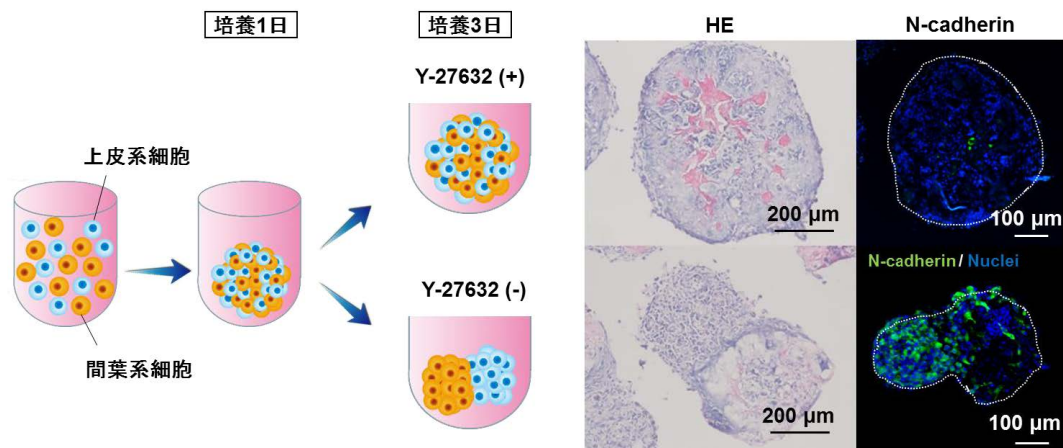


図 2-14 N-カドヘリンの蛍光免疫染色

2.4.2 ROCK 阻害剤 (Y-27632) を添加した培地で調製した毛包原基の毛包再生能

2.4.2.1 本項の目的

本項は、Y-27632 を添加した培地で調製した凝集体と通常の培地で調製した毛包原基の毛包再生能を比較することで、毛包原基の形成が毛包再生に重要かどうかを評価することを目的とした。

2.4.2.2 装置・試薬

以下に本実験に用いた装置・試薬を示す。

【装置】

- ・ 小動物用イソフルラン麻酔器：バイオリサーチセンター株式会社
- ・ 倒立型蛍光顕微鏡, DP-71：OLYMPUS
- ・ デジタルマイクロスコープ：KEYENCE

【試薬】

- ・ 妊娠マウス (C57BL/6jcl 妊娠 18 日) マウス：日本クレア
- ・ ICR ノードマウス 5 週齢♂：オリエンタル酵母
- ・ 18 G V ランス：日本アルコン
- ・ Prime surface 96 U plate：住友ベークライト社製
- ・ Dulbecco's modified eagle medium high glucose (DMEM)：SIGMA
- ・ Fetal bovine serum (FBS)：SIGMA
- ・ Penicillin-Streptomycin (P/S)：GIBCO
- ・ HuMedia-KG2：KURABO

2.4.2.3 実験操作

全体的な操作の流れを以下に示す。

マウス胎児細胞の採取

間葉系細胞及び上皮系細胞を妊娠マウスから採取した。

スフェロイド容器への播種

遠心後、新しい培地をそれぞれ添加し、間葉系細胞及び上皮系細胞をそれぞれ 8×10^3 cells/well の細胞密度で 96 U 非接着培養プレートに播種した。培地は下記の 2 種類を用いた。

- 1) Y-27632 (+)・・・間葉細胞培地と上皮細胞培地の 1 : 1 混合培地 + Y-27632 (30 μ M)
- 2) Y-27632 (-)・・・間葉細胞培地と上皮細胞培地の 1 : 1 混合培地

移植

3 日間培養後の組織を、マウス皮下に移植した。

観察

毛包原基を移植したマウスは、移植 21 日目にデジタルマイクروسコープを用いて観察した。

2.4.2.4 実験結果と考察

Y-27632 添加培地で調製した毛包原基 (Y-27632(+)) および通常培地で調製した毛包原基 (Y-27632 (-)) をマウス皮下に移植することで、毛包再生能を比較した。その結果、移植 21 日のマウス皮下からの毛再生効率は、Y-27632 (+) で 4/9、Y-27632 (-) で 9/9 と示された (図 2-15)。興味深いことに、Y-27632 (-) では表皮に発毛が見られない箇所はすべて皮下に毛が形成されていた。これは、毛包原基の形成により上皮系細胞と間葉系細胞の立体配置が決定されたことで、移植部からランダムな方向に発毛するのを制御し、発毛の方向決定がなされたためと考えられる。つまり、今回は、毛包原基移植により皮下にも発毛が見られたが、これは移植した毛包原基の上皮-間葉の向きがホストの上皮-間葉の位置関係と逆であったことが原因と考察している。一方、Y-27632 (+) では、表皮と皮下に同時に発毛する傾向が見られた。これは、移植体内で上皮系細胞及び間葉系細胞がランダムに位置しており、移植後に各細胞が周囲の細胞とランダムな方向に毛包を形成したためと考えられる。以上より、Y-27632 添加による毛包原基形成阻害は *in vitro* 培養での発毛に関する遺伝子発現を抑制するのみならず、毛包再生能も抑制することが示された。

2.4.2.5 本項のまとめ

本項では、Y-27632 添加による毛包原基形成の阻害により形成した凝集体（上皮系細胞及び間葉系細胞がランダムに位置している1つの細胞凝集体）と毛包原基（2種類の細胞凝集体が融合した細胞凝集体）の毛包再生能を比較することで、毛包原基形成が①毛包再生能の向上及び②再生毛の方向性制御に関わっており、本手法により形成した毛包原基は毛髪再生のための移植体として有用であることが示された。

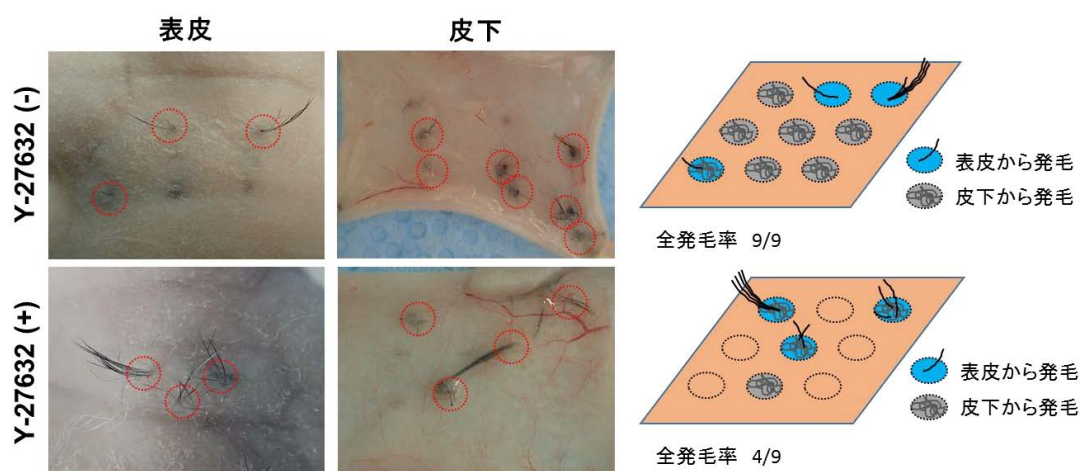


図 2-15 Y-27632 (+)と Y-27632 (-)の組織体を移植したマウス皮膚 (移植 21 日)

2.5 毛包原基培養日数と毛髪再生効率

2.5.1 本節の目的

本節では、毛包原基の培養条件を最適化するために、毛包原基の培養日数が毛髪再生に与える影響を評価した。毛包原基の培養日数を 1、3、5 日と振り、①発毛マーカー蛋白質 (Versican) の RT-PCR 解析と②移植による毛髪再生効率の解析を行った。

2.5.2 実験装置及び試薬

以下に本実験に用いた装置・試薬を示す。

【装置】

- ・ 倒立型位相差顕微鏡：IX-71, オリンパス社製
- ・ 倒立型蛍光顕微鏡：DP-71, オリンパス社製
- ・ 実体顕微鏡：キーエンス社製
- ・ Real time PCR system, Step One™ : Applied Biosystems
- ・ 微量サンプル分光光度計：GE ヘルスケア

- ・ 小動物用イソフルラン麻酔器：バイオリサーチセンター株式会社

【試薬】

- ・ 妊娠マウス (C57BL/6jcl 妊娠 18 日) マウス：日本クレア
- ・ Prime surface 96 U plate：住友ベークライト社製
- ・ Y-27632：WAKO
- ・ Dulbecco's modified eagle medium high glucose (DMEM)：SIGMA
- ・ Fetal bovine serum (FBS)：SIGMA
- ・ Penicillin-Streptomycin (P/S)：GIBCO
- ・ HuMedia-KG2：KURABO
- ・ Buffer RLT、70%エタノール、Buffer RW1、Buffer RPE、RNase free water
- ・ QIA Shredder スピンカラム (紫)、RNeasy スピンカラム (ピンク)
- ・ PCR 用 1000 μ L、200 μ L ピペットとそのチップ
- ・ RNase free water 吹きかけ用
- ・ Nuclear free water：Qiagen
- ・ QuickGene：KURABO
- ・ SYBR® Green Real-Time PCR Master Mixes：Thermo Fisher Scientific
- ・ 妊娠マウス (C57BL/6jcl 妊娠 18 日) マウス：日本クレア
- ・ ICR ノードマウス 5 週齢♂：オリエンタル酵母
- ・ 18 G V ランス：日本アルコン
- ・ Prime surface 96 U plate：住友ベークライト社製

2.5.3 実験操作

全体的な操作の流れを以下に示す。

【RT-PCR 解析】

マウス胎児の細胞採取

間葉系細胞及び上皮系細胞をマウス胎児から採取した。

スフェロイド容器への播種

遠心後、新しい培地をそれぞれ添加し、 8×10^3 cells/wel の細胞密度で 96U 非接着培養プレートに播種した。培地は間葉細胞培地と上皮細胞培地の 1 : 1 混合培地を用いた。

観察

培養 24, 48, 72 時間に細胞の様子を位相差顕微鏡で観察した

RT-PCR 解析

培養 1、3、5 日目の組織の RT-PCR 解析を行った。

移植

培養 1、3、5 日目の組織を、ノードマウス皮下に移植した。

観察

毛包原基を移植したマウスは、移植 18 日目にデジタルマイクروسコープを用いて観察した。

2.5.4 実験結果と考察

培養日数ごとの Versican の遺伝子発現と移植 18 日後の毛髪再生効率（再生数/移植数）を図 2-15 に示す。その結果、いずれにおいても 3 日間培養した毛包原基が高い毛髪再生能を有することが示された。一般に上皮系細胞及び間葉系細胞は生体外の長期培養で毛髪再生能を減少させる事が知られており、3 日目から 5 日目にかけて毛髪再生効率が低下したのはこのためと考えられる。一方で、1 日目から 3 日目の効率向上は毛包原基を形成したことで、それぞれの細胞が増殖・成長因子の産生が活発になったためと考えられる。本検討結果を踏まえ、以降の実験では毛包原基を 3 日培養した後で移植することに決定した。

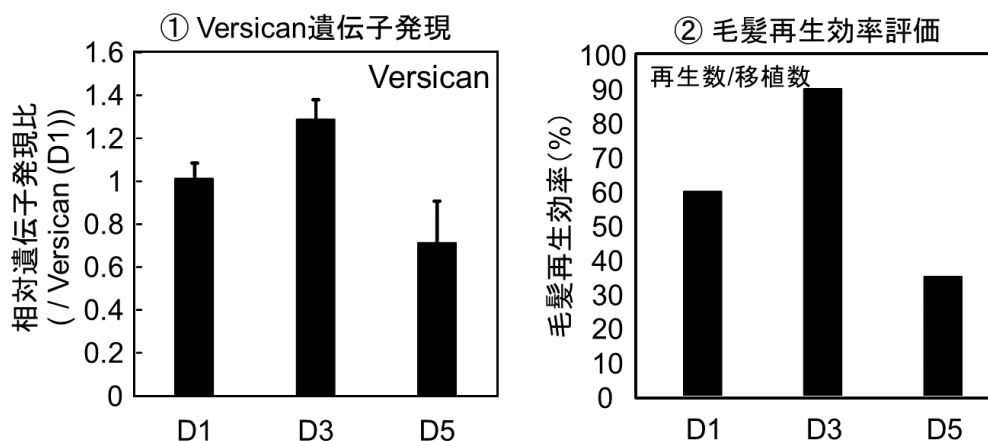


図 2-15 毛包原基培養日数を変更した際の毛髪再生効率

2.5.5 本項のまとめ

本項では、毛包原基の培養日数を 1、3、5 日と振り、①毛髪再生に関わるマーカー遺伝子の発現と②移植による毛髪再生効率の 2 項目を評価した結果、遺伝子発現及び毛髪再生効率のいずれにおいても 3 日間培養を行った毛包原基が最も高い毛髪再生効率を示すことが明らかになり、以降の実験では毛包原基を 3 日間培養した後に移植することとした。

2.6 本章のまとめ

本章では、自発的な細胞凝集現象を用いた毛包原基の調製法及びそれを用いた毛包再生について述べた。毛包再生のために用いるマウス胎児由来の上皮系細胞及び間葉系細胞の採取方法を述べた後、毛包原基を調製する方法を説明し、毛包原基を毛包原基の構成細胞、発毛に関する蛋白質発現の観点から評価した。そして、調製した毛包原基の免疫不全マウスへの移植により、毛包原基が毛周期を繰り返す毛を再生することを示した。さらに、阻害剤を用いて、N-カドヘリンを阻害することで上皮系細胞と間葉系細胞がランダムに混合したスフェロイドを形成し、これと毛包原基の発毛に関する遺伝子発現及び毛包再生能を比較することで、毛包原基の形成は発毛に関する遺伝子発現を増加させるのみならず、毛包再生能も向上させることを示した。以上の結果から、毛包原基の大量培養に必要な「簡便に」毛包原基を調製する手法を確立した。また、その毛包原基は生体と同等の毛包を再生する能力を有しており、移植組織として十分な機能を有する組織体と結論づけた。

参考文献

- [1] U. Lichti, J. Anders, S.H. Yuspa, Isolation and short-term culture of primary keratinocytes, hair follicle populations and dermal cells from newborn mice and keratinocytes from adult mice for in vitro analysis and for grafting to immunodeficient mice, *Nature Protocols* 3(5) (2008) 799-810.
- [2] H.V. Wilson, On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges, *Journal of Experimental Zoology* 5(1-3) (1907) 245-258.
- [3] M.S. Steinberg, M. Takeichi, EXPERIMENTAL SPECIFICATION OF CELL SORTING, TISSUE SPREADING, AND SPECIFIC SPATIAL PATTERNING BY QUANTITATIVE DIFFERENCES IN CADHERIN EXPRESSION, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(1) (1994) 206-209.
- [4] R.A. Foty, M.S. Steinberg, The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation, *Developmental Biology* 278(1) (2005) 255-263.
- [5] J.M. Kelm, M. Fussenegger, Microscale tissue engineering using gravity-enforced cell assembly, *Trends in Biotechnology* 22(4) (2004) 195-202.
- [6] D.Y. No, S.-A. Lee, Y.Y. Choi, D. Park, J.Y. Jang, D.-S. Kim, S.-H. Lee, Functional 3D Human Primary Hepatocyte Spheroids Made by Co-Culturing Hepatocytes from Partial Hepatectomy Specimens and Human Adipose-Derived Stem Cells, *Plos One* 7(12) (2012).
- [7] E. Urich, C. Patsch, S. Aigner, M. Graf, R. Iacone, P.-O. Freskgard, Multicellular Self-Assembled Spheroidal Model of the Blood Brain Barrier, *Scientific Reports* 3 (2013).
- [8] Y. Jun, A.R. Kang, J.S. Lee, S.-J. Park, D.Y. Lee, S.-H. Moon, S.-H. Lee, Microchip-based engineering of super-pancreatic islets supported by adipose-derived stem cells, *Biomaterials* 35(17) (2014) 4815-4826.
- [9] I.T. Hoffecker, H. Iwata, Manipulation of Cell Sorting Within Mesenchymal Stromal Cell-Islet Cell Multicellular Spheroids, *Tissue Engineering Part A* 20(11-12) (2014) 1643-1653.
- [10] P. Mistriotis, S.T. Andreadis, Hair Follicle: A Novel Source of Multipotent Stem Cells for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, *Tissue Engineering Part B-Reviews* 19(4) (2013) 265-278.
- [11] J. Kishimoto, R. Ehama, L. Wu, S.W. Jiang, N.Y. Jiang, R.E. Burgeson, Selective activation of the versican promoter by epithelial-mesenchymal interactions during hair follicle development, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(13) (1999) 7336-7341.
- [12] K.-e. Toyoshima, K. Asakawa, N. Ishibashi, H. Toki, M. Ogawa, T. Hasegawa, T. Irie, T. Tachikawa, A. Sato, A. Takeda, T. Tsuji, Fully functional hair follicle regeneration through the rearrangement of stem cells and their niches, *Nature Communications* 3 (2012).

- [13] C. Blanpain, W.E. Lowry, A. Geoghegan, L. Polak, E. Fuchs, Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche, *Cell* 118(5) (2004) 635-648.
- [14] C.-C. Yang, G. Cotsarelis, Review of hair follicle dermal cells, *Journal of Dermatological Science* 57(1) (2010) 2-11.
- [15] Y. Sun, Q. Wang, Modeling and simulations of multicellular aggregate self-assembly in biofabrication using kinetic Monte Carlo methods, *Soft matter* 9 (2013) 2172-2186

第三章

コラーゲンを含む毛包原基の調製

3.1 はじめに

前章では、細胞選別を用いて毛包原基を簡便に調製し、これを免疫不全マウスに移植することで毛包を再生する手法を確立した。一方、細胞は生体外で細胞外マトリックスと呼ばれるタンパク質に接着して生存し、接着することによって各種機能を保っている。毛包原基の間葉系細胞も生体において、コラーゲンなどの細胞外マトリックスを豊富に含む環境に存在している。本章では、毛包原基の毛包誘導能を向上させるため、間葉系細胞をコラーゲンゲルに包埋した間葉系細胞包埋ビーズ（毛包再生ビーズ）を調製し、これと上皮系細胞を混合し培養することで調製したコラーゲンを含む毛包原基を用いた毛包再生について述べる。第 2 節では、毛包再生ビーズの調製法を述べ、調製したビーズの毛包誘導能を毛包誘導マーカーである Versican の RT-PCR 解析により評価する。第 3 節では、調製した毛包再生ビーズの毛包誘導能を ALP 活性により評価する。第 4 節では、毛包誘導能の高い毛包再生ビーズの細胞数条件を検討する。第 5 節では、毛包誘導能の高い毛包再生ビーズのコラーゲン濃度条件を検討する。第 6 節では、ミオシン収縮阻害剤を用いてコラーゲンの収縮を抑制することで細胞の牽引力が毛包誘導能にいかに関与するかについて評価する。第 7 節では、毛包再生ビーズの毛包誘導能を免疫不全マウスへの移植により評価する。第 8 節では、毛包ビーズを用いて調製した毛包原基を免疫不全マウスへ移植することで、毛髪再生能を評価する。

3.2 自発的な凝集による毛包再生ビーズの調製

3.2.1 本節の目的

本節の目的は、コラーゲンを豊富に含む間葉系細胞凝集体である毛包再生ビーズを簡便に調製することである。毛包再生ビーズの調製過程を経時的に観察することで、間葉系細胞及びコラーゲン線維の挙動を観察した。

3.2.2 毛包周囲の細胞外マトリックス

毛包は他の組織、臓器と同様に、細胞及び細胞外マトリックスから形づくられている。胎児期の毛包形成においては、細胞外マトリックスを豊富に含む間葉組織に上皮系細胞が陥入することで毛包が形成する。成長期の毛包は周囲をコラーゲンやラミニンに囲まれており、休止期の毛包ではこれらのマトリックスが減少することが報告されている(図 3-1) [1]。これは毛包を構成する細胞と細胞外マトリックスの相互作用が毛包形成に関与することを示唆しており、この環境を再現することで高い毛包誘導能をもつ毛包原基の調製ができるのではないかと発想した。

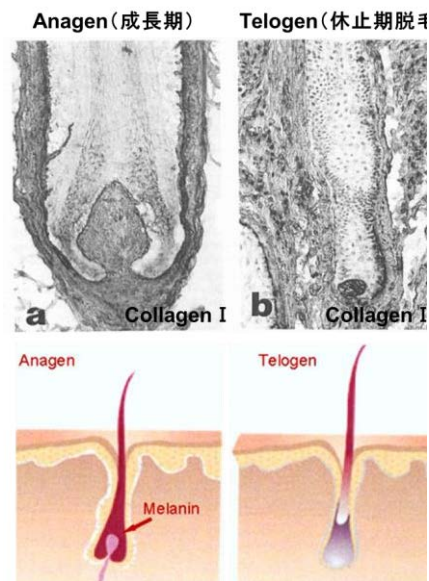


図 3-1 毛包周囲の Collagen

3.2.3 組織工学と細胞外マトリックス

細胞外マトリックスは生体内において細胞外の空間を充填し、骨格形成、細胞接着における足場、細胞増殖因子を保持する役割などを担っている。この細胞外マトリックスの構成成分には、特有の糖タンパク質であるプロテオグリカン、繊維を構成するタンパク質であるコラーゲン、複数の接着性を持つ水溶性のマトリクスタンパク質などが含まれる。細胞外マトリックスは、細胞との間で相互作用を起こし、細胞の組織化において重要な役割を果たす。さらに、細胞の形と機能を調節し、発生過程においても重要な

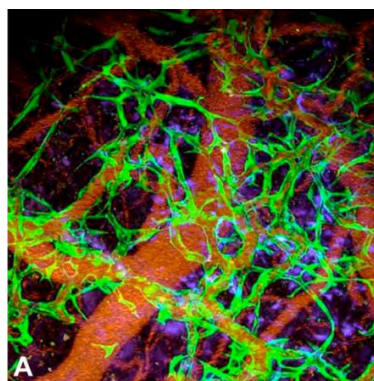


図 3-2 Collagen ゲル内での血管構造の形成: 参考文献 [3]より引用

役割をしている。一方、細胞外マトリックスを構成する成分はバイオマテリアルの材料として非常に有用である。これは移植後の分解、吸収性に優れていること、生体適合性が高いこと、細胞-マトリックス間の結合を形成しやすいことなどの理由から考えられる。生体外で、生体内の環境を実現しようとした際には、このようなタンパク質の中から、1 つあるいは、複数のタンパク質を用いて細胞の足場材料とする。中でも、コラーゲンは、生体適合性、細胞接着性、取り扱い易さの点で優れていることから細胞培養のために最も広く用いられている。コラーゲンはアミノ酸が結合したポリペプチド鎖が三本より合わさった三重螺旋

構造をしており、1つのペプチド鎖は、-Gly-X-Yという約1000残基のアミノ酸の繰り返し構造になっている（X、Yには他のアミノ酸が入る）。また、細胞接着因子であるRGD配列（Arg-Gly-Asp）を含んでいるため、細胞接着性がよい。一般に細胞培養は細胞培養皿というポリスチレンなどの硬い材料上で培養するが、コラーゲンゲル上で肝臓細胞を培養することで、細胞接着、細胞増殖、代謝などの細胞の機能を向上させることが可能である [2]。また、血管内皮細胞は、一般の細胞培養皿では、本来の血管構造を構築しないが、コラーゲンゲル内で細胞を播種すると血管内皮細胞が自発的に血管構造を再構築する [3]。予備検討において、間葉系細胞をコラーゲンゲル上で培養すること

で発毛マーカーであるアルカリホスファターゼ（ALP）活性が向上することがわかっている（図3-3）。本章では、間葉系細胞をゲル内に包埋し、より生体に近い環境を再現することで、間葉系細胞の発毛機能が向上するかについて検討を行った。

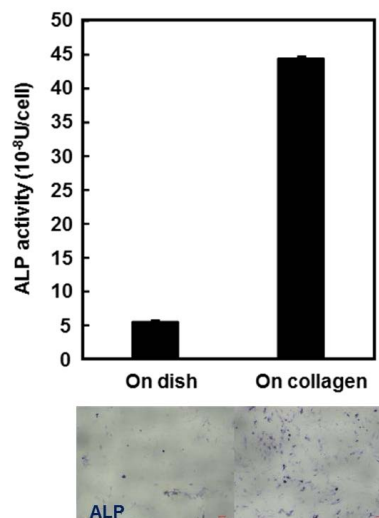


図 3-3 間葉系細胞の Collagen ゲル上培養（ALP 活性評価）

3.2.4 装置・試薬

【装置】

- ・ 倒立型位相差顕微鏡, IX-71 : OLYMPUS
- ・ 倒立型蛍光顕微鏡, DP-71 : OLYMPUS
- ・ 共焦点レーザー顕微鏡, LSM700 : Carl Zeiss
- ・ Real time PCR system, Step One™ : Applied Biosystems
- ・ 微量サンプル分光光度計 : GE Healthcare

【試薬】

- ・ 妊娠マウス (C57BL/6jcl 妊娠 18 日) : 日本クレア
- ・ Collagen type I-A : 新田ゼラチン
- ・ 10× F-12 培地 : 新田ゼラチン
- ・ 再構成緩衝溶液 : 新田ゼラチン
- ・ Prime surface 96 U plate : 住友ベークライト
- ・ Dulbecco's modified eagle medium high glucose (DMEM) : SIGMA
- ・ Fetal bovine serum (FBS) : SIGMA
- ・ Penicillin-Streptomycin (P/S) : GIBCO
- ・ Buffer RLT、70%エタノール、Buffer RW1、Buffer RPE、RNase free water
- ・ QIA Shredder スピンカラム (紫)、RNeasy スピンカラム (ピンク)
- ・ PCR 用 1000 μL、200 μL ピペットとそのチップ
- ・ RNase free water

- Nuclear free water : Qiagen
- QuickGene : KURABO
- SYBR® Green Real-Time PCR Master Mixes : Thermo Fisher Scientific
- Phosphate buffered saline (PBS) : Thermo Fisher Scientific
- Tween-20 : Sigma Aldrich
- Anti-collagen (rabbit) : Millipore
- Rabbit anti-Rat IgG Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 conjugate : Life technology
- 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) : WAKO
- Rhodamine phalloidin : Molecular Probes

3.2.5 実験操作

全体的な操作の流れを以下に示す。

マウス胎児細胞の採取

間葉系細胞をマウス胎児から採取した。

毛包再生ビーズの調製

新しい培地を添加し、間葉系細胞 2.0×10^6 cells を遠心後、コラーゲンゲル 0.4 mL を追加し細胞懸濁液を作製し、培養ディッシュの蓋に $2 \mu\text{L}$ ずつ滴下した。30 分インキュベート後、間葉細胞培養培地を追加し、3 日間培養を行った。

観察

培養 5 日後まで細胞の様子を位相差顕微鏡で観察した

免疫染色

1、3、5 日間培養後のサンプルをパラホルムアルデヒド固定し、以下の手順でコラーゲンの免疫染色を行った。

No	試薬	時間	注
1	PBS	5 分× 2	
2	TritonX-100	10 分	
3	10%BSA	60 分	
4	1 次抗体	120 分	1 : 2000 (PBS 希釈) *room temp.
5	PBS-T	10 分× 3	
6	2 次抗体	60 分	Alexa488
7	PBS-T	10 分× 3	
8	Rhodamine phalloidin	30 分	製品指定の濃度で染色
9	DAPI	9 分	

10	PBS	5分×3	封入
----	-----	------	----

RT-PCR 解析

1、3、5日間培養後のサンプルの RT-PCR 解析を行った。また、コントロールとして、採取し培養を行っていない間葉系細胞（Dissociated cell (P0)）と Prime surface 96 U plate に 1.0×10^4 cells/well で播種し、1、3、5日間培養後のサンプル（Spheroid）も同様に RT-PCR を行った。

	Forward primer	Reverse primer
Versicn	gACgACTgTCTTggTgg	ATATCCAAACAAGCCTg
GAPDH	AgAACATCATCCCTgCATCC	TCCACCACCCTgTTgCTgTA

3.2.6 実験結果と考察

スフェロイドなどの細胞密度の高い組織の作製には、作製する組織のサイズが重要であり、組織内部の細胞に酸素や栄養分を拡散により十分に供給可能なサイズが求められる。本研究では、間葉系細胞をコラーゲンに包埋しているため、コラーゲンが組織内部の細胞にまで酸素を供給するための通路として働き、比較的大きいサイズの組織体においても十分に酸素供給が可能と考えられる。また、皮膚線維芽細胞をコラーゲンゲル内に包埋し、このゲルを浮遊させて培養を行うと、包埋した細胞がコラーゲンゲルを収縮させながら新しい細胞外マトリックスを産生する。このように細胞がゲルを収縮させることも考慮し、本研究では、間葉系細胞を懸濁したコラーゲンゲルを、2 μ L のドロップレットとして打ち出すことで、毛包再生ビーズを作製した。つまり、図 3-4 に示すように、培養 dish の蓋の裏側に間葉系細胞を懸濁したコラーゲンゲルを滴下し、培養 dish の蓋をそっと閉めて 30 分間 37°C でインキュベートすることで直径約 2 mm のビーズを作製した。このビーズを回収後、培地に浸し 3 日間浮遊培養することで、細胞自身の牽引力により、ビーズは直径約 2 mm から約 500 μ m にまで自発的に収縮し、高濃度のコラーゲンを有する間葉系細胞集塊を形成した（図 3-4 C）。また、長期的に培養を試みたが、3 日目以降ビーズ直径の変化はほとんど見られなかった。続いて、ゲルビーズの収縮の際にコラーゲン線維がどのように再構築されるかを、コラーゲン線維の免疫蛍光染色により評価した（図 3-4 B）。その結果、培養とともにコラーゲン線維は細胞周囲で高密度に凝集する様子が観察された。このビーズの毛包誘導能を毛包誘導マーカーである Versican の遺伝子発現により評価したところ、スフェロイド培養と比較してビーズの培養は Versican の遺伝子発現を有意に増加させる傾向が確認

された (図 3-4 D)。一般に、間葉系細胞は培養ディッシュ上での培養で増殖を重ねるたびに (継代数を増やすたびに)、Versican の遺伝子発現が低下するのに対して、スフェロイド培養を行うことで Versican の遺伝子発現を維持できることが報告されている [4, 5]。今回の結果では、毛包再生ビーズがスフェロイドよりも高い Versican 発現を示しており、毛包再生ビーズを用いた培養が、既存のスフェロイド培養よりも適した培養法になりうる可能性が示唆された。この要因としては、①細胞密度の低下による酸素供給の改善、②コラーゲン-細胞間の結合による機能向上、③コラーゲングル収縮の際に細胞に付与されるテンションの影響などが挙げられる。これらの要因について、①包埋細胞数の変更、②コラーゲングル濃度の変更、③ミオシン阻害剤を用いたゲル収縮の阻害の実験を行うことで議論することとした。

3.2.7 本節のまとめ

本節では、間葉系細胞包埋コラーゲングルをドロップレットとして打ち出すことで毛包再生ビーズを調製し、3 日間の浮遊培養中に細胞牽引力により高濃度のコラーゲンを有する組織体を形成することを示した。また、この毛包再生ビーズは同じ細胞数で構成させるスフェロイドと比較しても高い発毛活性 (Versican の遺伝子発現) を示した。

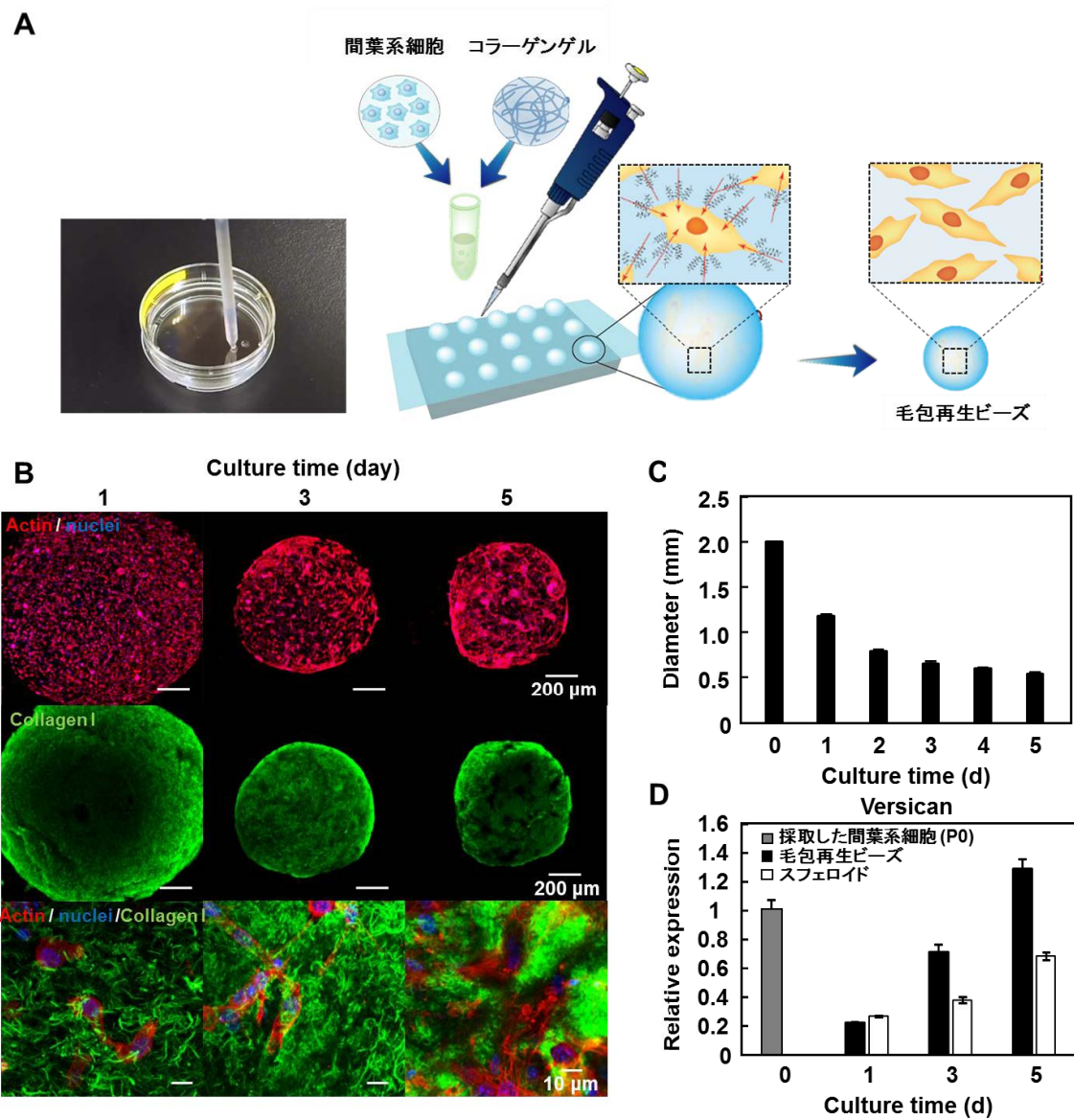


図 3-4 毛包再生ビーズ A: 毛包再生ビーズの調製方法、B: 培養 1, 3, 5 日目の毛包再生ビーズ 赤: Actin; 青: Nuclei; 緑: Collagen I、C: 培養 5 日間のビーズ平均直径変化、D: 培養 1, 3, 5 日目の毛包再生ビーズの Versican 遺伝子発現

3.3. 毛包再生ビーズの ALP 活性評価

3.3.1 本節の目的

前節では、3日間培養した毛包再生ビーズが同細胞数から構成されるスフェロイドと比較して高い Versican 遺伝子発現を示すことを明らかにした。本節では、間葉系細胞の毛包誘導マーカーの1つである ALP の活性を毛包再生ビーズ、スフェロイド、モノレイヤ培養の3つで比較することで、毛包再生ビーズの毛髪再生医療への有用性を検証する。

3.3.2 装置・試薬

【装置】

- ・ 倒立型位相差顕微鏡, IX-71 : OLYMPUS
- ・ 回転式マイクロトーム : Laica
- ・ 吸光度プレートリーダー, Sunrise : TECAN

【試薬】

- ・ 妊娠マウス (C57BL/6jcl 妊娠 18 日) : 日本クレア
- ・ Prime surface 96 U plate : 住友ベークライト社製
- ・ Collagen type I-A : 新田ゼラチン
- ・ 96 well cell culture plate : Falcon
- ・ 10× F-12 培地 : 新田ゼラチン
- ・ Sodium carbonate (Na_2CO_3) : WAKO
- ・ 再構成緩衝溶液 : 新田ゼラチン
- ・ Sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3) : WAKO
- ・ Prime surface 96 U plate : 住友ベークライト
- ・ Magnesium Chloride Hexahydrate ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) : WAKO
- ・ Dulbecco's modified eagle medium high glucose (DMEM) : SIGMA
- ・ p-nitrophenol : WAKO
- ・ Fetal bovine serum (FBS) : SIGMA
- ・ Disodium p-nitrophenyl phosphate hexahydrate : WAKO
- ・ Penicillin-Streptomycin (P/S) : GIBCO
- ・ Sodium hydroxide : WAKO
- ・ FastBlue RR salt : SIGMA
- ・ ピクリン酸 : WAKO
- ・ Naphthol AS-MX phosphate alkaline solution 0.25% : SIGMA
- ・ 20%ホルマリン液 : WAKO
- ・ 4% formaldehyde in PBS : WAKO
- ・ 酢酸 : SIGMA
- ・ Phosphate buffered saline (PBS) : Thermo Fisher Scientific
- ・ マイヤーヘマトキシリン染色液 : WAKO
- ・ エオシン Y 溶液 : 武藤化学

3.3.3 実験手順

全体的な操作の流れを以下に示す。

マウス胎児細胞の採取

間葉系細胞をマウス胎児から採取した。

毛包再生ビーズの調製

新しい培地を添加し、間葉系細胞 2.0×10^6 cells を遠心後、コラーゲンゲル 0.4 mL を追加し細胞懸濁液を作製し、培養ディッシュの蓋に $2 \mu\text{L}$ ずつ滴下した。30 分インキュベート後、間葉細胞培養培地を追加し、Prime surface 96 U plate に 1 つずつ移し替えたのち、3 日間培養を行った。比較として細胞密度 1.0×10^4 cells/well で Prime surface 96 U plate (スフェロイド培養) 及び 96 well cell culture plate (モノレイヤ培養) に播種し、3 日間培養したものを使用した。

ALP 染色

3 日間培養後のサンプルを、以下の手順で ALP 染色した。

a) Diazonium salt solution の調製

FastBlue RR salt カプセルを 48 ml の蒸留水 (室温 18-26°C) で溶解した。2 ml の Naphthol AS-MX phosphate alkaline solution を混合した。

b) サンプルの固定

サンプルをクエン酸緩衝アセトン液で 30 秒浸漬することで固定した。その後、脱イオン水 (milliQ) で 45 秒リンスした。

c) アルカリホスファターゼ染色

サンプルにアルカリ染色液を加え、遮光条件で 30 分染色した。その後、milliQ で 120 秒リンスした。

ALP 活性

a) 試薬の調製 以下の手順で ALP 活性測定用試薬を調製した。

① 基質溶解液

1) 0.2M Na_2CO_3 水溶液 22 mL, 0.2M NaHCO_3 水溶液 28 mL を milliQ 50 mL に混合させ、炭酸・重炭酸バッファー (pH 9.8) 0.1 mmol/L を作製した。

2) $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 40.66 mg を炭酸・重炭酸バッファー 100 mL に溶解した。

② 標準液希釈系

p-ニトロフェノールを基質溶解液に 27.8 mg/L (10 mM) で溶解し使用した。

③ 基質緩衝液

p-ニトロフェニルリン酸ナトリウム 6 水和物を基質溶解液に 0.132 g/50 mL (約 10

mM) で溶解した。

④ 反応停止液

NaOH を 0.2M に希釈した。

b) 細胞組織の固定 培養液を除去したのち、6 well プレートに PBS で 3 回洗浄した。

c) 組織の破壊及び抽出 0.05% トライトン X 溶液を 150 μL 加え、凍結、融解を繰り返した。

d) 遠心処理 well からアシストチューブに移し、4°C、15 分、15,000 rpm で遠心処理して上澄みを新しいアシストチューブに移しこれを検体⑤とした。

e) 測定 下記の手順に従って、反応を行った。(インキュベーション時間は 30 min)

	サンプル⑤ (検体)	ブランク (蒸留水)	標準液希釈系② (p-ニトロフェノール)
基質緩衝液③ (μL)	100	100	100
試料 (μL)	20	20	20
プレートミキサーで 1 分間攪拌後、37°C で 30 分間インキュベート			
反応停止液④ (μL)	80	80	80
プレートミキサーで 1 分間攪拌後、405 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定			

f) 解析 下記の式を用いて、1 細胞あたりの ALP 活性を評価した。

$$\text{活性 (units/}\mu\text{L)} = \frac{C}{t} \times a$$

C: 標準曲線から得られる吸光度に対する p-ニトロフェノール濃度 (nmol/μL)

t: 反応時間 (min), a: 検体の希釈倍数

*unit の定義

pH 9.8, 37°C で 1 分間に 1 nmol の p-ニトロフェノールを生成する酵素活性を 1 unit とした。

HE 染色

移植 18 日目の移植部を以下の手順で HE 染色した。

a) 組織固定 ブラン固定液 (ピクリン酸飽和水溶液 15ml、20 ホルマリン 5ml、氷酢酸 1ml の混合溶液) に 1 日浸漬することで組織の固定を行った。

b) パラフィン包埋 70, 90, 100 v/v% エタノール, 100 v/v% エタノール-2-ブタノール 1:1 溶液, 2-ブタノール, 2-ブタノール-パラフィン 1:1 溶液, パラフィンに 1 時間ずつ浸した

後、パラフィンブロックを作製した。

c) 切片作製 回転式マイクロトームを用いてパラフィン切片を作製した。

d) HE 染色 以下の手順で HE 染色を行った。

3.3.4 実験結果と考察

1.0×10^4 cells/well の播種密度で細胞培養用 96 well plate に播種した「モノレイヤ」、 1.0×10^4 cells/well の播種密度で Prime surface 96 U plate に播種した「スフェロイド」、 1.0×10^4 cells/beads の「毛包再生ビーズ」をそれぞれ調製し、3 日間培養を行った。培養 3 日目の毛包誘導能は、毛包誘導マーカータンパクである ALP の活性を染色及び比色法により評価した (図 3-5 A)。その結果、毛包再生ビーズ内のほとんどすべての細胞が ALP 染色で染色されていたのに対し、スフェロイドでは、一部の細胞が染色されているに留まり、またモノレイヤでは、ほとんどすべての細胞が染色されていなかった。また、比色法により定量化した 1 細胞あたりの ALP 活性は、毛包再生ビーズ > スフェロイド > モノレイヤの順に高い値を示し、毛包再生ビーズが最も高い毛包誘導能をもつことが示された (図 3-5 B)。以上より、Versican 遺伝子発現および ALP 活性のいずれにおいても毛包再生ビーズが他の培養方法と比較して、間葉系細胞の発毛活性を向上させることを示した。

3.3.5 本節のまとめ

本節では、3 日間培養した毛包再生ビーズの ALP 活性がスフェロイド培養及びモノレイヤ培養と比較しても有意に高いことを示した。

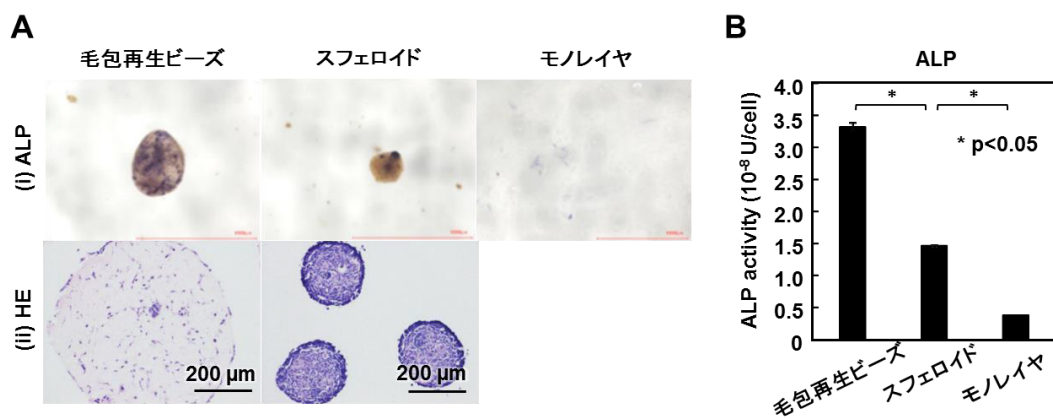


図 3-5 培養 3 日目の ALP 活性 A: 毛包再生ビーズ、スフェロイド、モノレイヤの ALP 染色 (i) ALP 染色 (ii) HE 染色、B: 1 細胞あたりの ALP 活性

3.4 毛包再生ビーズの包埋細胞数の検討

3.4.1 本節の目的

本節では、毛包再生ビーズに包埋する細胞数を変化させたときのビーズのサイズ、ビーズの発毛遺伝子解析を行い、毛包再生ビーズの細胞数の最適値を評価した。

3.4.2 装置・試薬

以下に本実験に用いた装置・試薬を示す。

【装置】

- ・ 倒立型位相差顕微鏡, IX-71 : OLYMPUS
- ・ 微量サンプル分光光度計 : GE Healthcare
- ・ Real time PCR system, Step One™ :
Applied Biosystems

【試薬】

- ・ 妊娠マウス (C57BL/6jcl 妊娠 18 日) : 日本クレア
- ・ Buffer RLT、70%エタノール、Buffer RW1、Buffer RPE、RNase free water
- ・ Collagen type I-A : 新田ゼラチン
- ・ QIA Shredder スピンカラム (紫)、RNeasy スピンカラム (ピンク)
- ・ 10× F-12 培地 : 新田ゼラチン
- ・ PCR 用 1000 μL、200 μL ピペットとそのチップ
- ・ 再構成緩衝溶液 : 新田ゼラチン
- ・ RNase free water 吹きかけ用
- ・ Dulbecco's modified eagle medium high glucose (DMEM) : SIGMA
- ・ Nuclear free water : Qiagen
- ・ Fetal bovine serum (FBS) : SIGMA
- ・ QuickGene : KURABO
- ・ Penicillin-Streptomycin (P/S) : GIBCO
- ・ SYBR® Green Real-Time PCR Master Mixes : Thermo Fisher Scientific
- ・ HuMedia-KG2 : KURABO

3.4.3 実験操作

全体的な操作の流れを以下に示す。

マウス胎児細胞の採取

間葉系細胞を妊娠マウスから採取した。

毛包再生ビーズ作製

間葉系細胞 8.0, 4.0, 2.0, 1.0×10^6 cells を遠心後、コラーゲンゲル 0.2 mL を追加し細胞懸濁液を作製し、培養ディッシュの蓋に 2 μL ずつ滴下した (細胞数 0.5, 1, 2, 4×10^4 cells/bead)。

30分インキュベート後、間葉系細胞培養培地 (DMEM+10% FBS+1% P/S) を追加し、3日間培養を行った。

位相差顕微鏡観察

培養1,3日目に位相差顕微鏡で経過観察を行った。また、ビーズのサイズを ImageJ で解析しゲルビーズサイズの経時変化を定量した。

RT-PCR 解析

3日間培養後のサンプルの RT-PCR 解析を行った。

	Forward primer	Reverse primer
Versicn	gACgACTgTCTTggTgg	ATATCCAAACAAgCCTg
HIF1 α	ggAgATCCTTCgAggAgCACTT	ggCgATTTAgCAgCAgATATAAgAA
GAPDH	AgAACATCATCCCTgCATCC	TCCACCACCCTgTTgCTgTA

3.4.4 実験結果と考察

毛包再生ビーズを構成する細胞数の最適値を検討するため、包埋細胞数 5, 10, 20, 40 $\times 10^3$ cells/2 μ L のビーズを作製し、毛包誘導マーカー及び低酸素マーカーの遺伝子発現量を評価した。培養3日間でビーズ直径はダイナミックに変化し、直径 500-800 μ m のビーズを形成した (図 3-6 A, B)。また、包埋細胞数が増加するにつれて、ビーズの直径は小さくなる傾向が観察された。これは細胞の牽引力によって、ビーズ内のコラーゲン線維が凝集されることに起因しており、細胞数が増加することにより、コラーゲン線維を凝集する力が増したためと考えられる。続いて、3日間培養したビーズの毛包誘導能を評価するため、Versican 遺伝子の発現量を評価した (図 3-6 C)。その結果、細胞数 1 $\times 10^4$ cells/beads のものが最も高い遺伝子発現を示した。この時、ビーズ内の細胞数が増加するに伴い、低酸素マーカーである HIF1 α の活性は増加し、Versican の活性は減少した。以上より、毛包再生ビーズの細胞数を 1 $\times 10^4$ cells/beads 以上にすることで一部の細胞で低酸素による発毛活性の低下が生じることが示唆された。そこで、1 $\times 10^4$ cells/beads を毛包再生ビーズ内の細胞が低酸素に陥らず高い毛包誘導能を示す包埋細胞数と判断し、以降の実験を進めることとした。

3.4.5 本節のまとめ

本節では、毛包再生ビーズに包埋する細胞数の検討を行い、1 $\times 10^4$ cells/beads 以上の細胞数では、低酸素による発毛活性の低下が生じることが示した。この結果より、1 $\times 10^4$ cells/beads を以降の実験の包埋細胞数として使用することとした。

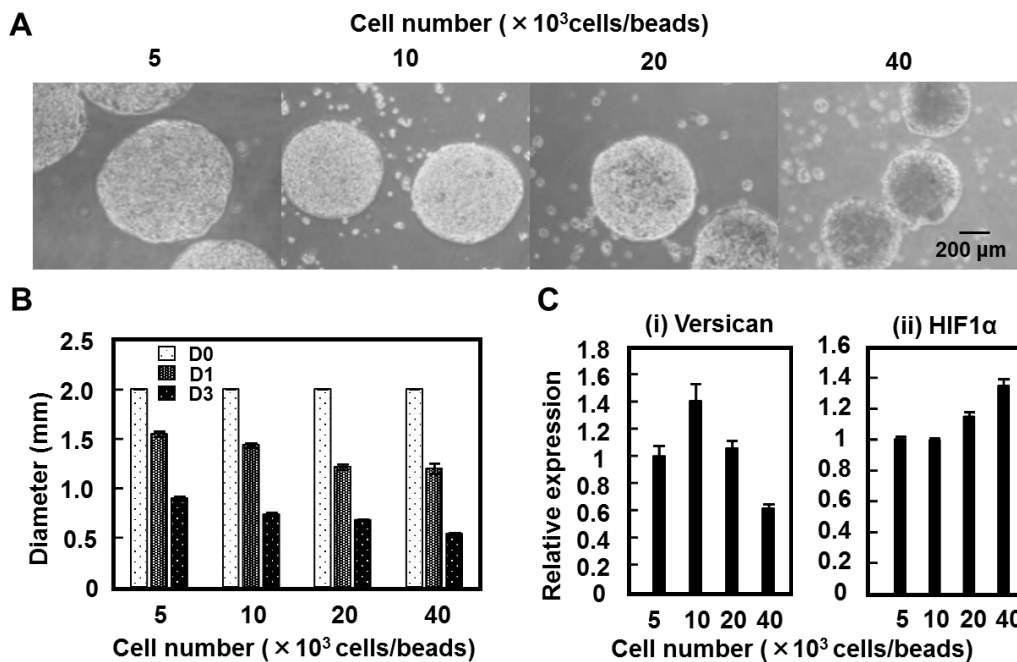


図 3-6 : 毛包再生ビーズを構成する細胞数と毛包誘導能 (A) 毛包再生ビーズの位相差顕微鏡像、(B) 3 日間培養後のビーズの直径、(C) 3 日間培養後のビーズの Versican 及び HIF1 α 遺伝子発現

3.5 毛包再生ビーズのコラーゲン濃度の最適化

3.5.1 本節の目的

本節では、コラーゲングル濃度を変更した際のビーズのサイズ、発毛遺伝子解析を行い、毛包再生ビーズのコラーゲン濃度の最適値を評価した。

3.5.2 装置・試薬

以下に本実験に用いた装置・試薬を示す。

【装置】

- ・ 倒立型位相差顕微鏡, IX-71 : OLYMPUS
- ・ 微量サンプル分光光度計 : GE Healthcare
- ・ Real time PCR system, Step One™ : Applied Biosystems

【試薬】

- 妊娠マウス (C57BL/6jcl 妊娠 18 日) : 日本クレア
- Collagen type I-A : 新田ゼラチン
- 10× F-12 培地 : 新田ゼラチン
- 再構成緩衝溶液 : 新田ゼラチン
- Dulbecco's modified eagle medium high glucose (DMEM) : SIGMA
- Fetal bovine serum (FBS) : SIGMA
- Penicillin-Streptomycin (P/S) : GIBCO
- HuMedia-KG2 : KURABO
- Buffer RLT、70%エタノール、Buffer RW1、Buffer RPE、RNase free water
- QIA Shredder スピнкаラム (紫)、RNeasy スピнкаラム (ピンク)
- PCR 用 1000 μ L、200 μ L ピペットとそのチップ
- RNase free water 吹きかけ用
- Nuclear free water : Qiagen
- QuickGene : KURABO
- SYBR® Green Real-Time PCR Master Mixes : Thermo Fisher Scientific
- キシレン : WAKO
- 99%エタノール : WAKO
- 媒染剤 (10%トリクロール酢酸水溶液+10%重クロム酸カリウム水溶液) : 武藤化学
- 第二媒染剤 (2.5%リントングステン酸+2.5%リンモリブデン酸水溶液) : 武藤化学
- ワイゲルト鉄ヘマトキシリン液 1 : 武藤化学
- ワイゲルト鉄ヘマトキシリン液 2 : 武藤化学
- カラッチ・ヘマトキシリン液 : 武藤化学
- 0.75%オレンジ G 液 : 武藤化学
- 酢酸 : SIGMA
- マッソン染色液 B : 武藤化学
- 2.5%リントングステン酸液 : 武藤化学
- アニリン青液 : 武藤化学

3.5.3 実験操作

全体的な操作の流れを以下に示す。

マウス胎児の細胞採取

間葉系細胞を妊娠マウスから採取した。

濃度の異なるコラーゲンゲル溶液の調製

3 mg/mL のコラーゲンゲル溶液を pH 3 の塩酸で希釈し、3, 2.25, 1.5, 0.75 mg/mL のコラーゲンゲル溶液を調製した。

毛包再生ビーズの作製

間葉系細胞 1.0×10^6 cells を遠心後、コラーゲンゲル 200 μ L を追加し細胞懸濁液を作製し、培養ディッシュの蓋に 2 μ L ずつ 100 個滴下した (細胞数 1.0×10^4 cells/bead)。30 分インキュベート後、間葉細胞培養培地 (DMEM + 10% FBS + 1% P/S) を加え、3 日間培養を行った。

位相差顕微鏡による観察

培養 1, 3 日目に位相差顕微鏡で経過観察を行った。また、ゲルビーズのサイズを Image J で解析しゲルビーズサイズの経時変化を定量した。

RT-PCR

既存のプロトコルに従って、RT-PCR により、各種遺伝子解析を行った。

	Forward primer	Reverse primer
Versican	gACgACTgTCTTggTgg	ATATCCAAACAAGCCTg
GAPDH	AgAACATCATCCCTgCATCC	TCCACCACCCTgTTgCTgTA

MT 染色

移植 18 日目の移植部を以下の手順で MT 染色した。

a) 組織固定 ブアン固定液（ピクリン酸飽和水溶液 15ml、20 ホルマリン 5ml、氷酢酸 1ml の混合溶液）に 1 日浸漬することで組織の固定を行った。

b) パラフィン包埋 70, 90, 100 v/v%エタノール, 100 v/v%エタノール-2-ブタノール 1 : 1 溶液, 2-ブタノール, 2-ブタノール-パラフィン 1 : 1 溶液, パラフィンに 1 時間ずつ浸した後、パラフィンブロックを作製した。

c) 切片作製 回転式マイクロトームを用いてパラフィン切片を作製した。

d) MT 染色 以下の手順で MT 染色を行った。

1	キシレン	30 分	17	1%酢酸水	2 秒
2	キシレン	30 分	18	マッソン染色液 B	20 分
3	100%エタノール	5 分	19	1%酢酸水	2 秒
4	100%エタノール	5 分	20	リタングステン酸水溶液	20 分
5	90%エタノール	5 分	21	1%酢酸水	2 秒
6	70%エタノール	5 分	22	アニリン青	5 分
7	流水	3 分	23	1%酢酸水	2 秒
8	蒸留水	5 秒	24	90%エタノール	30 秒
9	第一媒染剤	30 分	25	90%エタノール	1 分
10	流水	3 分	26	100%エタノール	1 分
11	蒸留水	5 秒	27	100%エタノール	5 分
12	ワイゲルト鉄ヘマトキシリン	5 分	28	100%エタノール	5 分
13	水洗	10 秒	29	キシレン	5 分
14	流水	5-10 分	30	キシレン	5 分
15	第二媒染剤	30 秒	31	封入	
16	0.75%オレンジ G 液	1 分		所要時間	200 分

3.5.4 実験結果と考察

毛包再生ビーズを構成するコラーゲングル濃度の最適値を検討するため、コラーゲングル濃度を 3.0, 2.25, 1.5, 0.75 mg/mL と設定し、各ビーズを作製し、その発毛に関する遺伝子発現量を評価した。作製した 4 種類の毛包再生ビーズは培養 3 日目までの間にビーズ直径がダイナミックに変化し、直径 300 - 900 μm の凝集体を形成した。このビーズの直径を定量したところ、ゲル濃度が減少するに伴い、ビーズの直径も小さくなる傾向が見られた。これは、ゲルの濃度、つまりコラーゲン線維の密度が低いほど、ゲルの架橋が脆くなり、細胞のけん引力によりゲルを容易に収縮することができたと考えられる。また、ゲル濃度が減少するに従い、毛包誘導マーカである Versican 遺伝子の発現は減少する傾向がみられた。以上より、毛包再生ビーズを構成するゲル濃度は 3.0 mg/mL が最も高い発毛活性を示し、ゲル濃度を減少させることで、発毛活性の低下が生じることが示された。そこで、3.0 mg/mL が毛包再生ビーズを構成するコラーゲングルの濃度として適している判断し、この濃度で以降の実験を進めることとした。

3.5.5 本節のまとめ

本節では、毛包再生ビーズを構成するコラーゲングルの濃度が 3.0 mg/mL の時、Versican 遺伝子発現が最も高い値を示し、この濃度を以降の実験のコラーゲングル濃度として使用することを決定した。

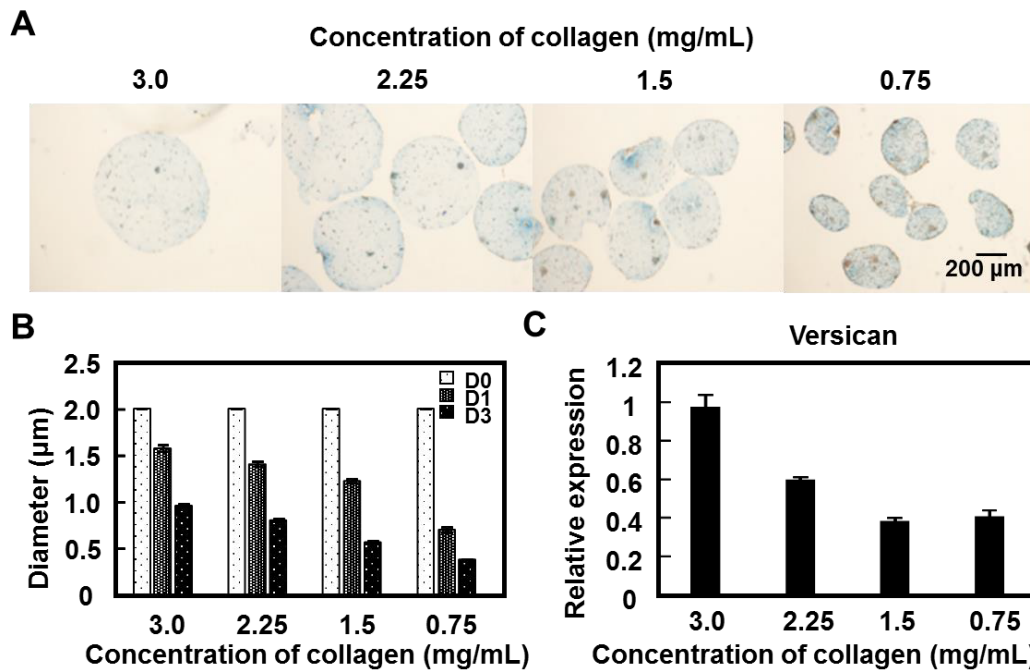


図 3-7 毛包再生ビーズのコラーゲン濃度と毛包誘導能 (A)ビーズの位相差顕微鏡像の経時変化、(B)3日間培養後のビーズの直径、(C)3日間培養後のビーズの Versican 遺伝子発現

3.6 毛包再生ビーズ培養時の細胞けん引力が毛包誘導能に与える影響

3.6.1 本節の目的

毛包再生ビーズが収縮する際、間葉系細胞では通常の培養とは異なる細胞牽引力が働く。この細胞牽引力はアクチン骨格の形成に関わっており、細胞の機能を変化させるのに十分なファクターになりうる。本節では、細胞が毛包再生ビーズを収縮させる際、細胞の毛包誘導遺伝子発現にどのような影響を及ぼすか評価する。ミオシンII阻害剤として用いられる Blebbistatin で細胞の牽引力を阻害することで収縮しない毛包再生ビーズを調製し、これと毛包再生ビーズの Versican 遺伝子発現を比較した。

3.6.2 細胞牽引力

細胞は細胞外マトリックスもしくは培養基板などに接着し、アクチン骨格を形成して細胞自身の形を維持している。このように細胞が基質に接着する際には、細胞に向かって力が働く [6]。この力を細胞牽引力と呼び、細胞の接着のみならず増殖や移動に大きな役割を果たしている。

3.6.3 Blebbistatin

細胞内で、ミオシンはアクチンと結合し、アクトミオシンを形成した状態で存在しており、このアクトミオシンは、発生過程の細胞のダイナミックな運動の牽引力を与えている。Blebbistatin は細胞の牽引力に関わるミオシンを阻害する阻害剤であり、発達したアクチン骨格の形成を阻害する。先行研究では、Organ Bud Generation 法（間葉系細胞の細胞牽引力を用いて、細胞凝集体を形成する手法（図 3-9A））での培養の際に、Blebbistatin を添加することで、細胞牽引力を阻害し、凝集体の形成を阻害できることが示されている [7]。本研究では、この Blebbistatin を用いて、間葉系細胞の細胞牽引力を阻害する。

3.6.4 装置・試薬

以下に本実験に用いた装置・試薬を示す。

【装置】

- ・ 倒立型位相差顕微鏡, IX-71 : OLYMPUS
- ・ 倒立型蛍光顕微鏡, DP-71 : OLYMPUS
- ・ 共焦点レーザー顕微鏡, LSM700 : Carl Zeiss
- ・ Real time PCR system, Step One™ : Applied Biosystems
- ・ 微量サンプル分光光度計 : GE Healthcare

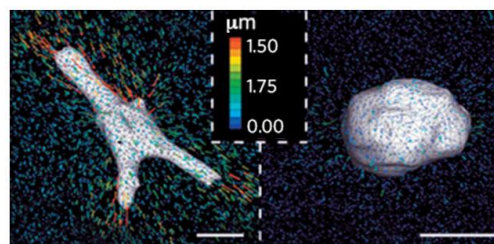


図 3-8 細胞牽引力の可視化 参考文献 [6]より引用 色で示した部分が細胞牽引力により引っ張られた部分

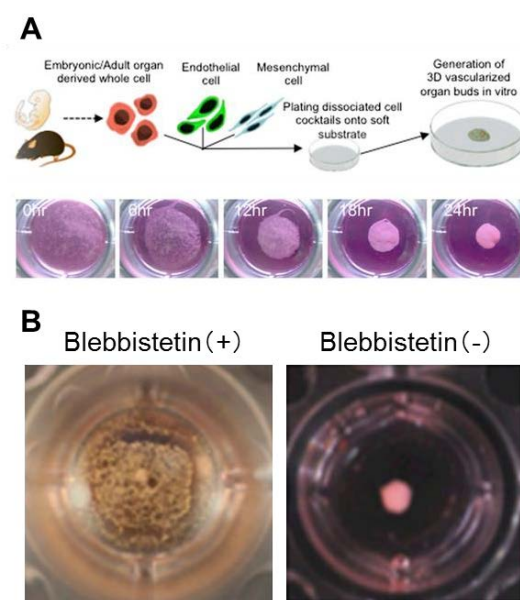


図 3-9 Blebbistatin による細胞牽引力阻害 参考文献 [7]より引用 A : Organ Bud Generation 法、B : Blebbistatin を用いた、Organ Bud の形成阻害

【試薬】

- ・ 妊娠マウス (C57BL/6jcl 妊娠 18 日) : 日本クレア
- ・ Collagen type I-A : 新田ゼラチン
- ・ 10× F-12 培地 : 新田ゼラチン
- ・ 再構成緩衝溶液 : 新田ゼラチン
- ・ Dulbecco's modified eagle medium high glucose (DMEM) : SIGMA
- ・ Fetal bovine serum (FBS) : SIGMA
- ・ Penicillin-Streptomycin (P/S) : GIBCO
- ・ HuMedia-KG2 : KURABO
- ・ Buffer RLT、70%エタノール、Buffer RW1、Buffer RPE、RNase free water
- ・ QIA Shredder スピンカラム (紫)、RNeasy スピンカラム (ピンク)
- ・ PCR 用 1000 μL、200 μL ピペットとそのチップ
- ・ RNase free water 吹きかけ用
- ・ Nuclear free water : Qiagen
- ・ QuickGene : KURABO
- ・ SYBR® Green Real-Time PCR Master Mixes : Thermo Fisher Scientific
- ・ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) : WAKO
- ・ Rhodamine phalloidin : Molecular Probes

3.6.5 実験操作

全体的な操作の流れを以下に示す。

マウス胎児細胞の採取

間葉系細胞を妊娠マウスから採取した。

毛包再生ビーズの作製

間葉系細胞 1.0×10^6 cells を遠心後、コラーゲングル 200 μL を追加し細胞懸濁液を作製し、細胞培養 dish の蓋に 2 μL ずつ 100 個滴下した (細胞数 10000 cells/bead)。30 分インキュベート後、培養培地を加え、3 日間培養を行った。培地は下記の 2 種類を用いた。

- 1) Blebbistatin (+)...間葉細胞培地+ Blebbistatin (30 μM)
- 2) Blebbistatin (-)...間葉細胞培地

位相差顕微鏡観察

培養 1, 3 日目に位相差顕微鏡で経過観察を行った。また、ゲルビーズのサイズを Image J で解析しゲルビーズサイズの経時変化を定量した。

RT-PCR

既存のプロトコルに従って、RT-PCR により、各種遺伝子解析を行った。

	Forward primer	Reverse primer
Versican	gACgACTgTCTTggTgg	ATATCCAAACAAgCCTg

GAPDH	AgAACATCATCCCTgCATCC	TCCACCACCCTgTTgCTgTA
-------	----------------------	----------------------

アクチン-核染色

3 日間培養後のサンプルをパラホルムアルデヒド固定し、以下の手順でアクチン-核染色を行った。

No	試薬	時間	注
1	PBS	1分×3	洗浄
2	TritonX-100	10分	透徹
3	PBS	1分×3	洗浄
4	Rhodamine phalloidin	30分	アクチン染色
5	PBS	1分×3	洗浄
6	DAPI	5分	核染色
7	PBS	5分×3	洗浄

3.6.6 実験結果と考察

毛包再生ビーズの収縮の際に、間葉系細胞が発毛に関する遺伝子発現を向上させるか検証するため、培養培地に Blebbistatin を添加したもの (Blebbistatin (+))、および Blebbistatin を添加しないもの (Blebbistatin (-)) を作製し、3 日間培養後の Versican 遺伝子発現量を評価した。3 日間培養後のビーズを図 3-10A に示す。Blebbistatin (-) では、ビーズは収縮し、細胞は発達したアクチン骨格を形成していたが、Blebbistatin (+) では、3 日間培養後のビーズのサイズはほぼ変化が見られず、アクチン骨格の形成が観察されなかった (図 3-10B)。また、Versican 遺伝子発現量を評価した結果、培養 1, 3 日後ともに、Blebbistatin (+) の方が Blebbistatin (-) よりも Versican 遺伝子の発現が有意に低い傾向が見られた (図 3-10C)。これは、Blebbistatin 添加によるビーズの収縮阻害が毛包誘導遺伝子 (Versican) 発現を抑制したためと考えられる。これより、毛包再生ビーズの収縮は間葉系細胞の毛包誘導遺伝子の発現を増加させる効果があることが示唆された。

3.6.7 本節のまとめ

本節では Blebbistatin による毛包再生ビーズの収縮阻害が毛包誘導遺伝子発現の低下を引き起こすことを示し、毛包再生ビーズ形成時の自発的な収縮が毛包誘導能を高める可能性を示した。

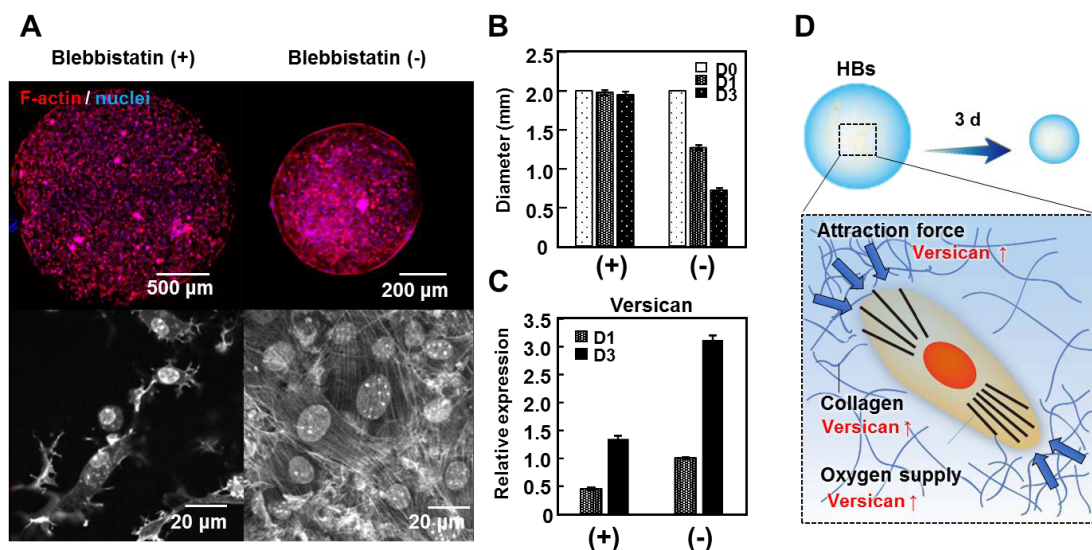


図 3-10 : 毛包再生ビーズ形成時の細胞けん引力が毛包誘導能に与える影響 A : 3日間培養後のビーズの共焦点顕微鏡像 赤 : アクチン ; 青 : 核、B : 3日間培養後のビーズの直径、C : 1, 3日間培養後のビーズの Versican 遺伝子発現、D : 毛包再生ビーズの毛包誘導能に関する因子

3.7 毛包再生ビーズの毛再生能の評価

3.7.1 本節の目的

本節の目的は、毛包再生ビーズを移植することで、毛包再生能を評価することである。3日間培養した毛包再生ビーズを上皮系細胞とともに免疫不全マウス皮下へ移植し（パッチ法）、移植1ヶ月後の毛包形成を観察した。また、高い毛包誘導能を有することが報告されている間葉系細胞のスフェロイドを比較として用いた。

3.7.2 毛包誘導能の *in vivo* assay（パッチ法）

毛包誘導能の評価方法として、パッチ法が現在では広く用いられている。これは、免疫不全マウスの皮膚内（間葉～脂肪組織の領域）にシリンジ等を用いてスペース（パッチ）を作製し、そこに細胞懸濁液を注入する方法である。注入された細胞はスペース内で毛包を形成し、移植した部分の皮下から毛の形成が観察される。黒毛の細胞を注入すれば、ホストの皮膚からでも皮下の毛髪の再生が色の変化で確認できる。

3.7.3 装置・試薬

以下に本実験に用いた装置・試薬を示す。

【装置】

- ・ 小動物用イソフルラン麻酔器：バイオリサーチセンター株式会社
- ・ 走査型電子顕微鏡, Miniscope : HITACHI
- ・ 倒立型蛍光顕微鏡, DP-71 : OLYMPUS
- ・ デジタルマイクロスコープ : KEYENCE

【試薬】

- ・ 妊娠マウス (C57BL/6jcl 妊娠 18 日) マウス : 日本クレア
- ・ Dulbecco's modified eagle medium high glucose (DMEM) : SIGMA
- ・ ICR ノードマウス 5 週齢♂ : オリエンタル酵母
- ・ Fetal bovine serum (FBS) : SIGMA
- ・ 20G V ランス : 日本アルコン
- ・ Penicillin-Streptomycin (P/S) : GIBCO
- ・ Prime surface 96 U plate : 住友ベークライト社製
- ・ Collagen type I-A : 新田ゼラチン
- ・ 10× F-12 培地 : 新田ゼラチン
- ・ 再構成緩衝溶液 : 新田ゼラチン

3.7.4 実験操作

全体的な操作の流れを以下に示す。

マウス胎児細胞の採取

間葉系細胞及び上皮系細胞を妊娠マウスから採取した。

スフェロイド容器への播種

間葉系細胞を遠心後、コラーゲンを追加し細胞懸濁液を作製し、 $\phi 4$ cm dish のふたに $2 \mu\text{L}$ ずつ滴下した (細胞数 1.0×10^4 及び 4.0×10^4 cells/bead)。30 分インキュベート後、間葉系細胞培養培地 (DMEM+10%FBS+1%P/S) を加え、3 日間培養を行った。コントロールとして、96 well U plate で 1.0×10^4 及び 4.0×10^4 cells/spheroid の間葉系細胞スフェロイドを調製した (同様に 3 日間培養)

移植

3 日間培養後、90 個の毛包再生ビーズとマウスから新たに採取した上皮細胞 1×10^6 cells を混合し、マウス皮下に移植した (各 30 個ずつ 3 箇所へ移植)。コントロールとして調製したスフェロイドも同様に移植した。

観察

移植 1 か月後に皮膚を切開し、デジタルマイクロスコープを用いて観察した。また、再生した毛は採取した皮膚をコラーゲナーゼ溶液に 1 時間浸漬させたあとバラバラにほぐし、

再生本数を数えたのち、走査型顕微鏡で観察した。

3.7.5 実験結果と考察

調製した毛包再生ビーズ及びスフェロイドを各 30 個ずつ 3 箇所上皮系細胞とともにパッチ法により移植した。移植 1 ヶ月後の毛包再生ビーズとスフェロイドが形成した毛の様子を図 3-11 に示す。毛包再生ビーズ移植部では黒い塊となって毛が形成しており、黒塊内からは大量の毛が観察された。一方、スフェロイドでは、毛の再生数が少なく、黒塊の大きさも小さい様子が観察された。またいずれの毛もキューティクル構造を有する形態的に正常な毛が形成されていた。それぞれの再生毛数を解析したところ、再生毛は 1.0×10^4 及び 4.0×10^4 cells のいずれの細胞数においても、ビーズで培養したものがスフェロイドで培養したものの 3 倍多く再生していた。また、再生毛の太さはいずれも $20 \mu\text{m}$ とマウスの体毛とほぼ同様の太さであり、有意差は見られなかった。以上より、毛包再生ビーズがスフェロイドよりも高い毛包誘導能を有することが示された。

3.7.6 本節のまとめ

本節では、毛包再生ビーズの毛再生能をパッチ法により評価した結果、毛包再生ビーズは既存の間葉系細胞スフェロイドよりも高い毛再生能を有することが示された。

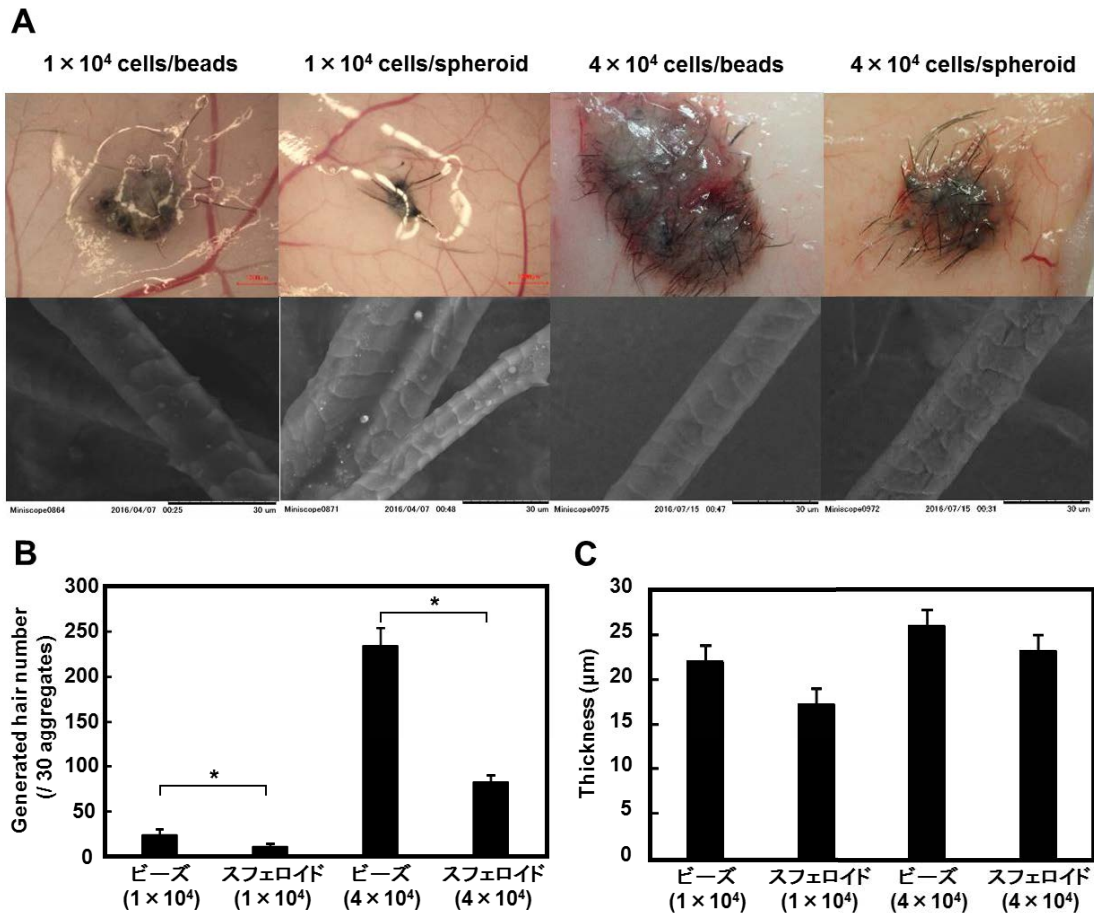


図 3-11 毛包再生ビーズの毛再生能の評価 (移植 1 ヶ月後) A: 移植 1 か月後の移植部 (i-iv) 移植部のデジタルマイクロスコープ像、(v-ix) 再生した毛の走査型顕微鏡像、B: 移植 1 か月後に観察された 1 移植部あたりの再生毛本数、C: 再生毛の平均直径

3.8 毛包再生ビーズを用いた毛包原基の調製

3.8.1 本節の目的

本節の目的は、毛包再生ビーズを用いて、毛包原基様の組織体を調製し、免疫不全マウス皮下へ移植することで、毛包再生能を評価することである。移植1ヶ月後の毛包再生能を、第2章で示した毛包原基と比較することで評価した。

3.8.2 装置・試薬

以下に本実験に用いた装置・試薬を示す。

【装置】

- ・ 小動物用イソフルラン麻酔器：バイオリサーチセンター株式会社
- ・ 走査型電子顕微鏡, Miniscope：HITACHI
- ・ 倒立型蛍光顕微鏡, DP-71：OLYMPUS
- ・ デジタルマイクロスコープ：KEYENCE

【試薬】

- ・ 妊娠マウス (C57BL/6jcl 妊娠 18 日) マウス：日本クレア
- ・ Dulbecco's modified eagle medium high glucose (DMEM)：SIGMA
- ・ ICR ノードマウス 5 週齢♂：オリエンタル酵母
- ・ Fetal bovine serum (FBS)：SIGMA
- ・ 20G V ランス：日本アルコン
- ・ Penicillin-Streptomycin (P/S)：GIBCO
- ・ Prime surface 96 U plate：住友ベークライト社製
- ・ HuMedia-KG2：KURABO
- ・ Collagen type I-A：新田ゼラチン
- ・ 10× F-12 培地：新田ゼラチン
- ・ 再構成緩衝溶液：新田ゼラチン

3.8.3 実験操作

全体的な操作の流れを以下に示す。

マウス胎児細胞の採取

間葉系細胞及び上皮系細胞を妊娠マウスから採取した。

スフェロイド容器への播種

間葉系細胞を遠心後、コラーゲンゲルを追加し細胞懸濁液を作製し、Prime surface 96 U plate の well に 2 μ L ずつ滴下した (細胞数 1.0×10^4 cells/bead)。30 分インキュベート後、上皮系細胞 1.0×10^5 cells/mL を懸濁した間葉系細胞培地 (DMEM+10%FBS+1%P/S) と上皮系細胞培地 (KG2) の 1 : 1 混合培地を 100 μ L ずつ well に加え、3 日間培養を行った。

コントロールとして、Prime surface 96 U plate に上皮系細胞 1.0×10^4 cells 及び間葉系細胞 1.0×10^4 cells の懸濁液を播種し 3 日間培養を行った。

毛包原基移植

ICR スードマウス皮下に 20G V ランスで移植穴をあけ、そこにマイクロピペット (10 - 0.5 μ L) で毛包原基を 1 つずつ移植した。(n=3)

観察

毛包原基を移植したマウスは 2 日に 1 回肉眼観察を行い、移植 18 日目にマイクروسコープを用いて観察した。

3.8.4 実験結果と考察

Prime surface 96 U plate で毛包再生ビーズと上皮系細胞を 3 日間共培養したところ、上皮系細胞と毛包再生ビーズが融合した毛包原基様構造を形成した。本節では、この組織を Hair beads (HBs) とし、第 2 章の毛包原基を Hair follicle germs (HFGs) と呼ぶ。Prime surface 96 U plate 作製した HBs 及び HFGs をピペッティングすることで回収し、免疫不全マウス皮下に移植したところ、移植 18 日後にいずれの移植体も宿主皮膚内に生着して毛成長する様子が観察された。平均再生本数と平均再生効率を比較すると、平均再生効率は HBs 及び HFGs のいずれも 60% 程度の値を示したが、平均再生本数は HBs が HFGs よりも有意に高い値を示した。これより、高密度のコラーゲンを含む HBs は HFGs よりも高い毛髪再生能を有する移植体であることが示された。

3.8.5 本節のまとめ

本節では、毛包再生ビーズを用いて調製した毛包原基が第 2 章の毛包原基よりも高い毛再生能を有することを示した。

3.9 本章のまとめ

本章では、コラーゲンを含む細胞凝集体である毛包再生ビーズを用いた毛髪再生について述べた。毛包再生ビーズを調製する方法を説明した後、毛包再生ビーズの毛包誘導能を発毛に関する蛋白質、遺伝子発現の観点から評価した。そして、毛包再生ビーズの包埋細胞数、コラーゲングル濃度、ビーズ収縮の影響を毛包誘導マーカー遺伝子の発現量により評価した。調製した毛包再生ビーズを免疫不全マウスへ移植することにより、毛包の再生が観察され、その発毛効率はスフェロイドと比較して高い効率を示した。さらに、毛包再生ビーズと

上皮系細胞をスフェロイド培養器で共培養することで、毛包原基様の構造体を調製し、これと毛包原基を免疫不全マウス皮下に移植した結果、毛包再生ビーズで作製した毛包原基様の構造体が高い発毛効率を有していた。以上の結果から、毛包再生ビーズを用いて調製した毛包原基は生体と同等の毛包を再生する能力を有しており、移植組織として高い毛髪再生能力を有する組織体と結論づけた。

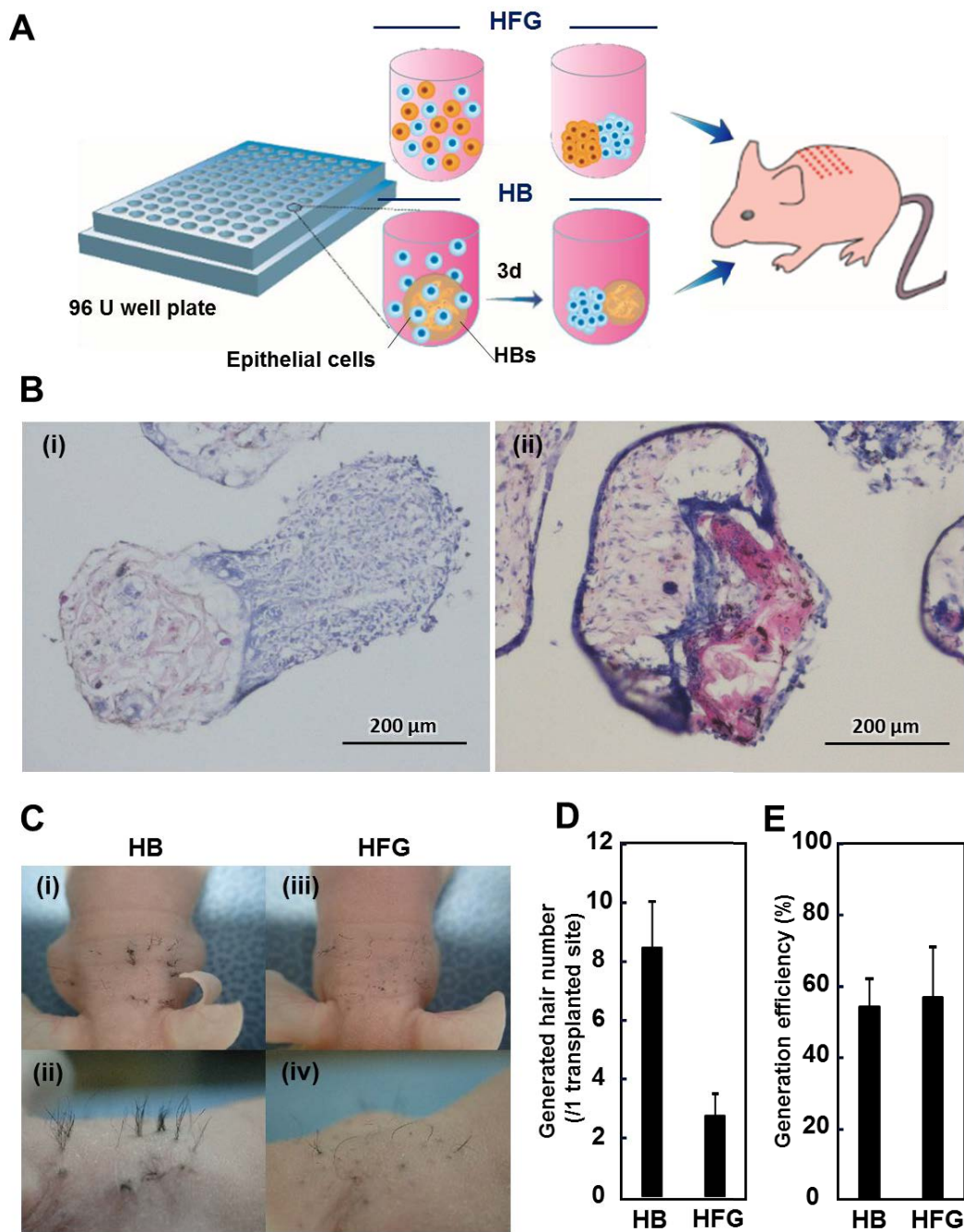


図 3-12 毛包再生ビーズを用いた毛包原基の毛再生能評価 A: 毛包再生ビーズを用いた毛包原基の調製方法、B: 移植 18 日後の移植部 (i, iii) 毛包再生ビーズを用いた毛包原基 (HBs)、(ii, iv) 細胞選別により調製した毛包原基 (HFGs)、C: 移植 18 日後の 1 移植部あたりの再生毛本数、C: 毛再生効率 (再生部/移植部)

参考文献

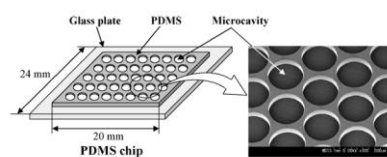
- [1] A.G. Messenger, K. Elliott, A. Temple, V.A. Randall, EXPRESSION OF BASEMENT-MEMBRANE PROTEINS AND INTERSTITIAL COLLAGENS IN DERMAL PAPILLAE OF HUMAN HAIR-FOLLICLES, *Journal of Investigative Dermatology* 96(1) (1991) 93-97.
- [2] G. Michalopoulos, F. Russell, C. Biles, PRIMARY CULTURES OF HEPATOCYTES ON HUMAN-FIBROBLASTS, *In Vitro-Journal of the Tissue Culture Association* 15(10) (1979) 796-806.
- [3] R. Samuel, L. Daheron, S. Liao, T. Vardam, W.S. Kamoun, A. Batista, C. Buecker, R. Schafer, X.X. Han, P. Au, D.T. Scadden, D.G. Duda, D. Fukumura, R.K. Jain, Generation of functionally competent and durable engineered blood vessels from human induced pluripotent stem cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(31) (2013) 12774-12779.
- [4] B. Lin, Y. Miao, J. Wang, Z. Fan, L. Du, Y. Su, B. Liu, Z. Hu, M. Xing, Surface Tension Guided Hanging-Drop: Producing Controllable 3D Spheroid of High-Passaged Human Dermal Papilla Cells and Forming Inductive Microtissues for Hair-Follicle Regeneration, *Acs Applied Materials & Interfaces* 8(9) (2016) 5906-5916.
- [5] C.A. Higgins, J.C. Chen, J.E. Cerise, C.A.B. Jahoda, A.M. Christiano, Microenvironmental reprogramming by three-dimensional culture enables dermal papilla cells to induce de novo human hair-follicle growth, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(49) (2013) 19679-19688.
- [6] S. Khetan, M. Guvendiren, W.R. Legant, D.M. Cohen, C.S. Chen, J.A. Burdick, Degradation-mediated cellular traction directs stem cell fate in covalently crosslinked three-dimensional hydrogels, *Nature Materials* 12(5) (2013) 458-465.
- [7] T. Takebe, M. Enomura, E. Yoshizawa, M. Kimura, H. Koike, Y. Ueno, T. Matsuzaki, T. Yamazaki, T. Toyohara, K. Osafune, H. Nakauchi, H.Y. Yoshikawa, H. Taniguchi, Vascularized and Complex Organ Buds from Diverse Tissues via Mesenchymal Cell-Driven Condensation, *Cell Stem Cell* 16(5) (2015) 556-565.

第四章

マイクロアレイチップを用いた毛包原基の大量調製

4.1 はじめに

第2章および第3章で毛包原基の調製法について紹介したが、この技術ヒトの脱毛症治療に応用することを考えると、毛髪再生能を有する毛包原基を均一かつ安定に大量調製する技術の確立が求められる。また、その技術の確立には、生体への安全性が担保されていることが絶対条件であり、コンタミネーションの恐れが生じる複雑な操作を必要としない技術とするべきである。このような観点から、本章では第2章で紹介した毛包原基を大量に調製する技術を開発することを目的とした。第2節では、毛包原基の大量培養を行う際の課題が培養細胞への酸素供給であることを指摘し、それを解決するためのアプローチについて述べた。第3節では、微細なウェルを均一かつ規則的に複数配置したポリジメチルシロキサン (PDMS) 製のマイクロアレイチップの作製方法を述べた。第4節では、このチップを用いて毛包原基を大量に調製する技術について述べた。第5節では、毛包原基の大量培養に最適な酸素濃度を検討した。第6節では、作製した毛包原基をシートとしてコラーゲンゲルに転写した後、免疫不全マウスにこのシートを移植することにより、免疫不全マウス皮下に毛を再生する技術を示した。第7節では、第6節で支持体として用いたコラーゲンゲルの力学的強度の欠如を補う新材料として、*in situ* 架橋マテリアルを開発し、これを支持体を用いて作製した毛包原基シートを移植することにより、免疫不全マウス皮下に高密度で毛を再生する技術を示した。



4.2 大量培養時の酸素供給

4.2.1 移植技術への適用と大量培養の課題

再生医療技術の実用化には、スフェロイドのような組織を大量に培養する技術の確立が不可欠であり、世界的に種々のコンセプトで大量培養技術の開発が推進されてきている。通常の 96 well plate での細胞培養技術を単にスケールアップする場合、培地

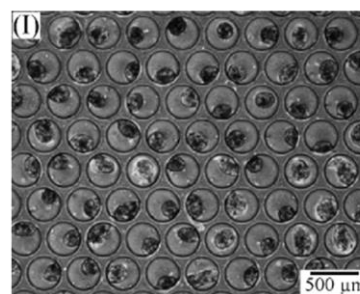


図 4-1 マイクロアレイチップを用いたスフェロイドの大量調製
参考文献 [1]より引用

や増殖因子、細胞外マトリックスなどの費用がかかること、大規模な培養スペースを要すること、作業時間がかかることなど様々な問題が生じる。そのため、大量培養においては、①複雑な操作を伴わず一度に多くの細胞培養が可能なること、②培地体積当たりの細胞密度

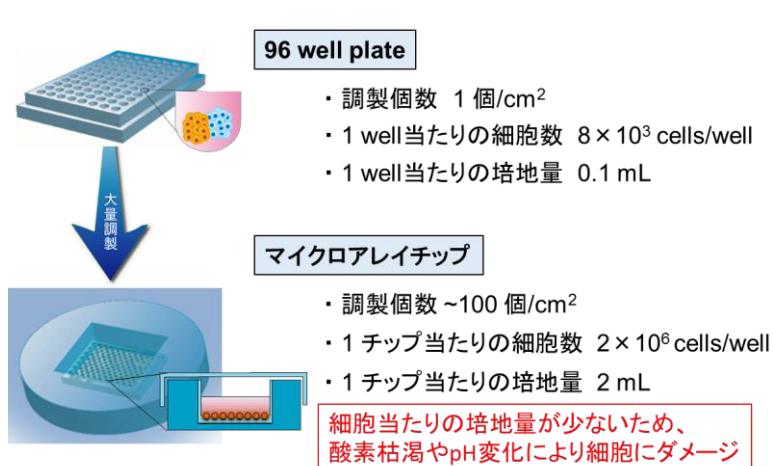


図 4-2 マイクロアレイチップを用いたスフェロイドの大量調製における課題

を高く設定できること、③細胞が大量培養中に酸素枯渇、pH 変化などによるダメージを受けないことが求められる。これらの条件を満たしスフェロイドを大量培養するための手法として、マイクロアレイチップを用いた手法が提案されている [1-3]。これは、培養容器の底面に微細加工技術を用いて微小なウェルを複数配置したチップに、単に細胞懸濁液を播種することで、すべてのウェル内で均一なサイズのスフェロイドを形成することができる方法である。培地体積当たりの細胞密度を高く設定できるため、広い培養スペースが必要なく、簡便にスフェロイドを調製できる。しかしながら、この手法では、細胞密度が非常に高いため、培養中の細胞の酸素消費が気液界面からの酸素供給で十分に補うことができず、細胞が低酸素に陥るという課題がある [4]。この課題を解決するため、本研究では、大量培養時の酸素供給効率を改善したマイクロアレイチップの開発に取り組んだ。

4.2.2 マイクロアレイチップの酸素供給効率の改善

大量培養中の細胞への酸素供給を改善するためには、エアレーションにより酸素を供給することや、培地を還流することなどが考えられる。これらの方法は、シリンジポンプなどの装置を用いる必要があるために手間がかかる上に、コンタミネーションのリスクが増す。また、細胞へ物理的なダメージが加わるため実現不可能である。そこで本研究では、従来の培養では考慮されていなかった培養容器底面からの酸素供給を可能にすることで培地への酸素供給を改善できないかと発想した。一般的にマイクロアレイチップの酸素供給は培地表面の気液界面からのみに限られ、底面及び側面からの酸素供給は見込めない。これはマイクロアレイチップが酸素透過性の低いプラスチックでできているためである。チップを酸素透過性の高い材料で作製すれば、底面及び側面からの酸素供給が可能となり、培地への酸

素供給量は確実に増加する。そこで高い酸素透過性を有するポリマーゆえにコンタクトレンズの原料にも用いられているポリジメチルシロキサン (PDMS) に着目した。PDMS は、同じ厚さ・濃度勾配の培地の約 20 倍の酸素透過度を示す。このため、PDMS をマイクロアレイチップの材質として用いることで、培養細胞への酸素供給を改善することが可能となるのではないかと発想した。本研究では、このような発想に基づき、PDMS 製のマイクロアレイチップを作製し、毛包原基の大量調製を目指した。

4.3 毛包原基チップの作製

4.3.1 本節の目的

本節の目的は、酸素透過性の高いシリコンゴムであるポリジメチルシロキサン (PDMS) を用いて、毛包原基の大量培養用に複数の well 構造を有するマイクロアレイチップを作製することである。

4.3.2 装置・試薬

以下に本実験に用いた装置・試薬を示す。

【装置】

- ・ 機械加工装置 MDX-540s : Roland
- ・ 実体顕微鏡 : キーエンス社製

【試薬】

- ・ オレフィンプレート (ZEONOR 1430R) : 日本化学工業株式会社
ゼオン株式会社
- ・ PDMS 硬化剤 (CAT-1300) : 信越化学工業株式会社
- ・ エポキシ樹脂 (クリスタルレジン NEO) : 日新レジン株式会社
- ・ Pluronic F-127 : SIGMA
- ・ Poly-dimethyl siloxane (PDMS ; KE-1300T) : 信越

4.3.3 実験操作

全体的な操作の流れを以下に示す。

凹鑄型の作製

3D-CAD ソフトウェア (Vcarve Pro 6.5) で切削パターンを作製し、機械加工装置を用いて ZEONOR 1430R プレート上にパターンを掘り出すことで凹鑄型を作製した。

凸鑄型の作製

作製した凹鑄型にエポキシ樹脂を注ぎ、2 日間硬化することで凸鑄型を作製した。

毛包原基チップの作製

PDMS (KE-1300T) と PDMS 硬化剤 (CAT-1300) を 10 : 1 の比率で混合し、凸鑄型を貼り付けた 6 cm φ dish に注ぎ 80°C のオーブンで 3 時間インキュベートすることで毛包再生チップを作製した。

毛包原基チップのオートクレーブ

未反応物を除去する為、作製した毛包再生チップを 500 mL ビーカーに入れ、蒸留水で浸したのち、オートクレーブした (2 回)。

毛包原基チップ表面の細胞非接着処理

a) プルロニック溶液作製 ビーカーに Pluronic F-127 (粉末) 2 g と PBS 48 g を加え、スターラーで 1 時間攪拌することで 4% Pluronic F-127 溶液を調製した。調製した溶液は濾過滅菌を行った。

b) Pluronic F-127 コーティング 毛包再生チップに 1 mL の PBS を加えてピペットティンクすることで 3 回洗浄したのち、4% Pluronic F-127 溶液を 2 mL を加えた後、37°C で 6 ~ 24 時間インキュベートした。

c) 洗浄 4% Pluronic F-127 溶液をアスピレータで吸引した後、PBS で 3 回洗浄した。

4.3.4 実験結果と考察

大量の毛包原基を作製するために、微細加工を用いて培養容器 (毛包原基チップ) を作製した (図 4-3)。オレフィン樹脂に直径 1 mm、深さ 500 μm の丸底 well を約 100 wells/cm² の規則的間隔で切削した。このデザインは日本人の成人男性の平均頭髪密度 (約 100 本/cm²) に合わせて設定した。また、well の深さについては、実際に予備検討を行った。浅い well 形状 (深さ 300 μm) では曲率の関係で細胞がウェルの中心部に集まりにくく、1 つのウェルに複数の凝集体が形成される。また、深いウェル (深さ 1 mm) では、後述する毛包原基のハイドロゲルへの転写が難しい。以上の結果より、深さ 500 μm の丸底 well とすることに決定した。これをエポキシ樹脂に転写後、さらに酸素透過性シリコンゴムである PDMS に転写することで、図 2-16 に示す培養容器を作製した。細胞非接着コートをした毛包原基チップに細胞の混合懸濁液を播種すると、細胞は重力により、各 well 内にほぼ均一に入り、数時間の間にすべての well 内で自発的に 1 つの細胞凝集体が形成されるように設計した。つまり、細胞の混合懸濁液を播種するのみで、一度に大量の毛包原基を形成させることが可能である。また、播種する細胞密度を変更することで容易にサイズの異なる均一な毛包原基を大量調製することも可能である。毛髪再生チップでは、well 間隔を頭髪と同じ密度で配置でき、毛髪再生部位と同じ面積の培養サイズで培養するのみで移植用の毛包原基を調製で

きるため、大量培養のために大きな装置を必要とせず、インキュベータさえあれば、必要量の毛包原基を調製できる点も大きな利点である。

4.3.5 本項のまとめ

本項では、微細加工技術をもちいて、底面に複数の well を有する PDMS 製の培養容器を作製した。

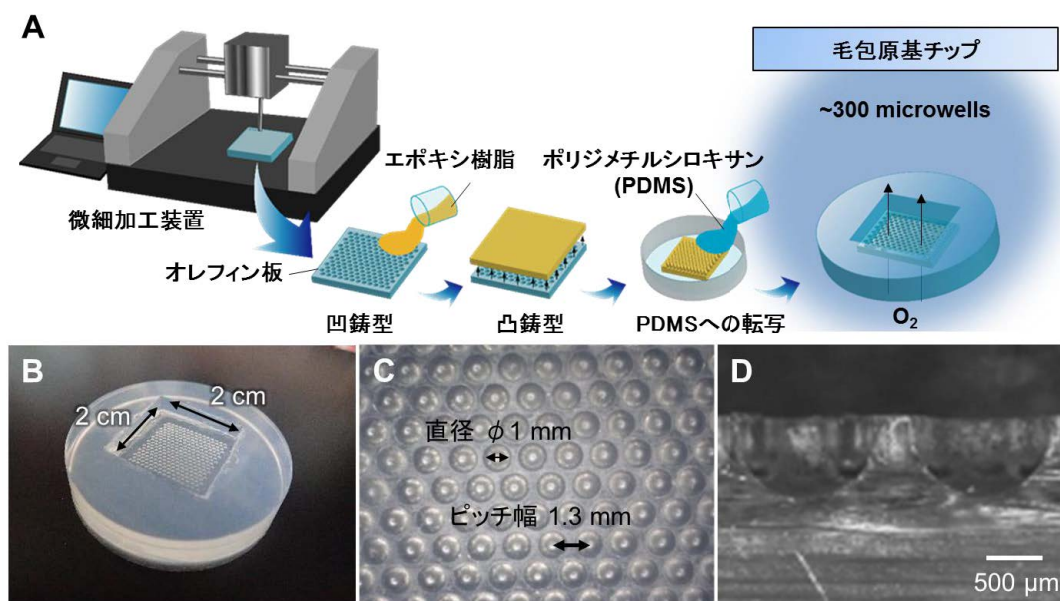


図 4-3 毛包原基チップの作製 A : 毛包原基チップの作製法、B : 作製した毛包原基チップ、C : チップの well 構造、D : well の断面図

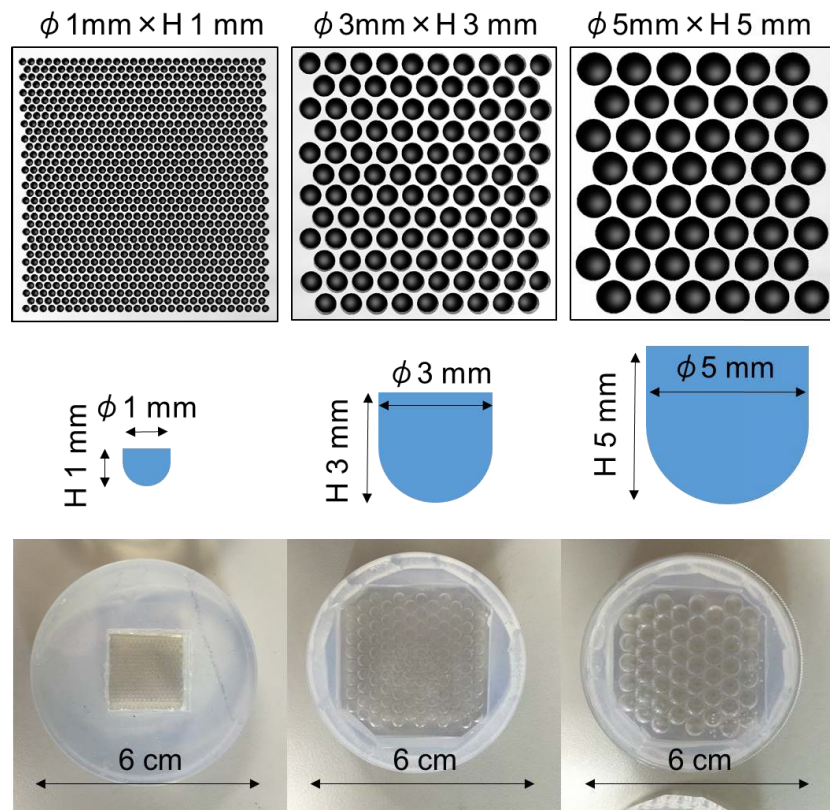


図 4-4 well サイズの異なる毛包原基チップ ドリル、デザインを変更することで容易に well サイズや well の深さを変更することが可能

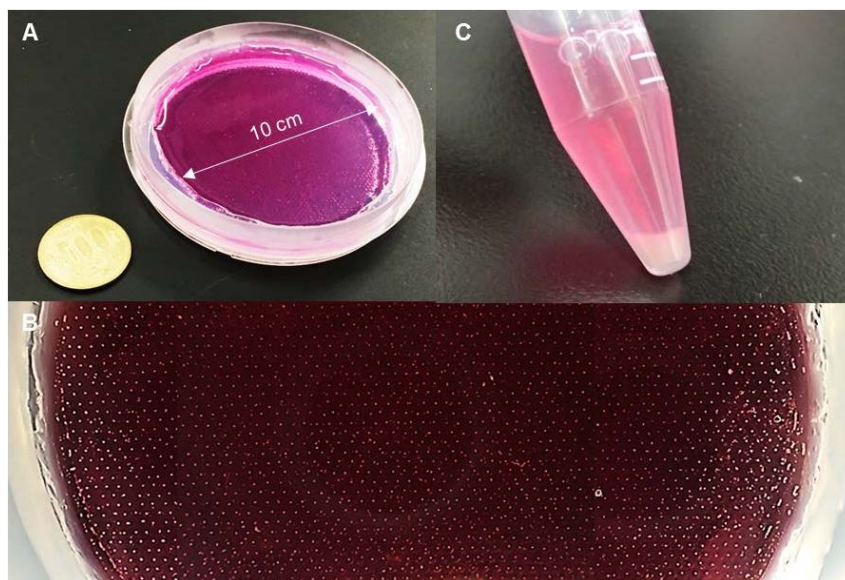


図 4-5 5000 個の well を有する毛包原基チップ A: 作製した毛包原基チップ、B、C: チップで作製した 5000 個のスフェロイド

4.4 毛包原基チップを用いた毛包原基の大量培養

4.4.1 本節の目的

本節の目的は、毛包原基チップを用いて毛包原基の大量培養を行うことである。毛包原基チップに上皮系細胞と間葉系細胞の細胞混合液を播種することで、底面に配置した well 内で播種した細胞が毛包原基を構築するかを検討した。

4.4.2 装置・試薬

以下に本実験に用いた装置・試薬を示す。

【装置】

- ・ 倒立型位相差顕微鏡, IX-71 : オリンパス社製
- ・ 倒立型蛍光顕微鏡, DP-71 : オリンパス社製
- ・ デジタルマイクロスコープ : KEYENCE
- ・ 共焦点レーザー顕微鏡, LSM700 : Carl Zeiss 社製
- ・ Real time PCR system, Step One™ : Applied Biosystems
- ・ 微量サンプル分光光度計 : GE ヘルスケア

【試薬】

- ・ 妊娠マウス (C57BL/6jcl 妊娠 18 日) マウス : 日本クレア
- ・ Dulbecco's modified eagle medium high glucose (DMEM) : SIGMA
- ・ Fetal bovine serum (FBS) : SIGMA
- ・ Penicillin-Streptomycin (P/S) : GIBCO
- ・ HuMedia-KG2 : KURABO
- ・ Buffer RLT、70%エタノール、Buffer RW1、Buffer RPE、RNase free water
- ・ QIA Shredder スピンカラム (紫)、RNeasy スピンカラム (ピンク)
- ・ PCR 用 1000 μ L、200 μ L ピペットとそのチップ
- ・ RNase free water 吹きかけ用
- ・ Nuclear free water : Qiagen
- ・ QuickGene : KURABO
- ・ SYBR® Green Real-Time PCR Master Mixes : Thermo Fisher Scientific
- ・ ピクリン酸 : WAKO
- ・ 20%ホルマリン液 : WAKO
- ・ 酢酸 : SIGMA
- ・ マイヤーヘマトキシリン染色液 : WAKO
- ・ エオシン Y 溶液 : 武藤化学
- ・ 10%中性緩衝ホルマリン液 : WAKO
- ・ スクロース : WAKO
- ・ OCT compound : サクラファインテック
- ・ Phosphate buffered saline (PBS) : Thermo Fisher Scientific
- ・ Tween-20 : Sigma Aldrich
- ・ Anti-HIF1 α 抗体 : SIGMA
- ・ Rabbit anti-Rat IgG Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 conjugate : Life technology

- ・ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) :
WAKO

- ・ Mount-Quick : 大道産業

4.4.3 実験操作

全体的な操作の流れを以下に示す。

マウス胎児細胞の採取

間葉系細胞及び上皮系細胞をマウス胎児から採取した。

チップへの播種

プルロニック処理をした毛包原基チップに上皮系細胞 1×10^6 cells/mL と間葉系細胞 1×10^6 cells/mL の細胞混合懸濁液を 1 mL 加え、3 日間培養を行った。比較として、周囲をアクリルで囲い、下からの酸素供給を遮断したチップで同様の実験を行った (図 4-6)。本節では毛包原基チップを Oxy (+)、比較として用いたチップを Oxy (-) とした。

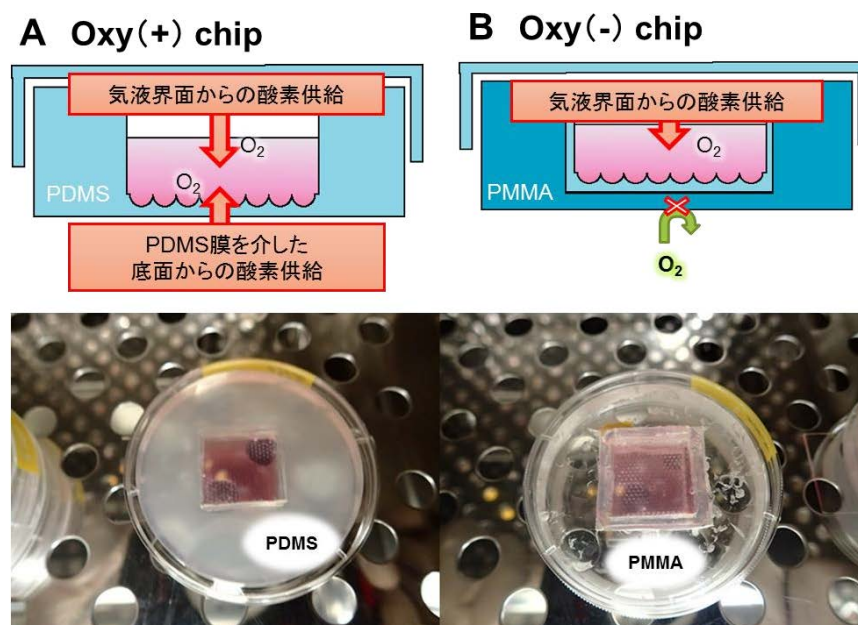


図 4-6 毛包原基チップの酸素供給 A: 作製した Oxy (+)チップ、B: 作製した Oxy (-)

細胞観察

培養 3 日後に位相差顕微鏡で観察した。

HE 染色

培養 3 日後の組織を以下の手順で HE 染色した。

- 組織固定 パラホルムアルデヒド液に 1 日浸漬することで組織の固定を行った。
- パラフィン包埋 70, 90, 100 v/v%エタノール, 100 v/v%エタノール-2-ブタノール 1 : 1

溶液, 2-ブタノール, 2-ブタノール-パラフィン 1 : 1 溶液, パラフィンに 1 時間ずつ浸した後、パラフィンブロックを作製した。

c) 切片作製 回転式マイクロトームを用いてパラフィン切片を作製した。

d) HE 染色 以下の手順で HE 染色を行った。

HIF1a 染色

培養 3 日後の組織の HIF1a 染色を行った。

RT-PCR 解析

3 日間培養後のサンプルの、RT-PCR 解析を行った。

	Forward primer	Reverse primer
Versican	gACgACTgTCTTggTgg	ATATCCAAACAAgCCTg
Tgfb2	TCCCgAATAAAAgCgAAgAg	AAgCTTCgggATTTATggTg
Nexin	CCACgCAAAGCAAACgAC	gAAACCggCCTgCTCATCCT
Igfbp5	ATgAgACAaggAATCCgAACA	TCAACgTACTgCTgTCgAA
HIF1a	GGAGATCCTTCGAGGAGCACTT	GGCGATTTAGCAGATATAAGAA
GAPDH	AgAACATCATCCCTgCATCC	TCCACCACCCTgTTgCTgTA

移植

3 日間培養後の組織を、マウス皮下に移植した。

観察

毛包原基を移植したマウスは 2 日に 1 回肉眼観察を行い、移植 18 日目にマイクロスコープを用いて観察した。

4.4.4 実験結果と考察

毛包原基の大量調製時の酸素供給の効果を評価するため、従来の細胞培養容器と同様に底面がプラスチック製のチップ (Oxy (-) チップ) をコントロールとして作製し、毛包原基形成の比較を行った。Oxy (-) チップでは、酸素供給が培地表面からのみ行われる。上皮系細胞と間葉系細胞の細胞懸濁液をチップに播種すると、細胞は自発的に well 内に均一な細胞数が分散され、各 well 内で 1 つの凝集体を形成した。3 日間培養した結果、底面からの酸素供給がある毛包原基チップ (Oxy (+) チップ) の場合、2 種類の細胞はそれぞれ分離し、毛包原基を形成したが、酸素供給がない Oxy (-) チップの場合は細胞選別現象が見られず、毛包原基が形成されなかった (図 4-7 A)。この際、Oxy (+) チップ播種 3 日後に形成した

毛包原基の形態を観察する限り、上皮系細胞の凝集体と間葉系細胞の凝集体のサイズはほぼ同じで均一であり、形成した毛包原基は細胞懸濁液の混合比率と同様の上皮 1 : 間葉 1 の比率で構築されていると考えられる。また、低酸素マーカーである HIF1a は底面からの酸素供給がない Oxy(-)チップで高く発現しており、発毛に関わる遺伝子である Versican, Nexin, Tgfβ2, Igfbp5 などの発現は底面からの酸素供給がある Oxy (+) チップが Oxy (-) チップよりも高い値を示した (図 4-7 B, C)。さらに、調製した毛包原基を移植した場合、Oxy (+) チップの場合では毛髪の再生が見られたが、Oxy (-) チップでは毛髪の再生は見られなかった (図 4-7 D)。先行研究では、本実験と同様に PDMS で作製した培養容器 (Oxy chip) と底面をアクリルで覆った培養容器 (Non oxy chip) を作製し、HepG2 細胞を培養した際の溶存酸素濃度を測定している [4]。その結果、Oxy chip では、培養開始後 120 mmHg の溶存酸素濃度を維持したが、Non oxy chip では、培養開始後数時間で 60 mmHg の溶存酸素濃度まで減少し、その値を維持していた (図 4-8)。これは、PDMS を介した底面からの酸素供給により、スフェロイドの大量培養においても外部環境とほぼ同様の酸素濃度を維持できることを示している。また、それぞれの培養容器で作製したスフェロイドの低酸素障害を評価したところ、Oxy chip で作製したスフェロイドは障害を受けていないのに対し、Non oxy chip では、低酸素によりスフェロイド内部の細胞が低酸素障害を受けていた。

本実験においても、Oxy(+)チップが培地中の溶存酸素濃度を高く保つことができたために、細胞が低酸素による障害を受けることなく、毛包原基を大量に調製することができたと考えられる。また興味深いことに、酸素供給を十分に行うことが可能なハンギングドロップ法を用いた毛包原基の培養において、ドロップ内で細胞が 1 つの凝集体を形成せず、毛包原基の形成も見られなかった (図 4-9)。培養容器の材質に PDMS を使用することで大量培養中の酸素供給を改善した毛包原基の培養容器は、本研究により初めて作製されたものであり、この培養容器の開発によって、初めて毛包原基を大量に調製する技術が開発されたと言える。

4.4.5 本項のまとめ

本項では、毛包原基チップを用いることで、毛包原基を簡便かつ大量に調製できることを示した。

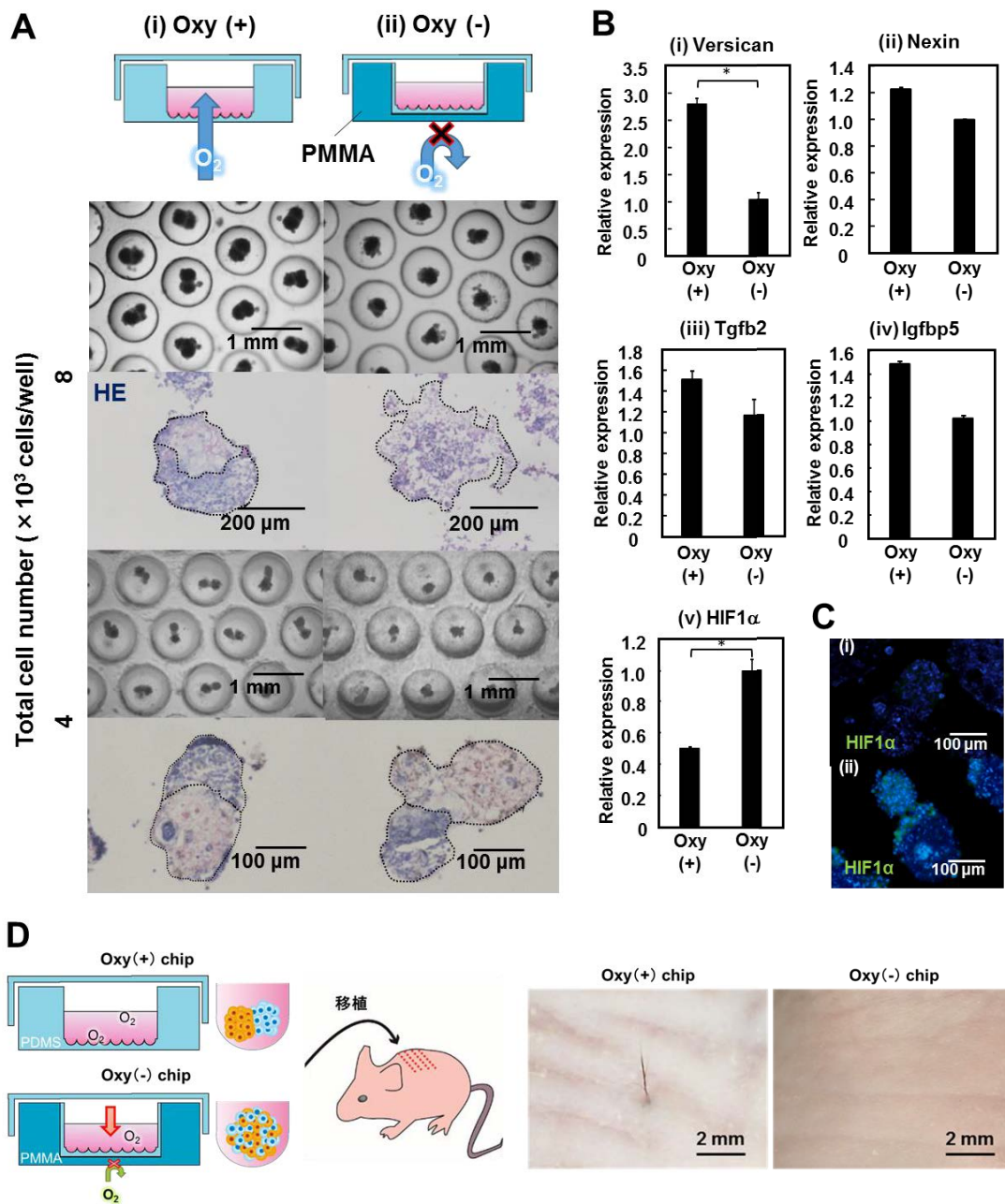


図 4-7 毛包原基チップ (Oxy (+)) を用いた毛包原基の大量培養 A : 上皮系細胞と間葉系細胞を Oxy (+) チップ及び Oxy (-) チップで 3 日間培養した様子、B : Oxy (+) チップ及び Oxy (-) チップで 3 日間培養した細胞の毛包誘導及び低酸素マーカーの相対発現比解析、C : Oxy (+) チップ及び Oxy (-) チップで 3 日間培養した組織の低酸素マーカーの蛍光免疫染色、D : Oxy (+) チップ及び Oxy (-) チップで 3 日間培養した組織の免疫不全マウスへの移植による毛髪再生 (移植 18 日後)

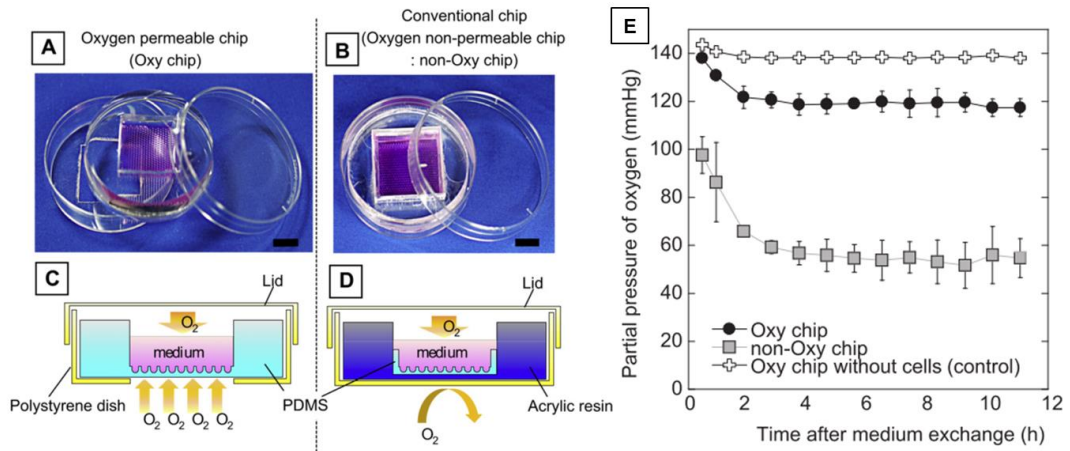


図 4-8 PDMS スフェロイドチップでの培養時の溶存酸素濃度：参考文献 [4]より引用
 A : Oxy (+)チップ、B : Oxy (-)チップ、C : Oxy (+)チップの酸素供給、D : Oxy (-)チップの酸素供給、E : 溶存酸素濃度

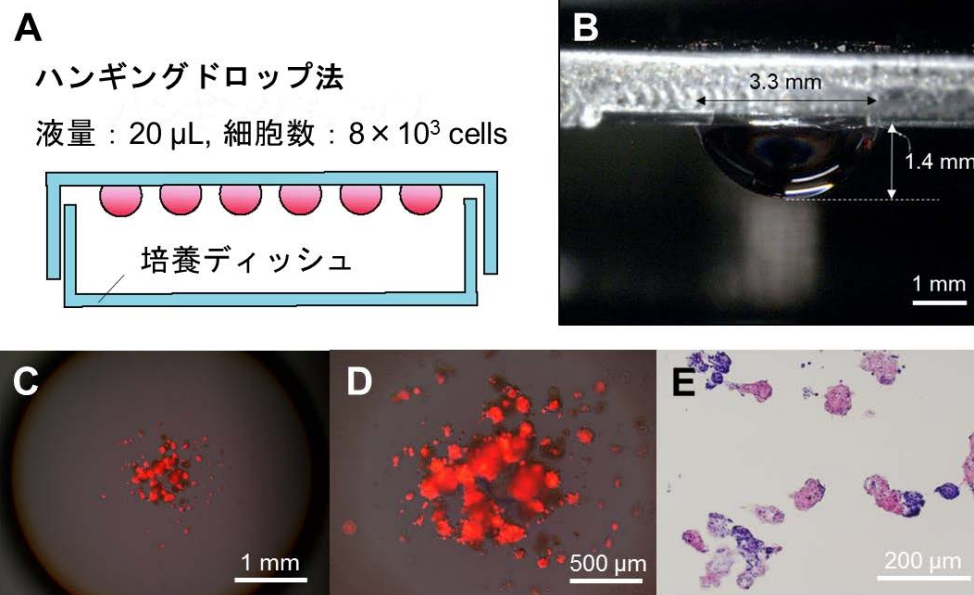


図 4-9 ハンギングドロップ法を用いた毛包原基形成 A : ハンギングドロップ法、B : 作製したドロップレット、C、D : 3日間培養後の組織体 (赤 : 間葉系細胞、黒 : 上皮系細胞)、E : 切片の HE 染色

4.5 毛包原基と酸素

4.5.1 本節の目的

毛包原基チップは酸素透過性が高いため、インキュベータ雰囲気中の酸素濃度を調整することで、細胞へ暴露される酸素濃度を調整することが可能となる。本節では、毛包原基培養時のインキュベータ内の酸素濃度を 2, 10, 21 % と設定し、毛包誘導能を向上させるの最適な酸素濃度を評価した。

4.5.2 装置・試薬

以下に本実験に用いた装置・試薬を示す。

【装置】

- Real time PCR system, Step One™ : Applied Biosystems
- 微量サンプル分光光度計 : GE ヘルスケア
- 酸素コントローラ : 協同インターナショナル

【試薬】

- マウス胎児 (C57BL/6jcl 妊娠 2w♀) マウス
- 毛包原基チップ
- Dulbecco's modified eagle medium high glucose (DMEM) : SIGMA
- Fetal bovine serum (FBS) : SIGMA
- Penicillin-Streptomycin (P/S) : GIBCO
- HuMedia-KG2 : KURABO
- Buffer RLT、70%エタノール、Buffer RW1、Buffer RPE、RNase free water
- QIA Shredder スピンカラム (紫)、RNeasy スピンカラム (ピンク)
- PCR 用 1000 μL、200 μL ピペットとそのチップ
- RNase free water
- Nuclear free water : Qiagen
- QuickGene : KURABO
- SYBR® Green Real-Time PCR Master Mixes : Thermo Fisher Scientific

4.5.3 実験操作

マウス胎児細胞の採取

間葉系細胞及び上皮系細胞をマウス胎児から採取した。

チップへの播種

遠心後、新しい培地をそれぞれ添加し、間葉系細胞及び上皮系細胞をそれぞれ 5×10^5 cells/chamber の細胞密度で毛包再生チップに播種した。培地は、間葉細胞培養培地 (DMEM+10%FBS+1%P/S) と HuMedia-KG2 の 1 : 1 混合培地を用いた。

RT-PCR

培養3日目のサンプルをの Versican 及び HIF1 α 遺伝子解析を RT-PCR により行った。

	Forward primer	Reverse primer
Vcan	gACgACTgTCTTggTgg	ATATCCAAACAAgCCTg
HIF1 α	ggAgATCCTTCgAggAgCACTT	ggCgATTTAgCAgCAgATATAAgAA
GAPDH	AgAACATCATCCCTgCATCC	TCCACCACCCTgTTgCTgTA

4.5.4. 実験結果と考察

毛包原基チップを 2, 10, 21%O₂ 環境のインキュベータ内で 3 日間培養することで毛包原基を調製し、培養後の毛包原基の毛包誘導マーカである Versican 及び低酸素マーカである HIF1 α の遺伝子発現について RT-PCR により定量した。その結果、酸素濃度が上昇するにつれて、毛包原基の HIF1 α の発現が減少し、毛包形成の際に発現する遺伝子としても知られる Versican 遺伝子の発現が向上する傾向が見られた (図 4-10)。つまり、毛包原基の調製には細胞が低酸素に陥ることのない十分な酸素を供給することが必要であることが示された。

4.5.5. 本節のまとめ

本項では、毛包原基チップでの毛包原基培養において、21%O₂ 環境が適した培養環境であることを示した。

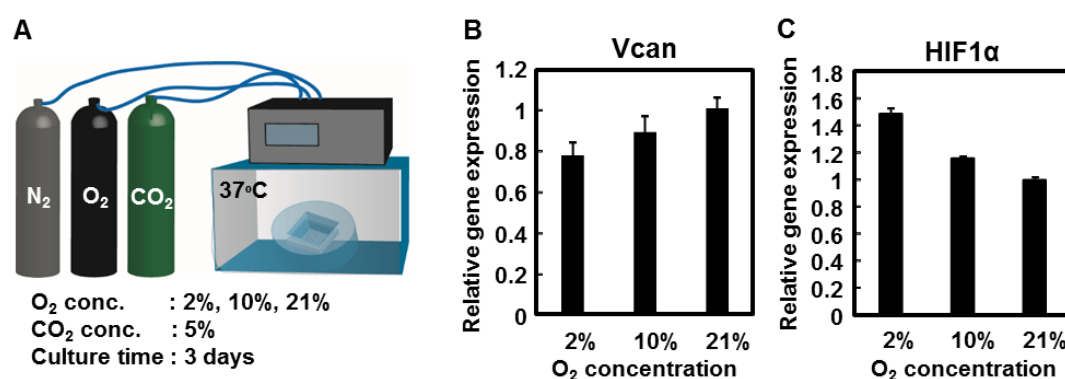


図 4-10 毛包原基の低酸素培養 A : 酸素コントローラを用いた毛包原基調製時の酸素濃度の検討、B : 3 日間培養後の毛包原基の Versican 遺伝子発現、C : 3 日間培養後の毛包原基の HIF1 α 遺伝子発現

4.6 毛包原基チップで調製した毛包原基の移植による毛包再生

4.6.1 本節の目的

本節では、毛包原基チップで調製した大量の毛包原基を回収し、規則的な配置を保ったまま、ゲルに転写することで回収し、これを免疫不全マウス皮下に移植することで、毛髪再生能および毛周期を評価することを目的とした。

4.6.2 装置・試薬

【装置】

- ・ 小動物用イソフルラン麻酔器：バイオリサーチセンター株式会社
- ・ デジタルマイクロスコープ：KEYENCE
- ・ 倒立型位相差顕微鏡, DP-71：OLYMPUS
- ・ 回転式マイクロトーム：Leica

【試薬】

- ・ 妊娠マウス (C57BL/6jcl 妊娠 18 日) マウス：日本クレア
- ・ Penicillin-Streptomycin (P/S)：GIBCO
- ・ ICR ノードマウス 5 週齢♂：オリエンタル酵母
- ・ HuMedia-KG2：KURABO
- ・ 20 G V ランス：日本アルコン
- ・ イソフルラン：MSD Animal Health
- ・ Prime surface 96 U plate：住友ベークライト社製
- ・ コラーゲンゲル：新田ゼラチン
- ・ Dulbecco's modified eagle medium high glucose (DMEM)：SIGMA
- ・ ピクリン酸：WAKO
- ・ 20%ホルマリン液：WAKO
- ・ 酢酸：SIGMA
- ・ Fetal bovine serum (FBS)：SIGMA
- ・ マイヤーヘマトキシリン染色液：WAKO
- ・ エオシン Y 溶液：武藤化学

4.6.3 実験操作

全体的な操作の流れを以下に示す。

マウス胎児細胞の採取

間葉系細胞及び上皮系細胞をマウス胎児から採取した。

チップへの播種

遠心後、新しい培地をそれぞれ添加し、間葉系細胞及び上皮系細胞をそれぞれ 5×10^5 cells/chamber の細胞密度でマイクロアレイチップに播種した。培地は、間葉細胞培養培地 (DMEM+10%FBS+1%P/S) と HuMedia-KG2 の 1 : 1 混合培地を用いた。

A. 毛包原基を回収し1つずつ移植

移植

毛包原基をピペッティングにより回収し、免疫不全マウスの皮下に移植した。

観察

毛包原基を移植したマウスは2日に1回マイクロスコープを用いて観察した。

B. 毛包原基をゲルに転写し、規則的な間隔を保ったまま移植

コラーゲンゲルのゲル化

3日間培養後、培地を吸い取り、コラーゲンゲル溶液を1 mL 加え、滅菌ガーゼを支持体としてゲル内に包埋した。4°C 冷蔵庫、シーソー型振盪機で50分ならした後、40分間37°Cでインキュベートした。

毛包原基のゲル転写

培地を加え、容器の端をつつくようにしてゲルをはがすことで毛包原基の規則配置を保ったままゲルに転写した。

移植

免疫不全マウスの背皮膚に転写したゲルを移植した。

観察

毛包原基を移植したマウスは2日に1回マイクロスコープを用いて観察した。

HE 染色

移植18日目の移植部を以下の手順でHE染色した。

a) 組織固定 ブラン固定液（ピクリン酸飽和水溶液 15ml、20ホルマリン 5ml、氷酢酸 1mlの混合溶液）に1日浸漬することで組織の固定を行った。

b) パラフィン包埋 70, 90, 100 v/v%エタノール, 100 v/v%エタノール-2-ブタノール 1 : 1 溶液, 2-ブタノール, 2-ブタノール-パラフィン 1 : 1 溶液, パラフィンに1時間ずつ浸した後、パラフィンブロックを作製した。

c) 切片作製 回転式マイクロトームを用いてパラフィン切片を作製した。

d) HE 染色 以下の手順でHE染色を行った。

4.6.4 実験結果と考察

毛包原基チップで調製した毛包原基をピペッティングにより回収し、免疫不全マウス皮下に移植することで、大量培養した毛包原基の毛包再生能を評価した。その結果、96 well plate で調製した同細胞数の毛包原基とほぼ同等の毛包再生効率および平均再生本数で免疫不全マウス皮下から毛髪再生が観察された（図 4-11）。これにより、毛包原基チップで大量

調製した毛包原基が生体と同等の毛包を再生する能力を有しており、移植組織として十分な機能を有する組織体と判断した。続いて、毛包再生チップで調製した毛包原基をより簡便かつ効率的に移植するため、図 4-12 に示すように毛包原基の規則配置を保った状態で皮下に移植する手法を試みた。毛包原基チップの培地を吸い取り、支持体およびコラーゲンを流し込んだ後、30 分のインキュベートによりコラーゲンをゲル化することで、毛包原基を規則的な配置を保った状態でゲルシートに転写した。転写したゲルシート（毛包原基転写シート）をチップから回収し、毛包原基 1 列ごとをメスで切り取り、免疫不全マウス皮下に作製した幅 2 cm 程度のスリットに挿入するように移植した。移植後 14 日目に移植したスリット部から高密度に毛周期をもつ毛が形成され、さらに、この毛は移植時と同様に 1 列に綺麗に並んでいた。さらに再生した毛は毛周期を繰り返すことも観察された。

4.6.5 本節のまとめ

本節では、毛包再生チップで調製した毛包原基をコラーゲンゲルに転写することで、毛包原基転写シートを作製し、これを移植することで規則的に並んだ毛髪を再生できることを示した。

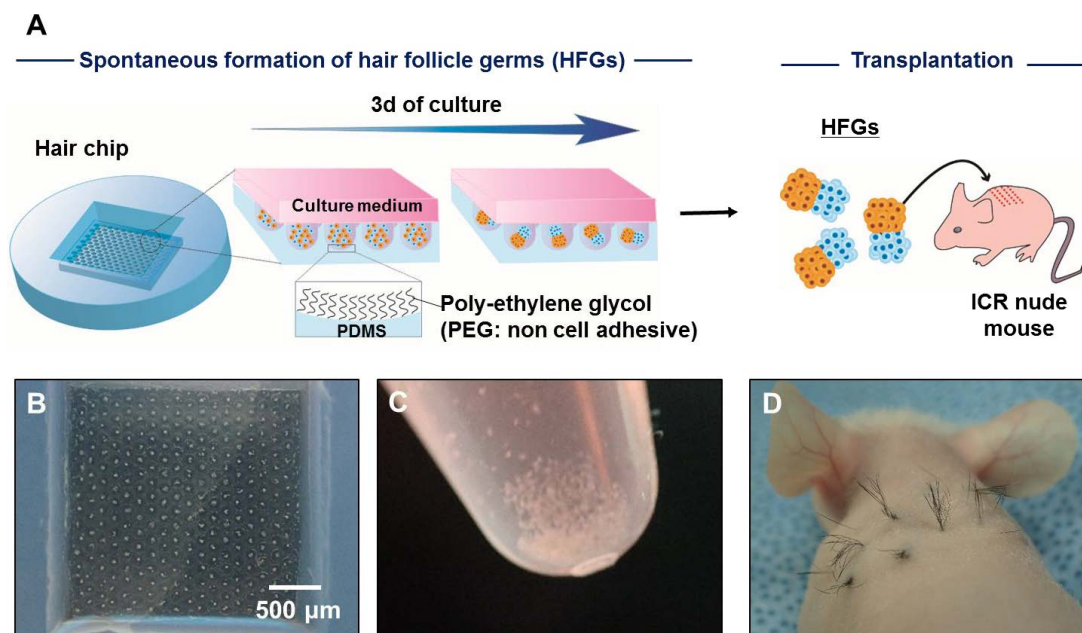


図 4-11 毛包原基の大量移植による毛の高密度再生 A: 毛包原基の大量移植、B: 3 日間培養後のチップ内の毛包原基、C: 回収した毛包原基、D: 移植 18 日後に再生した毛

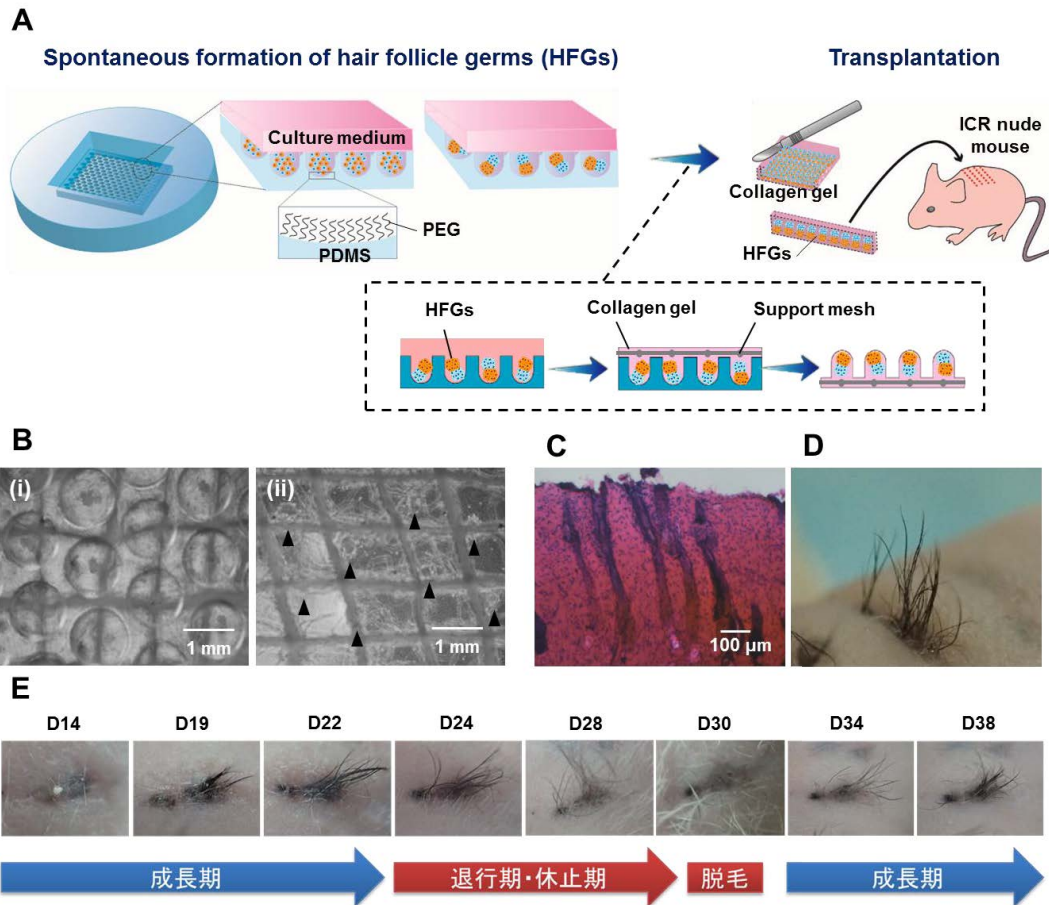


図 4-12 毛包原基転写シート移植による毛の高密度再生 A: 毛包原基転写シートの作製と移植、B: 毛包原基のコラーゲンゲル転写 (i) 転写前、(ii) 転写後、C: 移植 21 日後の皮膚切片の HE 染色、D: 移植 21 日後の移植部、E: 再生した毛の毛周期

4.7 *in situ* 架橋ハイドロゲルを用いた毛包原基転写シートの作製

4.7.1 はじめに

前章では、毛包再生チップ内に作製した毛包原基をコラーゲンゲルに転写し、それを皮下に作製したスリットに挿入するように移植することで、スリットから高密度に大量の毛髪を再生できることを示した。一方、毛包原基の転写に用いたコラーゲンゲルは力学的強度が不十分であり、移植の際のハンドリングが難しい。また、ゲル化に1時間以上の時間を要するため、細胞への悪影響が懸念される。このような課題を解決するために、本節では、生体適合性が高い材料を用いて、ハンドリングに十分な力学強度を有し、素早くゲル化するハイドロゲルを開発する。第2項では、既存の化学架橋ハイドロゲルの利点及び欠点を指摘し、*in situ* 架橋ハイドロゲルが毛包再生シートのハイドロゲルとして適していることを明示する。第3項では、*in situ* 架橋ハイドロゲルの合成方法について述べ、作製したハイドロゲルのゲル化時間を評価する。第4項では、*in situ* 架橋ハイドロゲルの物性について、ゲル孔径、力学的強度、細胞毒性を指標に評価する。第5項では、*in situ* 架橋ハイドロゲルを用いて毛包原基を転写することで、ハンドリングが容易な毛包原基転写シートを作製できるか評価する。

4.7.2 化学架橋ハイドロゲル

生体由来マトリックスの抱えるゲル化時間とゲル強度の課題を解決するため、細胞外マトリックスを構成する成分を化学的に架橋したハイドロゲルの研究が世界中で行われている。生体由来の原料に化学架橋を加えることで、ゲル強度を強化したハイドロゲルの作製が可能となる。また、反応速度の速い架橋反応を用いることで素早いゲル化を実現することができる。本節では、以上の条件を満たす化学架橋ハイドロゲルとして、光架橋性ハイドロゲルと *in situ* 架橋ハイドロゲルについて紹介する。

光架橋ハイドロゲル

Ali Khademhosseini らのグループは、ゼラチンにメタクリル酸を修飾させることで GelMa と呼ばれる光架橋ハイドロゲルを開発した [5]。このゲルは UV 光を照射すると架橋反応が起こり、非常に素早くかつ容易にゲルを作製でき、原料も目的に合わせて変更できる [6]。UV 光の当たらない部分はゲル化しないため、細胞組織のパターニングが可能であり (図 4-13) [7, 8]、近年では、バイオプリンターのインクとしても用いられている [9]。

また、皮下にゲル溶液を注入し、皮膚の上から UV を照射することでゲルを架橋することも可能であり、細胞移植のための生体ノリとしても期待されている [10]。このように、光架橋ハイドロゲルは再生医療分野で幅広い展開が期待されているが、ゲル作製時の長時間の UV 照射が細胞の DNA へダメージを与えることが懸念されている。そのため、UV などの外部刺激を必要とせず、素早くゲル化するハイドロゲルとして *in situ* 架橋ハイドロゲルが注目されている。

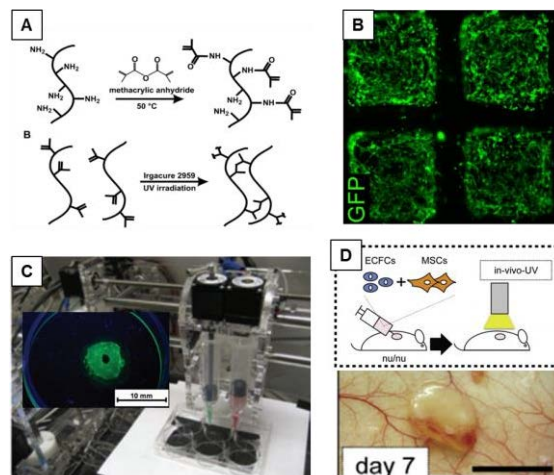


図 4-13 光架橋ハイドロゲル 参考文献 [5, 9, 10]より引用 A: 光架橋ゲルの架橋反応、B: 光架橋ゲルのパターンニング、C: 光架橋ゲルのバイオインクとしての利用、D: 光架橋ゲルの

In situ 架橋ハイドロゲル

2液のゲル原料を混合するのみで素早くゲル化するハイドロゲルは「その場所で」というラテン語の”*in situ*”を用いて *in situ* 架橋ハイドロゲルと呼ばれる (図 4-14)。この架橋に用いられる代表的な化学反応が Click chemistry である [11] (図 4-15)。これは、実験操作が非常に簡便で、水中や生体適合条件下においても、目的生成物を高収率で与え、副生成物を生じない反応の1つである。また、強固な結合をつくれる高化学選択的・高収率・高速反応が特徴である。この Click chemistry 反応で用いられる官能基を修飾した2種類の溶液を混合することにより、選択的な架橋反応が生じ、素早いゲル化が生じる [12-16]。光毒性もないため、①素早いゲル化、②力学的強度、③生体適合性を兼ね揃えたハイドロゲルとして、細胞パターンニング、腹膜癒着防止材、三次元組織の足場材料など幅広く利用されている。本研究では、*in situ* 架橋ハイドロゲルが毛包再生シートのハイドロゲルとしての条件を満たすと考え、*in situ* 架橋ハイドロゲルを合成し、毛包原基転写シートの作製に適用した。

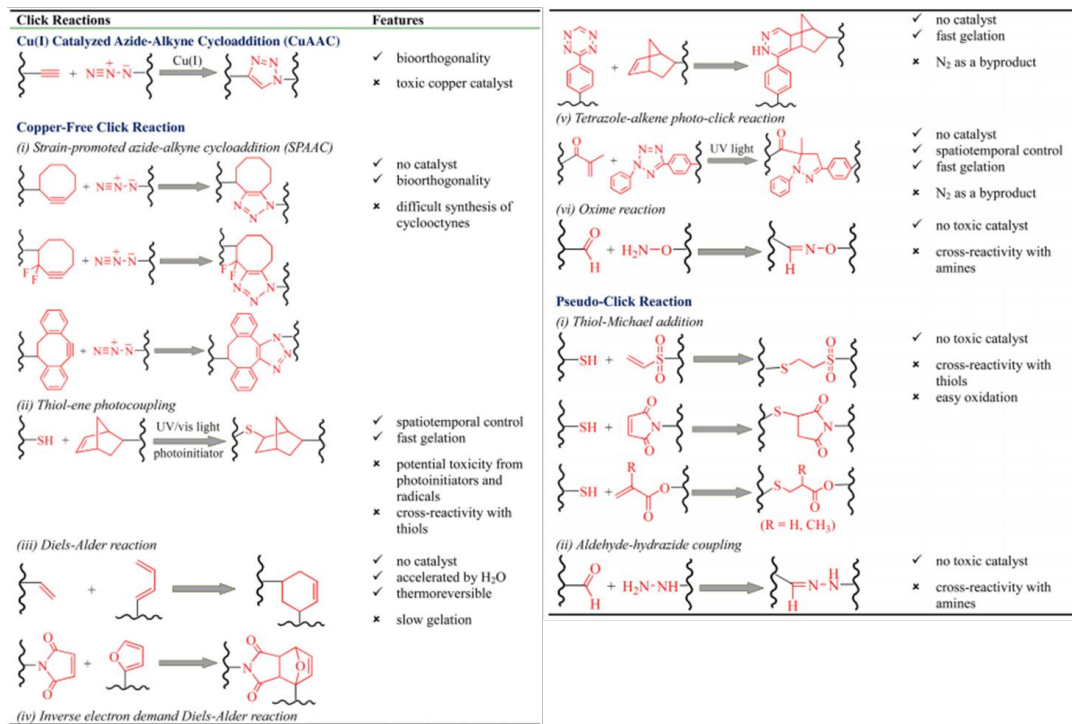


図 4-15 Click chemistry 反応 参考文献 [11]より引用

4.7.3 *in situ* 架橋 Gelatin-HA ゲル、*in situ* 架橋 Gelatin-CMC ゲルの合成

4.7.3.1 本節の目的

アルデヒドやケトンとヒドラジドと反応すると、常温で非常に早い脱水縮合反応を生じる。また、この反応は触媒を必要とせず、副生成物として水しか生じないため Click chemistry の中でも非侵襲的な反応である (図 4-16)。この反応をゲルの架橋部位として用いることで、つまり、アルデヒド基とヒドラジド基を化学修飾した 2 つのゲル原料を作製し 2 液を混合することで、素早く架橋し、生体適合性に優れたハイドロゲルを作製することを目的とした。また、原料として生体適合性の高いゼラチン (Gelatin) とヒアルロン酸 (HA) もしくはカルボキシメチルセルロース (CMC) を用いた。

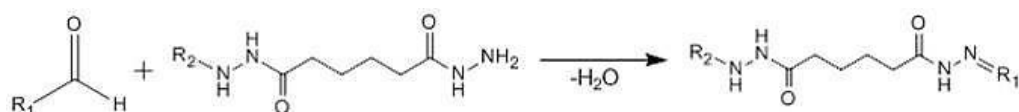


図 4-16 アルデヒドとアジピン酸ジヒドラジドの脱水縮合反応

4.7.3.2 EDC 試薬

1966年にHoareとKoshlandはカルボジイミドを用いてカルボキシル基の修飾をより穏和にかつ系統的に行うことを検討し、実用的な方法を発表した。この方法では、アミンとカルボキシル化合物の混合溶液にカルボジイミドを加えることで、両化合物間にペプチド結合が形成される。また、この反応はHOBt試薬を用いることによって副生成物の生成を抑えることができる。

4.7.3.3 過ヨウ素酸ナトリウム

過ヨウ素酸ナトリウムは有機合成分野で水溶性物質の酸化剤として用いられる。過ヨウ素酸ナトリウムを用いた反応として最も一般的なのは、1,2-ジオール（グリコール）の酸化裂開反応である。この部分構造を持つ化合物に過ヨウ素酸ナトリウムを作用させると間の炭素-炭素結合が切断され、対応するアルデヒドまたはケトンの構造を形成する。

4.7.3.4 装置・試薬

以下に本実験に用いた装置・試薬を示す。

【装置】

- ・ 300 ml 三角フラスコ：東京理化工器
- ・ 500ml ビーカー：東京理化工器
- ・ 透析膜 MWCO 6-8000：Thermo Fisher Scientific
- ・ 凍結乾燥機：EYELA, FDU-1200

【試薬】

- ・ Gelatin from porcine skin type A：Sigma-Aldrich
- ・ 1-ethyl-3-carbodiimido (EDC) (M=191.7)：和光純薬
- ・ 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) (M=135.12)：和光純薬
- ・ Adipodihydrazide (ADH) (M=174.20)：和光純薬
- ・ Dimethyl sulfoxide (DMSO) (M=78.14)：和光純薬
- ・ 1M HCl：和光純薬
- ・ 1M NaOH：和光純薬
- ・ Sodium chloride (NaCl) (M=58.44)：和光純薬
- ・ Ethanol (M=46.07)：和光純薬
- ・ 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic Acid (TNBS)：東京化成工業
- ・ tert-butyl carbazate (t-BC)：和光純薬
- ・ ヒアルロン酸ナトリウム (Mw~60,000)：キッコーマンバイオケミファ
- ・ Sodium periodate (M=213.89)：和光純薬
- ・ Ethylene glycol (M=62.07)：和光純薬
- ・ Carboxymethyl cellulose (Mw~90000)：Sigma

4.7.3.5 実験操作

全体的な操作の流れを以下に示す。

【Gelatin-ADH の合成】

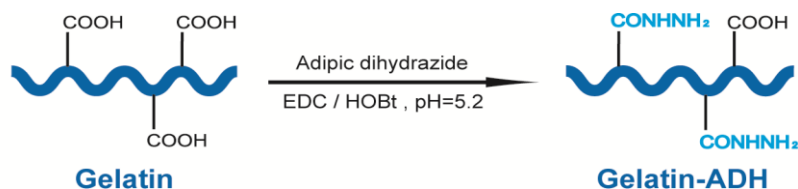


図 4-17 Gelatin-ADH の合成

Gelatin の溶解

300 ml ナスフラスコに 1 g の Gelatin を加え、100 ml の MilliQ 水で 1 晩攪拌して溶解した。

ADH の溶解

Gelatin 溶液に Adipodihydrazide (ADH) 1.42 g を入れ、溶解するまで 1 時間攪拌した。

EDC 試薬による架橋反応

HOBt 溶液 (HOBt 0.15 g に DMSO 1.0 ml、MilliQ 1.0 ml を混合) をパスツールピペットで滴下した。その後、同様に EDC 溶液 (EDC 0.15 g に DMSO 1.0 ml、H₂O 1.0 ml を混合) をパスツールピペットで滴下し、pH を 5.3 に調整した。以後 4 時間、30 分おきに pH 調整を行ったのち、1 晩攪拌を行った。

透析

7 日間透析膜 (MWCO : 6-8000) で透析を行った。

凍結乾燥

ろ紙 (No.1 : Advantec) を用いて不純物及び沈殿物を除去し、7 日間凍結乾燥を行った。

Gelatin-ADH の溶解

凍結乾燥体を 5 wt% / vol の NaCl 溶液に溶解した (Gelatin-ADH 濃度 5-10 mg/ml)。

エタノール再沈殿法を用いた精製

Ethanol 1L 中に Gelatin-ADH+NaCl 溶液を攪拌しながら滴下し、Gelatin-ADH を再沈殿させた。30 分攪拌させたのち、これを遠心分離機で遠心分離 (2,500 rpm、4 分間) することで再沈殿物を回収した。

透析

再沈殿 Gelatin-ADH を 100 ml の milliQ 水に加え 2 時間攪拌したのち、7 日間透析を行った。

凍結乾燥

ろ紙 (No.1 : Advantec) を用いて不純物及び沈殿物を除去し、7 日間凍結乾燥を行った。

【HA-CHO の合成】

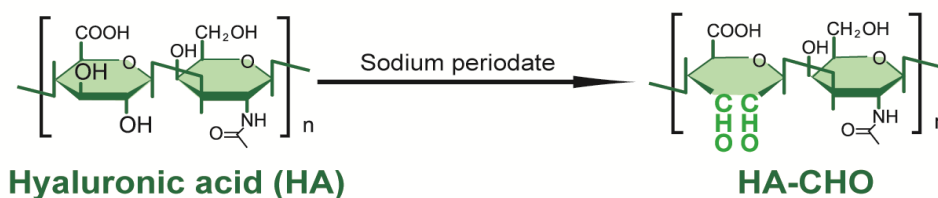


図 4-18 HA-CHO の合成

ヒアルロン酸ナトリウムの溶解

300 ml 三角フラスコに 1.5 g のヒアルロン酸ナトリウム (HA) を加え、150 ml の milliQ 水で溶解するために常温で 1 晩攪拌した。

過ヨウ素酸ナトリウムによる開環反応

Sodium periodate 0.80 g (1 等量) を 10 ml の milliQ 水に溶解し全量を滴下した (遮光のため、アルミホイルでフラスコを覆った)。2 時間攪拌後、未反応物除去のために Ethylene glycol 0.2 ml を加え、さらに 15 分攪拌した。

透析

7 日間透析膜 (MWCO : 6-8000) で透析を行った。

凍結乾燥

ろ紙 (No.1 : Advantec) を用いて不純物及び沈殿物を除去し、7 日間凍結乾燥を行った。

【CMC-CHO の作製】

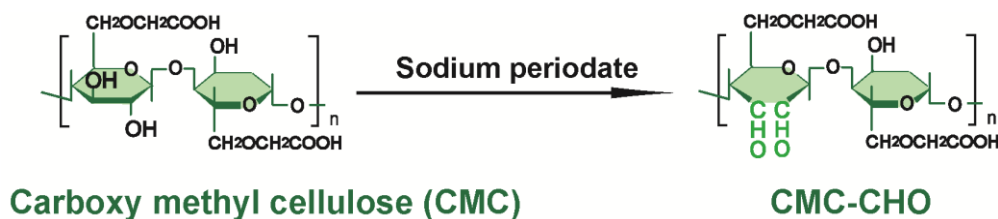


図 4-19 CMC-CHO の合成

カルボキシメチルセルロース (CMC) の溶解

300 ml 三角フラスコに CMC 1.0 g を加え、100 ml の milliQ 水で溶解するために常温で 1 晩攪拌した。

過ヨウ素酸ナトリウムによる開環反応

Sodium periodate 0.58 g (1 等量) を 10 ml の milliQ 水に溶解し全量を滴下した (遮光のため、アルミホイルでフラスコを覆った)。2 時間攪拌後、未反応物除去のために Ethylene glycol 0.2 ml を加え、さらに 15 分攪拌した。

透析

7 日間透析膜 (MWCO : 6-8000) で透析を行った。

凍結乾燥

ろ紙 (No.1 : Advantec) を用いて不純物及び沈殿物を除去し、7 日間凍結乾燥を行った。

【Gelatin-HA hydrogel、Gelatin-CMC hydrogel の作製】

Gelatin-ADH, HA-CHO, CMC-CHO の溶解

Gelatin-ADH、HA-CHO、CMC-CHO を PBS、10× Ham's F12 medium、再構成緩衝液 (0.05 N NaOH, 200 mM HEPES, and 2.2% NaHCO₃) の 8:1:1 混合溶液に溶解し、Gelatin-ADH 溶液、HA-CHO 溶液、CMC-CHO 溶液とした。

2 液混合によるゲル化時間測定

以下の濃度で、スターラー (155 rpm) 上で混合した。2 液を混合してからスターラーバーが動かなくなるまでの時間をゲル化時間とした。

4.7.3.6 実験結果と考察

カルボジイミド法を用いて、Gelatin に ADH 基を修飾することで Gelatin-ADH を合成した。Gelatin に新たに修飾した ADH 基の修飾率は、TNBS アッセイにより、Gelatin のカルボキシル基への Adipodihydrazide (ADH) の修飾率は~30%と求められた。Gelatin の

細胞接着配列である、RGD 配列の D (Asp) はカルボキシル基を側鎖に持っているため、すべて反応してしまうと RGD 配列が少なくなり、細胞接着率の低下につながる。そのため、この修飾率が適当であると判断した。また、ADH、EDC 試薬及び HOBt の添加量を変更することでヒドラジド基の修飾量を容易に変更可能であった。また、HA 及び CMC を過ヨウ素酸ナトリウムで開環することでアルデヒド基を形成し、HA-CHO、CMC-CHO を合成した。HA に新たに形成した CHO 基の修飾率は、¹HNMR スペクトルの 2.00 ppm に新たに出現したアルデヒドの水素原子によるピークから~80%と求められた (図 4-20)。合成した Gelatin-ADH と HA-CHO (混合比率 5 : 2) 及び Gelatin-ADH と CMC-CHO (混合比率 5 : 4) をダブルシリンジで混合することにより、常温で素早くゲル化するハイドロゲルを作製し、それぞれのゲルを *in situ* 架橋 gelatin-HA ゲル及び *in situ* 架橋 gelatin-CMC ゲルと名付けた (図 4-21)。これらのゲルは濃度を変更するのみで性質を容易に変更することが可能である。それぞれ 3 種類のゲル濃度でゲル化時間の評価を行ったところ、濃度依存的にゲル化時間が短縮し、3 分以内にはすべての濃度でゲル化した (表 4-1)。このゲル化時間はコラーゲンゲル (ゲル化時間 30 分以上) と比較して 10 倍早いことが示された。

4.7.3.7 本項のまとめ

本節では、gelatin に ADH を修飾した gelatin-ADH と HA、CMC に CHO を修飾した HA-CHO 及び CMC-CHO を合成し、これらをダブルシリンジで混合することで、数秒~数分でゲル化する *in situ* 架橋 gelatin-HA ゲル及び *in situ* 架橋 gelatin-CMC ゲルを作製した。

表 4-1 *in situ* 架橋ハイドロゲルの混合濃度とゲル化時間

Hydrogel	Concentration of gelatin-ADH (w/v %)	Concentration of CMC-CHO (w/v %)	Gelation time (s)	Abbreviation
Gelatin-HA	2.5	1.0	18 ± 3.0	G2.5H1
Gelatin-HA	5.0	2.0	6 ± 0.5	G5.0H2
Gelatin-HA	7.5	3.0	3 ± 0.3	G7.5H3
Gelatin-CMC	2.5	2.0	13 ± 1	G2.5C2
Gelatin-CMC	5.0	4.0	28 ± 3	G5.0C4
Gelatin-CMC	7.5	6.0	166 ± 6	G7.5C6
Collagen	—	—	>1800	COL

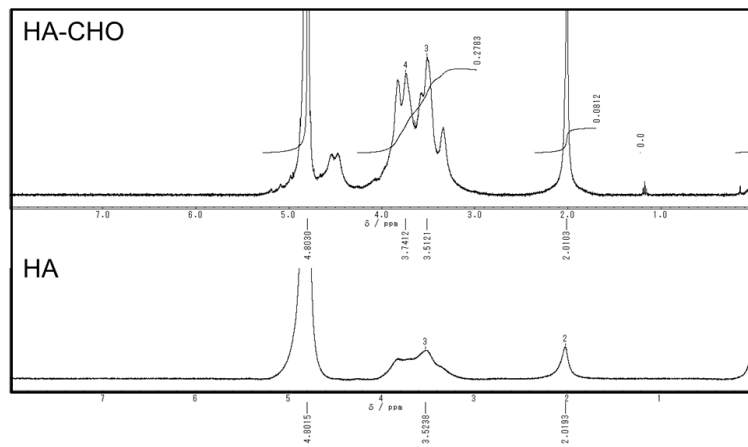


図 4-20 ^1H NMR スペクトル (HA-CHO, HA)

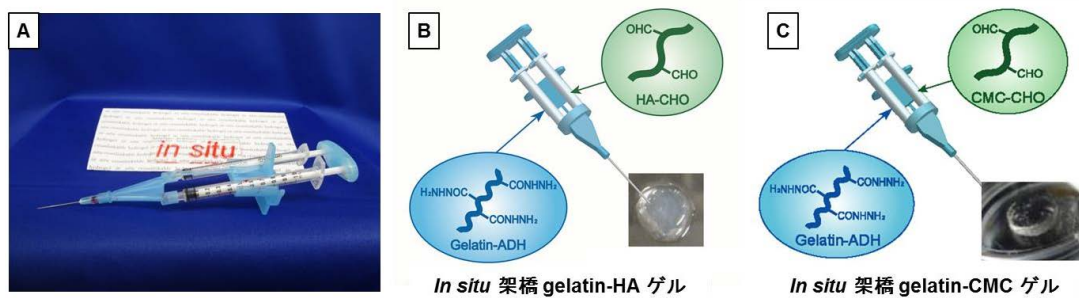


図 4-21 作製した *in situ* 架橋ハイドロゲル A : ダブルシリンジ、B : *in situ* 架橋 gelatin-HA ゲル、C : *in situ* 架橋 gelatin-CMC ハイドロゲル

4.7.4 *in situ* 架橋ハイドロゲルの物性評価

4.7.4.1 本節の目的

本節では、作製した *in situ* 架橋 Gelatin-HA ハイドロゲル及び *in situ* 架橋 gelatin-CMC ゲルの物性を評価するため、ゲル孔径評価、物性試験機を用いたヤング率評価、及び細胞毒性評価の 3 項目について計測を行う。

4.7.4.2 装置・試薬

以下に本実験に用いた装置・試薬を示す。

【装置】

- ・ 凍結乾燥機 FDU-1200 : EYELA
- ・ インキュベータ : 三洋電機製
- ・ 物性試験機 Texture Analyzer : EKO
- ・ 超純水製造装置 (Milli-Q Advantage A10) : MILLIPORE
- ・ 走査型電子顕微鏡 Miniscope : HITACHI
- ・ ダブルシリンジ : ニプロ
- ・ クリーンベンチ : 三洋電機
- ・ 遠心分離機 : 三洋電機製

【試薬】

- ・ ヒト臍帯由来血管内皮細胞 GFP-HUVEC : Dr. Aldrich
J. Folkman (Children's Hospital Boston)
- ・ Ham-F12 粉末培地 : Invitrogen.
- ・ 血管内皮細胞用増殖培地 EBM-2・添加因子セット : タカラバイオ
- ・ Gelatin-ADH
- ・ Phosphate Buffered Saline : GIBCO.
- ・ HA-CHO
- ・ Rhodamine-phalloidin : Life technology
- ・ Glass beads
- ・ DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole : Sigma
- ・ Collagen Type1-C : 新田ゼラチン

4.7.4.3 実験操作

全体的な操作の流れを以下に示す。

Gelatin-ADH, HA-CHO, CMC-CHO の溶解

Gelatin-ADH, HA-CHO, CMC-CHO を PBS、10× Ham's F12 medium、再構成緩衝液 (0.05 N NaOH, 200 mM HEPES, and 2.2% NaHCO₃) の 8:1:1 混合溶液に溶解し、Gelatin-ADH 溶液、HA-CHO 溶液、CMC-CHO 溶液とした。

Gelatin-ADH, HA-CHO, CMC-CHO の溶解

Gelatin-ADH, HA-CHO, CMC-CHO をダブルシリンジでゲル化させた。

【ゲル孔径測定】

***in situ* 架橋 Gelatin-HA, Gelatin-CMC ゲルの凍結乾燥**

作製した3種類の濃度の *in situ* 架橋 Gelatin-HA ゲル, *in situ* 架橋 Gelatin-CMC ゲルを液体窒素で急冷させ、凍結乾燥機で1日凍結乾燥を行った。

SEM による観察

得られた凍結乾燥ゲルの切片を切断し走査型顕微鏡によりゲルの孔径を評価した。

【ゲル強度測定】

***in situ* 架橋 Gelatin-HA, Gelatin-CMC ゲルのヤング率評価**

得られた 3 種類の濃度の *in situ* 架橋 Gelatin-HA ゲル, *in situ* 架橋 Gelatin-CMC ゲルの破壊強度を物性試験機により測定し、ヤング率を評価した。

【ゲル生体適合性評価】

GFP-HUVEC 播種

GFP-HUVEC を 48 well プレートに 1×10^4 cells/well で播種し、1 日間培養した。

***in situ* 架橋ゲルの細胞暴露**

in situ 架橋 Gelatin-HA ゲル, *in situ* 架橋 Gelatin-CMC ゲル, コラーゲンゲルを各 well 内に 0.5 ml ずつ加え、1 日培養を行った。

Ethidium bromide (EB) による死細胞染色

Ethidium bromide によって死細胞染色を行った。

4.7.4.4 実験結果と考察

作製したゲルの物性を評価するため、3 種類の濃度の *in situ* 架橋 gelatin-HA ゲル及び 3 種類の濃度の *in situ* 架橋 gelatin-CMC ゲルを作製し、ゲルの孔径、ゲルのヤング率、ゲルの毒性を評価した。凍結乾燥させたゲルの切片の孔径を走査型電子顕微鏡で観察し、定量した結果を図 4-22 に示す。ゲル孔径は、ゲル濃度増加に依存して縮小し、架橋密度が密になることが観察された。また、物性試験機でゲル強度の指標であるヤング率を測定した結果、ゲル濃度増加に依存してヤング率が増加する傾向が示された (図 4-22 C)。コラーゲンゲル (0.03mg/ml) を比較対象として用いたが、ゲル強度があまりにも弱すぎるために測定が不可能であった。さらに、ゲルの細胞毒性を Live-dead assay により評価した結果、*in situ* 架橋 gelatin-HA ゲルでは、生体由来コラーゲンと同様にすべての濃度で 90%程度の細胞生存率を示した。*in situ* 架橋 gelatin-CMC ゲルでは、濃度を増加させるに従って生存率は減少した (図 4-22 D)。これは、未反応の CHO 基が細胞毒性を与えたためと考えられる。以上より、*in situ* 架橋 Gelatin-HA ゲルがコラーゲンと同様の細胞生存率を示し、毛包再生シート作製のゲルとしての条件をすべて満たすことを確認した。ハンドリング可能なゲル強度であること、細胞がゲル内に遊走可能な孔径であることを考慮して G5.0H2 の濃度を以降の実験で用いることを決めた。

4.7.4.5 本項のまとめ

本項では、*in situ* 架橋 geletin-HA ゲル及び *in situ* 架橋 geletin-CMC ゲルの物性を評価し、*in situ* 架橋 Gelatin-HA ゲル (G5.0H2) が毛包再生シート作製のゲルとしての条件を満たすことを示した。

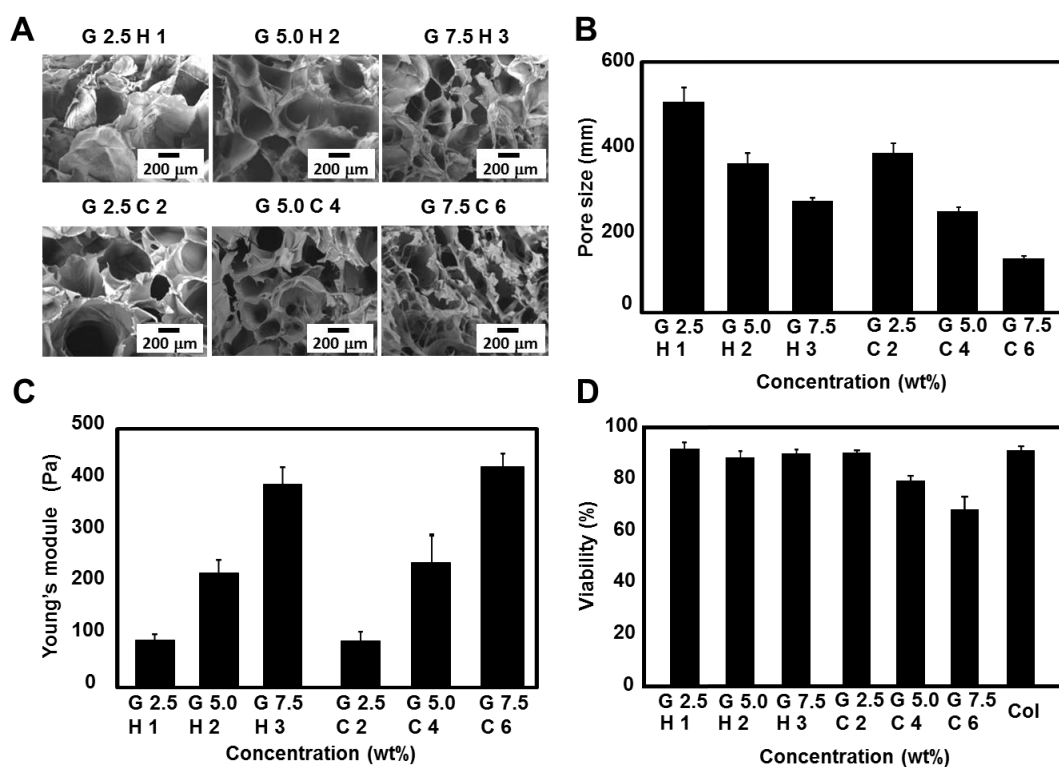


図 4-22 *in situ* 架橋ゲルの物性評価 A: 凍結乾燥したゲルの切片の断面図、B: ゲルの孔径、C: ヤング率、D: 細胞生存率

4.7.5 毛包原基チップで調製した毛包原基の *in situ* 架橋 geletin-HA ゲルへの転写

4.7.5.1 本節の目的

本節では、毛包原基チップで調製した大量の毛包原基を回収し、規則的な配置を保ったまま、*in situ* 架橋 geletin-HA ゲルに転写することを目的とした。

4.7.5.2 装置・試薬

【装置】

- ・ 小動物用イソフルラン麻酔器: バイオリサー
- ・ デジタルマイクロスコープ: KEYENCE
- ・ チセーター株式会社
- ・ 回転式マイクロトーム: Leica
- ・ 倒立型位相差顕微鏡, DP-71: OLYMPUS

【試薬】

- ・ 妊娠マウス (C57BL/6jcl 妊娠 18 日) マウス : 日本クレア
- ・ 毛包原基チップ
- ・ ICR ノードマウス 5 週齢♂ : オリエンタル酔母
- ・ Dulbecco's modified eagle medium high glucose (DMEM) : SIGMA
- ・ Fetal bovine serum (FBS) : SIGMA
- ・ Penicillin-Streptomycin (P/S) : GIBCO
- ・ HuMedia-KG2 : KURABO
- ・ イソフルラン : MSD Animal Health
- ・ 20 G V ランス : 日本アルコン
- ・ Prime surface 96 U plate : 住友ベークライト社製
- ・ コラーゲンゲル : 新田ゼラチン
- ・ ピクリン酸 : WAKO
- ・ 20%ホルマリン液 : WAKO
- ・ 酢酸 : SIGMA
- ・ マイヤーヘマトキシリン染色液 : WAKO
- ・ エオシン Y 溶液 : 武藤化学

4.7.5.3 実験操作

全体的な操作の流れを以下に示す。

マウス胎児細胞採取

間葉系細胞及び上皮系細胞をマウス胎児から採取した。

マイクロアレイチップ播種

遠心後、新しい培地をそれぞれ添加し、間葉系細胞及び上皮系細胞をそれぞれ 5×10^5 cells/chamber の細胞密度でマイクロアレイチップに播種した。培地は、間葉細胞培養培地 (DMEM+10%FBS+1%P/S) と HuMedia-KG2 の 1 : 1 混合培地を用いた。

in situ 架橋ハイドロゲルのゲル化

3 日間培養後、培地を吸い取り、*in situ* 架橋ハイドロゲル溶液を 1 mL 加えゲル化させた。

毛包原基のゲル転写

培地を加え、容器の端をつつくようにしてゲルをはがすことで毛包原基の規則配置を保ったままゲルに転写した。

4.7.5.4 実験結果と考察

作製した *in situ* 架橋ゲル及びコラーゲンゲルに毛包原基を転写した様子を、図 4-23 に示す。*In situ* 架橋ゲルでは、well の凹凸をゲルに転写する事ができ、ピンセットでのハンドリングが容易に可能であった。一方、コラーゲンゲルでは、well の凹凸構造まで鮮明に観察することはできず、ピンセットでハンドリングする事が難しかった (図 4-23)。以上よ

り、*in situ* 架橋ゲルを用いることで、毛包原基のピッチ間を維持したままゲルシートに転写することが可能であり、移植時のハンドリングでゲルシートが崩壊することのないことが示された。

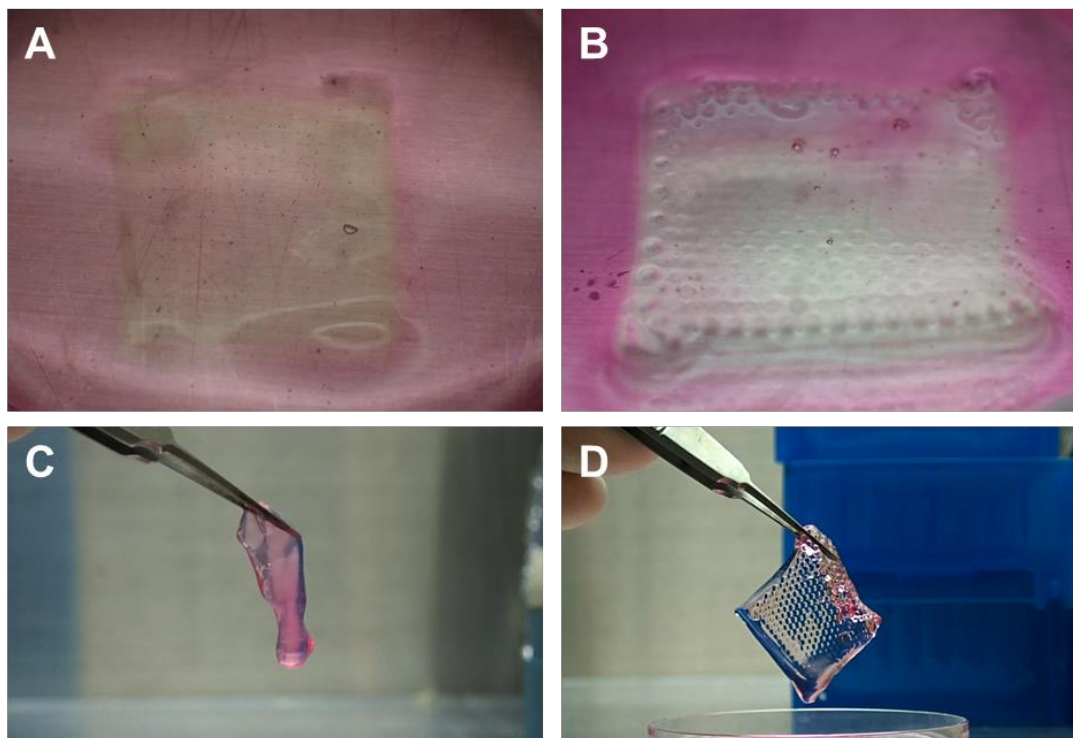


図 4-23 ゲル転写シートのハンドリング A: コラーゲンゲルに転写した毛包原基、B: *in situ* 架橋ゲルに転写した毛包原基、C: 転写したコラーゲンゲルのハンドリング、D: 転写した *in situ* 架橋ゲルのハンドリング

4.7.5.5 本節のまとめ

本節では、*in situ* 架橋ゲルを用いて、規則的な配置を保ったまま大量の毛包原基を回収し、このゲルシートがコラーゲンゲルで転写したゲルシートと比較して強い力学強度を有していることを示した。

4.8 本章のまとめ

本章では、PDMS 製のマイクロアレイチップ（毛包再生チップ）を用いた毛包原基の大量調製法及びそれを用いた毛包再生について述べた。組織の大量調製において培養中の酸素供給の重要性を述べた後、酸素透過率の高い PDMS を材質に用いることの有用性を述べ、毛包再生チップの作製方法を示した。作製したチップで毛包原基を大量調製でき、調製した

毛包原基が毛包再生能を有することを示した。一方で、比較として作製した底面をアクリルで作製したチップでは、培養細胞に十分な酸素を供給できないために毛包原基の形成が見られず、毛包の再生が観察されなかった。このことから、毛包再生チップは大量培養中の細胞へ十分な酸素供給が可能であり、毛包原基の大量調製に不可欠な培養容器であると結論づけた。また、大量調製した毛包原基は、コラーゲンゲルに転写することで規則的な配置を維持したまま毛包原基を回収することができ、これをゲルごと皮下移植することで、高密度に毛包を再生できることを示した。さらに、コラーゲンの支持体としての脆さを補うため、*in situ* 架橋ハイドロゲルをコラーゲンの代わりに用いることで、オペの際のハンドリングが容易になり、より規則的な配置を保った状態でシートを調製することができた。以上の結果から、毛包原基の大量培養に必要な毛包再生チップ作製し、これを用いて毛包原基を簡便かつ均一に大量調製する手法を確立した。また、その毛包原基は生体と同等の毛包を再生する能力を有しており、移植組織として十分な機能を有する組織体であることを示した。

参考文献

- [1] K. Nakazawa, Y. Izumi, J. Fukuda, T. Yasuda, Hepatocyte spheroid culture on a polydimethylsiloxane chip having microcavities, *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* 17(8) (2006) 859-873.
- [2] K. Takayama, K. Kawabata, Y. Nagamoto, K. Kishimoto, K. Tashiro, F. Sakurai, M. Tachibana, K. Kanda, T. Hayakawa, M.K. Furue, H. Mizuguchi, 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing, *Biomaterials* 34(7) (2013) 1781-1789.
- [3] F. Kitagawa, S. Takei, T. Imaizumi, Y. Tabata, Chondrogenic Differentiation of Immortalized Human Mesenchymal Stem Cells on Zirconia Microwell Substrata, *Tissue Engineering Part C-Methods* 19(6) (2013) 438-448.
- [4] T. Anada, J. Fukuda, Y. Sai, O. Suzuki, An oxygen-permeable spheroid culture system for the prevention of central hypoxia and necrosis of spheroids, *Biomaterials* 33(33) (2012) 8430-8441.
- [5] J.W. Nichol, S.T. Koshy, H. Bae, C.M. Hwang, S. Yamanlar, A. Khademhosseini, Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels, *Biomaterials* 31(21) (2010) 5536-5544.
- [6] M.P. Cuchiara, A.C.B. Allen, T.M. Chen, J.S. Miller, J.L. West, Multilayer microfluidic PEGDA hydrogels, *Biomaterials* 31(21) (2010) 5491-5497.
- [7] R. Gauvin, Y.C. Chen, J.W. Lee, P. Soman, P. Zorlutuna, J.W. Nichol, H. Bae, S.C. Chen, A. Khademhosseini, Microfabrication of complex porous tissue engineering scaffolds using 3D projection stereolithography, *Biomaterials* 33(15) (2012) 3824-3834.
- [8] G. Eng, B.W. Lee, H. Parsa, C.D. Chin, J. Schneider, G. Linkov, S.K. Sia, G. Vunjak-Novakovic, Assembly of complex cell microenvironments using geometrically docked hydrogel shapes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(12) (2013) 4551-4556.
- [9] A. Skardal, J.X. Zhang, L. McCoard, X.Y. Xu, S. Oottamasathien, G.D. Prestwich, Photocrosslinkable Hyaluronan-Gelatin Hydrogels for Two-Step Bioprinting, *Tissue Engineering Part A* 16(8) (2010) 2675-2685.
- [10] R.-Z. Lin, Y.-C. Chen, R. Moreno-Luna, A. Khademhosseini, J.M. Melero-Martin, Transdermal regulation of vascular network bioengineering using a photopolymerizable methacrylated gelatin hydrogel, *Biomaterials* 34(28) (2013) 6785-6796.
- [11] Y. Jiang, J. Chen, C. Deng, E.J. Suuronen, Z. Zhong, Click hydrogels, microgels and nanogels: Emerging platforms for drug delivery and tissue engineering, *Biomaterials* 35(18) (2014) 4969-4985.
- [12] C.A. DeForest, B.D. Polizzotti, K.S. Anseth, Sequential click reactions for synthesizing

and patterning three-dimensional cell microenvironments, *Nature Materials* 8(8) (2009) 659-664.

[13] P.V. Chang, J.A. Prescher, E.M. Sletten, J.M. Baskin, I.A. Miller, N.J. Agard, A. Lo, C.R. Bertozzi, Copper-free click chemistry in living animals, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(5) (2010) 1821-1826.

[14] A. Takahashi, Y. Suzuki, T. Suhara, K. Omichi, A. Shimizu, K. Hasegawa, N. Kokudo, S. Ohta, T. Ito, In Situ Cross-Linkable Hydrogel of Hyaluronan Produced via Copper-Free Click Chemistry, *Biomacromolecules* 14(10) (2013) 3581-3588.

[15] Y. Lee, J.W. Bae, D.H. Oh, K.M. Park, Y.W. Chun, H.J. Sung, K.D. Park, In situ forming gelatin-based tissue adhesives and their phenolic content-driven properties, *Journal of Materials Chemistry B* 1(18) (2013) 2407-2414.

[16] X.Z. Shu, Y.C. Liu, F.S. Palumbo, Y. Lu, G.D. Prestwich, In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering, *Biomaterials* 25(7-8) (2004) 1339-1348.

第五章

ヒト毛乳頭細胞を用いた毛包原基調製

5.1 はじめに

第 4 章ではマウス胎児由来の上皮系細胞および間葉系細胞を用いて毛包を大量に再生する技術を示した。この技術をヒトへ応用する為には、アンドロゲンの影響を受けにくいヒトの患者の後頭部から採取した毛包の細胞を用いて毛包原基を調製し、それを移植することで毛髪を再生する技術の確立が不可欠であろう。マウスと同様にヒト胎児の細胞を使用する場合、他家移植になるため拒絶反応が生じる可能性が考えられ、また、iPS 細胞から胎児の毛包細胞への分化誘導技術も十分に確立されていないことから、患者自身の毛包の細胞が最も現実的に使用可能な細胞源と考えられる。

本章では、ヒト毛乳頭細胞をマウス胎児由来間葉系細胞の代わりに用いて毛包原基を調製し、それを免疫不全マウス皮下に移植することで毛包再生能を評価する。第 2 節では、自発的な細胞凝集現象を用いた毛包原基の調製法を述べる。第 3 節では、調製した毛包原基の毛包誘導能を免疫不全マウスへ移植することで評価する。

5.2 ヒト毛乳頭細胞とマウス上皮系細胞の自発的な細胞凝集現象を用いた毛包原基の調製

5.2.1 本節の目的

本節では、ヒト毛乳頭細胞とマウス上皮系細胞を 1:1 で混合し、Prime surface 96 U plate および毛包原基チップに播種することで、細胞選別により毛包原基を調製することを目的とした。

5.2.2 装置・試薬

【装置】

- ・ 倒立型位相差顕微鏡, IX-71 : OLYMPUS
- ・ 倒立型蛍光顕微鏡, DP-71 : OLYMPUS

【試薬】

- ・ C57BL/6jcl 7w♂マウス : 日本クレア
- ・ Prime surface 96 U plate : 住友ベークライ
ト社製

- ・ 毛包原基チップ
- ・ ヒト毛乳頭細胞：Promo cell 社
- ・ ヒト毛乳頭細胞増殖培地（DPCGM）：Promo cell 社
- ・ HuMedia-KG2：KURABO
- ・ Phosphate buffered saline (PBS)：Thermo Fisher Scientific
- ・ Vybrant™ Cell-labeling Solutions：Thermo Fisher Scientific

5.2.3 実験操作

全体的な操作の流れを以下に示す。

マウス胎児細胞採取

上皮系細胞をマウス胎児から採取した。

ヒト毛乳頭細胞の染色

ヒト毛乳頭細胞の 1 mL 懸濁液に Vybrant™ Cell-labeling Solutions を 5 μ L 加え、20 分間インキュベートした。

スフェロイド容器播種

Cell labelling (赤) したヒト毛乳頭細胞 (P4) 及び上皮系細胞をそれぞれ 1:1 で混合し、全細胞数 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1×10^3 cells/well の細胞密度で 96 U 非接着培養プレートに播種した。培地は、DPCGM と HuMedia-KG2 の 1:1 混合培地を用いた。

毛包原基チップ播種

スフェロイド容器に播種する場合と同様にヒト毛乳頭細胞を染色し、1:1 で混合した後、 1×10^6 cells/chamber の細胞密度で毛包原基チップに播種した。培地は、DPCGM と HuMedia-KG2 の 1:1 混合培地を用いた。

顕微鏡観察

培養 1, 3 日目に位相差顕微鏡観察を行った。

5.2.4 実験結果と考察

マウス胎児 (胎齢 18 日) より採取した上皮系細胞とヒト培養毛乳頭細胞を 1:1 の割合で混合し、96 well 細胞非接着プレートに播種した。播種した 2 種類の細胞は、1 つの凝集体を形成した後、3 日間の培養中に凝集体内で同種細胞どうしが集合する細胞選別が見られた。少ない播種細胞数 ($\sim 8 \times 10^3$ cells/well) では、マウス上皮系細胞とマウス間葉系細胞と同様に、2 つの凝集塊からなる 1 つの毛包原基が形成されたものの、播種細胞数が増加するにつれて、上皮系細胞塊の周囲で複数個の毛乳頭塊が融合した 1 つの凝集体を形成した (図 5-1 A (i), (ii))。これは、毛包再生チップに細胞を播種した場合も同様にすべての well 内で自発的

な毛包原基形成が観察された (図 5-1 B, C)。以上より、ヒト毛乳頭細胞と上皮系細胞を用いた場合も毛包原基を大量に調製できることが示された。

5.2.5 本節のまとめ

本節では、ヒト毛乳頭細胞とマウス上皮系細胞を 1 : 1 で混合した細胞懸濁液を 96 well 細胞非接着プレートおよび毛包再生チップに播種することで、細胞選別により毛包原基を形成可能なことを見出した。

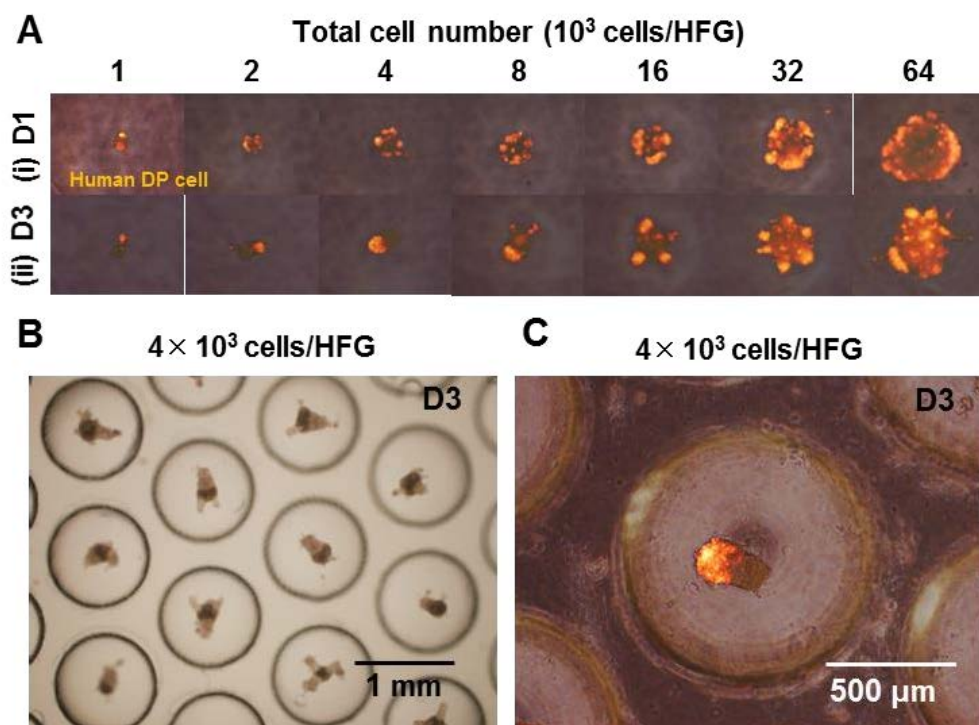


図 5-1 ヒト毛乳頭細胞とマウス上皮系細胞からなる毛包原基の調製 A : Prime surface 96 U plate で調製した毛包原基 (i) 培養 1 日目の凝集体内の細胞の分布、及び (ii) 培養 3 日目の凝集体内の細胞の分布. 間葉系細胞は Vybrant™ Cell-labeling Solutions (赤) で染色. B : 毛包再生チップで調製した毛包原基 (培養 3 日目)、C : 培養 3 日目の凝集体内の細胞の分布.

5.3 ヒト毛乳頭細胞とマウス上皮系細胞からなる毛包原基移植による毛包再生

5.3.1 本節の目的

本節では、ヒト毛乳頭細胞とマウス上皮系細胞を用いて調製した毛包原基をマウス皮下に移植することで毛包再生能を評価した。

5.3.2 装置・試薬

【装置】

- デジタルマイクロスコープ：KEYENCE
- 回転式マイクロトーム：Leica
- 小動物用イソフルラン麻酔器：バイオリサーチセンター株式会社

【試薬】

- C57BL/6jcl 7w♂マウス：日本クレア
- ICR ノードマウス 5 週齢♂：オリエンタル酵母
- Prime surface 96 U plate：住友ベークライト社製
- ヒト毛乳頭細胞：Promo cell 社
- ヒト毛乳頭細胞増殖培地（DPCGM）：Promo cell 社
- HuMedia-KG2：KURABO
- 20 G V ランス：日本アルコン
- ピクリン酸：WAKO
- 20%ホルマリン液：WAKO
- 酢酸：SIGMA
- マイヤーヘマトキシリン染色液：WAKO
- エオシン Y 溶液：武藤化学
- 10%中性緩衝ホルマリン液：WAKO
- Phosphate buffered saline (PBS)：Thermo Fisher Scientific
- Tween-20：Sigma Aldrich
- Anti-Nuclei Antibody, clone 235-1：Millipore
- ヒストファイン マウスステインキット：ニチレイバイオサイエンス

5.3.3 実験操作

全体的な操作の流れを以下に示す。

マウス胎児細胞採取

上皮系細胞をマウス胎児から採取した。

スフェロイド容器播種

Cell labelling (赤) したヒト毛乳頭細胞 (P4) 及び上皮系細胞をそれぞれ 1:1 で混合し、全細胞数 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1×10^3 cells/well の細胞密度で 96 U 非接着培養プレートに播種

した。培地は、DPCGM と HuMedia-KG2 の 1 : 1 混合培地を用いた。

毛包原基チップ播種

スフェロイド容器に播種する場合と同様にヒト毛乳頭細胞を染色し、1:1 で混合した後、 1×10^6 cells/chamber の細胞密度で毛包原基チップに播種した。培地は、DPCGM と HuMedia-KG2 の 1 : 1 混合培地を用いた。

毛包原基移植

ICR ノードマウス皮下に 20 G V ランスで移植穴をあけ、そこにマイクロピペット (10 - 0.5 μ L) で毛包原基を 1 つずつ移植した。

観察

毛包原基を移植したマウスは 2 日に 1 回肉眼観察を行い、移植 18 日目にマイクロスコープを用いて観察した。

HE 染色

移植 18 日目の移植部を以下の手順で HE 染色した。

a) 組織固定 ブラン固定液 (ピクリン酸飽和水溶液 15ml、20 ホルマリン 5ml、氷酢酸 1ml の混合溶液) に 1 日浸漬することで組織の固定を行った。

b) パラフィン包埋 70, 90, 100 v/v%エタノール, 100 v/v%エタノール-2-ブタノール 1 : 1 溶液, 2-ブタノール, 2-ブタノール-パラフィン 1 : 1 溶液, パラフィンに 1 時間ずつ浸した後、パラフィンブロックを作製した。

c) 切片作製 回転式マイクロトームを用いてパラフィン切片を作製した。

d) HE 染色 以下の手順で HE 染色を行った。

免疫染色

移植 18 日目の移植部を以下の手順で免疫染色した。

a) 組織固定 10%ホルマリン固定液に 1 日浸漬することで組織の固定を行った。

b) パラフィン包埋 70, 90, 100 v/v%エタノール, 100 v/v%エタノール-2-ブタノール 1 : 1 溶液, 2-ブタノール, 2-ブタノール-パラフィン 1 : 1 溶液, パラフィンに 1 時間ずつ浸した後、パラフィンブロックを作製した。

c) 切片作製 回転式マイクロトームを用いてパラフィン切片を作製した。

d) 免疫染色 Anti-Nuclei Antibody, clone 235-1 (50 倍希釈) とヒストファインマウスステインキットを用いて、ヒト由来細胞の免疫染色を行った。

5.3.4 実験結果と考察

マウス胎児 (胎齢 18 日) より採取した上皮系細胞とヒト培養毛乳頭細胞を 1 : 1 の割合で混

合し、3日間培養することで調製した毛包原基を免疫不全マウス皮下に移植した結果、 4×10^3 cells/well 以上の細胞数からなる毛包原基で毛周期及びキューティクル構造を有する毛の形成が観察された (図 5-2)。移植 18 日後の皮膚切片の HE 染色から皮下に毛包の形成が観察され、免疫染色より形成した毛乳頭はヒト由来細胞であることが示された (図 5-3)。さらに再生した毛包は一定の毛周期を繰り返すことが示された (図 5-4)。平均再生本数と平均再生効率は、毛包原基を構成する細胞数に依存せず、すべての細胞数において、平均再生本数は 1-2 本、平均再生効率は 40%程度であった。本検討で使用した毛乳頭細胞は 4 回継代されたものを使用しているため、毛乳頭細胞の毛包形成能が減少していたことが原因と考えられる。以上より、ヒトの毛乳頭細胞を用いて、毛包原基の大量調製が可能であり、これを移植することで新しい毛包を形成できることを示した。今後は、ヒトへの応用を見据え、ヒト毛乳頭細胞及びヒト毛包上皮幹細胞を用いて毛包原基を大量調製し、それを移植することでヒト毛髪再生を目指したい。

5.3.5 本節のまとめ

本節では、ヒト毛乳頭細胞を用いて調製した毛包原基を免疫不全マウスに移植することで、マウス皮下から毛髪を再生することに成功した。

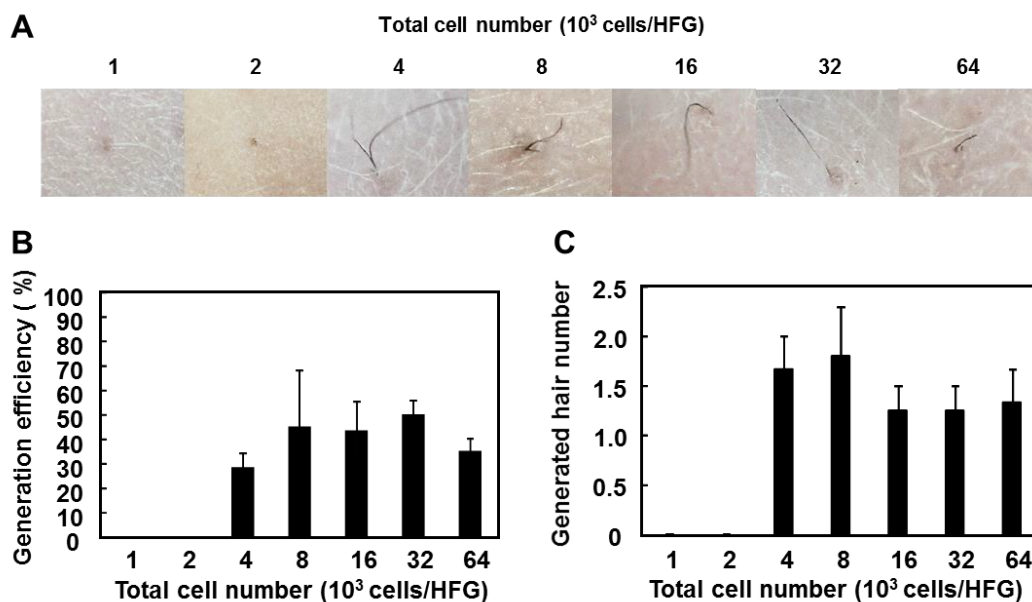


図 5-2 ヒト毛乳頭細胞とマウス上皮系細胞からなる毛包原基の毛髪再生能 A: 調製した毛包原基の移植により再生した毛、移植 18 日目の移植部. B: 移植 18 日目の再生効率 (発毛部/移植部)、C: 移植 18 日目の 1 移植部あたりの再生本数.

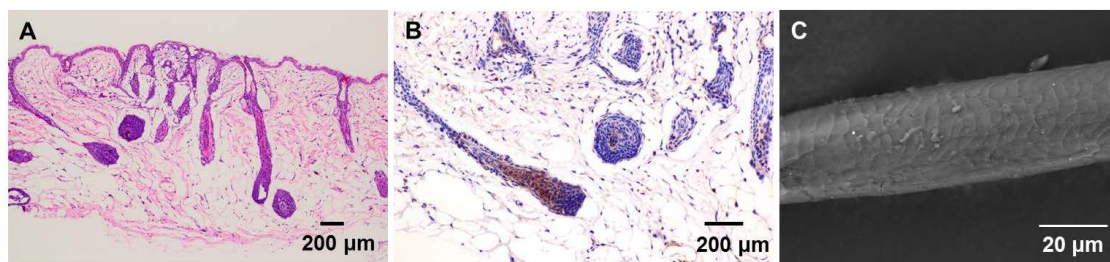


図 5-3 再生した毛包及び毛幹の評価 A：移植 18 日目の皮膚切片の HE 染色、B：移植 18 日目の皮膚切片の免疫染色（茶：Human cell）、C：再生毛の走査型電子顕微鏡像

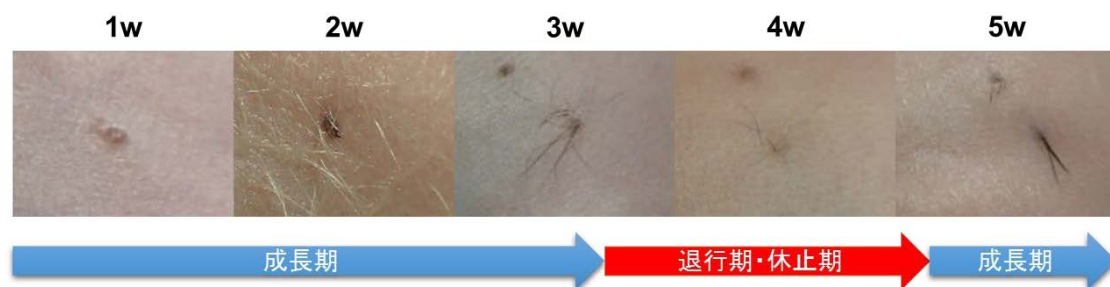


図 5-4 再生した毛包の毛周期

5.4 ヒト血管内皮細胞とヒト毛乳頭細胞とマウス上皮系細胞の自発的な細胞凝集現象を用いた血管付毛包原基の調製

5.4.1 本節の目的

本節では、毛包原基形成時に血管内皮細胞を混合することで、ヒト血管内皮細胞とヒト毛乳頭細胞とマウス上皮系細胞の細胞選別により毛細血管を有する毛包原基を調製することを目的とした。

5.4.2 装置・試薬

【装置】

- ・ 倒立型位相差顕微鏡, IX-71 : OLYMPUS
- ・ 倒立型蛍光顕微鏡, DP-71 : OLYMPUS

【試薬】

- ・ C57BL/6jcl 7w♂マウス：日本クレア
 - ・ 毛包原基チップ
 - ・ Prime surface 96 U plate：住友ベークライ
 - ・ ヒト毛乳頭細胞：Promo cell 社
- ト社製

- ・ ヒト毛乳頭細胞増殖培地 (DPCGM) : Promo cell 社
- ・ HuMedia-KG2 : KURABO
- ・ RFP 導入ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) : Angioproteomic 社
- ・ GFP 導入ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) : Angioproteomic 社
- ・ 血管内皮細胞増殖培地 (EGM-2) : LONZA
- ・ Phosphate buffered saline (PBS) : Thermo Fisher Scientific
- ・ Vybrant™ Cell-labeling Solutions : Thermo Fisher Scientific

5.4.3 実験操作

全体的な操作の流れを以下に示す。

マウス胎児細胞採取

上皮系細胞をマウス胎児から採取した。

スフェロイド容器播種

ヒト毛乳頭細胞 (P4)、上皮系細胞及びヒト臍帯静脈血管内皮細胞をそれぞれ 4 : 4 : 1 で混合し、全細胞数 72, 36, 18, 9, 4.5, 2.25, 1.12×10³ cells/well の細胞密度で 96 U 非接着培養プレートに播種した。培地は、DPCGM と HuMedia-KG2 と EGM-2 の 1 : 1 : 1 混合培地を用いた。

毛包原基チップ播種

スフェロイド容器に播種する場合と同様に各細胞を混合した後、1×10⁶ cells/chamber の細胞密度で毛包原基チップに播種した。培地は、DPCGM と HuMedia-KG2 と EGM-2 の 1 : 1 : 1 混合培地を用いた。

顕微鏡観察

培養 1, 3 日目に位相差顕微鏡観察を行った。

HE 染色

培養 3 日目の毛包原基を以下の手順で HE 染色した。

a) 組織固定 ブアン固定液 (ピクリン酸飽和水溶液 15ml、20 ホルマリン 5ml、氷酢酸 1ml の混合溶液) に 1 日浸漬することで組織の固定を行った。

b) パラフィン包埋 70, 90, 100 v/v%エタノール, 100 v/v%エタノール-2-ブタノール 1 : 1 溶液, 2-ブタノール, 2-ブタノール-パラフィン 1 : 1 溶液, パラフィンに 1 時間ずつ浸した後、パラフィンブロックを作製した。

c) 切片作製 回転式マイクロトームを用いてパラフィン切片を作製した。

d) HE 染色 以下の手順で HE 染色を行った。

RT-PCR

培養3日目のサンプルをの Versican 及び HIF1a 遺伝子解析を RT-PCR により行った。

	Forward primer	Reverse primer
Versican	CCAgCAAgCACAAAATTTCA	TgCACTggATCTgTTTCTTCA
ALP	ATTgACCACgggCACCAT	CTCCACCgCCTCATgCA
GAPDH	gCACCGTCAAaggCTgAgAAC	TggTgAAgACgCCAgTggA

5.4.4 実験結果と考察

播種した3種類の細胞は、1つの凝集体を形成した後、3日間の培養中に凝集体内で同種細胞どうしが集合する細胞選別が見られた(図 5-5A)。少ない播種細胞数($\sim 9 \times 10^3$ cells/well)では、2つの凝集体からなる1つの毛包原基が形成され、尚且つ血管内皮細胞は毛乳頭細胞の凝集体の中で血管網を形成した(図 5-5B (i), (ii))。これは、毛包再生チップに細胞を播種した場合も同様にすべての well 内で自発的な血管網付き毛包原基の形成が観察された(図 5-5C)。以上より、ヒト毛乳頭細胞と上皮系細胞と血管内皮細胞を加えた場合も毛包原基を大量に調製できることが示された。さらに毛包原基及び血管付毛包原基の Versican、ALP 遺伝子発現を評価した結果、血管付毛包原基は毛包原基よりも有意に高い Versican、ALP 遺伝子発現を示した(図 5-5D, E)。これは血管内皮細胞の産生するサイトカイン(VEGF など)が毛乳頭細胞の毛包誘導能向上に寄与したためと考えられる。

5.4.5 本節のまとめ

本節では、ヒト毛乳頭細胞とマウス上皮系細胞とヒト血管内皮細胞を4:4:1で混合した細胞懸濁液を96 well 細胞非接着プレートおよび毛包再生チップに播種することで、細胞選別により血管付毛包原基を形成可能なことを見出した。さらに、この血管付毛包原基は通常の毛包原基よりも高い毛包誘導能をもつことを示した。

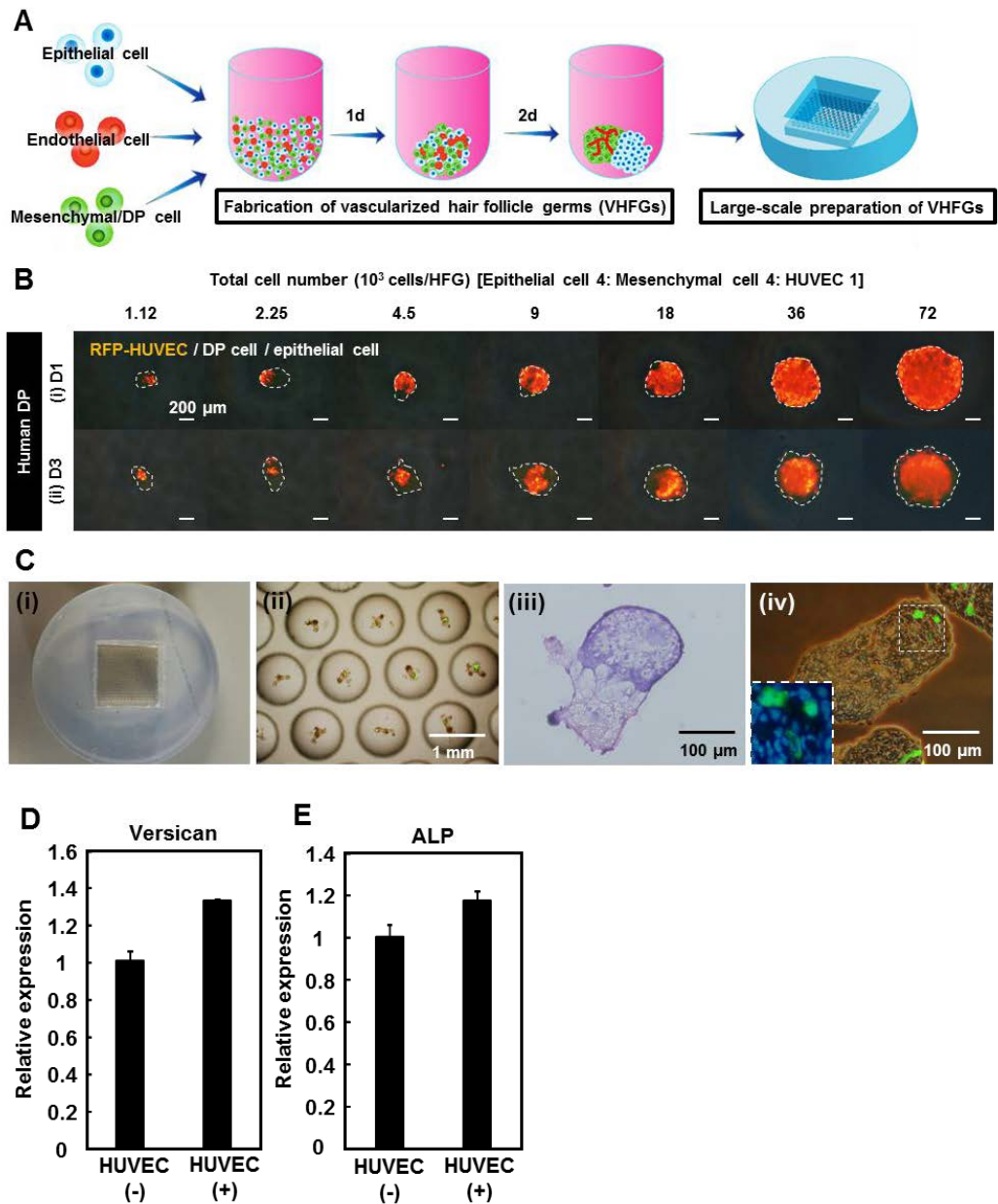


図 5-5 ヒト毛乳頭細胞とマウス上皮系細胞とヒト血管内皮細胞からなる毛包原基の調製 A:細胞選別による血管付毛包原基の形成、B : Prime surface 96 U plate で調製した血管付毛包原基 (i) 培養 1 日目の凝集体内の細胞の分布、及び (ii) 培養 3 日目の凝集体内の細胞の分布. 血管内皮細胞は RFP を導入 (赤色). C : 毛包再生チップで調製した血管付毛包原基 (培養 3 日目)、(i) 毛包原基チップ、(ii) 顕微鏡像. 血管内皮細胞は GFP を導入 (緑色). (iii) 切片の HE 染色、(iv) 切片の蛍光写真 (緑色 : GFP-HUVEC) D : 培養 3 日目の血管付毛包原基の Versican 遺伝子発現、E : 培養 3 日目の血管付毛包原基の ALP 遺伝子発現

5.5 血管付毛包原基移植による毛包再生

5.5.1 本節の目的

本節では、ヒト毛乳頭細胞とマウス上皮系細胞とヒト血管内皮細胞を用いて調製した血管付毛包原基をマウス皮下に移植することで毛包再生能を評価した。

5.5.2 装置・試薬

【装置】

- デジタルマイクロスコープ：KEYENCE
- 回転式マイクロトーム：Leica
- 小動物用イソフルラン麻酔器：パイオリサーチセンター株式会社
- 走査型電子顕微鏡：HITACHI

【試薬】

- C57BL/6jcl 7w♂マウス：日本クレア
- ピクリン酸：WAKO
- ICR ノードマウス 5 週齢♂：オリエンタル酵母
- 20%ホルマリン液：WAKO
- Prime surface 96 U plate：住友ベークライト社製
- 酢酸：SIGMA
- ヒト毛乳頭細胞：Promo cell 社
- マイヤーヘマトキシリン染色液：WAKO
- ヒト毛乳頭細胞増殖培地（DPCGM）：Promo cell 社
- エオシン Y 溶液：武藤化学
- HuMedia-KG2：KURABO
- 10%中性緩衝ホルマリン液：WAKO
- GFP 導入ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）：Angioproteomie 社
- Phosphate buffered saline (PBS)：Thermo Fisher Scientific
- 血管内皮細胞増殖培地（EGM-2）：LONZA
- Tween-20：Sigma Aldrich
- 20 G V ランス：日本アルコン
- Anti-Nuclei Antibody, clone 235-1：Millipore
- ヒストファイン マウスステインキット：ニチレイバイオサイエンス

5.5.3 実験操作

全体的な操作の流れを以下に示す。

マウス胎児細胞採取

上皮系細胞をマウス胎児から採取した。

毛包原基チップ播種

ヒト毛乳頭細胞（P4）、上皮系細胞及びヒト臍帯静脈血管内皮細胞をそれぞれ 4 : 4 : 1 で

混合し、 1×10^6 cells/chamber の細胞密度で毛包原基チップに播種した。培地は、DPCGM と HuMedia-KG2 と EGM-2 の 1 : 1 : 1 混合培地を用いた。

移植（パッチ法）

3 日間培養後、マウス皮下に作製した 3 箇所のパッチに 30 個ずつの血管付毛包原基を移植した。コントロールとして血管なし毛包原基も同様に移植した。

移植（植毛法）

ICR ノードマウス皮下に 20 G V ランスで移植穴をあけ、そこにマイクロピペット（10・0.5 μ L）で毛包原基を 1 つずつ移植した。

観察

毛包原基を移植したマウスは 2 日に 1 回肉眼観察を行い、移植 18 日目にマイクロスコープ及び走査型電子顕微鏡を用いて観察した。

5.5.4 実験結果と考察

調製した血管付毛包原基をパッチ法で免疫不全マウス皮下に移植した結果、通常の毛包原基と比較して平均再生本数及び平均毛髪直径が有意に高い値を示した。血管内皮細胞がホストの血管を毛包原基に引き込むことで再生効率が向上したと考えられる。また、植毛法を用いて、1 つずつ血管付毛包原基を移植創に移植した場合も、平均再生本数が通常の毛包原基よりも有意に高い値を示した。以上の結果より、毛包原基に血管構造を付与することは、毛包原基の毛髪再生効率向上に有効なことが示された。

5.5.5 本節のまとめ

本節では、血管付毛包原基が通常の毛包原基よりも高い毛髪再生能を有することを示した。

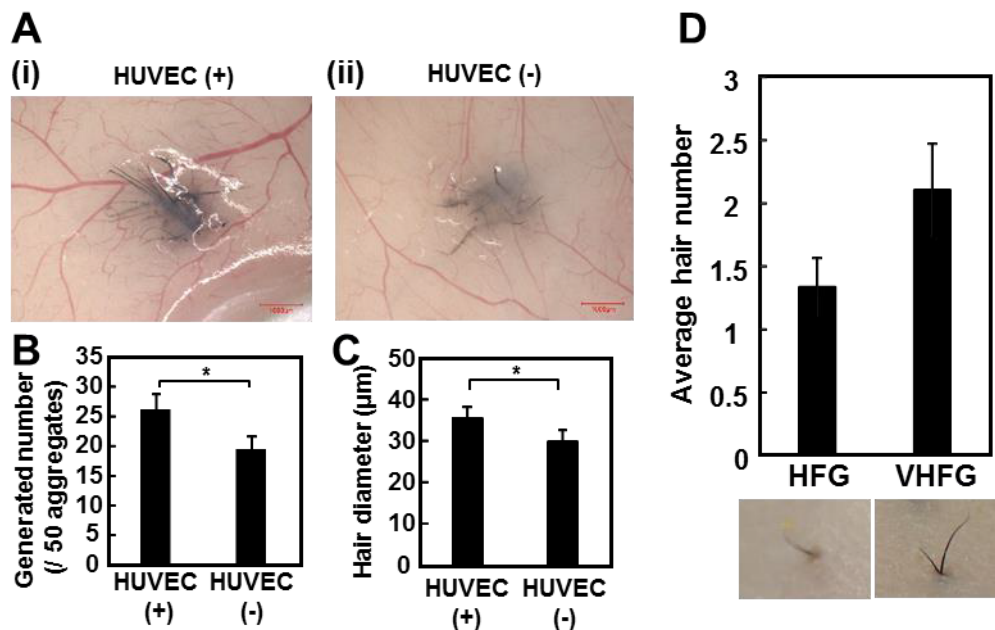


図 5-6 血管付毛包原基の移植による毛髪再生 A: 1ヶ月後の移植部 (パッチ法) (i) 血管付毛包原基移植、(ii) 血管なし毛包原基移植. B: パッチあたりの平均再生本数 C: 再生毛髪のアverage直径、D: 移植部あたりの平均再生本数 (植毛法)、VHFG: 血管付毛包原基 HFG: 血管なし毛包原基

5.6. 本章のまとめ

本章では、ヒト毛乳頭細胞とマウス上皮系細胞を用いて自発的な細胞凝集現象を用いた毛包原基の調製法及びそれを用いた毛髪再生について述べた。ヒト毛乳頭細胞をマウス間葉系細胞の代わりに用いて毛包原基を調製した後、免疫不全マウスへの移植により、毛包原基が毛周期を繰り返す毛を再生することを示した。さらに、毛包原基に血管構造を付与することで毛髪再生効率が向上することを示した。以上の結果から、調製した毛包原基は生体と同等の毛包を再生する能力を有しており、移植組織として十分な機能を有する組織体と結論づけた。

第六章

結論、総括

第一章では、脱毛症に対する既往の治療法を紹介すると共に、最先端治療として期待されている毛髪再生医療のアプローチについて説明した。毛髪再生医療のアプローチとして、従来の細胞移植では再生効率が低いため、近年では、組織工学技術を用いて毛包原基を構築し、それを移植することで再生効率が上昇するようになってきた状況を示した。既往研究から、毛髪再生医療を実用化する上での問題点は毛包原基の簡便な大量培養技術の欠如であることを指摘し、これを克服する新規技術の開発を本研究の目的として明示した。

第二章では、本研究の基盤技術である自発的な細胞凝集現象を用いた毛包原基の調製法について詳しく述べた。これはマウス胎児の上皮系細胞と間葉系細胞の 2 種類の細胞混合液を混合して播種するといった非常に簡便な操作のみで毛包原基が構築でき、大量調製に適した手法である。調製した毛包原基を免疫不全マウスに移植することにより、移植部から毛髪の再生が観察され、再生した毛髪は正常な毛周期を繰り返した。

第三章では、成長期の毛包に豊富に含まれるコラーゲンを含む毛包原基を用いた毛髪再生について述べた。生体内の細胞は細胞外マトリックスと接着した状態で存在しており、その結合が生体の様々なシグナル伝達や機能維持に関わっている。本研究では、間葉系細胞を包埋したコラーゲンマイクロゲルを調製し、上皮系細胞と混合して培養することでコラーゲンを含む毛包原基を調製した。調製した毛包原基を免疫不全マウスへ移植したところ、コラーゲンの作用により毛髪の再生本数が増加することが観察された。

第四章では、微細なウェルを均一かつ規則的に複数配置したポリジメチルシロキサン (PDMS) 製のマイクロアレイチップを開発し、毛包原基を大量に調製する技術について述べた。作製したチップは、培地表面からの酸素供給に加えて、酸素透過性の高い PDMS 膜を介した底面からも酸素供給可能である。このため、細胞の大量培養で課題となる細胞の低酸素障害が抑えられ、毛包原基の大量培養を実現できた。2 種類の細胞混合液を作製したチップ上に播種すると、すべてのウェル内で毛包原基が形成された。また、作製した毛包原基をシートとしてゲルに転写した後、免疫不全マウスにこのシートを移植することにより、免

疫不全マウス皮下に高密度で毛を再生できることを明示した。さらに、コラーゲンの力学的強度を補うために *in situ* 架橋ハイドロゲルを開発し、毛包原基をゲルに規則的な間隔を保ったまま転写し、その構造を維持したまま移植できることを示した。

第五章では、ヒト毛髪再生への応用に向けて、ヒトの毛根に存在する毛乳頭細胞を用いた毛包原基の大量調製について述べた。マウス胎児の上皮系細胞とヒト毛乳頭細胞を混合した懸濁液をチップに播種することで毛包原基を大量調製した。これを免疫不全マウスの皮膚に移植すると、正常な毛周期を繰り返す組織学的に正常な毛包を再生した。

今後、ヒトから採取した上皮系細胞と間葉系細胞を用いて、ヒト毛包原基の大量培養に取り組む予定である。もちろん、毛包原基を大量調製するための細胞を如何に確保するか、毛髪再生効率を如何に上げるかなど、解決しなければならない課題は山積みしている。これらの課題に1つずつ取り組み、高い毛髪再生能を有する毛包原基を大量調製する技術を確立したい。今後、毛髪再生医療が本格的に稼働し、従来の自毛植毛治療に代わるものとなれば、失った毛髪について悩むことのない世の中が現実のものとなるであろう。世界中の医療機関で毛包原基を大量培養するための毛包再生チップが用いられ、患者に安価に必要な毛包原基を提供することができるよう、本技術をより一層発展させていきたい。

謝辞

本研究を進めるにあたり、懇切丁寧なご指導ならびに助言を頂きました横浜国立大学工学研究科、福田淳二准教授、新田見匡特別研究教員、さらに、東京大学大学院医学系研究科、疾患生命工学センター、再生医療工学部門、伊藤大知准教授、岡山理科大学理学部、臨床生命科学科、片岡健教授に心より感謝致します。

また、学位審査にあたり、懇切丁寧なご指導ならびに助言を頂きました横浜国立大学工学研究科、渡邊昌俊教授、小泉淳一教授、板垣宏教授、中村一穂准教授に心より感謝致します。

そして、研究全般において助言、協力して下さった先輩方、研究室内での有意義な時間を共に過ごし、苦しい時でも互いに励ましあった仲間、後輩に感謝致します。

最後に、研究に専念できる生活環境を与え、温かく見守ってくれた両親、家族、友人に心から感謝致します。

2017年3月

景山 達斗

業績リスト

(1) 学術雑誌等に発表した論文 (査読あり 5 報)

- [1] **Tatsuto Kageyama**, Takahiro Kakegawa, Tatsuya Osaki, Junko Enomoto, Taichi Ito, Tadashi Nittami and Junji Fukuda, Rapid engineering of endothelial cell-lined vascular-like structures in in situ crosslinkable hydrogels, *Biofabrication* (IF=4.289), IOP science, 6, 2, 025006, 2014
- [2] **Tatsuto Kageyama**, Takahiro Kakegawa, Tatsuya Osaki, Taichi Ito, Tadashi Nittami and Junji Fukuda, In situ crosslinkable hydrogel for rapid engineering of vascular-like structures by using electrochemical detachment of cells, *Proc. μ TAS 2013* (Proceeding paper)
- [3] Tatsuya Osaki, Takahiro Kakegawa, **Tatsuto Kageyama**, Junko Enomoto, Tadashi Nittami and Junji Fukuda, Acceleration of vascular sprouting from fabricated perfusable vascular-like structures, *PLoS one* (IF=3.234) 10(4), 2015
- [4] Junko Enomoto, Naoto Mochizuki, Katsumi Ebisawa, Tatsuya Osaki, **Tatsuto Kageyama**, Dina Myasnikova, Tadashi Nittami, Junji Fukuda, Engineering thick cell sheets by electrochemical desorption of oligopeptides on membrane substrates, *Regenerative Therapy*, Elsevier, 3, pp24-21, 2016
- [5] **Tatsuto Kageyama**, Tatsuya Osaki, Junko Enomoto, Dina Myasnikova, Tadashi Nittami, Takuro Hozumi, Taichi Ito and Junji Fukuda, In situ crosslinkable gelatin-CMC hydrogels designed for rapid engineering of perfusable vasculatures, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, American Chemical Society, 2, 6, pp 1059-1066, 2016

(2) 学術雑誌等又は商業誌における解説、総説 (海外学術雑誌、査読あり 1 報、国内学術雑誌、査読あり 3 報)

- [1] Junko Enomoto, Takahiro Kakegawa, Tatsuya Osaki, **Tatsuto Kageyama**, Junji Fukuda, Cell detachment for engineering three-dimensional tissues, *Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems*, Eds. Arai, Tatsuo, Arai, Fumihiko, Yamato, Masayuki, Chapter 12, 213-222, 2015, ISBN 978-4-431-55297-0
- [2] **景山達斗**, 掛川貴弘, 福田淳二, 成形加工プロセスを模した立体組織作製, 「生物工学会誌」特集, 第 92 巻, 第 4 号, 2014
- [3] **景山達斗**, 福田淳二, 送液可能な血管構造を作るアプローチ, *HAB Newsletter*, Vol.21, No.1, 2014
- [4] **景山達斗**, 福田淳二, 髪の毛は蘇るのか?, *生物工学会誌バイオメディア*, Vol.93, No.6, 2015

(3) 国際会議における発表（口頭、査読あり 2 報、ポスター、査読あり 4 報）

[1] Tatsuto Kageyama, Takahiro Kakegawa, Tatsuya Osaki, Taichi Ito, Hiroaki Suzuki and Junji Fukuda, In situ crosslinkable hydrogel for rapid engineering of vascular-like structures by using electrochemical detachment of cells, 2012 MRS Fall Meeting, Boston, USA, poster, Nov. 2012

[2] Tatsuto Kageyama, Takahiro Kakegawa, Tatsuya Osaki, Taichi Ito, Tadashi Nittami and Junji Fukuda, In situ crosslinkable hydrogel for rapid engineering of vascular-like structures by using electrochemical detachment of cells., μ TAS 2013, Freiburg, Germany, poster, Oct. 2013

[3] Tatsuto Kageyama, Takahiro Kakegawa, Tatsuya Osaki, Junko Enomoto, Taichi Ito, Tadashi Nittami and Junji Fukuda, Rapid micromolding of endothelial cell-lined vascular-like structures in in situ crosslinkable hydrogels, Termis-EU 2014, Genova, Italy, oral, Jun. 2014

[4] Tatsuto Kageyama, Tatsuya Osaki, Junko Enomoto, Taichi Ito, Takahisa Anada, Osamu Suzuki and Junji Fukuda, Vascularized bone tissue engineering using rapid vascular fabrication technique. 4th TERMIS-WC, Boston, USA, poster, Sep. 2015

[5] Tatsuto Kageyama, Ken Kataoka and Junji Fukuda, Fabrication of regularly aligned hair follicles using microfabricated PDMS microarray chips. 2016 MRS Spring Meeting, Phoenix, USA, oral, Mar. 2016

[6] Tatsuto Kageyama and J. Fukuda, Large-scale preparation of hair follicle germs using oxygen-permeable PDMS microarray chips. 3rd International Conference on Biomaterial Science in Tokyo 2016 (ICBS2016), Tokyo, Japan, Nov. 2016

(4) 国内学会、シンポジウム等における発表

（口頭：査読あり 10 報，招待講演 1 報，ポスター：査読あり 8 報、査読なし 5 報）

[1] 景山達斗, 掛川貴弘, 大崎達哉, 伊藤大知, 鈴木博章, 福田淳二, 電気化学的細胞脱離と in situ ゲル化スマートバイオマテリアルを用いた血管様構造の構築, 化学工学会第 44 回大会秋季大会, 2012 年 9 月（口頭）

[2] 景山達斗, 伊藤大知, 鈴木博章, 福田淳二, 電気化学的細胞脱離とスマートバイオマテリアルを用いたテ

ィッシュエンジニアリング, 第 64 回日本生物工学会大会, 2012 年 10 月（口頭）(受賞あり)

[3] 景山達斗, 伊藤大知, 鈴木博章, 福田淳二, 電気化学的細胞脱離と in situ スマートマテリアルを用いた血管様構造の構築, つくば医工連携フォーラム 2013, 2013 年 1 月（ポスター）

[4] 景山達斗, 伊藤大知, 鈴木博章, 福田淳二, 血管様構造の高速モーディイングのため

の in situ 架橋ハイドロゲル, 第 2 回バイオアセンブラ若手シンポジウム, 2013 年 6 月 (ポスター)

[5] 景山達斗, 掛川貴弘, 大崎達哉, 伊藤大知, 新田見匡, 福田淳二, 三次元臓器モールドイングに向けた in situ ゲル化マテリアル, 第 35 回日本バイオマテリアル学会, 2013 年 11 月 (口頭)

[6] 景山達斗, 掛川貴弘, 大崎達哉, 伊藤大知, 新田見匡・福田淳二, In situ 架橋スマートマテリアルを用いた三次元臓器モールドイング, 第 2 回日本生物工学会東日本支部コロキウム, 2014 年 3 月 (口頭)

[7] 景山達斗, 掛川貴弘, 大崎達哉, 伊藤大知, 新田見匡, 福田淳二, 三次元組織構築のための血管構造モールドイング, 日本生物工学会 第 6 回 若手研究シンポジウム 2014 年 7 月 (口頭)

[8] 景山達斗, 掛川貴弘, 大崎達哉, 伊藤大知, 新田見匡, 福田淳二, In situ 架橋スマートマテリアルを用いた三次元骨組織モールドイング, 第 3 回バイオアセンブラ若手シンポジウム, 2014 年 7 月 (ポスター)

[9] 景山達斗, 掛川貴弘, 大崎達哉, 伊藤大知, 新田見匡, 福田淳二, 成形加工プロセスを模倣した素早い三次元臓器モールドイング, 化学工学会第 46 回大会秋季大会, 2014 年 9 月 (口頭)

[10] 景山達斗, 掛川貴弘, 大崎達哉, 伊藤大知, 新田見匡, 福田淳二, In situ 架橋ハイドロゲルを用いた三次元臓器モールドイング, 第 66 回日本生物工学会大会, 2014 年 9 月 (ポスター) (受賞あり)

[11] 景山達斗, 掛川貴弘, 大崎達哉, 伊藤大知, 新田見匡, 福田淳二, 成形加工プロセスを模倣した骨組織モールドイング, 日本生物工学会東日本支部 第 9 回 学生発表討論会, 2014 年 11 月 (口頭, 飛翔賞受賞者招待講演)

[12] 景山達斗, 掛川貴弘, 大崎達哉, 伊藤大知, 新田見匡, 福田淳二, 「射出成形技術を模した三次元血管導入骨組織モデルの構築」動物実験代替法学会 第 27 回大会, 2014 年 12 月 (ポスター)

[13] 景山達斗, 掛川貴弘, 大崎達哉, 伊藤大知, 新田見匡, 福田淳二, 電気化学細胞脱離を用いた血管導入骨組織の構築, 第 82 回電気化学学会, 2015 年 3 月 (ポスター) (受賞あり)

[14] 景山達斗, 園山由希江, 吉村知紗, 伊藤大和, 穴田貴久, 鈴木治, 福田淳二, 射出成形技術を模した血管導入骨組織の構築, 第 14 回日本再生医療学会総会, 2015 年 3 月 (ポスター)

[15] 景山達斗, 大崎達哉, 伊藤大和, 穴田貴久, 鈴木治, 福田淳二, 骨をつくる, 毛を生やす, 第 4 回バイオアセンブラ若手シンポジウム, 2015 年 7 月 (ポスター)

[16] 景山達斗, 吉村知紗, 福田淳二, 上皮系と間葉系細胞の自発的な分離凝集による毛包組織の調整, 第 37 回日本バイオマテリアル学会, 2015 年 11 月 (ポスター, ハイライト講演) (受賞あり)

[17] 景山達斗, 吉村知紗, 大崎達哉, 片岡健, 福田淳二, スフェロイドアレイチップを用い

た毛包原基の大量調製, 第 15 回日本再生医療学会, 2016 年 3 月 (口頭)

[18] 景山達斗, 福田 淳二, 上皮系と間葉系細胞の凝集体形成を利用した毛包原基の大量調製, 第 4 回細胞凝集研究会, 2016 年 9 月 (シンポジウム講演)

[19] 景山達斗, 吉村知紗, 片岡健, 福田 淳二, 酸素透過性マイクロウェルアレイチップを用いた毛包原基の大量調製, 第 68 回日本生物工学会, 2016 年 9 月 (ポスター)

[20] 景山達斗, 福田 淳二, 間葉系細胞包埋ゲルビーズを用いた毛髪再生技術の開発, 第 54 回日本人工臓器学会大会, 2016 年 11 月 (ポスター)

[21] 景山達斗, 吉村知紗, 園山由希江, 清水亮啓, Yan Lei, 福田 淳二, 微細加工技術を用いた毛包原基大量調製容器の開発, 第 21 回日本臨床毛髪学会学術集会 2016 年 11 月 (口頭)
...他 3 件

(5) 特許等 (申請中 5 件うち PCT 出願 2 件)

[1] 特願 2015-179750, 出願人 横浜国立大学, 発明者 福田淳二, 景山達斗, 園山由希江, 荒木拓人

[2] 特願 2015-214547, 出願人 横浜国立大学, 発明者 福田淳二, 景山達斗, 吉村知紗, 大西希咲 (PCT 出願)

[3] 特願 2015-215034, 出願人 横浜国立大学, 発明者 福田淳二, 景山達斗, 園山由希江, 荒木拓人

[4] 特願 2016-120808, 出願人 横浜国立大学, 発明者 福田淳二, 景山達斗 (PCT 出願)

[5] 特願 2016-226344, 出願人 横浜国立大学, 発明者 福田淳二, 景山達斗

(6) 新聞報道・受賞

(新聞報道 1 報)

[1] 日本経済新聞, 「毛生む器官、大量培養 横浜国大、再生医療に道」, 2016 年 2 月 22 日
(受賞 11 件)

[2] 文部科学省主催, 第 1 回サイエンスインカレ, サイエンスインカレ奨励賞, 2012 年 2 月

[3] 文部科学省主催, 第 1 回サイエンスインカレ, 富士フィルム賞, 2012 年 2 月

[4] 筑波大学, 学長表彰, 2012 年 3 月

[5] 筑波大学, 物性・分子工学専攻, 学修優秀賞, 2012 年 3 月

[6] 第 64 回日本生物工学会大会, セルプロセッシング計測評価研究部会学生発表賞, 2012 年 10 月

[7] 筑波大学, 物性・分子工学専攻, 修士論文優秀賞, 2014 年 3 月

[8] 第 3 回超高速バイアアセンブラ若手シンポジウム 優秀発表賞, 2014 年 7 月

[9] 日本生物工学会第 6 回若手研究シンポジウム Young Researcher 's Award, 2014 年 7 月

[10] 日本生物工学会 生物工学学生優秀賞 (飛翔賞), 2014 年 9 月

- [11]電気化学会 学生ポスター賞 2015年3月
- [12]第37回日本バイオマテリアル学会ハイライト講演 2015年11月
- [13]第54回日本人工臓器学会大会萌芽ポスターセッション 大会長賞 2016年11月
- [14]Journal of materials chemistry B poster prize 2016年11月