

論文の内容の要旨

論文題目 毛髪再生治療における移植細胞の培養法に関する研究
氏名 金山幸司

脱毛症は、遺伝、ホルモン代謝異常、自己免疫異常、外傷、化学療法、感染症など様々な原因により毛密度が減少する皮膚障害である。生命を脅かす疾患ではないが、患者の整容上の問題を引き起こし、精神的・心理的負担を与え、QOL を低下させる。投薬による育毛治療は重症例に対しては効果が期待できない、植毛手術は採取できるドナーの数に限界がある、など既存の治療法には問題点があるため、これらの欠点を克服できる治療法の開発が望まれている。

毛髪（毛幹）を産生する毛包は上皮系細胞・間葉系細胞・色素細胞などの異なる細胞系譜に由来する細胞から構成される小器官で、胎生期には上皮系細胞と間葉系細胞の上皮-間葉相互作用によって毛包が形成されることが知られている。毛根（毛球部）に存在する間葉系細胞である毛乳頭細胞（dermal papilla cell, DPC）に毛包形成能（毛包誘導能）があることが示されて以来、培養 DPC を用いた毛包再生の研究が世界中で行われるようになった。また毛根鞘に存在する別の間葉系細胞である真皮毛根鞘細胞（dermal sheath cell, DSC）は DPC に分化する能力のある比較的未分化な細胞と考えられており、DPC との混合移植で毛包再生を促進するという報告もある。

我々の研究室では、増幅可能な毛包由来間葉系細胞（DPC と DSC）の移植による毛髪再生治療の実現に向けて、基礎研究を重ねてきた。しかし、それらの細胞は長期間の培養中に細胞老化が促進し、増殖能と毛包誘導能を失ってしまうため、臨床応用には至っていない。また、既存の培養法は動物由来の製剤を用いるため、ヒトへの細胞移植を行う上で感染などの危険性を除外することができない。本研究の目的は、毛髪再生治療の実現のため、それらの問題点を解決しうる DPC と DSC の適切な培養方法を確立することである。

第一章では、培養中の「酸素濃度」に着目して培養方法の最適化を行った。生体内組織の酸素濃度（生理学的等酸素）が 1~11%であることを考慮すると、20%酸素下で行われる慣習的な細胞培養環境は非常に「高酸素」下である。「高酸素」による酸化ストレスは、細胞のテロメアを短縮させ、発生した種々の活性酸素（ROS）がミトコンドリアの機能障害を引き起こし、最終的に細胞のアポトーシスを誘導することが知られている。Upton JH らは生理学的「等酸素」で培養した方が「高酸素」で培養するよりも DPC の細胞老化を抑制するという報告をしているが、毛包誘導能の評価はされていない。また酸素濃度の DSC に対する影響については未だ明らかとなっていない。我々は DPC と DSC を生体内組織の環境と等しい酸素濃度である「等酸素」で培養した方が「高酸素」で培養するよりも、細胞の増幅と毛包誘導能の維持にとって有効であると考えた。

そこで本研究では、準備したヒト由来の DPC と DSC を生理学的な「高酸素（20%酸素）」「等酸素（6%酸素）」「低酸素（1%酸素）」の3種類の条件下で培養し、それぞれの細胞の増殖能と毛包誘導能を評価することで、「等酸素」が「高酸素」や「低酸素」と比べてより良い培養条件であるか否か検討した。

細胞増殖試験と BrdU 取り込みアッセイでは、「等酸素」による培養が最も DPC および DSC の増殖を促進した。「低酸素」は DPC の増殖を抑制したが、逆に DSC に対しては増殖を促進した。RT-PCR による毛包誘導関連遺伝子の発現解析では、「低酸素」で培養した DPC で *BMP4*, *LEF1*, *VCAN* など複数の遺伝子の発現低下が認められ、培養時間依存性に発現が低下する傾向があった。一方、「低酸素」または「等酸素」で培養した DSC では未分化マーカーでもある *SOX2* の発現が高い傾向があった。網羅的遺伝子発現解析（マイクロアレイ）では、「等酸素」で培養した DSC は「高酸素」で培養した場合と比較して、*SPRY1*, *NROB1*, *MSX2*, *IFITM1* などの多分化能関連遺伝子の発現が相対的に高かった。毛包誘導能を評価するために行った動物実験（グラフトチャンバー法による DPC と DSC の移植実験）では、DPC は「等酸素」で培養した場合に最も再生毛包の総数が多く、再生毛包の成熟度も高い傾向があった。しかし「低酸素」で培養した場合には再生毛包の総数が少なかった。DSC では再生毛包の総数については有意な差を認めなかったが、再生毛包の成熟度は「低酸素」で有意に高かった。

In vitro で評価した増殖能と In vivo で評価した毛包誘導能の結果から、DPC にとっての至適な酸素濃度は「等酸素」～「高酸素」で、DSC にとっての至適な酸素濃度は「低酸素」～「等酸素」であると考えられた。DPC と比較して酸素濃度が低い条件の方がより良い状態で DSC を培養できる可能性が示唆されたが、一般的に DPC が存在する毛球部は、毛周期における成長期において酸素分圧の比較的高い脂肪組織内に位置し、DSC が存在する毛根鞘はそれよりも上部の真皮内に位置し、酸素分圧は脂肪組織よりも低い環境にある。これらの解剖学的特徴は細胞種によって最適な酸素濃度が異なることを反映している可能性がある。また DSC は DPC の前身となる比較的未分化な細胞で、DPC は DSC から供給されると考えられている。種々の幹細胞の未分化能が低酸素下で維持されることと同様に、酸素濃度の低い環境が比較的未分化な細胞である DSC の機能維持に寄与した可能性がある。反面、分化した細胞である DPC に対しては「低酸素」による悪影響の方が大きいと考えられた。

第二章では、培地中の「血清」に着目して培養法の最適化を行った。細胞を用いた再生治療において、動物由来の製剤の使用は未知の病原微生物の感染や重篤な免疫反応の危険性を排除できないため、臨床応用のためには極力これらの動物由来の製剤を使用しないことが望まれる。

そこで本研究では、動物由来血清に代替可能なものとしてヒト由来の多血小板血漿（platelet-rich

plasma, PRP) を候補として選択した。準備したヒト由来の DPC を「FBS を含む増殖培地 (keratinocyte-conditioned medium containing FBS, KCM-FBS)」と「PRP を含む増殖培地 (KCM-PRP)」で培養し、両者の増殖能と毛包誘導能を評価することで、FBS が PRP に代替可能か否か検討した。

「KCM-PRP」は、「KCM-FBS」よりも DPC の増殖を促進し、毛包誘導関連遺伝子のうち *ALPL*, *TGFB2*, *VCAN* の発現が高く、*in vivo* での毛包誘導活性も高かった。この結果から、従来の動物由来の FBS はヒト由来の PRP に代替可能であると考えられた。

以上のように本研究では、毛包由来間葉系細胞の培養において重要な因子である「酸素濃度」と「血清」の条件を最適化した。DPC の培養においては「等酸素」～「高酸素」が、DSC の培養においては「低酸素」～「等酸素」が適切な酸素濃度であることが示された。特に DSC は DPC と比較して培養中に増殖能と毛包誘導能を失いやすいため、その長期間培養法は未だに確立していない。この生理学的「低酸素」～「等酸素」を用いた新しい DSC 培養法はその問題を解決する一法となると考えられる。一方、ヒト由来の PRP が DPC の増殖促進効果と毛包誘導能維持において FBS に劣らないことが示された。動物由来の FBS がヒト由来の PRP に代替可能であることは、安全面の観点から臨床応用の上で非常に有用である。また、PRP を利用した細胞増幅効率の高い DPC 培養法は、大量の移植細胞を確保するのに有効であるとともに、DPC の初代培養において切除される自毛 (犠牲健常毛) の節約に寄与する。本研究で得られた知見は、細胞移植による毛髪再生治療の確立と発展に資すると考えられる。