

論文の内容の要旨

論文題目

培養細胞移植による毛包再生治療の開発

～移植法と培養法の最適化に関する研究～

氏名

青井 則之

1. 背景

薄毛や禿髪は遺伝子的、外傷、ホルモン、薬物治療などさまざまな原因で発生し、多数の人が治療を希望されているが、いまだ有効といえるものは数えるほどしかない。外科的な治療にかぎって言えば、単位毛包移植術が有効な治療法であるが、採取できるドナーが限られているという欠点がある。増毛治療は生活の QOL を上げるためのものであるため身体に対する侵襲を最小限にしたものが社会的に求められている。

2. 目的

ドナーに制限のある単位毛包移植術の欠点を解決するために、毛乳頭細胞と毛球部の結合組織性毛根鞘の毛包誘導能を利用して、培養によって数千から数万倍に増殖させた細胞を用いて毛包再生する治療の開発に取り組むことにした。細胞移植による毛包再生は細胞の毛包誘導能を維持する培養法の最適化と、移植法の最適化を検討する必要がある。本研究では第 1 章で移植方法を検討し、第 2 章で細胞の培養法について検討を行った。

3. 研究の方法

第 1 章) 移植法の開発

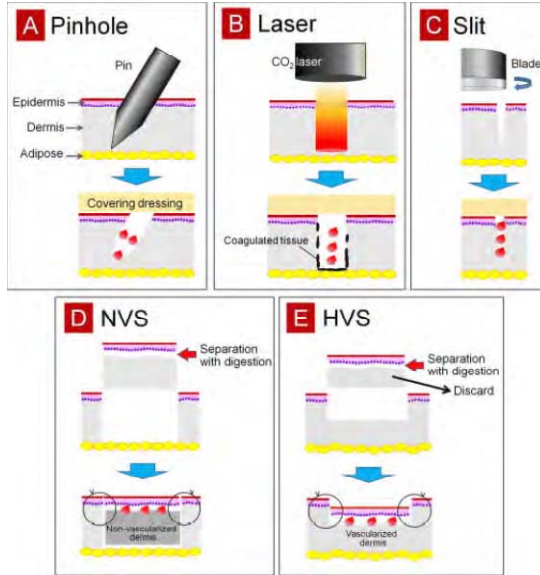
まず、ラットの髭由来の新鮮毛乳頭組織を臨床で使用可能な 5 種類の方法で移植を行い、毛包誘導能を評価した。その後、もっとも優れた方法で、培養毛乳頭細胞を移植し、発毛状態などを評価した。毛包誘導を厳密に評価するために、移植床はラットの足底無毛部を使用した。毛包誘導能の統計学的評価は線形回帰分析によって行った。

第 2 章) 培養細胞の毛包誘導能を維持/増加させる培地の開発

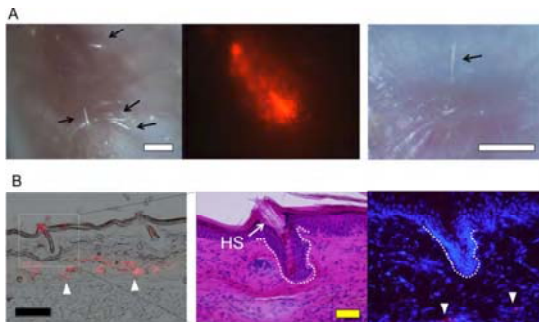
培養毛乳頭細胞は継代をつづけると線維芽細胞に近づき、毛包誘導能を失ってしまう。これを維持するものとして表皮細胞の培養上清が知られているが、我々はこの成分の中の活性型ビタミン D (以下 VD_3 と記載) に着目した。まず、 VD_3 の培養ヒト毛乳頭細胞に与える効果 (増殖効果、細胞毒性、遺伝子発現など) を BrdU や免疫染色、qRT-PCR などを行い、検討した。その後、毛包誘導能を維持/増加させる因子となるかどうかを第 1 章で検討した動物モデルを使用して調べた。

4. 結果

1-1) 5 種類の移植法と結果

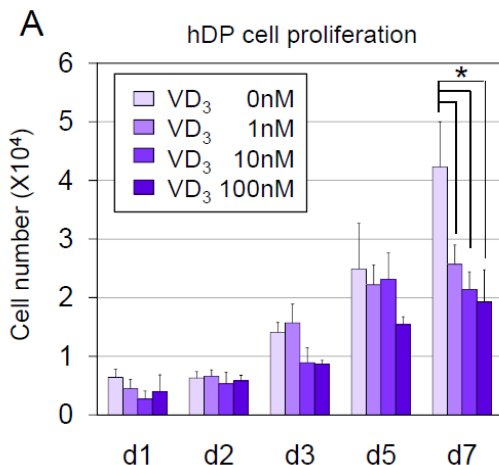


ラットの足底無毛部に新鮮毛乳頭細胞を左図に示す 5 種類の方法で移植した。A) Pinhole 法 : 0.7mm の針で穴をあけ、その穴に移植した。B) laser 法 : 炭酸ガスレーザーで 0.9mm の穴をあけ、その穴に移植した。C) Slit 法 : メスで 200-400 μ m の深さのスリットを作り、その切れ目に移植した。D) NVS(=non-vascularized sandwich) 法 : メスで分層皮膚を 150-300 μ m の厚さでスライスし、切り取った皮膚を *Dyspase* で酵素処理して表皮と真皮を分離後、その間に移植体をはさんでもとの足底部に戻した。E) HVS(=Hemi-vascularized sandwich)法: D)と同様に分層皮膚を切り取って酵素処理した後、分離した表皮と足底に残った真皮とで移植体をはさんだ。どの方法も最後にドレッシング材を使用して創部を被覆した。8 週間後の評価では HVS 法のみ肉眼的発毛を認めた。サンプルの切片を組織学的に評価すると 1 サンプル当りの再生毛包数、stage6 以上の成熟毛包数は HVS 法が統計学的に有意差をもって多かった。



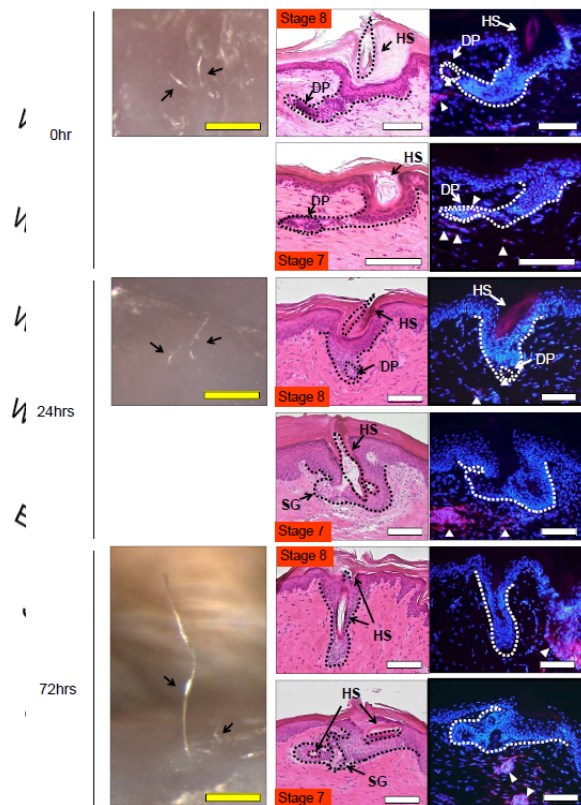
1-2) 培養毛乳頭細胞の移植

5 種類の移植法でもっとも毛包誘導の成績がよかった HVS 法を用いて培養毛乳頭細胞をシートの状態で移植した。移植細胞には DiI で色素標識した。左図に示すようにミニチュアサイズながら、多数の発毛に成功した。



2-1) VD₃ の培養ヒト毛乳頭細胞への効果

まず、VD₃ を各濃度 (0~100 nM) 添加して細胞の増殖能を調べたところ、濃度依りに細胞増殖抑制効果を認めた(左図上)。BrdU の取り込みを調べても同様の効果がみられた。一方で細胞免疫染色では VD₃ の細胞毒性は認めなかった。毛包関連遺伝子発現の変化を qRT-PCR によって調べたところ Wnt10b の mRNA が 48 時間後で有



意に増加した。(左図下)また、Wnt10b の発現増加は VD₃ を 100 nM 添加したときにもっとも増加した。また、同時に毛包誘導の指標となっている ALPL と TGF-β2 の遺伝子発現も亢進させることが分かった。

2-2) VD₃ の transduction pathway

この VD₃ の毛乳頭細胞に対する遺伝子発現効果はビタミン D レセプター(以下 VDR と記載))を介した genomic な作用なのか、細胞膜レセプターなどを介した non-genomic な作用なのかを検証するため、VDR の mRNA を阻害する実験を行った。まず作成した 6 つの shRNA を HEK293 細胞に lipofection して Western blotting で VDR の Knockdown 効率を調べた。#2 以外の shRNA であれば VDR の Knock down は良好であった。その後、ヒト毛乳

頭細胞に control vector と #1-shRNA の挿入された Vector を、レトロウイルスを用いて遺伝子導入して調べた。その結果、VD₃ に直接反応する酵素である 24(OH)ase の Knock down が確認でき、かつ Wnt10b、ALPL、TGF-β2 の遺伝子発現の上昇は VD₃ を投与しても上昇しなかった。このことから、これらの遺伝子の発現上昇は Vitamin D-VDR Pathway を介して生じていることが分かった。

2-3) VD₃ の毛包誘導効果

最後に VD₃ を移植前に培地に添加することで毛包誘導に差がでるかどうかを調べた。移植体として培養ラット毛乳頭細胞シート片を用い、VD₃(100 nM)をそれぞれ 0、24、72 時間培地に添加した。移植法は前述した HVS 法で行い、レシピエントはラットの足底無毛部を使用した。移植後 8 週間後に組織を回収して評価した。

VD₃ を 72 時間添加したもので肉眼的にもっとも質の良い毛髪が再生した。各群の代表例を左図に示す。組織切片を HE 染色と Hoechst33342 による核染色にて評価した。誘導毛包の総数は VD₃ 添加群と非添加群で統計学的な有意差がなかったが、VD₃ の添加時間の長さに比例して増加した。stage6 以上の成熟毛包数や肉眼的発毛数は VD₃ 添加群が有意に高かった。VD₃ を添加することで特に再生毛包の質を高める効果があることが明らかになった。VD₃ には分化を促進する効果が知られているが、毛乳頭細胞に対しても認められた。

3) 考察

臨床の場で使用可能な 5 種類の移植法を検討したところ、HVS 法がもっとも優れていた

が、この結果は移植床の血行のよさと、表皮細胞とくに表皮基底細胞と間葉系成分である毛乳頭細胞の接触のよさによってもたらされたと推察される。また、 VD_3 にはカルシウムのホメオスターシス維持や増殖抑制効果、分化促進効果、免疫調節効果などが知られているが、毛乳頭細胞にも増殖抑制効果や分化促進効果が認められ、移植に用いる毛乳頭細胞の培地に使用することで毛包誘導能を促進することが示された。 $Wnt10b$ にはこれまでの報告で毛包再生を促進する効果が知られている。また、 $TGF-\beta 2$ も毛包発生に強く関わっていることが報告されている。これらの事実より、毛包誘導促進作用は VDR を介して生じる $Wnt10b$ や $TGF-\beta 2$ の遺伝子発現の上昇が関わっている可能性が考えられた。

3)結論

動物実験を通じて、臨床で施術可能でかつ胎児や新生児の表皮細胞などを使用しない移植法の開発を行った。さらに VD_3 が毛包誘導を高める培地の成分となり得ることを明らかにした。これらの実験は治験前の基礎データとなり、今後、さらなる改善を加えて細胞移植による禿髪治療の実現が期待される。