

氏名（本籍）	あさ かわ きょう すけ 浅川 杏 祐（愛媛県）
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	甲第 847 号
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	毛包の機能的な再生に関する研究

論文審査委員	（主査）教授 辻 孝
	教授 田代 文夫 教授 友岡 康弘
	准教授 十島 二郎 教授 深井 文雄

論文内容の要旨

1. 背景

ほぼすべての器官は、胎児期の上皮・間葉系細胞から構成される器官原基において、時空間的制御を受けた複雑な分子シグナル機構による相互作用により発生する。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期に類似した上皮・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う。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。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、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、脱毛症に対する抜本的な毛包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、正常

な構造を有する器官を発生させる「器官原基法」を開発し、2012年には、器官原基法を応用して、成体毛包細胞から目的の部位における完全に機能的な毛包の再生を示した。

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再生した毛包を同所的に移植することにより、毛包の生着と周期的成長を明らかにした。さらに、立毛筋、神経との適切な接続による立毛機能の再現を評価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。

2. 結果

2-1) 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、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、および間葉細胞を、器官原基法を用いて再生毛包原基を作製し、マウス腎皮膜下に移植したところ、移植後 14 日目に、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シストに向かって、一方向性に毛幹を伸長した。再生毛包と天然毛包の成長期背部体毛について毛包長、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。

2-2) 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 本の毛包ユニットに細切した後、自家植毛術を応用し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毛幹成長が観察された。組織解析を行ったところ、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。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、Alkaline phosphatase、さらに、毛球部最外層の薄い細胞層は毛乳頭の前駆細胞である真皮毛根鞘マーカーの α smooth muscle actin 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。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生着し、発毛、毛幹伸長だけでなく、毛器官の

永続性を司る幹細胞ニッチを有することが示された。

2-3) 同所的移植再生毛包の永続性の解析

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、周期的な毛幹伸長を移植後 100 日以上に渡り繰り返し、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、再生毛包の有毛、無毛期間を解析したところ、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、再生毛幹の形態学的特徴は、毛周期を経ても変化しないことが示されたことから、再生毛包は同所的移植により、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。

2-4) 同所的移植再生毛包の周辺組織と連携した機能的再生

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、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。再生毛包を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。一方、同所的移植再生毛包では、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。毛包と立毛筋・神経との機能的な接続を評価するために、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のアセチルコリン (ACh) を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、ACh 投与により、ACh 濃度依存的な毛幹の立毛角度変化が誘導され、また、ACh 受容体のアンタゴニストであるアトロピンを局所投与したところ、立毛応答が有意に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、同所的移植再生毛包は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示された。

3. 考察

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、成熟

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。

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、これまでに単一化上皮細胞・間葉細胞を用いた種々の毛包再生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作製し、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、毛包の選択的に移植による毛包再生治療の可能性を示唆した。

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。毛包上皮性幹細胞は、毛包を構成する全ての上皮組織に分化し、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、長期間にわたって毛種を維持した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。

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、個体の体温調整にと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の連携的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、再生毛包の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。

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。本研究は再生器官原基からの再生成熟器官の同所的移植による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。

論文審査の結果の要旨

ほぼすべての器官は、胎児期の上皮・間葉相互作用により誘導される器官原基から発生する。毛包は、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おり、これは毛包の特定部位に上皮性幹細胞と、毛乳頭細胞と呼ばれる間葉性細胞によって誘導される。毛包の機能不全により発症する脱毛症治療に向けて、薬物療法や自己毛包移

植術が開発され、数多くの治療実績を有している。しかしながら、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、脱毛症に対する毛包再生治療の技術開発が期待されている。器官再生に向けて、生物の発生システムを利用して再生器官を作り出す概念が提唱されており、最近になって上皮性幹細胞と間葉性幹細胞の三次元的な細胞操作技術である「器官原基法」が開発され、歯や毛包の器官原基を移植して器官再生できることが実証された。本研究では、再生毛包原基から発生させた成熟型再生毛包の移植による毛髪再生医療の実現可能性を実証することを目的として研究を行っている。

器官原基法により作製した再生毛包原基からの再生成熟毛包による同所的な毛包再生の解析では、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の解析を行い、形態学的に天然体毛と同等な毛包の再生が可能であることを示した。また、既存の脱毛症治療法である自家植毛術を応用して、単毛包化した成熟再生毛包のヌードマウス背部への同所的移植により、再生成熟毛包の生着と毛幹萌出が可能であることを示している。また、組織学的解析により、再生毛包は組織学的に天然毛包と同等であり、毛包幹細胞マーカーである CD34, CD49f 共発現の上皮性幹細胞と、Versican 陽性の毛乳頭細胞、毛乳頭の前駆細胞である α -SMA 陽性の真皮毛根鞘を天然同様な配置で有することから、毛包上皮性、間葉性幹細胞ニッチを再構築していることを明らかにしている。これらの解析により、既存の脱毛症治療法を応用して、人為的に再生した毛包の同所的移植による毛包再生が可能であることを明らかにした。

毛包の発生機序に基づいた毛包再生の解析では、再生毛幹の形態学的解析により、再生毛包原基の由来する背部皮膚に存在する、運命付けられた全ての毛種を再生していることを示した。また、同所的に移植した再生成熟毛包の長期経時的解析により、毛種を維持し、移植後 100 日以上にわたる周期的な毛幹伸長を繰り返すことを明らかにした。さらに再生毛包は、上皮性幹細胞ニッチ領域特異的に神経・立毛筋との接続を回復しており、アセチルコリンの局所投与による毛包の立毛機能評価系を構築した結果、再生毛包の立毛機能解析により、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を示している。

これらの研究成果から、本論文は、再生毛包原基を再生した成熟毛包を皮下移植することにより周辺組織と接続して毛包の生理機能を回復することが可能であることを結論している。

以上、本論文は、器官再生医療としての再生成熟毛包による機能的な毛包の再生医療の実現可能性を示すと共に、発生生物学や細胞生物学、再生医学の進展に貢献すると判断された。以上の事由により、本研究は博士（工学）の学位論文として十分価値あるものと認められる。