

[課程一2]

審査の結果の要旨

氏名 井上 啓太

本研究は、ヒト毛包由来細胞移植による毛髪再生治療の開発を行うため、ヒト毛包を用いて毛包上皮系細胞の幹細胞マーカーによる単離および毛乳頭細胞の毛包誘導能の解析を行ったものであり、下の結果を得ている。

ヒト毛包を各種幹細胞マーカーで免疫染色したところ、K15 および CD200 が毛包バルジ周辺に発現しており、CD34 および CD271 は毛根部に近い外毛根鞘に発現していた。バルジにおける外毛根鞘最外層（基底層）の細胞は CD200⁺CD34⁻K15⁺、基底上層の細胞は CD200⁺CD34⁻K15⁻であることがわかった。

新鮮毛包由来細胞を cell sorter により分析すると、毛包由来細胞に特異的に CD200⁺CD34⁻の分画が含まれていることがわかった。また、この分画を K15 の発現の有無により更に解析すると、CD200⁺CD34⁻K15⁺ 細胞と CD200⁺CD34⁻K15⁻細胞の大きさ（forward scatter 値; FSC 値）には有意差が存在し、前者が後者より大きいことがわかった。

CD200⁺CD34⁻FSC^{high}（すなわち CD200⁺CD34⁻K15^{-rich}）と CD200⁺CD34⁻FSC^{low}（すなわち CD200⁺CD34⁻K15^{-poor}）の細胞集団をきたまま cell sorter により分取し、コロニー形成能を比較したところ、両者とも高いコロニー形成能を示したが、前者においてより大きなコロニーを形成することがわかった。

毛包バルジには CD200⁺CD34⁻FSC^{high}（すなわち CD200⁺CD34⁻K15^{-rich}）と CD200⁺CD34⁻FSC^{low}（すなわち CD200⁺CD34⁻K15^{-poor}）という、コロニー形成能が高い2つの幹細胞集団が存在し、それぞれがバルジ基底層細胞および基底上層細胞と考えられた。また、表面抗原をもとに細胞を生かしたまま毛包上皮系幹細胞を分取することが可能であることが示された。

次に、毛包誘導能関連因子の検索のため、マイクロアレイおよびリアルタイムPCRによって、培養ヒト毛乳頭細胞と線維芽細胞の遺伝子発現を網羅的に比較解析したところ、毛乳頭細胞においてTGF-β2の発現が増強していた。

この結果をもとに、ヒト表皮ケラチノサイトが分泌すると考えられる物質が培養ヒト毛乳頭細胞のTGF- β 2分泌に与える影響を調べたところ、活性型ビタミンD3を添加したときに顕著に増加することがわかった。さらに、毛包誘導因子のひとつとされるアルカリフォスファターゼ活性も著明に増強した。

培養ヒト毛乳頭細胞を毛包再生モデルに移植し、TGF- β タイプI受容体キナーゼ阻害剤(SB431542)を持続投与して、再生した毛包の成熟度および毛包数を調べると、阻害剤投与群で成熟度の高い毛包が減少し、毛包数も有意に減少することがわかった。またTGF- β 2の中和抗体を持続投与すると、毛包成熟が抑制され、毛包数も有意に減少した。

TGF- β 2はヒト毛乳頭細胞の毛包誘導能を反映するバイオマーカー遺伝子として利用できると考えられ、再生毛包モデルを用いた実験結果から、実際に生体内でもTGF- β 2が毛包誘導因子として機能していることがわかった。また活性型ビタミンD3によりTGF- β 2発現が増強することから活性型ビタミンD3を使用した毛乳頭細胞の培養方法が毛包誘導能の維持のために有用である可能性が示された。

以上、本論文は、ヒト毛包上皮系幹細胞の単離のためにCD200とCD34および細胞の大きさが有用であるという新たな可能性を示した。また培養ヒト毛乳頭細胞の毛包誘導能の指標としてTGF- β 2が有用であることを*in vitro*, *in vivo*の双方の実験系で示し、活性型ビタミンD3がTGF- β 2発現を増強するという新たな知見を述べた。本研究はこれまで未知に等しかったヒト毛包誘導メカニズムの解明および毛包再生治療法の開発に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値すると考えられる。