

ヒトiPS細胞を用いた*in vitro*毛包誘導モデルの開発

慶應義塾大学医学部皮膚科学教室

大山 学

In the present study, we successfully established a protocol to induce human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) into keratinocyte precursor cells, expressing keratin 18 and 14. By co-culturing hiPSC-derived keratinocyte precursor cells with human dermal papilla cells, we were able to, at least partially, recapitulate bidirectional crosstalk between hair matrix cells and the dermal papilla in the hair follicle, which may provide a valuable tool for future investigation.

1. 緒言

毛髪とそのスタイルは個人の印象を左右し、時として職業までも連想させるなど我々の社会生活に影響を与える。そのため、毛髪の維持、発育に関わる物質に対する社会的ニーズは大きい。従って毛包細胞に対し生理活性を示す分子を効率よくスクリーニングする方法の確立はコスメロジーにおいて重要な意味をもつ。

本研究の目的は、ヒト induced pluripotent stem cell (hiPSC) を用いた*in vitro*毛包誘導モデルの開発である。毛包自体の発生、毛幹(毛髪)の形成・伸長には毛母細胞(毛幹形成に特化した毛球部のケラチノサイト)と毛乳頭細胞間の上皮-間葉系相互作用が重要である。毛包の維持、発育促進に関与する因子を効率よく選択するには、この相互作用を再現するモデルを開発する必要がある。特に*in vitro*の系はスクリーニングなどに有用であり、これまでも確立が試みられてきた^{1,2)}。

従来のヒト細胞を用いたモデルは、ヒト細胞の供給の限界の点から相互作用を実現する能力が低い成人由来の分化したケラチノサイトと継代数が高く特性を失いつつある毛乳頭細胞を組み合わせる方法をとらざるを得なかった¹⁾。これまでのヒト細胞を用いた毛包再構成実験で、成人ケラチノサイトよりも新生児由来のケラチノサイトの方が毛乳頭細胞とクロストークし毛包を再現する効率が高いことが知られており^{3,4)}、幼若なケラチノサイトを用いれば毛包での上皮-間葉系相互作用を再現できる可能性はより高くなることが予想される。そこで、本研究ではhiPSCからケラチノサイトへ誘導する過程で得られる幼若な分化段階のhiPSC由来ケラチノサイトとヒト毛乳頭細胞の共培養に基

づく*in vitro*毛包誘導モデルの開発を試みることにした。

計画初年度となる昨年度はhiPSCからケラチノサイトへの分化誘導と分化度調節のための条件確立を試みた。その結果、1) 上皮系への分化には胚様体形成をした後、レチノイン酸(RA)を添加した条件で培養する必要がある 2) コラーゲンでコートした培養ディッシュとケラチノサイト無血清培地を使用してhiPSCを培養した時のみケラチン14、18の発現がみられる 3) 効率よくケラチノサイトへの分化を誘導するためにはBMP4の添加が必要であることが判った。また、分化誘導に適したRAとBMP4の濃度はそれぞれ1 μ M RA、25ng/ml BMP4であろうと結論された。また、hiPSCのラインごとに試薬に対する反応性が異なることも示唆された。

計画最終年度となる本年度は昨年度評価した山中4因子を導入した201B7、WD39の二つのhiPSCラインに加え4因子のうちMYCを導入していないWDT2を加えた3つのラインについてケラチノサイト前駆細胞への誘導を試みるとともに、得られた細胞をヒト毛乳頭細胞と共培養し*in vitro*毛包誘導モデルの確立を目指した。

2. 実験

2.1 細胞と試薬

本研究においてはヒト真皮線維芽細胞にレトロウイルスを用いて山中3または4因子(*POU5F1*、*SOX2*、*KLF4*、*MYC*+/-)を導入して確立した3つのhiPSCライン(201B7⁵⁾、WD39⁶⁾、WDT2 [3因子のライン]⁷⁾を使用した。前年度の報告で記載した如く、hiSP細胞はマイトマイシン処理したマウス胎児線維芽細胞(MEF)をフィーダーとして使用し、ヒトiPS細胞培地(20% Knockout Serum Replacement (Life technologies)、2mM L-glutamine (Sigma)、1 $\times 10^{-4}$ M nonessential amino acids (Sigma)、1 $\times 10^{-4}$ M 2-mercaptoethanol (Sigma)、4ng/ml FGF2 (Wako, Osaka, Japan)、0.5% penicillin and streptomycin (Life technologies) 含有 DMEM/Ham's F12培地)で継代培養した。

共培養で使用するヒト毛乳頭細胞は慶應義塾大学倫理申請2005-0075に従って同意の上で採取された頭部良性腫瘍の



Development of *in vitro* hair follicle induction model using human induced pluripotent stem cells

Manabu Ohyama

Department of Dermatology, Keio University School of Medicine

周辺部の頭皮サンプルから実体顕微鏡下でマイクロダイセクションによって得た毛乳頭を Amniomax-C100 Complete medium (Life Technologies) にて培養したものを使用した。

2.2 前年度の検討で決定した条件を用いた3つの異なる hiPSC ラインを用いたケラチノサイト前駆細胞への分化誘導

前年度決定した RA および BMP4 の濃度を用いて hiPSC をケラチノサイト前駆細胞へ分化誘導した。hiPSC をフィーダーから遊離させ胚様体形成を行い、2日追加培養した後、1 μM RA (Sigma) および 25 ng/ml BMP4 (R&D Systems) を培地に追加、3日間培養の後、ゼラチンコートディッシュを用いてケラチノサイト培地 defined-KC serum free medium (DKSM, Life technologies) にて付着培養し合計11日間培養し hiPSC 由来ケラチノサイト前駆細胞を得た。

2.3 ケラチノサイト前駆細胞のケラチノサイトマーカー発現の解析

2.2の段階で得られた hiPSC 由来ケラチノサイト前駆細胞について、遺伝子発現レベル、タンパク発現レベルのそれぞれについてケラチノサイトマーカーの発現を解析した。

前年度同様に遺伝子発現レベルの解析にはリアルタイム PCR 解析を用いた。具体的には RNeasy Mini または Micro キット (Qiagen) を用いて解析対象となる細胞から totalRNA を分離。Superscript III First Strand Synthesis SuperMix (Life Technologies) を用いて cDNA を合成した後、Primer Express software (Life Technologies) を用いて作成したプライマーを使用し、Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies) と Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR system (Life Technologies) を用いて解析した。PCR の条件は、95℃ 10分、95℃ 15秒、60℃ 60秒を40サイクル行った。得られ

た値 (ΔCT値) は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の ΔCT 値を基準に標準化し比較検討した。

タンパクレベルでの解析は解析対象となるケラチノサイト前駆細胞をコラーゲンコートしたカバースリップに4% paraformaldehyde を用いて固定し、一次抗体として mouse anti-human monoclonal keratin 18 (KRT18) (1:100, ab668, Abcam, Cambridge, UK), mouse monoclonal anti-human tumor protein p63 (P63) (1:100, ab735, Abcam) or mouse monoclonal anti-human keratin 14 (KRT14) (1:100, ab7800, Abcam) を 4℃ 一昼夜反応させた後、PBS にて洗浄して30分間 Goat anti-mouse IgG Alexa 488 (1:200, Life Technologies) と反応させ観察した。

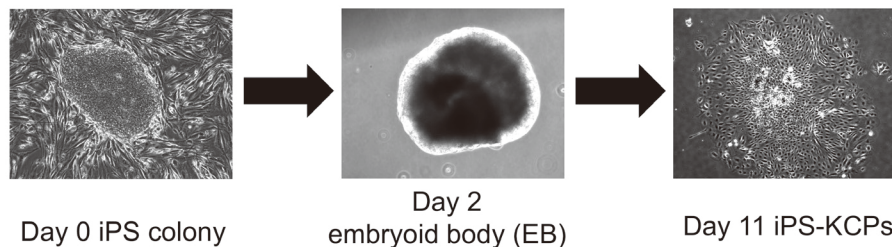
2.4 hiPSC 由来ケラチノサイト前駆細胞とヒト毛乳頭細胞の共培養系

hiPSC 由来ケラチノサイト前駆細胞または、コントロールとしてのヒトケラチノサイトとヒト毛乳頭細胞の共培養は、Inuiらの方法¹⁾を改変して用いた。2.5 × 10⁵個の hiPSC 由来ケラチノサイト前駆細胞または、コントロールとしてのヒトケラチノサイトを透過性のあるメンブレンが底に張られたトランスウェルインサート (Corning, Corning, NY) にまき、80% コンフルエントに到達した2継代目のヒト毛乳頭細胞を培養中のディッシュに培養液を共有するように重ねた。共培養の培養液として DMEM と F12 を 3 : 1 の比率で混合したものを用いた。共培養開始後2日目に totalRNA を回収し遺伝子発現解析を行った。

3. 結果

3.1 胚様体形成させ RA と BMP4 を作用させた hiPSC はラインを問わずケラチノサイト系への分化を示す形態をとる

前年度確立したプロトコール (図1)⁸⁾を用いて201B7、



Day	0	2	5	11
Medium	iPS medium (-FGF)		Defined KC serum free medium	
Factors		Retinoic acid BMP4		
Culture	Floating		Collagen I coated dishes	

図1 本研究で確立された hiPSC からケラチノサイト前駆細胞を得るためのプロトコール (文献⁸⁾より改変)

WD39、WDT2の全てのhiPSCラインの分化誘導を試みたところ、全てのラインで分化誘導開始後11日後にはケラチノサイトに類似した上皮系の形態を有する細胞に変化していることが明らかになった。

3.2 分化誘導されたhiPSC由来細胞は幼若ケラチノサイトに類似したマーカー発現パターンを示す

上記のプロトコールによって分化誘導されたhiPSC由来ケラチノサイト前駆細胞をケラチノサイト系統のマーカー(ケラチン14、18、p63)に対するモノクローナル抗体を用いて蛍光染色した。ケラチン18は主として単層上皮に発現するケラチンで比較的幼若なケラチノサイトで発現しており、ケラチン14は分化したケラチノサイト(特に基底膜)で発現しているケラチンである。図2に示すように、どのラインから誘導したものでも、ケラチン18、p63を強く発現し、コロニーの周囲ではケラチン14が発現していた⁸⁾。これは幼若な分化段階のケラチノサイトでみられるパターンであり、目的とするケラチノサイト前駆細胞をhiPSCから誘導することができたことを示す所見である。

3.3 ヒトケラチノサイトと毛乳頭細胞を用いた共培養系の確立

*in vitro*で毛球部における上皮-間葉系相互作用を再現

するため、共培養システムの確立を試みた(図3、文献¹⁾を参考)。まず、このシステムにおいてコントロールとして正常ケラチノサイトが毛乳頭細胞と相互作用することを確認した。

2日間の共培養の後、ケラチノサイトにおける毛包関連遺伝子の発現を評価したところ、共培養しない場合と比較して発現が有意($p < 0.05$)に上昇しており(図4)、この系が上皮-間葉系相互作用の評価に有用であることが示された。

3.4 hiPSC由来ケラチノサイト前駆細胞と毛乳頭細胞を用いた共培養系の確立

次いで前述のプロトコールで分化誘導したhiPSCが共培養系でヒト毛乳頭細胞と相互作用しヒトケラチノサイトと同様に毛包関連遺伝子発現を増強するかどうかについて検討した。

興味深いことにヒト毛乳頭細胞と共培養すると201B7hiPSC由来のケラチノサイト前駆細胞は正常ケラチノサイトより毛包関連遺伝子を強く発現した(図5)。毛球部における上皮-間葉系相互作用は双方向である。そこで、hiPSC由来ケラチノサイト前駆細胞が共培養した毛乳頭細胞に影響を与えるか否かを検討した。

すると201B7由来ケラチノサイト前駆細胞は正常ケラ

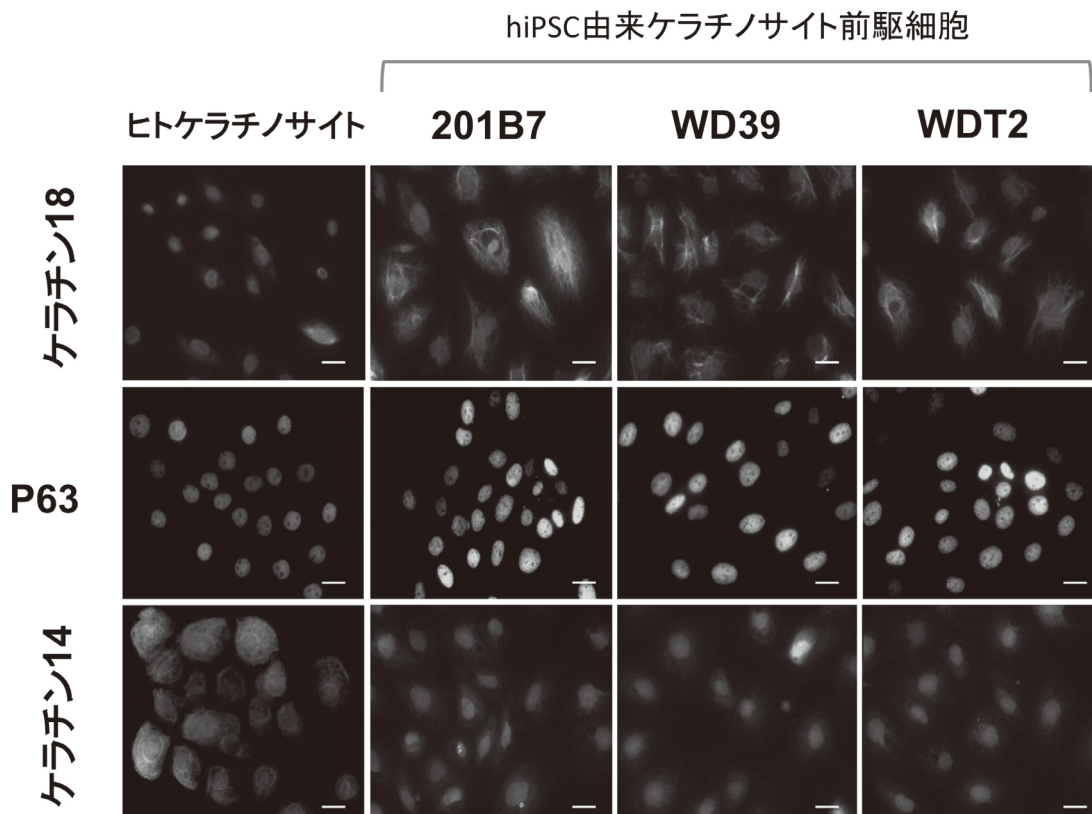
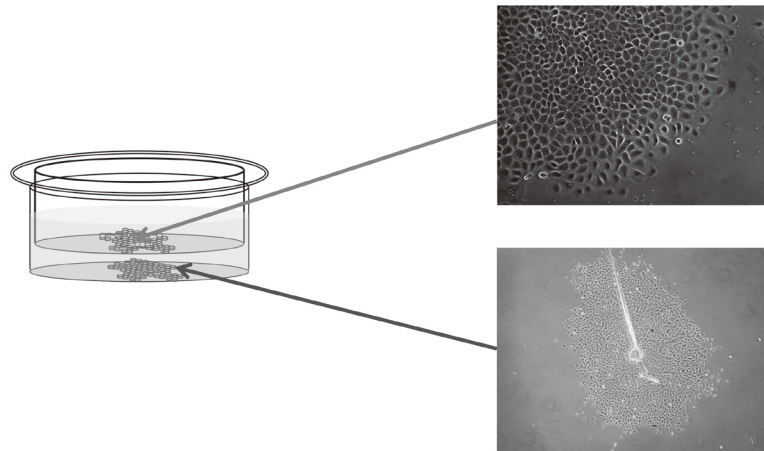


図2 3つの異なるhiPSCラインから得たケラチノサイト前駆細胞はケラチン18、p63陽性、ケラチン14弱陽性を示す(文献⁸⁾より改変)

正常ヒトケラチノサイト
またはhiPCS由来ケラチノサイト前駆細胞



ヒト毛乳頭細胞

図3 本研究で用いられた *in vitro* でヒト毛球部の上皮-間葉系相互作用を評価する共培養モデル (*in vitro* 毛誘導モデル)

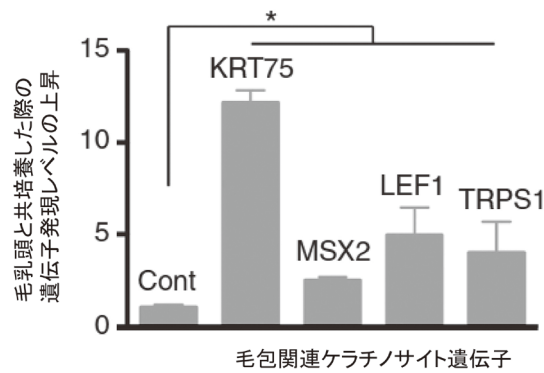


図4 共培養システムにおける正常ケラチノサイトでの毛包関連遺伝子の発現増強 (文献⁸⁾より改変)

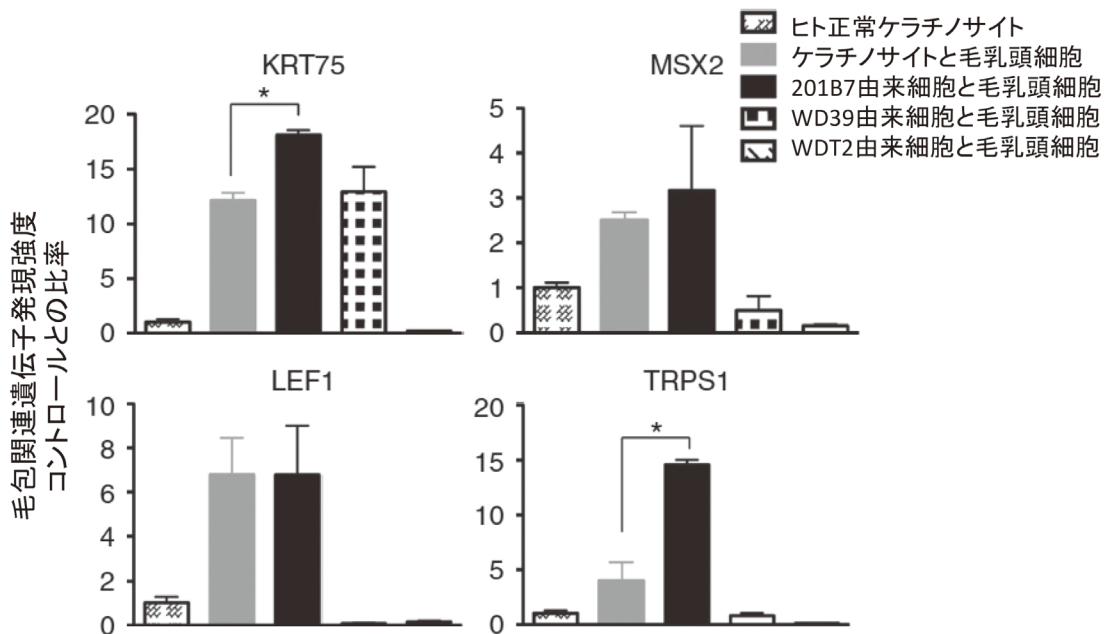


図5 共培養系による hiPSC 由来ケラチノサイト前駆細胞における毛包関連遺伝子の発現の増強 (文献⁸⁾より改変)

チノサイトよりも強くヒト毛乳頭細胞に働きかけ毛乳頭細胞のバイオマーカーであるALPL、BMP4、LEF1の発現を増強することが明らかになった(図6)。つまり、201B7hiPSC由来ケラチノサイト前駆細胞と毛乳頭細胞からなる共培養の系は、毛球部で起きている上皮-間葉系細胞間相互作用の少なくとも一部を再現しており、本研究で目指した*in vitro*毛包誘導モデルとして使用することができる可能性があることが示された。

4. 考察

検討した3種類のhiPSCラインの全てがほとんど同じケラチノサイト分化マーカーの発現を示していたにもかかわらず、共培養の系では201B7由来の細胞のみがコントロールとして使用したヒト正常ケラチノサイトと比較して毛乳頭細胞からのシグナルに対して優れた反応性を示した。少なくとも本研究の開始時に予測した「幼若な性質を示すケラチノサイトは毛乳頭からの毛誘導シグナルに対する反応性が高い」という仮説は部分的には支持されたことになる。

201B7hiPSCラインがその他のラインと比較して有意な差をもって優れた反応性を示した理由としては、1) 初期化の程度が他のラインより優れていた 2) デフォルトで上皮系に分化しやすい などの理由があると思われる今後さらなる比較検討が必要と考えられた。また、今回の結果から、hiPSCのラインごと特性が大きく異なり、使用目的に合うラインを決定するために、応用ごとに数種のラインを比較検討する必要があることも明らかになった。

今回の検討では、hiPSCからケラチノサイトへの分化誘導の程度が均一ではなく、ヘテロな細胞集団を使用したため、どの分化段階の細胞が良好な反応を示したのか判断しにくい。今後はケラチノサイトの表面マーカーなどを用いて事前にソーティングすることにより、より効率のよいシステムの構築が可能になることが期待される。

本研究で確立されたシステムに関しては、どの程度毛球部の生物学的イベントを再現しているのか十分に検討できていない。今後はマイクロアレイなどを用いた網羅的遺伝子解析を行うなどしてさらに厳密にシステムを定義していくことが必要であると考えられる。

様々な改善点が考えられるものの、本研究はhiPSCの活用法の一つの方向性を示唆するものであり、今後さらなる改良により、毛包に作用する薬剤のスクリーニングシステムなどへの発展が期待できると思われる。

5. 総括

hiPSCから幼若なケラチノサイトの特性をもつケラチノサイト前駆細胞を作成するプロトコルを確立するとともに、ヒト毛乳頭細胞との共培養することにより*in vitro*毛包誘導モデルのプロトタイプを作成した。(本研究は文献⁸⁾の一部として行われた)

(引用文献)

- 1) Inui S, Fukuzato Y, Nakajima T, Yoshikawa K, Itami S. Androgen-inducibile TGF-beta1 from balding dermal papilla cells inhibits epithelial cell growth: a clue to

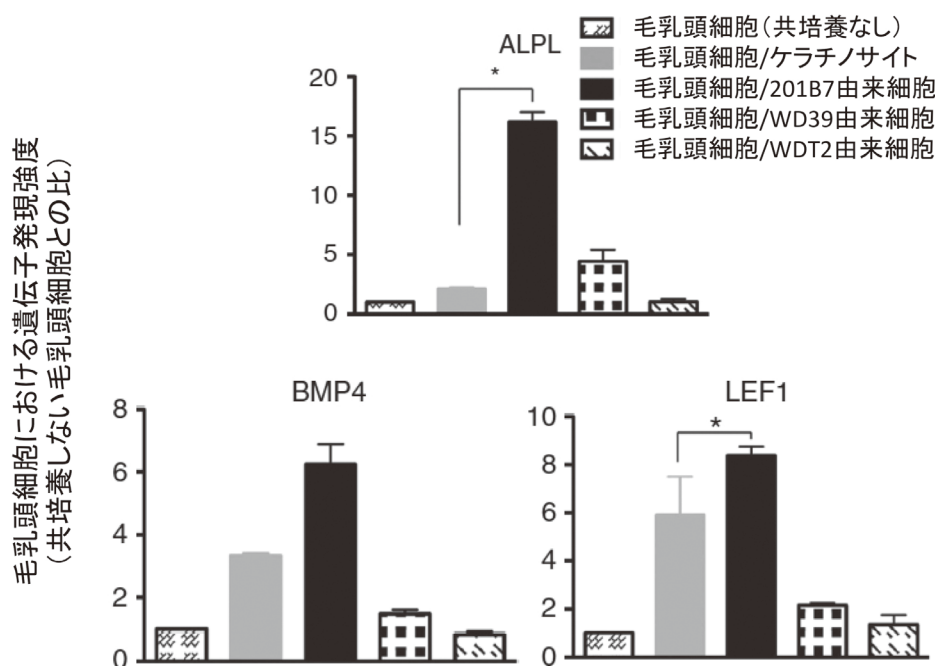


図6 共培養系による毛乳頭細胞におけるバイオマーカーの発現の増強 (文献⁸⁾より改変)

- understand paradoxical effects of androgen on human hair growth. *FASEB J* 2002; **16**: 1967-1969.
- 2) Ohyama M, Veraitch O. Strategies to enhance epithelial-mesenchymal interactions for human hair follicle bioengineering. *J Dermatol Sci* 2013; **70**: 78-87.
- 3) Ehama R, Ishimatsu-Tsuji Y, Iriyama S, et al. Hair follicle regeneration using grafted rodent and human cells. *J Invest Dermatol* 2007; **127**: 2106-2115.
- 4) Thangapazham RL, Klover P, Wang JA, et al. Dissociated Human Dermal Papilla Cells Induce Hair Follicle Neogenesis in Grafted Dermal-Epidermal Composites. *J Invest Dermatol* 2013.
- 5) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; **131**: 861-872.
- 6) Ohta S, Imaizumi Y, Okada Y, et al. Generation of human melanocytes from induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 2011; **6**: e16182.
- 7) Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, et al. Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and alpha-synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue. *Mol Brain* 2012; **5**: 35.
- 8) Veraitch O, Kobayashi T, Imaizumi Y, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived ectodermal precursor cells contribute to hair follicle morphogenesis in vivo. *J Invest Dermatol* 2013; **133**: 1479-1488.