

平成 25 年度博士論文

毛包の機能的な再生に関する研究

東京理科大学大学院基礎工学研究科
生物工学専攻 浅川 杏祐
指導教員 博士（理学）辻 孝

目次

略語表	3
要旨	4
序論	12
方法	17
結果	23
考察	30
謝辞	35
参考文献	37
図表	44
主論文およびその他業績	54

略語表

ACh:	Acetylcholine
ad:	Adipocyte
ALP:	Alkaline Phosphatase
AT:	Atropine
Cal:	Calponin
cys:	Cyst
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DP:	Dermal Papilla
EGFP:	Enhanced Green Fluorescence Protein
FUT	Follicular Unit Transplantation
H&E:	Eosin and Haematoxylin
HF	Hair Follicle
hs:	Hair Shaft
irs:	Inner Root Sheath
NF:	Neurofilament H
OC:	Organ Culture
ors:	Outer Root Sheath
PBS(-):	Phosphate Buffered Saline
SRC:	Sub-Renal Capsule
sg:	Sebaceous Gland
Vcan:	Versican
WT:	Wild Type
α -SMA:	Smooth Muscle α -Actin

要旨

ほぼすべての器官は、胎児期の上皮・間葉系細胞の相互作用により発生する。毛包、歯、唾液腺といった外胚葉性皮膚付属器官は、外胚葉由来の上皮性細胞と、中胚葉および神経提由来の間葉性細胞から構成される器官原基より、時空間的制御を受けた複雑な分子シグナル機構により発生すると考えられている。毛包は発生過程において、毛包や皮脂腺、および皮膚表皮に分化可能な上皮性幹細胞と、毛乳頭細胞と呼ばれる毛包誘導能を有した間葉性細胞が幹細胞ニッチに維持される。この2種類の幹細胞が成体において発生過程の上皮・間葉相互作用を繰り返すことにより、周期的な毛包成長と退行である毛周期を生涯にわたって繰り返すことが知られている。

毛包は、発生過程において、形態学的特徴の異なる毛幹を産生する複数種の毛包に運命付けられる。その後、毛幹を体表面より萌出することにより、外的侵害や紫外線等から体表面の防御やカモフラージュなどの機能を担っている。ヒトにおいては性的成熟や個体識別および社会的な地位を示すなどの社会的な役割も果たしている。また、発生過程において立毛筋や末梢神経と接続することにより感覚受容器として機能すると共に、温度変化に伴って立毛応答して体温調節する生理的機能を有する。最近では、幹細胞生物学の発展により、毛包は皮膚の恒常性を保つ成体幹細胞プールとしての機能を担い、神経、筋、脂肪や皮膚免疫細胞と連携して機能することが示され、毛包は皮膚にも影響を及ぼす重要な器官であると考えられている。

外傷や熱傷による毛包の喪失や、毛包の機能不全により発症する脱毛症の治療のために、種々の薬物療法や自己毛包の移植が開発され、数多くの治療実績を有している。しかしながら、無毛症や乏毛症などの毛包疾患に対しては有効な治療法は確立されておらず、根本的な脱毛症治療として、新たな毛器官の再生医療の技術開発が期待されている。再生医学は生物学的な発生・再生の原理に基づいて新しい学問体

系として確立され、生物の発生システムを利用して再生器官を作り出すアプローチが考えられている。本研究室では、2007年に、中尾らは三次元的な細胞操作によって正常な構造を有する器官を発生させる「器官原基法」を世界に先駆けて開発した。さらに2012年は、豊島らが器官原基法を応用して、成体毛包の上皮性細胞と間葉性細胞から目的の部位において完全に機能的な毛包の再生を示して毛包の器官再生医療への実現可能性を示した。

そこで本研究では、再生毛包の機能損傷部位への移植による毛髪再生医療への実用可能性を実証することを目的として、マウス胎児背部皮膚由来細胞より異所的に毛包を再生する技術開発を進め、自己毛包移植術を用いて長期移植することにより、再生毛包のレシピエント組織との生着と、幹細胞ニッチを再生することによる毛包の周期的成長を明らかにした。さらに、立毛筋、神経と適切に接続し、立毛機能を再現するかを明らかとすることによって再生毛包の機能的な再生について解析した。

器官原基法により作製した再生毛包原基からの再生毛包による毛包の同所的再生を解析するため、腎皮膜下における再生毛包原基からの異所的な毛包再生を解析した。胎齢18.5日のGFPマウス胎児背側皮膚に由来する単一化上皮細胞(7.5×10^4 cells)および間葉細胞(7.5×10^4 cells)を、器官原基法を用いて、コラーゲンゲル内にて高密度に区画化して再生毛包原基を作製し、器官培養2日後にマウス腎皮膜下に移植した。移植後14日に組織解析を行ったところ、組織学的に正常な毛包を有する皮膚構造体が形成された。再生毛包は、上皮細胞によって形成された嚢胞腔に向かって、一方向性に毛幹を伸長した。再生毛包には、マウス天然体毛と同様に形態学的に区別されるAwl / Guard / Zigzag毛が存在している。そこで再生毛包と天然毛包の成長期背部体毛のAwl毛について毛包長、毛球部幅の比較解析を行ったところ、再生毛包は形態学的に天然体毛と同等であることが示された。以上の結果から、

器官原基法により、皮膚組織に由来する特徴を有する毛包を再生可能であることが示された。

人為的に作製した成熟毛包としての異所的再生毛包が、任意の場所に移植可能であり、生着、発毛することを解析するため、異所的再生毛包をヌードマウス皮内に移植し、再生毛包の同所的再生を解析した。腎皮膜下移植後 14 日目の再生毛包を摘出し、1, 2 本の毛包からなるユニットに細切した後、脱毛症治療で行われている自家植毛術を応用して毛幹を露出させてヌードマウス皮内へ移植した結果、移植後 22 日に GFP 陽性の移植部位において GFP 陽性の毛包からの毛幹成長が観察された。組織解析を行ったところ、移植再生毛包の上皮組織はレシピエント上皮組織と正常に接続し、天然毛包と同様の毛球部、皮脂腺を含む上皮組織を形成していた。また、再生毛包には皮脂腺が存在し、Oil Red 染色により皮脂を分泌していることが判明した。毛包幹細胞が存在するバルジ領域と定義されている外毛根鞘には、毛包幹細胞マーカーである CD34, CD49f 共発現の細胞が配置していることから、毛包上皮性幹細胞ニッチを再構築していることが示された。一方、再生毛包の毛乳頭細胞は、分化マーカーである Versican および Alkaline phosphatase (ALP) を発現しており、毛球部最外層の薄い細胞層は、alpha smooth muscle actin (α -SMA) を発現していることから、毛乳頭の前駆細胞である真皮毛根鞘が再生していることが示され、間葉細胞ニッチも再構築していることが示された。以上の結果より、再生毛包は同所的に移植することにより、再生毛包は生着し、発毛、毛幹伸長するだけでなく、毛器官の永続性を司る幹細胞ニッチを再構築することが示された。

同所的に移植した再生毛包は、上皮性・間葉性幹細胞ニッチを再構築していることから、再生毛包の毛器官としての永続性を検証するため、同所的移植再生毛包について長期経時的解析を行った。再生毛包は、同所的移植後、周期的に毛幹の伸長と脱毛を繰り返しており、周

期的な毛幹伸長は移植後 100 日後においても観察された。毛幹伸長期と毛幹非伸長期において移植部位を組織学的に解析したところ、毛幹非伸長期では、毛包の上皮組織が退行しており、毛幹伸長期では毛乳頭細胞が上皮細胞に覆われた成長期毛包特有の毛球部構造が観察されたことから、同所的に移植した毛包は正常な毛周期を繰り返していることが示された。また、移植した再生毛包の有毛、無毛期間を解析したところ、有毛期間は 10.7 ± 2.0 day で、無毛期間は 10.5 ± 1.6 day であり、再生毛包の毛周期長は、全ての周期においてコントロールと比較して有意な違いは認められなかった。さらに、再生毛包の毛幹を解析したところ、毛周期を経ても毛幹の形態学的特徴は変化しないことが示された。以上の結果から、成熟毛包は目的の部位に移植することにより、毛種を維持したまま周期的な成長と退行を繰り返すことが示され、毛器官としての永続性が示された。

毛包は周辺組織と適切に接続することにより毛包固有の機能を発現することから、異所的再生毛包が、神経、立毛筋などの周辺組織と接続した機能的な再生であるかどうかを解析した。平滑筋マーカーである Calponin と神経細胞マーカーである Neurofilament について免疫組織学的に解析したところ、腎皮膜下移植後 14 日の再生毛包の上部領域では Calponin 陽性の繊維状細胞集団が観察されたものの、Neurofilament 陽性の神経は観察されなかった。再生毛包をヌードマウス皮内へ同所的に移植をすると、移植後 22 日において天然毛包と同様に、毛包のバルジ領域に平滑筋、神経線維が共に接続していることが明らかとなった。同所的に移植した再生毛包が立毛筋や神経と機能的に接続していることを評価するために、立毛機能評価系を構築した。自家植毛術を応用して、単毛包化した天然毛包をヌードマウス皮内に移植して生着したのち、立毛応答解析群として神経伝達物質であるアセチルコリン (ACh) を毛包付近に局所投与した時の毛幹の萌出角度の変化を解析したところ、コントロールに比べ、ACh 投与により、

ACh 濃度依存的な毛幹の立毛角度変化が観察された。また、ACh 受容体のアンタゴニストであるアトロピン (AT) を局所投与したところ、有意に立毛応答が阻害されたことから、立毛機能評価系として利用可能であることが判明した。本立毛機能評価系を用いて再生毛包について同様に解析したところ、再生毛包は ACh 刺激により有意な毛幹の立毛角度変化が観察された。以上の結果から、再生毛包は目的の部位に移植することにより、レシピエント表皮組織だけでなく、神経や立毛筋を介して周辺組織と機能的に接続することが明らかとなり、同所的に移植した再生毛包は毛器官として固有の周辺組織との連携した立毛機能を有していることが示された。

本研究では、再生器官の同所的移植による器官再生医療の概念実証を目的として、異所的再生毛包の同所的移植による機能的な毛包再生について研究を行った。本研究において、人為的な細胞操作により天然毛包と同等な毛包が再生可能であること、再生毛包を同所的に移植することにより生着し、機能的な幹細胞ニッチを有することに起因する毛周期を再現すること、さらに周辺組織と連携した立毛機能を再現することを明らかとし、再生器官による器官再生医療の概念実証と共に、器官置換再生医療における三次元的な機能的器官再生の重要性を示した。

現在、完全に機能欠損に陥った器官に対する治療法として臓器移植が適応されている。再生医療の技術開発として、これまでに単一化した胎仔または新生仔皮膚の上皮細胞と間葉細胞より毛包を再生する種々の方法が試みられてきたものの、FUT で実現されている毛流や精密な毛密度の制御による審美性を伴った再生は実現されていなかった。本研究では、単一化細胞から天然同等の毛包を異所的に作り出すことができ、さらに臨床の移植技術を利用して同所的に移植することにより、審美性を伴った毛包再生を果たしたのみならず、同所的部位での機能評価を可能とした。これらの結果から、器官原基法を用いた毛包

再生技術は、由来する組織の形質に依存した毛包を再生可能であり、治療目的に適合する毛包を選択的に移植する再生治療となるポテンシャルを有することが示唆された。

毛包の器官再生医療では、毛包固有の機能や形質を永続的に維持することが、重要な課題である。バルジ領域に局在する上皮性幹細胞は、毛包を構成する 7 種もの上皮組織に分化するだけでなく、表皮損傷時には皮脂腺や表皮細胞へ分化し、恒常性の維持に寄与していると考えられている。間葉性組織である毛乳頭細胞と真皮毛根鞘は、上皮性幹細胞を固有の形質の毛包へと分化誘導すると共に、休止期において TGF β シグナルを介して休眠状態の上皮性幹細胞を活性化することにより、毛周期の開始を指示するシグナルセンターとしての役割を担うことが知られている。これらのことから、再生毛包が永続性を獲得するためには、上皮性・間葉性幹細胞ニッチを再構築することが不可欠であると考えられてきた。本研究では、正所的環境下で毛包単位の機能を評価することを可能とし、再生毛包の長期間にわたって毛周期が繰り返されることが示された。これらの結果から、毛種運命を維持した永続的な毛髪再生の可能性が示唆される。

器官は、周辺組織と機能的に接続することにより、機能を発揮することが知られている。毛包は胎児期の発生過程で神経が侵入し、筋組織が毛包と皮膚を連結しながら成熟毛包となることにより、個体の体温調整に取って重要な機能である立毛応答を引き起こす。これまでに、自己単毛包移植術が脱毛症治療としておこなわれていたものの、同所的に移植した天然毛包や再生毛包が周辺組織と連携した機能を有しているかは未解明であった。本研究において、毛包の立毛機能を評価する方法を構築した結果、天然毛包や異所的に再生した毛包を同所的に移植することにより、発生過程と同様の周辺組織との接続を再構築し、立毛機能を再現することが明らかとなった。以上のことから、再生毛包による連携的機能を有する毛包再生が可能であることが示された。

さらに、同所的移植再生毛包においてバルジ領域特異的に神経接続していることから、バルジ領域細胞には神経誘引機能があることが示唆される。

再生器官による再生医療の実現には、同所的に完全に機能する器官を構築する技術が必要であると考えられている。これまでに三次元的な細胞構築により作製した再生毛包原基の同所的移植により完全に機能的な毛包の再生が示されてきた。本研究は再生器官原基から異所的に再生した成熟器官を同所的に移植することにより早期機能型の器官置換再生医療の概念の構築に貢献するとともに、その実現可能性を示唆した。今後、生体外での毛髪再生技術、毛髪の培養技術を開発することにより、機能的毛包の再生医療の臨床応用実現に資すると考えられる。これらの技術開発は、外胚葉性器官をはじめとする、器官置換再生医療の実現に貢献することが期待される。

序論

再生医療は幹細胞生物学や発生生物学、再生の原理に基づいて新たな学問体系として確立されつつあり、これを応用して再生医療技術へ発展することが期待されている (Brookes, J. P. & Kumar, A. 2005; Watt, F. M. & Hogan, B. L. 2000; Ikeda, E. et al., 2009)。現在の再生医療では部分的に傷害を受けた組織や器官の修復に向けて、造血幹細胞による悪性リンパ腫治療や間葉系幹細胞による心筋梗塞治療などに代表される、生体内に存在する幹細胞を移入する「幹細胞移入療法」や (Copelan, E.A., 2006; Nishikawa, S. et al., 2008)、細胞操作技術として細胞シート技術が開発されたことにより、表皮や角膜、心筋細胞などの機能的細胞シートの臨床研究が推進されている (Miyahara, Y. et al., 2006; Ohashi, K. et al., 2007; Korbling, M., Estrov, Z., 2003)。さらに次世代の再生医療として、現在の臓器移植医療の概念に相当する、傷害や疾患によって機能不全に陥った臓器を再生臓器と置き換える臓器再生医療が期待されている。外胚葉性器官の機能的な再生のコンセプトとして、胎児期の器官発生過程プロセスを再現するアプローチが提唱されている (Ikeda, E., Tsuji, T., 2008; Yen, A. H., Sharpe, P. T., 2006)。からだを構成する歯や毛、唾液腺など、ほとんどの外胚葉性器官は、胎児期の上皮組織と間葉組織から構成される器官原基における、時空間的に厳密に制御された上皮・間葉相互作用によって発生する (Chuong, C. M. et al., 2006; Pispas, J. & Theis, I., 2003)。この器官発生原理を応用した上皮細胞と間葉細胞を再構築する再生戦略は、外胚葉性器官である歯や髪の毛、唾液腺の再生で概念が構築された (Sharpe, P. T. & Young, C. S., 2005; Duailibi, S. E. et al., 2006)。これらの器官は多くの生理学的な機能を有しており、齲蝕や歯欠損、男性型脱毛症といった疾患の予防として人々の Quality of Life に貢献している (Nieminen, P., 2009; Randall, V. A. et al., 1993)。私たちは、これまでに、人為的に作製した再構成歯

胚から再生した、歯槽骨を含む再生歯ユニットの同所的移植により、咀嚼の可能性、骨リモデリングのための歯周靱帯機能と口腔の有害な刺激への反応機能を有する歯の再生を実証することにより、人為的に作製した成熟再生器官による器官再生という、新たな再生医療の概念を提唱した (Ikeda, E. et al., 2009; Oshima, M. et al., 2011)。現在、代表的な脱毛症である男性型脱毛症に対する治療法としては、外科的手法として自家植毛術 (Follicular unit transplantation; FUT) が開発され、毛種や密度、毛流を天然同様に再現可能な治療法として、臨床治療に応用されている (Unger, W. et al., 2010)。

外胚葉性器官であり、体表面に多く存在する毛包は、胎児期に皮膚の一部の上皮細胞と間葉細胞によって構成される毛包原基において、WntシグナルやBMPシグナルなどを介した上皮間葉相互作用により発生し、複数種の細胞や組織、神経、血管などが高度に組織化されたひとつの器官である。成熟毛包は、毛穴を構成する漏斗部、峡部と幹細胞ニッチであるバルジ領域からなる不変部と、毛包上皮細胞の前駆細胞である毛母細胞と間葉系の毛乳頭細胞が配置する可変部から構成される (Hardy, M. H., 1992; Stenn, K. S. & Paus, R., 2001)。毛包は発生過程で不変部の峡部に表皮性幹細胞、バルジ領域に CD34, CD49f 共陽性の上皮性幹細胞、バルジ領域下方領域に神経堤由来の色素幹細胞、さらに、毛乳頭内における多能性間葉性幹細胞など、複数の幹細胞を維持する幹細胞ニッチを有するため、幹細胞プールとしての機能を有し、皮膚環境の恒常性を維持している (Oshima, H. et al., 2001; Blanpain, C. et al., 2004; Nishimura, E. K. et al., 2005; Jahoda, C. A. et al., 2003, 図 1a)。これらの毛包に格納される幹細胞のうち、バルジ領域の上皮性幹細胞と毛乳頭内の間葉性幹細胞は、成体においても胎児期の毛包発生期と類似したシグナルの相互作用を繰り返し、成長期、退行期、休止期か

らなる、毛周期と呼ばれる周期的な毛包の再生と崩壊を繰り返す (Stenn, K. S. & Paus, R., 2001; Greco, V. et al., 2009)。これにより、毛包は体表面より毛幹を永続的に萌出することにより、外的因子による侵害からの防御や、審美的な役割を担う。上皮性幹細胞は、成長期において、外毛根鞘 (outer root sheath; ors) や内毛根鞘 (inner root sheath; irs)、毛母細胞 (hair matrix; hm)、毛幹 (hair shaft; hs) に分化する能力を有し (Stenn, K. S. & Paus, R., 2001; Oshima, H. et al., 2001; Blanpain, C. et al., 2004)、一方で、毛乳頭細胞とその前駆細胞である真皮毛根鞘細胞は、毛母細胞の細胞増殖や分化を制御することにより、毛幹の固さや大きさ、毛周期期間など形態学的、機能的な特徴を決定し、からだの部位によって固有の特徴を持つ、頬ひげや体毛 (Guard, Awl/Auchene, Zigzag) に運命付けると考えられている (Stenn, K. S. & Paus, R., 2001; Yamao, M. et al., 2010; McElwee, K. J. et al., 2003; Driskell, R. R. et al., 2009)。

毛包は、発生過程で神経、血管などの周辺組織と連携的に接続しながら成熟毛包へと発生する (Paus, R. et al., 2001)。成熟毛包は、体表面から萌出した毛幹へ外部因子が触れることによる感覚受容センサーとしての機能を有する。また、立毛筋を介して皮膚と接続することにより、冷温刺激により立毛筋が収縮した結果、交感神経支配により立毛現象が起こり、空気と皮膚との間に毛幹の厚い層を形成し、熱放散を防ぐことで体温調整を行っている (Chuong, C. M., 1998)。このように、毛包は周辺組織と機能的に接続することにより、外部環境の変動から内部環境の恒常性を守るための合理的なフィードバック機構の効果器としての生理学的な機能を有している。これまでに完全に機能的な毛包の再生を目指し、間葉細胞の移入による毛包可変部の再生や (Jahoda, C. A. et al., 1984; Jahoda, C. A. et al., 1996)、皮膚組織から単

離取得した上皮細胞と間葉細胞の細胞の自己組織化を利用した毛包再生など、多くの毛包再生技術が開発されてきた（Weinberg, W. C. et al., 1993; Lichti, U. et al., 2008）。最近、私たちは、胎児期の器官発生過程の上皮間葉相互作用を再現しうる三次元的な細胞操作によって、正常な構造を有する再生歯や再生毛包を高頻度で発生させる「器官原基法」を開発し（Nakao, K. et al., 2007）、人為的に再生した再生歯胚や再生毛包原基を、成体の機能欠損部位に同所的に移植することにより、再生器官が発生・萌出して、咬合機能、歯根膜機能、神経機能といった生理的機能を回復した歯の再生や、神経・立毛筋と機能的に接続することによる立毛応答を回復した毛包の再生が可能であることを明らかにした（Ikeda, E. et al., 2009; Toyoshima, K. E. et al., 2012）。

本研究では、現在の、肝不全に対する肝移植などに代表される臓器移植医療に代替しうる、人為的再生臓器による臓器置換再生医療の技術開発を目的として、再生毛包原基から異所的に再生成熟毛包を作製し、FUT法を応用して、細分化した毛包ユニットをヌードマウスの無毛皮膚領域に同所的に移植した。移植した再生成熟毛包は体表面より毛幹を萌出し、組織学的な解析により自律的にレシピエント表皮や神経、立毛筋との接続を回復したことが示された。さらに、再生成熟毛包は上皮性・間葉性幹細胞ニッチを再生したことに起因する毛周期を示し、アセチルコリン刺激による立毛応答機能を再現した。これらの結果は、人為的に作製した成熟再生毛包が、現在のFUT法による脱毛症治療に代替する、将来の脱毛症治療法となる可能性を示している。

方法

動物

C57BL/6 マウスおよび Balb/c nu/nu マウスは日本エスエルシー (Shizuoka, Japan) より購入した。また、C57BL/6-Tg(CAG-EGFP) C14-Y01-FM131Osb マウスは理化学研究所バイオリソースセンター (Tsukuba, Japan)より購入した。マウスの管理および操作はアメリカ国立衛生研究所の実験動物指針、文部科学省の実験動物指針および動物愛護法に従った。全ての実験は東京理科大学の実験動物管理委員会の許可の上、実施した。

胎齢 18.5 日マウス背部皮膚細胞からの再生毛包原基の作製

胎齢 18.5 日のマウス胎仔の背部皮膚組織を摘出した。皮膚組織に付着する筋組織などの皮下組織の混入は毛包の形成頻度に影響を与えるため、入念に取り除いた。トリミングした背部皮膚組織はメス (No.11 Feather, Osaka, Japan) を用いて 2 mm 画に細分化し、4.8 U/ml の Dispase (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) を PBS (-) で 5 倍希釈した酵素反応液中に浸漬して、55 rpm、4℃、1 時間処理した。1 時間後、DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) で酵素反応液を限界希釈後、上皮組織と間葉組織を 25G の注射針 (Terumo, Tokyo, Japan) で外科的に分離した。上皮組織は、10000 U/ml collagenase I (Worthington, Lakewood, NJ) -20 U/ml DNase I (Takara Bio, Shiga, Japan) -PBS(-)で、37℃で 40 分間の処理を 2 回行い、その後 0.25% trypsin (Invitrogen, Carlsbad, CA) -20 U/ml DNase I -PBS(-)によって 37℃で 10 分間処理し、DMEM により酵素反応停止後にピペッティングで単一化細胞にまで分解した。間葉の単一化細胞は 50 U/ml collagenase I -20 U/ml DNase I -DMEM によって 37℃で 55 rpm で振盪しながら、1 時間処理し、酵素反応液を限界希釈後、ピペッティングすることにより取得した。上皮と間葉の単一

化細胞をそれぞれシリコンコートしたマイクロチューブ（Eppendorf, Hamburg, Germany）に入れ、2500 rpm で 5 分間遠心することにより細胞ペレットを得た。上清を GELoader Tip 0.5-20 ml (Eppendorf)によって完全に除去することで、約 5×10^8 cells/ml の濃度の上皮細胞と間葉細胞の高密度細胞懸濁液を取得した。上皮細胞と間葉細胞が高密度に区画化された再生毛包原基を作製するために、シリコンコートした細胞培養 dish の上に滴下した 30 ml の Cellmatrix type I-A（Nitta gelatin, Osaka, Japan）のコラーゲンゲルドロップ中に、0.1-10 ml pipette tip (Molecular Bio Products, San Diego, CA)を用いて 7.5×10^4 cells の間葉細胞を注入し、間葉細胞の凝集体を作製した。続いて 7.5×10^4 cells の上皮細胞懸濁液を間葉細胞の凝集体に密着するようにして注入した。この再生毛包原基が注入されたゲルを 37°C に 10 分間静置することで固化し、先の細いピンセットで摘み上げて、6 ウェルプレートに設置した cell culture insert (0.4 mm pore diameter; BD, Franklin Lakes, NJ)の上に移動させた。6 ウェルプレート中には DMEM を添加し、37°C、5% CO₂ のインキュベーター内で 2 日間培養した。

腎皮膜下移植

2 日の器官培養後、再生毛包原基を定法に従って 8 週齢マウスの腎皮膜下に 14 日間移植した (Fingert, 1984)。

成体体毛・再生毛包の単毛包化

8 週齢の C57BL/6-Tg(CAG-EGFP) C14-Y01-FM131Osb マウスより、抜毛 5 日後の背中の皮膚を摘出した。メス (No.14 Feather) を用いて、皮下脂肪および結合組織を除去し、毛包ユニットを摘出した。腎皮膜下移植後 14 日の再生毛包を摘出し、同様の手法により毛包ユニットを

摘出した。

単毛包ユニットの皮内移植

深麻酔下において 6 週齢 Balb/c nude マウスの背中皮膚に 20G のオフサルミック V - ランス (Alcon Japan, Tokyo, Japan) を用いて、皮膚に対して水平になるように皮膚内に針の先端から 2.8 mm までを突き刺し、穴を開けた。ピンセットを用いてガイド毛が皮膚外に露出される様に再生毛包原基および単毛包化した成体体毛を皮内に移植した。露出したガイド毛には Steri-Strip(3M Health Care, Loughborough, UK) を貼り、移植部位にナースバン (Sunplanet, Tokyo, Japan) を置き、上からマウスの胴体にニチバンサージカルテープ (Nichiban, Tokyo, Japan) を巻きつけた。サージカルテープは移植後 7 日目で除去した。

マクロ経過観察方法

移植直後および移植後 7 日目から 2~3 日おきに移植部位を Lumar (Carl Zeiss, Jene, Germany) を用いて、発毛の有無を確認しながら外観の蛍光実体写真撮影した。

組織学的解析

組織化学染色による組織学的解析のために、再生毛包は、4% パラホルムアルデヒド水溶液で固定後、エタノール希釈系列で脱水し、キシレンで透徹したのち、パラフィン包埋した。パラフィン切片 (5 mm) は、ヘマトキシリン-エオジン (H&E) 染色を行い、AxioCAM MRc5 (Carl Zeiss) を設置した正立顕微鏡 Axio Imager A1 (Carl Zeiss) にて検鏡した。

免疫組織化学的解析

免疫組織化学的解析のための組織は、ホルマリン（マイルドホルム 10N, WAKO, Osaka, Japan）で固定後、12.5%、25% スクロース水溶液で置換したのち、ドライアイス-ヘキサンを用いて O.C.T. compound（Sakura Finetechnical, Tokyo, Japan）で凍結包埋した。10 μ m 薄切した凍結切片に対して、抗 CD49f（Abcam, Cambridge, UK）, CD34（Abcam）, Versican（Milipore, Billerica, MA）, α -SMA（Epitomics, Burlingame, CA）, GFP（Clontech, Mountain View, CA）による免疫染色を行った。摘出組織は、未固定で凍結包埋した。切片は 1% BSA と 0.005% Tween20 を含む PBS(-) にて室温 1 時間のブロッキングを行った後に、一次抗体を滴下して 4°C で一晩反応させた。一次抗体は 0.1% BSA と 0.005% Tween20（MP Biomedicals, Illkirch, France）を含む PBS(-) 溶液でそれぞれ希釈して反応させた。二次抗体、Alexa594 標識した抗ウサギ IgG（Invitrogen, Carlsbad, CA）、Alexa594 標識した抗ラット IgG（Invitrogen）、Alexa594 標識した抗ヤギ IgG（Invitrogen）を用いた。これらの免疫染色画像は共焦点レーザー顕微鏡（LSM780 Meta; Carl Zeiss）の蛍光を用いて撮影した。

浮遊法による厚切り切片の免疫組織化学的解析

100 μ m に切片化した組織に対して、抗 Neurofilament H（CHEMICON, Temecula, CA）および Calponin（Abcam）による免疫染色を行った。摘出組織はホルマリン（マイルドホルム 10N）により 12 時間以上固定し、凍結包埋した。切片は 1% BSA と 0.1% Triton-X を含む PBS(-) にて室温 2 時間のブロッキングを行った後に、一次抗体を滴下して 4°C で一晩反応させた。一次抗体は 0.1% BSA と 0.1% Triton X を含む PBS(-) 溶液で 1:500 に希釈して反応させた。二次抗体、Alexa594 標識した抗

ウサギ IgG (Invitrogen) および、Alexa594 標識した抗ラット IgG (Invitrogen) を用いた。これらの免疫染色画像は共焦点レーザー顕微鏡 (LSM780 Meta; Carl Zeiss) を用いて撮影した。

立毛機能応答試験

10 mm マイクロシリンジ (Hamilton, Reno, NV, USA) を用いて、移植毛包付近に神経伝達物質および阻害剤を投与した。まず、皮膚の反射を出来る限り防ぐため、PBS(-)を 1 ul 投与し、その後、同じ部位に 0.1, 1.0, 10 mg/ml のアセチルコリン (Sigma) を 1 ul 投与した。また、アセチルコリンの特異性を示すため、アセチルコリンの投与前にアセチルコリンインヒビターである 100 mg/ml のアトロピン (Sigma) を 1 ul 投与した。立毛角度は顕微鏡画像解析を行い、計測した。薬剤投与前後の写真は、SteREO Lumar V12 (Carl Zeiss) および Axio Cam (Carl Zeiss) にて撮影を行った。

結果

1. 再生毛包原基からの異所的毛包の再生

器官原基法により作製した再生毛包原基からの再生毛包による毛包の同所的再生を解析するため、まず、腎皮膜下における再生毛包原基からの異所的な毛包再生を解析した。胎齢 18.5 日の GFP マウス胎児背側皮膚を酵素処理により上皮細胞と間葉細胞に単一細胞化し、器官原基法により、それぞれ 7.5×10^4 cells をコラーゲンゲル内にて高密度に区画化して再生毛包原基を作製した。器官培養 2 日後、再生毛包原基は間葉細胞に面した上皮組織が高密度に整列し組織化して透明度が高くなっている様子が観察され、成熟毛包への発生を促すために、マウス腎皮膜下に移植した（図 1b）。移植後 14 日目に、再生毛包原基から、一方向に毛幹を伸長した毛包が再生した（図 2, 実体像）。組織解析を行ったところ、表皮層、真皮層、脂肪層からなる皮膚構造体が形成されており、それに連続して再生毛包が形成されていた。再生毛包は外毛根鞘や内毛根鞘、および毛乳頭細胞を正常に形成しており、上皮細胞によって形成された嚢胞腔 (cyst; cys) に連続した再生毛包の上部では、皮脂腺 (sg; sebaceous gland) が形成されていた（図 2, HE 染色像）。マウスの体幹部に存在する天然体毛には、毛幹を構成する角化上皮組織であるキューティクルや毛髄質の構造的違いにより、太さや形態の異なる Guard, Awl/Auchene, Zigzag 毛が存在していることが知られている（図 3a）。再生毛包の毛種について解析したところ、頬ひげを除く全ての体毛種が存在していた。その存在比は、Guard ; $2.0 \pm 3.1\%$, Awl/Auchene ; $44.0 \pm 16.2\%$, Zigzag ; $36.2 \pm 14.8\%$ であった（図 3b）。この存在比は胎齢 18 日に存在する毛種の割合と一致する。再生毛包のサイズについて解析するために、天然毛包の成長期背部体毛の Awl 毛と再生毛包の Awl 毛について毛包長、最大毛球部幅の比較解析

を行ったところ、再生毛包は天然体毛と同等のサイズであることが示された（図 3c）。以上の結果から、器官原基法により、皮膚組織に由来する特徴を有する毛包を再生可能であることが示された。

2. 異所的毛包の同所的移植による毛包再生

人為的に作製した成熟毛包としての再生毛包が、任意の場所に移植可能であり、生着、発毛することを解析するため、再生毛包をヌードマウス皮内に移植し、再生毛包の同所的再生を解析した。腎皮膜下移植後 14 日目の再生毛包を摘出し、1, 2 本の毛包からなるユニットに細切した後、脱毛症治療で行われている自家植毛術を応用して毛幹を露出させてヌードマウス皮内へ移植した。このとき、レシピエント表皮と接続して正常に毛幹萌出させるために、再生毛幹を体表面より露出して、創傷治癒するまで外科用テープで固定した（図 4a）。その結果、移植後 16 日までに移植再生毛包は脱落したが、22 日後には GFP 陽性の移植部位において GFP 陽性の毛包からの毛幹伸長が観察された（図 4b）。組織解析を行ったところ、GFP 陽性の移植再生毛包の上皮組織はレシピエント上皮組織と正常に接続し、天然毛包と同様の毛球部、皮脂腺を含む上皮組織を形成した（図 4c）。また、再生毛包には皮脂腺が存在し、Oil Red 染色により皮脂を分泌していることが判明した（図 5, 上段左）。毛包幹細胞が存在するバルジ領域と定義されている、皮脂腺下方の外毛根鞘には、毛包幹細胞マーカーである CD34, CD49f 共発現の細胞が配置していることから、毛包上皮性幹細胞ニッチを再構築していることが示された（図 5, 上段中央、右）。一方、再生毛包の毛乳頭細胞は、分化マーカーである Versican (Vcan) および Alkaline phosphatase (ALP) を発現しており、毛球部最外層の薄い細胞層は、

毛乳頭細胞の前駆細胞である、真皮毛根鞘マーカーの α smooth muscle actin (α -SMA) を発現していることから、間葉細胞ニッチも再構築していることが示された (図 5, 下段)。以上の結果より、再生毛包は同所的に移植することにより、正常な組織構造で生着し、発毛、毛幹伸長するだけでなく、毛器官の永続性を司る幹細胞ニッチを再構築することが示された。これらのことから、同所的移植再生毛包は毛周期や周辺組織と連携した立毛応答機能を有することが示唆された。

3. 同所的移植再生毛包の永続性の解析

毛包は、成体において保持される上皮性幹細胞ニッチ・間葉細胞ニッチ間の毛包発生期と類似したシグナル分子による上皮・間葉相互作用により、周期的な毛包の成長と退行が繰り返されることが知られている。再生毛包が毛器官として永続的な毛周期を営むかを検証するために、同所的移植再生毛包を長期経時観察することにより、毛包の周期的成長を解析した。その結果、同所的移植後、再生毛包は移植部位において毛幹の伸長と退行を繰り返した (図 6a)。この周期的な毛幹成長は移植後 100 日後も観察された。有毛、無毛期間を解析したところ、有毛期間は 10.7 ± 2.0 (day) で、無毛期間は 10.5 ± 1.6 (day) であった。各移植部位における再生体毛の毛周期を 2 回追跡したところ、全ての周期においてコントロールと比較して優位な違いは認められなかった (図 6b)。また、毛幹伸長期と毛幹非伸長期において移植部位を組織学的に解析したところ、移植後 30 日の毛幹非伸長期では、移植物であることを示す GFP 陽性毛包の可変領域の上皮組織が崩壊し、体表面方向へ退行している様子が観察された (図 6c, 左)。一方、移植後 42 日の毛幹伸長期では毛乳頭細胞が上皮細胞に覆われた毛球部が観察され、

成長期毛包であることが示された（図 6c, 右）。さらに、毛種特異的な形態学的特徴から、再生毛包の毛種について解析したところ、毛周期を経て、新たに毛包再生した後も、移植時の毛種特異的な形態的特徴を維持していることが示された（図 7）。以上の結果から、成熟毛包は目的の部位に移植することで、その毛種を維持しつつ、周期的な成長と退行を繰り返すことが示され、毛器官としての永続性が示された。これらのことから、器官原基法により作製した成熟再生毛包は、幹細胞を維持し、幹細胞システムを営む能力を有することが示唆される。

4. 同所的移植毛包の立毛機能評価系の構築

毛包が固有の機能を発揮するためには周辺組織と適切に接続することが重要である。これまでに、同所的に移植した毛包の立毛機能の評価する方法は確立されておらず、移植毛包の周辺組織との接続による機能的再生は未解明であった。天然毛包を同所的に移植した場合、神経、立毛筋といった周辺組織と適切に接続することを検証するために、免疫組織学的解析を行った。

まず、天然体毛について平滑筋マーカーである calponin と神経細胞マーカーである Neurofilament について免疫組織学的に解析したところ、天然体毛のバルジ領域では、calponin 陽性の立毛筋と Neurofilament 陽性の神経が接続する様子が観察された。同様に、単毛包化した天然体毛を、自家植毛術を応用してヌードマウス皮内へ移植し、周辺組織との接続を解析したところ、再生毛包のバルジ領域において天然同様の立毛筋、神経の接続が観察された（図 8a）。

続いて、同所的移植再生毛包が立毛筋・神経と機能的に接続していることを評価するために、立毛機能評価系を構築した。天然毛包をヌ

ードマウス皮内に移植して生着したのち、コントロール群としての PBS(-)、立毛応答解析群として神経伝達物質であるアセチルコリン (ACh) を移植毛包の近傍に局所投与した時の毛幹の体表面からの萌出角度の変化を解析したところ、PBS(-)投与時に比べ、ACh 投与により毛幹の萌出角度の変化が誘導された (図 8b)。また、毛幹の萌出角度変化は ACh 濃度依存的であることが示された (図 8c)。ACh 特異的な反応であることを示すために、ACh 受容体のアンタゴニストであるアトロピン (AT) を局所投与後、同部位に ACh を局所投与したところ、毛幹は PBS(-)投与時と同程度の萌出角度変化を示したことから、有意に立毛応答が阻害されたことが示された (図 8d)。以上のことから、本評価系が毛包の立毛機能評価系として利用可能であることが判明した。

5. 同所的移植再生毛包の周辺組織と連携した機能的再生

同所的に移植した再生毛包が、神経、立毛筋といった周辺組織と適切に接続し、機能的な再生を果たしていることを検証した。

まず、免疫組織学的解析により周辺組織との接続を解析したところ、再生毛包原基の腎皮膜下移植後 14 日目において、calponin 陽性の繊維状細胞集団が再生した毛包と皮膚を連結するように接続している様子が観察されたものの、Neurofilament 陽性の神経は、毛包内に侵入し接続している様子は観察されなかった。一方、再生毛包を単毛包に細分化した後、同所的に移植した再生毛包では、移植後 22 日目において、皮脂腺下方のバルジ領域に立毛筋、神経がともに接続する様子が観察された (図 9a)。

同所的に移植した再生毛包の周辺組織との接続による機能的再生を

検証するために、天然毛包を用いて確立した立毛機能評価系を用いて、再生毛包の立毛応答能を解析したところ、ACh 刺激による有意な毛幹の立毛角度変化が観察された（図 9b, c）。以上の結果から、再生毛包は目的の部位に移植することで、レシピエント表皮組織だけでなく、神経や立毛筋を介して周辺組織と接続し、天然毛包と同等の立毛機能を有することが示された。

考察

本研究では、再生成熟器官の同所的移植による機能的な器官再生医療の概念実証を目的として、FUT 法を応用した再生成熟毛包のヌードマウス背部皮膚への移植による機能的な毛包再生について研究を行った。本研究において、人為的な細胞操作により天然毛包と同等な毛包が再生可能であること、再生毛包を同所的に移植することにより生着し、機能的な幹細胞ニッチを有することに起因する毛周期を再現すること、さらに立毛筋・神経と機能的な接続を再生し、立毛機能を再現することを明らかとし、再生成熟器官による器官置換再生医療システムの概念実証と共に、機能的な器官再生医療における、三次元的な器官再生の重要性を示した。

現在、完全に機能欠損に陥った器官に対する治療法として臓器移植が適応されている（Oshima, M. et al., 2011; Fiegel, H. C. et al., 2007）。次世代の再生医療として、現在の臓器移植治療の代替となりうる技術である、様々な幹細胞や前駆細胞を三次元的に再構築し、完全に機能的な成熟器官を再生し、機能不全に陥った臓器や器官と置換する再生医療技術の開発が期待されている（Chuong, C. M. et al., 2007）。毛包の機能疾患である男性型脱毛症に対する自家植毛術による治療は、器官移植治療として最も成功した治療法の一つである（Unger, W. et al., 2010）。これまでに、胎児期の器官発生を模倣した、単一化した胎仔または新生仔皮膚の上皮細胞と間葉細胞をもちいた器官再生コンセプトによる種々の毛包再生技術が開発されてきた（Jahoda, C. A. et al., 1984; Jahoda, C. A. et al., 1996; Weinberg, W. C. et al., 1993; Lichti, U. et al., 2008; Nakao, K. et al., 2007）。これらの方法は、毛包の上皮細胞と間葉細胞を混合して移植することにより、細胞自律的な毛包原基形成を促すため、FUT で実現されている毛流や精密な毛密度の制御による審美性を伴った再生は実現されていなかった（Weinberg, W. C. et al., 1993; Lichti, U. et al., 2008）。本研究では、私たちは、単一化細胞から形態学的に天然体毛と同等で、組織学的に正常な毛包構造を有する再

生毛包を作製可能であり、FUT 法を応用してマウス背部に移植することにより、審美性を伴った毛包再生を果たした。さらに、本実験系により、再生毛包の同所的部位での機能評価を可能とした。以上の結果から、器官原基法を用いた毛包再生技術は、FUT 法による脱毛症治療に代替しうる毛髪の再生治療技術となるポテンシャルを有することが示唆された。

毛髪の再生医療では、人為的に作製した再生毛包が運命づけられた毛種特異的な固有の機能や形質を永続的に維持することが、重要な課題である (Hardy, M. H., 1992; Kutzner, H. et al., 2006)。毛包は毛周期を営むことにより、繰り返し毛幹を萌出し、外的因子からの保護や、体温調整、感覚機能としての機能を果たす (Chuong, C. M., 1998; Peters, E. M. et al., 2001; Dorfl, J., 1985; Peters, E. M. et al., 2002)。男性型脱毛症にたいする FUT 法による治療では、後頭部の正常頭髪を脱毛部位に移植することにより、生着し、毛幹伸長するのみならず、脱毛部位の環境からは独立して、後頭部頭髪の正常な毛幹の太さや長さ、形態や毛色などの特徴を永続的に維持することが知られている (Unger, W. et al., 2010)。毛包の永続的な毛周期に寄与する幹細胞は発生過程で毛包内の幹細胞ニッチに格納され、一生涯にわたり保持される (Watt, F. M. & Hogan, B. L., 2000; Hardy, M. H., 1992; Oshima, H. et al., 2001; Blanpain, C. et al., 2004)。バルジ領域に局在する上皮性幹細胞は、毛包を構成する 7 種もの上皮組織に分化するだけでなく、表皮損傷時には皮脂腺や表皮細胞へ分化し、恒常性の維持に寄与していると考えられている (Watt, F. M. & Hogan, B. L., 2000; Hardy, M. H., 1992; Oshima, H. et al., 2001; Ito, M. et al., 2011)。間葉性組織である毛乳頭細胞と真皮毛根鞘は、上皮性幹細胞を固有の形質の毛包へと分化誘導すると共に、毛周期の開始を指示するシグナルセンターとしての役割を担うことが知られている (Yamao, M. et al., 2010; McElwee, K. J. et al., 2003; Jahoda, C. A. et al., 1984; Jahoda, C. A. et al., 1996)。これらのことから、機能

的な再生毛包において、再生毛包は上皮性・間葉性幹細胞ニッチを再構築し、皮膚環境で毛周期を営むことが不可欠であると考えられてきた (Chuong, C. M. et al., 2006)。本研究では、皮膚環境下で再生毛包は幹細胞ニッチを再生し、毛種固有の形質を維持し、天然体毛と同等の毛周期を長期間にわたって営むことが示された。以上の結果から、毛種運命を維持した永続的な毛髪再生の可能性が示唆される。

毛包は、胎児期の発生過程で立毛筋と神経が毛包不変部のバルジ領域選択的に接続しながら成熟毛包を形成する。マウス体毛の立毛筋は Calponin 陽性の平滑筋により構成され、バルジ領域の上皮性幹細胞が分泌する細胞外マトリクスである Nephronectin 発現領域において、隣接した間葉細胞が立毛筋へ分化することが知られている (Fujiwara, H. et al., 2011)。毛包は、神経組織が立毛筋と接続することで、立毛機能と洞毛機能を獲得し、および感覚受容器官として機能する (Peters, E. M. et al., 2001; Kutzner, H. et al., 2006; Dorfl, J., 1985; Peters, E. M. et al., 2002; Fujiwara, H. et al., 2011)。さらに、毛包内の merkel 細胞によって誘導され、接続すると考えられている感覚神経の終末端より分泌される Hedgehog シグナルは、毛包の表皮性幹細胞ニッチの維持に重要な役割を果たすことが知られている (Brownell, I. et al., 2011; Peters, E. M. et al., 2001; Dorfl, J., 1985; 1985; Peters, E. M. et al., 2002)。これまでに、自己単毛包移植術が脱毛症治療としておこなわれていたものの、同所的に移植した天然毛包や再生毛包が神経や立毛筋と接続を回復して、連携的機能を有しているかは未解明であった。これらのことから、再生成熟毛包による毛髪の再生医療にとって、同所的に移植した再生毛包が成体皮膚環境と立毛筋や神経とを介して連携し、機能的回復を果たすことは非常に重要である。本研究において、私たちは毛包の立毛機能を評価する方法を構築した結果、人為的に作製した再生毛包がバルジ領域において発生過程と同様の立毛筋・神経接続を再構築し、立毛機能を再現することが明らかとなった。以上の結果から、再生成熟

毛包の同所的移植により、毛包固有の機能を完全に再現した毛包再生が可能であり、将来的な脱毛症治療へ応用可能であることが示唆される。

再生器官による再生医療の実現には、同所的に完全に機能する器官を構築する技術が必要であると考えられている。これまでに三次元的な細胞構築により作製した再生毛包原基の同所的移植により完全に機能的な毛包の再生が示されてきた。本研究は再生器官原基から再生した成熟毛包を、既存の脱毛症治療法である FUT 法を用いて同所的に移植することにより、機能的な毛包の再生医療の概念の構築に貢献するとともに、その実現可能性を示唆した。今後、生体外での毛髪再生技術、毛髪の培養技術を開発することにより、再生成熟毛包による毛髪再生医療の臨床応用実現に資すると考えられる。これらの技術開発は、外胚葉性器官をはじめとする、器官置換再生医療の実現に貢献することが期待される。

謝 辞

本研究にあたり、手厚い御指導と御鞭撻を賜りました東京理科大学基礎工学研究科生物工学専攻、辻孝教授に厚く御礼申し上げます。さらに、本研究に際し、御指導と御協力を頂きました東京理科大学総合研究機構社会連携部、豊島公栄博士をはじめ、北里大学医学部再生医療形成外科学、佐藤明男特任教授、北里大学医学部形成外科・美容外科学、武田啓准教授に深く感謝の意を表します。

さらに、実験を遂行するにあたり多大な御協力を賜りました東京理科大学基礎工学部生物工学科辻研究室の諸氏並びに卒業生へ心から感謝いたします。

最後に、陰ながら支えてくれた母、祖父母、叔父、友人に深く感謝いたします。本当にありがとうございました。

参考文献

Brockes, J. P. & Kumar, A. Appendage regeneration in adult vertebrates and implications for regenerative medicine. *Science*. 310, 1919–1923 (2005).

Watt, F. M. & Hogan, B. L. Out of Eden: Stem cells and their niches. *Science*. 287, 1427–30 (2000).

Ikeda, E. et al. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 106, 13475–80 (2009).

Copelan EA Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 354: 1813–1826 (2006).

Nishikawa S, Goldstein RA, Nierras CR The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 725–729 (2008).

Miyahara, Y., et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med* 12: 459–465 (2006).

Ohashi, K., et al. Engineering functional two- and three-dimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets. *Nat Medicine* 13: 880–885 (2007).

Korbling, M., Estrov, Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med* 349: 570–582 (2003).

Chuong, C. M., Wu, P., Plikus, M., Jiang, T. X. & Bruce, W. R. Engineering stem cells into organs: topobiological transformations demonstrated by beak,

feather, and other ectodermal organ morphogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 72, 237–274 (2006).

Pispa, J. & Thesleff, I. Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Dev Biol.* 262, 195–205 (2003).

Sharpe, P. T. & Young, C. S. Test-tube teeth. *Sci Am.* 293, 34–41 (2005).

Duailibi, S. E., Duailibi, M. T., Vacanti, J. P. & Yelick, P. C. Prospects for tooth regeneration. *Periodontol* 2000. 41, 177–187 (2006).

Nieminen, P. Genetic basis of tooth agenesis. *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* 312, 320–42 (2009).

Randall, V. A. et al. Hormones and hair growth: variations in androgen receptor content of dermal papilla cells cultured from human and red deer (*Cervus elaphus*) hair follicles. *J. Invest. Dermatol.* 101, 114S–120S (1993).

Oshima, M. et al. Functional Tooth Regeneration Using a Bioengineered Tooth Unit as a Mature Organ Replacement Regenerative Therapy. *PLoS ONE*. 6, e21531 (2011).

Hardy, M. H. The secret life of the hair follicle. *Trends Genet.* 8, 55–61 (1992).

Stenn, K. S. & Paus, R. Controls of hair follicle cycling. *Physiol. Rev.* 81, 449–94 (2001).

Oshima, H., Rochat, A., Kedzia, C., Kobayashi, K. & Barrandon, Y. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell*. 104, 233–45 (2001).

Blanpain, C., Lowry, W. E., Geoghegan, A., Polak, L. & Fuchs, E. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell*. 118, 635–48 (2004).

Nishimura, E. K., Granter, S. R. & Fisher, D. E. Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science*. 307, 720–24 (2005).

Jahoda, C. A., Whitehouse, J., Reynolds, A. J. & Hole, N. Hair follicle dermal cells differentiate into adipogenic and osteogenic lineages. *Exp. Dermatol.* 12, 849–59 (2003).

Greco, V. et al. A two-step mechanism for stem cell activation during hair regeneration. *Cell Stem Cell*. 4, 155–69 (2009).

Yamao, M. et al. Contact between dermal papilla cells and dermal sheath cells enhances the ability of DPCs to induce hair growth. *J. Invest. Dermatol.* 130, 2707–18 (2010).

McElwee, K. J. et al. Cultured peribulbar dermal sheath cells can induce hair follicle development and contribute to the dermal sheath and dermal papilla. *J. Invest. Dermatol.* 121, 1267–75 (2003).

Driskell, R. R., Giangreco, A., Jensen, K. B., Mulder, K. W. & Watt, F. M. Sox2- positive dermal papilla cells specify hair follicle type in mammalian epidermis. *Development*. 136, 2815–23 (2009).

Chuong, C. M. Morphogenesis of epithelial appendage. in Molecular basis of epithelial appendage morphogenesis. (ed. Chuong, C. M.) (R. G. Landes Company, Austin, Texas) (1998).

Jahoda, C. A., Horne, K. A. & Oliver, R. F. Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells. *Nature*. 311, 560–62 (1984).

Jahoda, C. A., Oliver, R. F., Reynolds, A. J., Forrester, J. C. & Horne, K. A. Human hair follicle regeneration following amputation and grafting into the nude mouse. *J Invest Dermatol*. 107, 804–07 (1996).

Weinberg, W. C. et al. Reconstitution of hair follicle development in vivo: determination of follicle formation, hair growth, and hair quality by dermal cells. *J. Invest. Dermatol*. 100, 229–36 (1993).

Lichti, U., Anders, J. & Yuspa, S. H. 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. *Nat Protoc*. 3, 799–810 (2008).

Nakao, K. et al. The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods*. 4, 227–30 (2007).

Toyoshima, K. E. et al. Fully functional hair follicle regeneration through the rearrangement of stem cells and their niches. *Nat commun.* 3, 784 (2012).

Unger, W. et al. Hair Transplantation, Fifth Edition (2010).

Sato, A. et al. Single follicular unit transplantation reconstructs arrector pili muscle- and nerve-connections and restores functional hair follicle piloerection in preparing. *J. Dermatol.* 39, 1–6 (2012).

Peters, E. M. et al. Hair-cycle-associated remodeling of the peptidergic innervation of murine skin, and hair growth modulation by neuropeptides. *J. Invest. Dermatol.* 116, 236–45 (2001).

Fiegel, H. C. et al. Hepatic tissue engineering: from transplantation to customized cell-based liver directed therapies from the laboratory. *J. Cell Mol. Med.* 12, 56–66 (2007).

Chuong, C. M., Cotsarelis, G. & Stenn, K. Defining hair follicles in the age of stem cell bioengineering. *J Invest Dermatol.* 127, 2098–2100 (2007).

Kutzner, H., Requena, L., Rütten, A. & Mentzel, T. Spindle cell predominant trichodiscoma: a fibrofolliculoma/trichodiscoma variant considered formerly to be a neurofollicular hamartoma: a clinicopathological and immunohistochemical analysis of 17 cases. *Am. J. Dermatopathol.* 28, 1–8 (2006).

Dorfl, J. The innervation of the mystacial region of the white mouse: A topographical study. *J. Anat.* 142, 173–184 (1985).

Peters, E. M. et al. Developmental timing of hair follicle and dorsal skin innervation in mice. *J. Comparative Neurology*. 448, 28–52 (2002).

Ito, M. et al. Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature*. 447, 316–20 (2007).

Fujiwara, H. et al. The basement membrane of hair follicle stem cells is a muscle cell niche. *Cell*. 144, 577–89 (2011).

Brownell, I., Guevara, E., Brain, B. C., Loomis, C. A. & Joyner, A. L. Nerve-Derived Sonic Hedgehog Defines a Niche for Hair Follicle Stem Cells Capable of Becoming Epidermal Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 6, 552–65 (2011).

Hellmann, K. The isolated pilomotor muscles as an in vitro preparation. *J. Physiol*. 169, 603–20 (1963).

図表

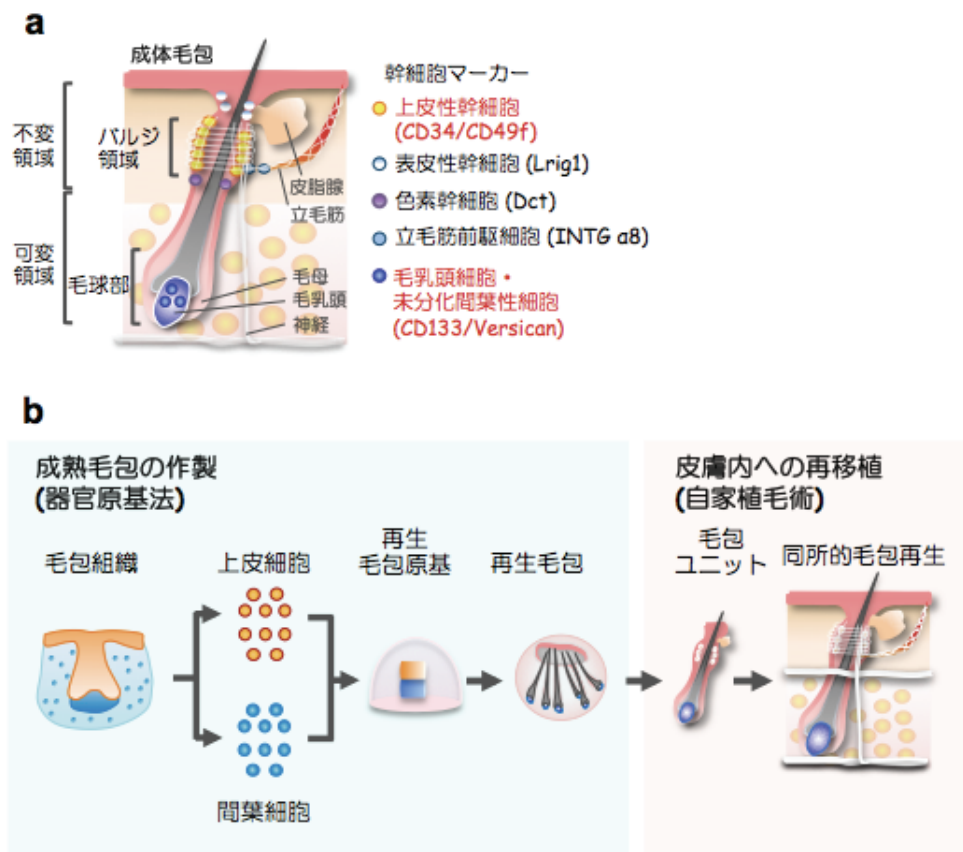


図 1. 毛包の構造と器官原基法
 (a) 毛包の構造と幹細胞
 (b) 器官原基法による成熟毛包の再生と再生毛包の再移植による毛包の機能的再生の概要

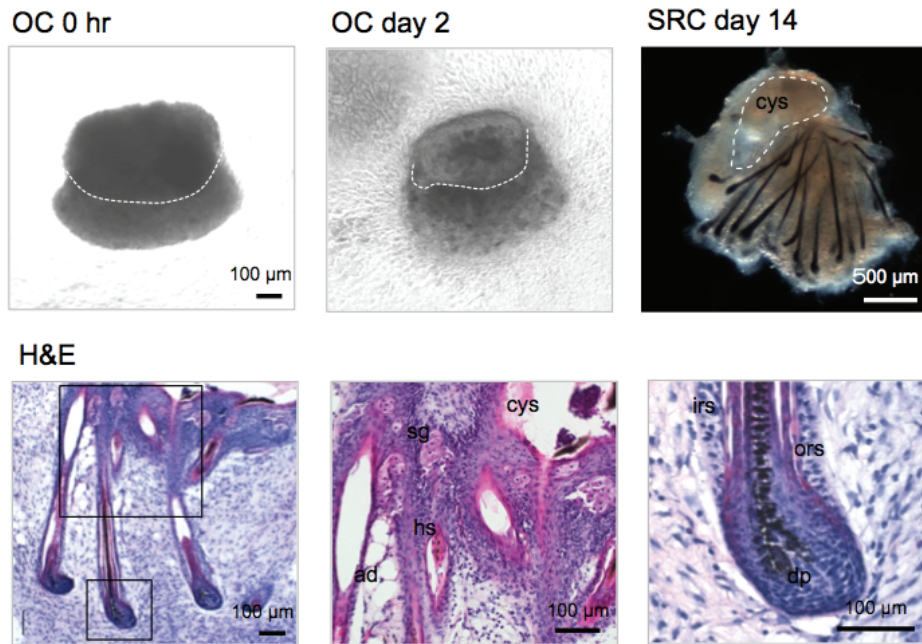


図 2. 再生毛包原基の異色による異所的毛包再生

再生毛包原基と再生毛包の形態学的・組織学的解析。位相差像は再生毛包原基の器官培養(OC; organ culture)後 0 時間と 2 日を示す。点線は上皮間葉境界面を示す。腎皮膜下移植後 14 日の再生毛包の実体画像(上段右)。下段に再生毛包の H&E 染色像を示す。Box 領域の拡大画像を右に示す。ad; adipocyte, cys; cyst, dp; dermal papilla, hs; hair shaft, irs; inner root sheath, ors; outer root sheath, sg; sebaceous gland。

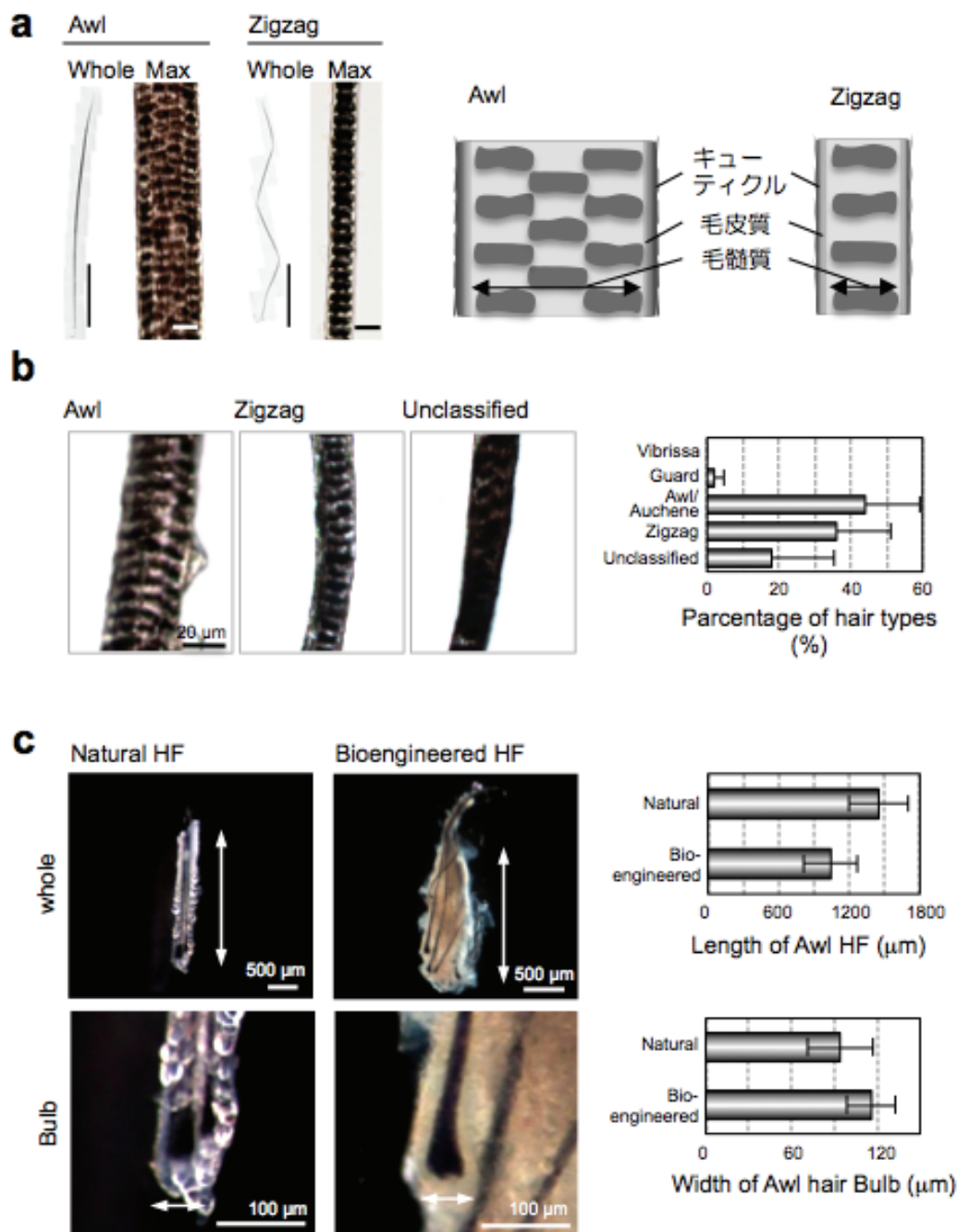


図 3. 再生毛幹の形態学的解析による毛種の解析

(a) 天然体毛の Awl 毛と Zigzag 毛の毛種特異的な形態学的特徴。右に毛幹の構造を示す。(b) 再生毛包の形態学的解析による毛種の解析。実体像は再生毛包の Awl 毛, Zigzag 毛, Unclassified。右に定量的解析データを示す。解析再生毛包 n=108 本。(c) 再生 Awl 毛と天然 Awl 毛の毛包長と毛球部幅の形態学的解析比較解析。右に定量的解析データを示す。解析 Awl 再生毛包 n=16 本。HF; hair follicle。

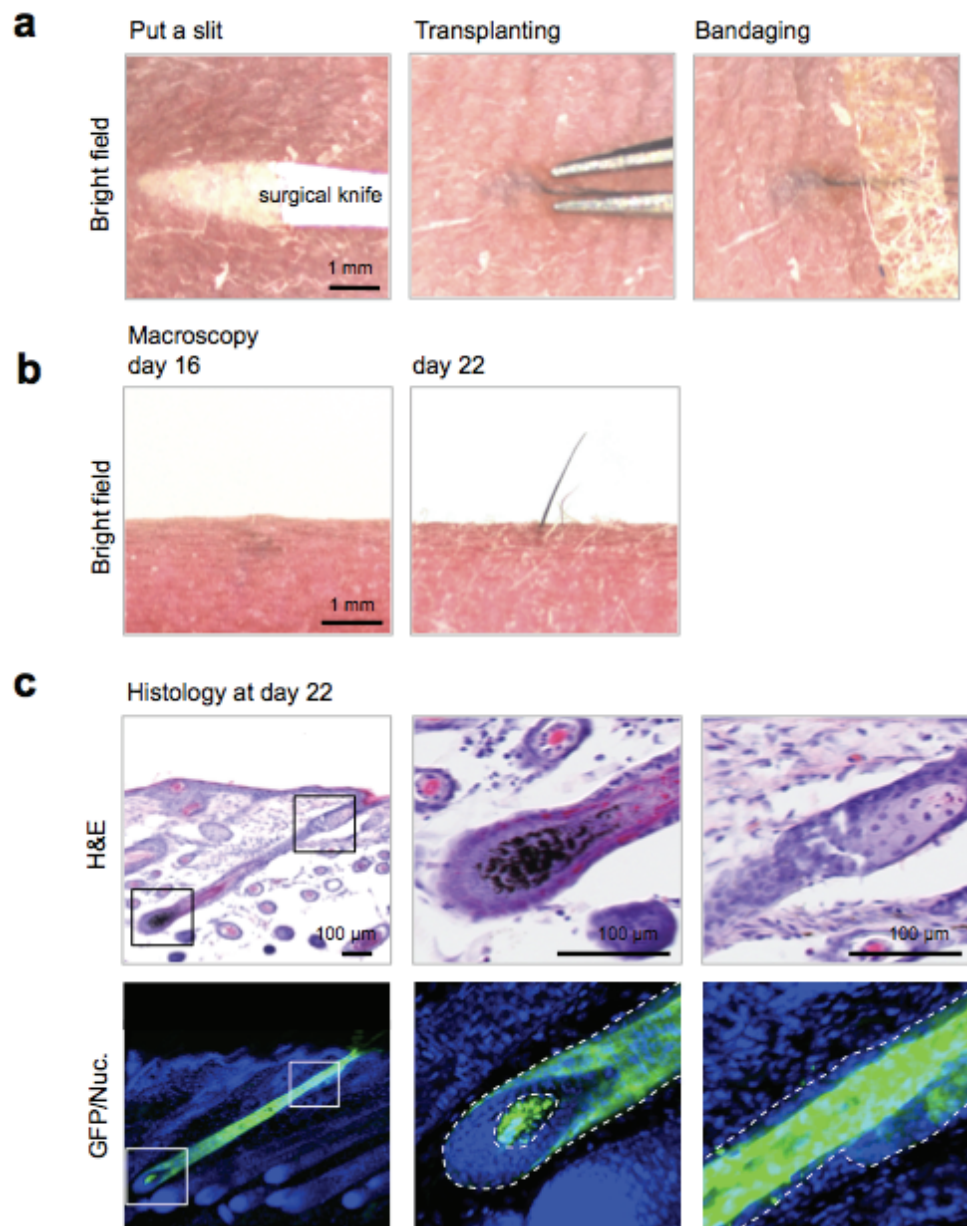


図 4. 再生成熟毛包の再移植による同所的毛包再生

(a) 再生毛包の同所的再移植方法の概要。外科用ナイフにより移植創を作製し(左)、ピンセットを用いて再生毛包を移植し(中央)、毛幹を固定する(右)。(b) 移植後 16 日(左)と 22 日(右)のマクロ観察画像。(c) 移植後 22 日の再生毛包の組織学的解析。H&E 染色像(上)と GFP 蛍光画像(下)。Box 領域の拡大像をそれぞれ右に示す。

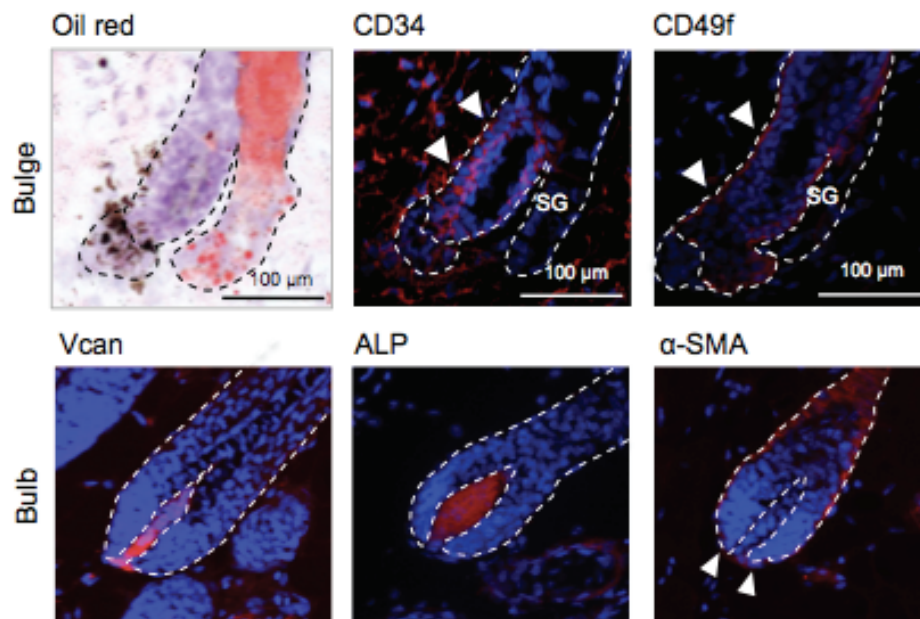


図 5. 再生成熟毛包の幹細胞ニッチ

再生毛包の免疫組織学的解析。Oil Red 染色により、皮脂腺が確認される(上段左)。バルジ領域を抗 CD34, CD49f 抗体により解析した(上段右 2 画像)。毛球部は ALP 酵素染色、抗 Versican 抗体、抗 α -SMA 抗体による免疫組織化学染色により解析した(下段)。核は Hoechst33258 により染色した。矢頭は陽性領域を示す。

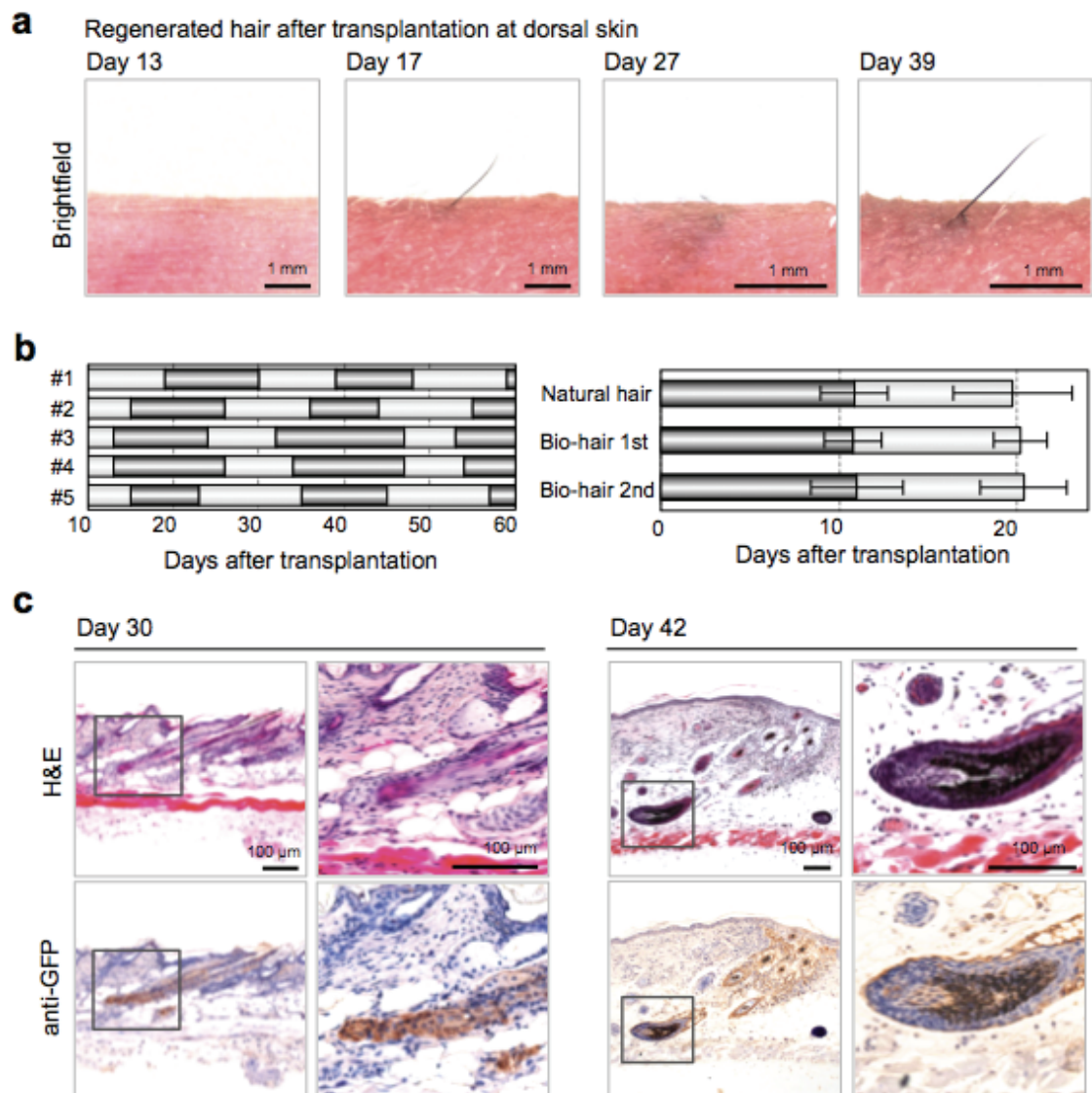


図 6. 同所的再生毛包の毛周期解析

(a) 再生毛包移植後の発毛経過解析。同所的移植後 13, 17, 27, 39 日について示した。(b) 再生毛包の長期経過観察。移植後 60 日間にわたり、有毛期間(黒色)と無毛期間(灰色)を解析した(左)。天然毛包と再生毛包(第一、第二毛周期)の毛周期長を比較解析した(右)。解析再生毛包 $n=5$ 本。(c) 再生毛包の同所的移植後 30 日(左)と 42 日(右)の H&E 染色による組織学的解析(上段)と抗 GFP 抗体による免疫組織学的解析(下段)。再生毛包の免疫組織学的解析。Box 領域の拡大像を右に示す。

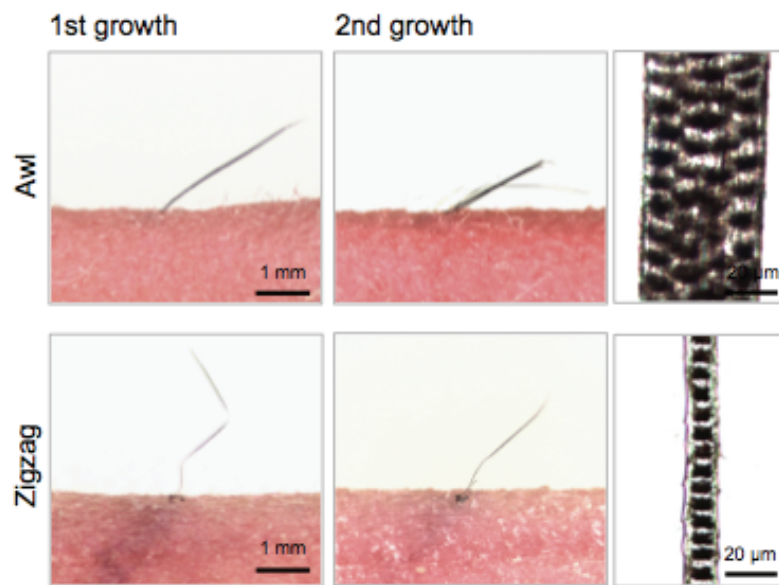


図 7. 同所的再生毛包の長期性状維持
Awl 毛(上段)と Zigzag 毛(下段)の第一、第二毛周期成長期でのマクロ観察による毛種解析。右に、第二毛周期での毛幹の実体画像を示す。

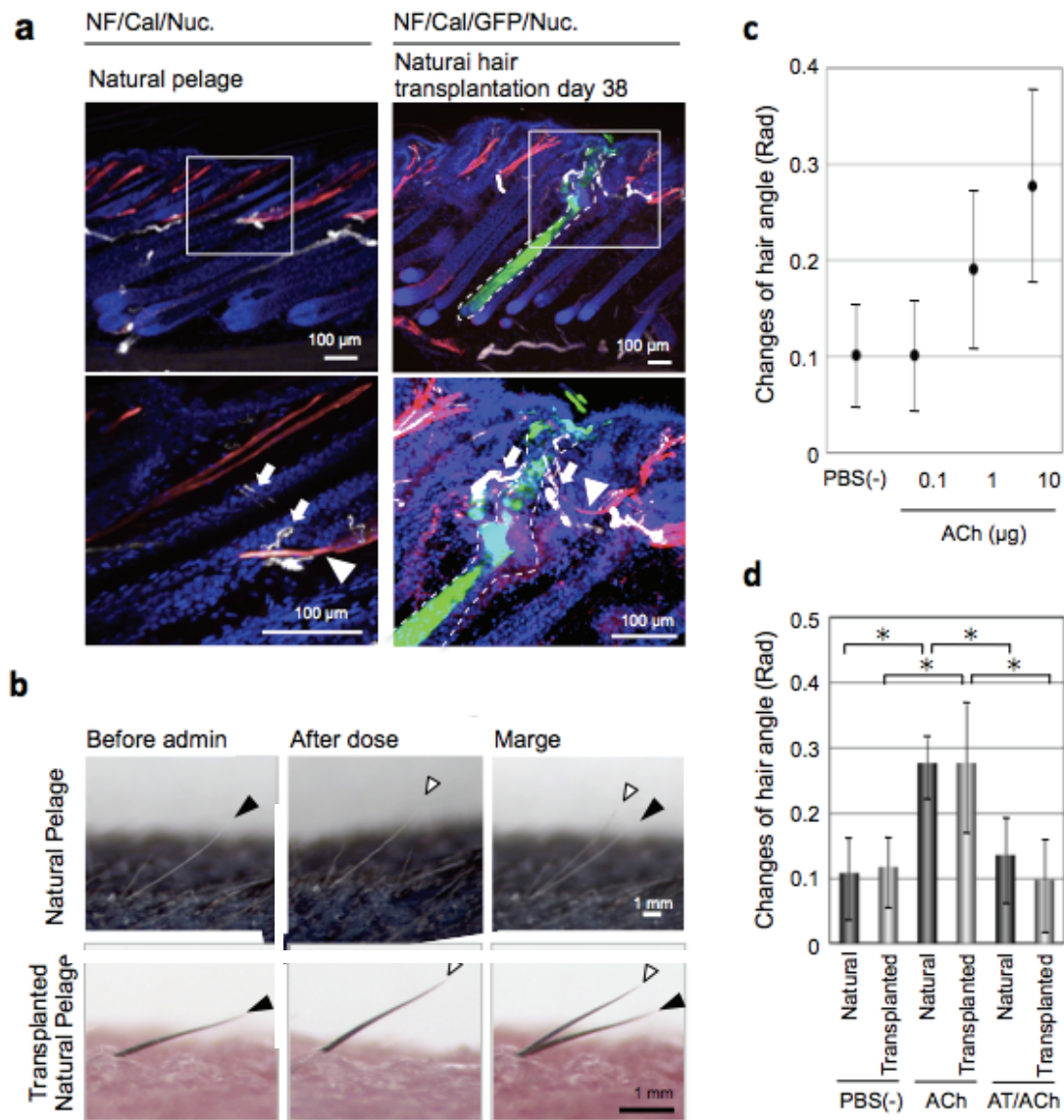


図 8. 立毛機能評価系の構築

(a) 天然体毛と同所的移植天然毛包(移植後 38 日)の抗 calponin(Cal)抗体、抗 Neurofilament H(NF)抗体による免疫組織学的解析。Box 領域の拡大像をそれぞれ下に示す。核は Hoechst33258 により染色した。矢は神経繊維、矢頭は平滑筋を示す。(b) 天然体毛(上段)、同所的移植天然体毛(下段)のアセチルコリン(ACh)の局所投与による立毛応答試験のマクロ観察画像。黒矢頭は PBS(-)投与直後、白矢頭は ACh 投与後直後の毛幹を示す。右に重ね合わせ画像を示す。(c) 天然毛包の ACh 濃度依存的な立毛角度変化。解析再生毛包 n=6 本。(d) 天然体毛(黒色)と同所的移植天然毛包(灰色)の ACh 投与による立毛角度変化の定量的解析。解析再生毛包 n=7 本。P<0.05 (*)

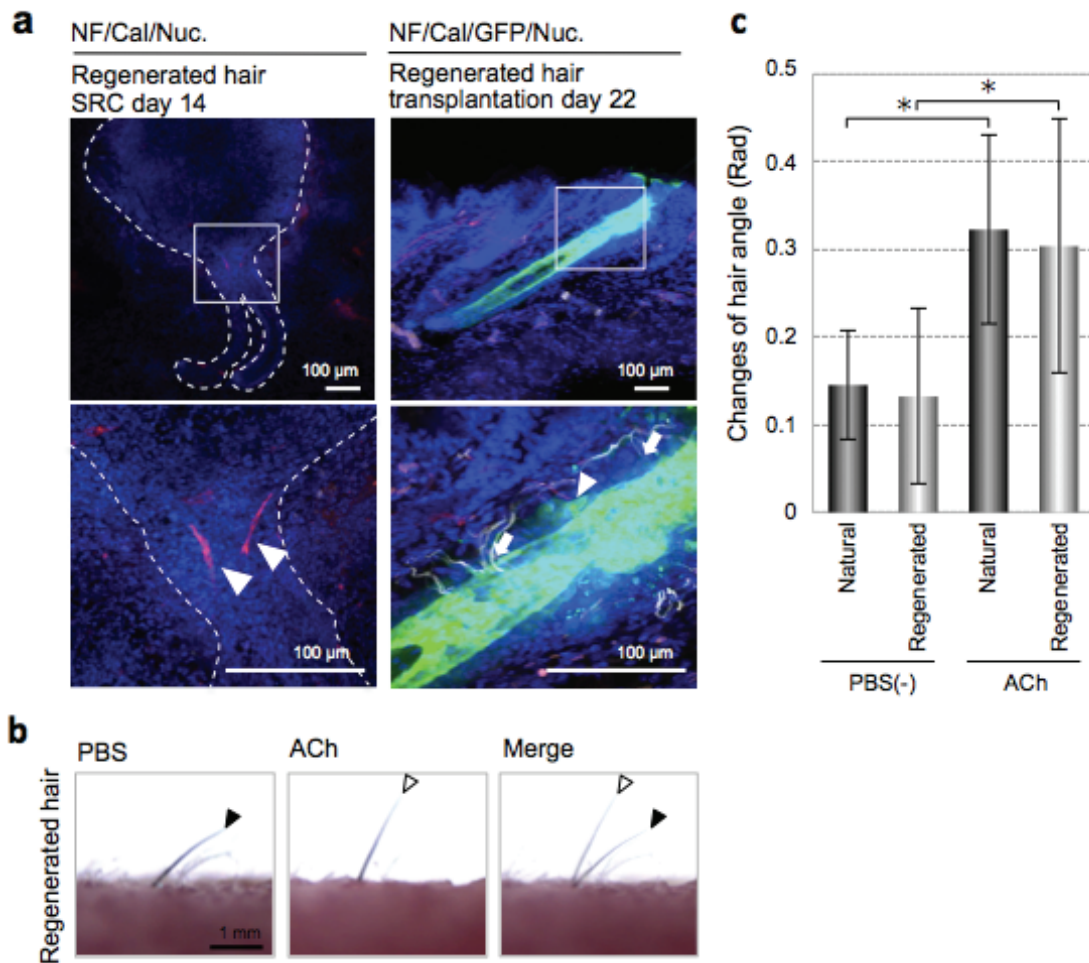


図 9. 再生毛包の立毛機能解析

(a) 再生毛包(腎皮膜下移植後 14 日)と同所的移植再生毛包(移植後 22 日)の抗 calponin(Cal)抗体、抗 Neurofilament H(NF)抗体による免疫組織学的解析。Box 領域の拡大像をそれぞれ下に示す。核は Hoechst33258 により染色した。矢は神経繊維、矢頭は平滑筋を示す。(b) 同所的移植再生毛包のアセチルコリン(ACh)の局所投与による立毛応答試験のマクロ観察画像。黒矢頭は PBS(-)投与直後、白矢頭は ACh 投与後直後の毛幹を示す。右に重ね合わせ画像を示す。(c) 天然毛包(黒色)と再生毛包(灰色)の ACh 投与による立毛角度変化の定量的解析。解析再生毛包 n=5 本。P<0.05 (*)

主論文およびその他業績

主論文

1. **Kyosuke Asakawa**, Koh-ei Toyoshima, Naoko Ishibashi, Hirofumi Tobe, Ayako Iwadate, Tatsuya Kanayama, Tomoko Hasegawa, Kazuhisa Nakao, Hiroshi Toki, Shotaro Noguchi, Miho Ogawa, Akio Sato and Takashi Tsuji, Hair organ regeneration via the bioengineered hair follicular unit transplantation. *Scientific Reports*. **2**:424, 2012
2. Akio SATO, Koh-ei TOYOSHIMA, Hiroshi TOKI, Naoko ISHIBASHI, **Kyosuke ASAKAWA**, Ayako IWADATE, Tatsuya KANAYAMA, Hirofumi TOBE, Akira TAKEDA and Takashi TSUJI, Single follicular unit transplantation reconstructs arrector pili muscle and nerve connections and restores functional hair follicle piloerection. *The Journal of Dermatology*. **39**, 682-687, 2012

その他の論文

1. Koh-ei Toyoshima, **Kyosuke Asakawa**, Naoko Ishibashi, Hiroshi Toki, Miho Ogawa, Tomoko Hasegawa, Tarou Irie, Tetsuhiro Tachikawa, Akio Sato, Akira Takeda and Takashi Tsuji, Fully functional hair follicle regeneration through the rearrangement of stem cells and their niches. *Nature Communications*. **3**:784, 2012

【学会発表（シンポジウム発表）】

1. 豊島 公栄、**浅川 杏祐**、土岐 寛志、石橋 菜央子、井角 香子、中尾 一久、辻 孝、再生毛包原基の移植による毛髪の機能的再生、第 29 回日本臨床皮膚外科学会総会・学術集会第 16 回日本臨床毛髪学会学術集会合同学術集会、沖縄・万国津梁館,2011 年 2 月

25 日

2. 浅川 杏祐、豊島 公栄、小川 美帆、佐藤 明男、武田 啓、辻 孝、臨床応用を目指した毛包の器官再生技術、第 22 回日本形成外科学会基礎学術集会、新潟、朱鷺メッセ、2013 年 11 月 7 日

【学会発表（口頭発表）】

1. 野口 翔太郎、浅川 杏祐、豊島 公栄、對比地 久義、米山 奈保、金山 達哉、戸部 浩史、石橋 菜央子、佐藤 明男、辻 孝、培養ヒト毛乳頭細胞の定量的な毛包再生機能評価系の構築、第 12 回日本再生医療学会総会、横浜、パシフィコ横浜、2013 年 3 月 21 日
2. 浅川 杏祐、豊島 公栄、戸部 浩史、岩楯 綾子、金山 達哉、野口 翔太郎、石橋 菜央子、佐藤 明男、辻 孝、ヒト皮膚移植動物モデルを用いたヒト頭髪毛包由来細胞による毛髪再生、第 12 回日本再生医療学会総会、横浜、パシフィコ横浜、2013 年 3 月 21 日
3. 金山 達哉、浅川 杏祐、豊島 公栄、戸部 浩史、岩楯 綾子、石橋 菜央子、佐藤 明男、辻 孝、毛包の機能的再生(I)再生毛包原基の高密度皮内移植による同所的毛髪再生医療モデルの開発、第 11 回日本再生医療学会総会、横浜、パシフィコ横浜、2012 年 6 月 12 日
4. 浅川 杏祐、豊島 公栄、戸部 浩史、岩楯 綾子、金山 達哉、石橋 菜央子、長谷川 智子、佐藤 明男、辻 孝、毛包の機能的再生(II)再生毛包の皮内移植による毛包の機能的再生、第 11 回日本再生医療学会総会、横浜、パシフィコ横浜、2012 年 6 月 12 日
5. 岩楯 綾子、豊島 公栄、戸部 浩史、野口 翔太郎、浅川 杏祐、石橋 菜央子、佐藤 明男、辻 孝、毛包の機能的再生(III)成体皮内移植における毛包と神経接続の自律的再生機能、第 11 回日本再生医療学会総会、横浜、パシフィコ横浜、2012 年 6 月 12 日

6. 石橋 菜央子、豊島 公栄、浅川 杏祐、岩楯 綾子、金山 達哉、戸部 浩史、野口 翔太郎、辻 孝、毛包の機能的再生(IV)再生毛包原基の皮内移植により再生した毛包と神経・筋接続の選択的再生、第11回日本再生医療学会総会、横浜、パシフィコ横浜、2012年6月12日
7. 長谷川 智子、豊島 公栄、浅川 杏祐、金山 達哉、戸部 浩史、野口 翔太郎、石橋 菜央子、小川 美帆、辻孝、毛包の機能的再生(I)胎児皮膚由来細胞による体毛の再生、第34回日本分子生物学会年会、横浜・パシフィコ横浜、2011年12月13日
8. 浅川 杏祐、石橋 菜央子、豊島 公栄、小川 美帆、辻孝、毛包の機能的再生(II)毛包幹細胞ニッチ再生による成体頬髭毛包の機能的再生、第34回日本分子生物学会年会、横浜・パシフィコ横浜、2011年12月13日
9. 豊島 公栄、浅川 杏祐、石橋 菜央子、弓削 洋平、辻孝、毛包の機能的再生(III)色素性幹細胞ニッチの再生による毛色制御、第34回日本分子生物学会年会、横浜・パシフィコ横浜、2011年12月13日
10. 石橋 菜央子、岩楯 綾子、金山 達哉、浅川 杏祐、豊島 公栄、辻孝、毛包の機能的再生(IV)立毛筋接続ニッチの再生による立毛機能の再現、第34回日本分子生物学会年会、横浜・パシフィコ横浜、2011年12月13日

【学会発表（ポスター発表）】

1. 金山 達哉、戸部 浩史、豊島 公栄、浅川 杏祐、野口 翔太郎、石橋 菜央子、佐藤 明男、辻 孝、器官原基法により再生した毛包の毛

流形成と立毛筋接続方向に関する研究, 第 12 回日本再生医療学会総会, 横浜, パシフィコ横浜, 2013 年 3 月 21 日

2. 戸部 浩史、浅川 杏祐、豊島 公栄、岩楯 綾子、金山 達哉、野口 翔太郎、石橋 菜央子、佐藤 明男、辻 孝, 毛包再生前臨床試験に向けたヒト皮膚移植動物モデル構築, 第 12 回日本再生医療学会総会, 横浜, パシフィコ横浜, 2013 年 3 月 21 日
3. 浅川 杏祐、豊島 公栄、石橋 菜央子、戸部 浩史、岩楯 綾子、金山 達哉、野口 翔太郎、佐藤 明男、辻 孝, 異所的再生毛包と神経および筋接続の再現による毛包機能獲得に関する研究, 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡, 福岡国際会議場, 2012 年 12 月 11 日
4. 長谷川 智子、豊島 公栄、浅川 杏祐、金山 達哉、戸部 浩史、野口 翔太郎、石橋 菜央子、小川 美帆、辻孝, 毛包の機能的再生(I) 胎児皮膚由来細胞による体毛の再生, 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜・パシフィコ横浜, 2011 年 12 月 13 日、ポスター
5. 浅川 杏祐、石橋 菜央子、豊島 公栄、小川 美帆、辻孝, 毛包の機能的再生(II) 毛包幹細胞ニッチ再生による成体頬髭毛包の機能的再生, 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜・パシフィコ横浜, 2011 年 12 月 13 日、ポスター
6. 豊島 公栄、浅川 杏祐、石橋 菜央子、弓削 洋平、辻孝, 毛包の機能的再生(III) 色素性幹細胞ニッチの再生による毛色制御, 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜・パシフィコ横浜, 2011 年 12 月 13 日、ポスター
7. 石橋 菜央子、岩楯 綾子、金山 達哉、浅川 杏祐、豊島 公栄、辻孝, 毛包の機能的再生(IV) 立毛筋接続ニッチの再生による立毛機能の再現, 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜・パシフィコ横浜, 2011 年 12 月 13 日、ポスター

8. 石橋 菜央子、豊島 公栄、土岐 寛志、浅川 杏祐、井角 香子、辻孝、毛包再生による毛髪機能的再生 IV 再生毛のアセチルコリン投与による立毛応答、第 10 回日本再生医療学会総会、東京・京王プラザホテル、2011 年 3 月 2 日、ポスター
9. 土岐 寛志、浅川 杏祐、石橋 菜央子、井角 香子、豊島 公栄、辻孝、毛包再生による毛髪機能的再生 III 再生毛の毛周期解析、第 10 回日本再生医療学会総会、東京・京王プラザホテル、2011 年 3 月 2 日、ポスター
10. 浅川 杏祐、土岐 寛志、石橋 菜央子、井角 香子、豊島 公栄、辻孝、毛包再生による毛髪機能的再生 II 成体マウス頬髭毛包由来細胞を用いた再生毛包原基移植による毛の再生、第 10 回日本再生医療学会総会、東京・京王プラザホテル、2011 年 3 月 2 日、ポスター
11. 豊島 公栄、浅川 杏祐、石橋 菜央子、土岐 寛志、井角 香子、辻孝、毛包再生による毛髪機能的再生 I 器官原基法により再生した毛包原基の皮内移植と毛髪再生の解析、第 10 回日本再生医療学会総会、東京・京王プラザホテル、2011 年 3 月 2 日、ポスター

以上

