

## [課程—2]

### 審査の結果の要旨

氏名 青井 則之

本研究は、ヒト毛乳頭細胞移植による毛髪再生治療の開発を行うため、**Vitro** ではヒト毛乳頭細胞を用いて遺伝子発現の解析を行い、**Vivo** では動物モデルを作成し、ラット髭由来毛乳頭細胞を用いて毛包誘導能を確認する実験を行ったものであり、下の結果を得ている。

1. 第1章では臨床現場で使用可能な移植法の開発について取り組んだ。手術侵襲が少なく、毛包が再生されない場合でも後遺症が可能な限り残らない5種類の移植法[Pinhole法、Laser法、Slit法、Non-vascularized sandwich (NVS) 法、Hemi-vascularized sandwich (HVS) 法]を開発した。
2. 最初の実験では5種類の移植法でラットの髭由来新鮮毛乳頭組織を移植体として、ラットの足底の無毛部を移植床として実験したところ、胎児や新生児の表皮細胞を用いずとも、移植部の表皮細胞と表皮真皮間相互作用をおこし、毛包が形成されることが示された。手術侵襲が皮膚に加わり、創部のリモデリングが生じる過程も表皮真皮間相互作用が生じる一助となっていることが推測される。
3. 組織学的に再生毛包を数、成熟度、形態で評価し、統計的分析を行ったところ、5種類の移植法の内、HVS法が最も有効であることが明らかになった。この結果により毛包を効率的に再生するには移植床の血行の状態と移植した培養毛乳頭細胞と表皮基底細胞との接触の状態が重要であることが推察された。
4. 次の実験ではHVS法で培養ラット毛乳頭細胞シートを同様にラット足底の無毛部に移植した。新鮮毛乳頭組織を移植した時と同様にstage8に及ぶ高い成熟度の毛包が再生された。細胞シートの移植で誘導された毛包は毛乳頭組織の移植で誘導されたものより多数であったが、サイズは小さかった。これはシートで移植したほうが、細胞は均一に拡散しやすく、表皮真皮間相互作用は生じやすくなるが、毛乳頭は小さくなってしまふことに起因すると考えられた。
5. 第2章では培養毛乳頭細胞の毛包誘導能を維持する培地の開発に取り組んだ。これまで表皮細胞の培養上清が誘導能を維持するとの報告があったが、当研究室ではその中の成分や血清中の毛包関連因子をピックアップして調べたところ、 $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$  (以下 $\text{VD}_3$ ) がヒト毛乳頭細胞の毛包誘導能の指標であるTGF- $\beta$ 2とALPの活性を高めることを報告している。そこで、今回 $\text{VD}_3$ に着目して実験を進めた。最初に $\text{VD}_3$ によるヒト毛乳頭細胞の増殖効果を調べたところ、増殖を濃度依存的に抑制するが細胞死を誘導しているためではないことが分かった。
6.  $\text{VD}_3$ はヒト毛乳頭細胞のTGF- $\beta$ 2、ALP mRNAの発現を24-48時間後に亢進する作用があり、間

接的な反応が認められた。さらに、毛包関連遺伝子でVD<sub>3</sub>によって発現が亢進するものを調べたところ、Wnt10bが明らかになった。この遺伝子の発現も間接的な反応によるものであった。TGF-β2とWnt10bは毛包発生初期に重要な役割を果たしていること、またALPは毛包誘導能の指標として知られている。

7. ヒト毛乳頭細胞のWnt10bの発現を亢進させる他の因子を検索するとatRAが無血清培地で6時間後をピークとして直接的かつ一過性に亢進し、血清の存在下ではその作用が48時間後も延長することが明らかになったが、発現亢進効果は100nMの濃度のVD<sub>3</sub>には及ばなかった。

8. ヒト毛乳頭細胞のWnt10bの発現をさらに亢進させる方法としてVD<sub>3</sub>とall trans Retinoic Acid (atRA)、VD<sub>3</sub>と ketoconazole を併用してmRNAの発現をqRT-PCRでKineticに測定したが、併用効果による発現亢進は認められなかった。

9. ヒト毛乳頭細胞においてVD<sub>3</sub>によりWnt10b、ALP、TGF-β2の遺伝子発現が亢進する伝達経路はgenomicなものか、non-genomicなものかを調べるために、まず、Vitamin D のanalogueであるTEIを使用した。これはヒトの細胞にはVitamin D receptor (VDR) のantagonistとして作用するとの報告があるが、細胞の種類や培養条件により異なることでも知られている。そこで、VD<sub>3</sub>とTEIとの併用でWnt10bの遺伝子発現を調べたが、阻害作用も、亢進作用も認められなかった。そこで、VDRに対するRNA干渉 (shRNA) を用いて実験をおこなったところ、Wnt10b、ALP、TGF-β2の遺伝子発現はすべてKnock downされることを確認した。そのため、VD<sub>3</sub>がヒト毛乳頭細胞に対してWnt10b、ALP、TGF-β2の遺伝子発現を亢進するのは間接的ではあるが、VDRを介したgenomic pathwayによって生じていることが明らかになった。

10. VD<sub>3</sub>は動物モデルで培養毛乳頭細胞に前処置に使用することで毛包再生の成績を高めることができた。このことは、VD<sub>3</sub>が培養毛乳頭細胞の毛包誘導能を亢進し、毛乳頭細胞においてもVD<sub>3</sub>の分化誘導効果が確認でき、今後の治療にも使用できる可能性が示唆された。

以上、本論文は、毛包再生治療確立にむけ、移植法としてはHVS法が、培養法としてはVD<sub>3</sub>を培地に移植前の前処置で使用することが有用であるという新たな可能性を示した。また今後、毛包再生治療が確立した際にはWnt10、ALP、TGF-β2が培養ヒト毛乳頭細胞の毛包誘導能の指標としても使用できる可能性を*in vitro*, *in vivo*の実験系で示した。さらに改良を加える必要性はあるが、本研究は治験前の基礎データとなり、細胞移植による禿髪治療の実現に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。