

女性頭髪における休止期 - 成長期移行シグナルメカニズムの *in vitro* 解析系の構築

東京工科大学応用生物学部

岩 渕 徳 郎

Development of *in vitro* evaluation system for telogen-anagen transition was attempt. The respiration activity of mixed monolayer-culture of human dermal papilla cells (hDP) and human outer root sheath cells was significantly increased in 10 days, however, that of sphere-formed hDP and human outer root sheath cells was significantly decreased. The results on respiration activity of sphere indicated that characteristics of the sphere-formed hDP was similar to the hair bulb in telogen phase. Gene expression profile of hair cycle regulating-factors in sphere suggested that the profile of sphere-formed hDP was similar to hDP in telogen phase. When cyclosporin A which is a powerful hair growth inducer was added to sphere-formed hDP, gene expression profile for hair cycle regulating-factors was similar to hDP in anagen phase. The results suggested that sphere-formed hDP might be used as an *in vitro* system to evaluate for new hair induction. This system would be useful for screening of hair regrowth reagent for female hair loss.

1. 緒 言

男性だけでなく、女性でも薄毛は大きな毛髪悩みである。男性の薄毛は毛髪径の減少の影響が大きいが、女性の薄毛は毛髪密度の低下の影響が大きい^{1,2)}。これは、女性では発毛が重要であることを示唆している。これまで男性の薄毛研究の結果、「太く、長く」を訴求する薬剤が探索されてきたが、女性の薄毛の研究例は少ない³⁾。

ヒトの毛髪には毛が成長する成長期、毛が成長しない休止期、成長期から休止期へ移行する退行期の3つの期があり、生涯を通して成長期、退行期、休止期を繰り返す。これを毛周期と言う⁴⁻⁶⁾。発毛とは毛周期の休止期から成長期への移行であり、新たな毛球部の形成が上皮系細胞-間葉系細胞間の相互作用によって起こる現象である⁷⁾。発毛評価法は現時点ではマウスの*in vivo* 発毛試験のみが実用化されているが、動物実験廃止の流れにそぐわず、ヒト頭髪とマウス体毛の差異の説明も難しい。

報告者らのこれまでの研究により、2種の毛包由来細胞(毛乳頭細胞[hDP]と外毛根鞘細胞[hORS])を用いて、

- ① 3次元培養(スフェア形成)を行うと毛包様構造を形成すること
- ② hORSがhDPを取囲むように配置すること
- ③ 既知発毛薬剤でhORSのみが増殖刺激を受けることが確認されている。これらより、ヒト毛髪細胞の3次元培養で発毛様のイベントを解析できる可能性が示唆された。



Development of *in vitro* evaluation system for telogen-anagen transition in female hair cycle

Tokuro Iwabuchi

Faculty of Bioscience and Biotechnology,
Tokyo University of Technology

本研究は女性の薄毛で重要な課題である発毛を解析可能な*in vitro* 評価系を構築することを目的とした。そのため、ヒト毛包由来の細胞および関連細胞を用いてスフェアを形成させ、その特性を解析した。

2. 方 法

2.1. 細胞、培地、細胞培養

細胞は、間葉系細胞としてヒト女性毛包由来の毛乳頭細胞(hDP-49F)を使用した。上皮系細胞としてヒト女性毛包由来の外毛根鞘細胞(hORS-40F)または正常ヒト角化細胞(hKC)を使用した。

培地は、間葉系細胞用の基礎培地としてDMEM (Life Technologies) を使用し、栄養培地として10% FBS-DMEMを使用した。上皮系細胞用の基礎培地として、Life Technologies社指定のサプリメントを添加しないKeratinocyte-SFM (K-SFM; Life Technologies) を、栄養培地としてサプリメントを添加したK-SFMを使用した。全ての培地には抗生物質(ペニシリン、ストレプトマイシン、アムホテリシンB)を添加した。

細胞の3次元培養法として、非接着性丸底プレート(PrimeSurface 96Uプレート、以下PS-96Uプレート; 住友ベークライト)を使用し、本プレートの各ウェルに細胞を2000播種した。細胞播種後、37°C-5% CO₂で培養し、スフェアを形成させた。対照実験として、通常の細胞培養用プレートで単層培養を同条件で行った。

2.2. 遺伝子発現解析

遺伝子発現の解析は、形成させたスフェアおよび単層培養細胞から、ISOGEN (日本ジーン)でmRNAを調製した後、SuperScript III (Invitrogen)を用いて、cDNAを調製した。調製したcDNAを鋳型にreal time PCRで被検遺伝子の発現量を単層培養と3次元培養の場合とで比較した。

発毛薬剤である cyclosporin A (CsA) に対する応答性に対する培養方法の比較は、3次元培養および単層培養した hDP に CsA (終濃度 50ng/ml) を添加し、37°C -5% CO₂ で培養後、遺伝子発現を real time PCR で比較した。

2.3. 細胞増殖測定

細胞の増殖性は細胞の呼吸活性を指標に、AlamarBlue (BioRad) を用いて測定した。単層培養は 96well プレートで、3次元培養(スフェア形成)は PS-96U プレートで行った。いずれのプレートとも、1種の細胞を培養する時は 1well あたり 3000 細胞を、2種の細胞を培養する時は 1well あたり 両細胞とも 2000 細胞(計 4000 細胞)を播種した。培養後、1well の培地量の 1/100 量の AlamarBlue を添加し 4 時間 37°C -5% CO₂ インキュベーターで静置したのち測定した (Ex. 560nm, Em. 590nm)。スフェアの呼吸活性測定時は、96well プレートに全量移して測定した。

2.4. 細胞染色

O. C. T Compound でスフェアを凍結固定後、マイクロームでスフェア切片を作成し、スライドグラスに固定した。さらに、4% パラホルムアルデヒド (PFA) でスフェア切片を固定し、TritonX-100 処理を行い、3% BSA-PBS (-) に 60 分間浸漬し、1次抗体反応を行った。PBS (-) で

洗浄後、2次抗体反応を行い、DAPI を含有したマウント剤を添加し、蛍光顕微鏡で観察した。毛乳頭細胞検出用には間葉系細胞マーカーとして Vimentin [Anti-Vimentin (D21H3; CST ジャパン)] を、上皮系細胞検出用には上皮系細胞マーカーとして Pancytokeratin [Cytokeratin Pan Monoclonal Antibody (PAN-CK; Life Technologies)] を選定した。

3. 結果

3.1. 毛包由来細胞の単層培養とスフェアでの呼吸活性の違い

hDP 単独での単層培養とスフェアにした場合の経時での呼吸活性変化を図 1 に示した。単層培養では、経時的に有意に呼吸活性は増加したのに対し、スフェアでは細胞播種後 6 日では変化はなく、10 日目に有意に減少を示した。

混合培養 (hDP+hORS) での単層培養とスフェアにした場合の経時での呼吸活性変化を図 2 に示した。単層培養では、経時的に有意に呼吸活性は増加したのに対し、スフェアでは細胞播種後 6 日以降有意に減少を示した。

3.2. 毛乳頭細胞と上皮系細胞から形成したスフェアの内部構造

前項の検討から、hDP 単独および hDP+hORS 混合の

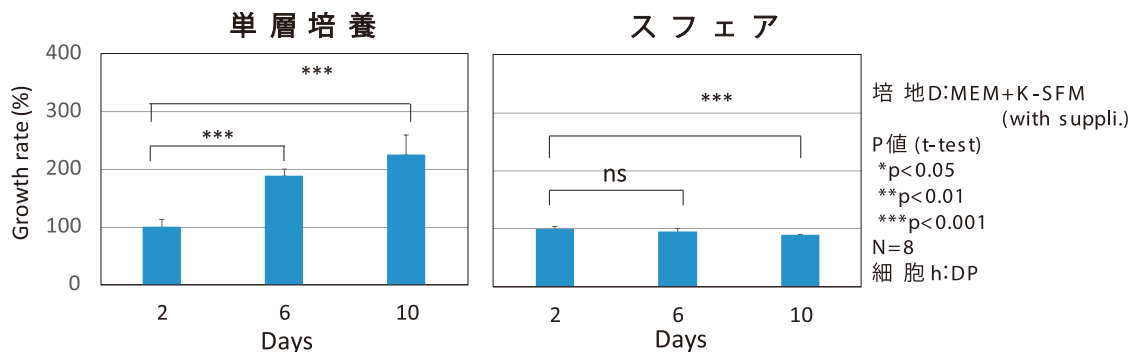


図 1 単層培養とスフェアでの呼吸活性比較(毛乳頭単独培養)

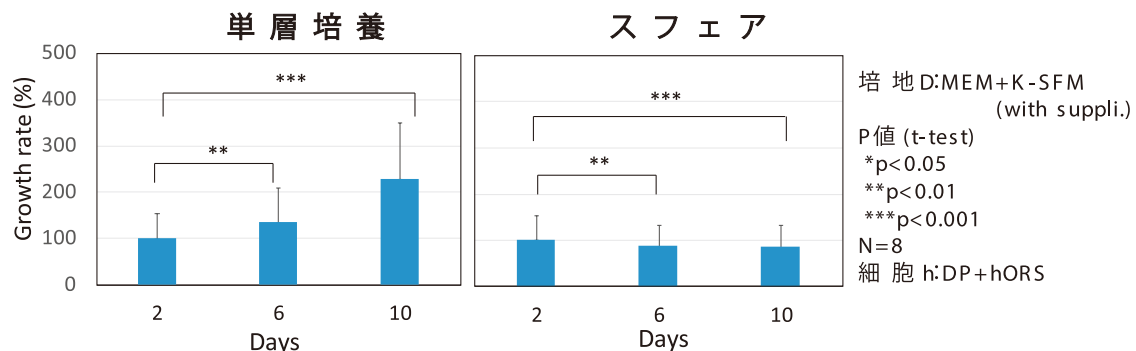


図 2 単層培養とスフェアでの呼吸活性比較(混合培養)

フェアはいずれも、呼吸活性が低下し、休止期状態の毛球部と似ている状態であることがわかった。次に、混合スフェアを作成した時のスフェアの構造を解析した。本実験では上皮系細胞として、hORSに代えてhKCを使用した。hDPを特異的に認識する抗Vimentin抗体を、hKCを特異的に認識する抗Pancytokeratin抗体を使用し、抗Vimentin抗体を検出する2次抗体にはFITCが、抗Pancytokeratin抗体を検出する2次抗体にはAlexa Fluor 594が蛍光物質として結合している。なお、細胞核はDAPIで蛍光染色した。

hDP+hORS混合スフェアの切片の染色像を図3に示した。中心部が緑色(FITC)を示したことから、hDPが中心部に凝集し、それを取り囲むように外側に赤色(Alexa Fluor 594)を示したことからhKCが配置していることが確認された。実際の毛球部では、中心に毛乳頭細胞があり、毛乳頭と隣接するように局在する。このことから毛球部の細胞局在と類似した、スフェアであると考察した。本実験は実際の毛球部を再現することが重要であるので、評価に用いることができる可能性を示した。

3.3. スフェア化したhDPの生存性

hDPをスフェア化すると呼吸活性が低下することが3.1.の検討で明らかとなった。これは、細胞が生存していない可能性を疑わせた。そこで、スフェア形成後10日経過し十分に呼吸活性が低下してスフェア化したhDPを取り出し、

再度平板上で培養し細胞の生存性を観察した。図4に平板に静置後1日のhDPスフェア(左)を、静置後10日のhDPスフェア(右)を示した。hDPスフェアから明らかにhDPがアウトグロースしており、インタクトな毛乳頭を単離して培養した時と同様の様子を示した。結果から、スフェア化したhDPは生存しており、単に呼吸活性が低下しただけの状態であることが確認された。

3.4. 毛乳頭細胞単独の単層培養とスフェアでの毛周期関連遺伝子の発現特性

hDPのスフェアと単層培養細胞を作成し、休止期維持因子(BMP-4)⁸⁾、成長期維持因子(FGF7、アルカリ性フォスファターゼ[ALP])^{9,10)}、退行期誘導因子(TGF- β 2、FGF5)^{11,12)}の発現をreal time PCRで評価した(図5)。単層培養からスフェアに変化することで、①休止期維持因子BMP-4の発現は有意に亢進、②成長期維持因子FGF7とALPは有意に低下、③退行期誘導因子TGF- β 2とFGF5は有意に低下した。これらの結果は、①BMP-4の発現亢進はスフェアになることによって休止期に近い状態、②FGF-7とALPの発現低下はスフェアが成長期初期から中期以外の時期に似ている、③TGF- β 2とFGF5の発現低下は成長期後期から退行期以外の時期に似ていることを示唆していた。以上より、スフェア化hDPは成長期初期から退行期以外の期、つまり休止期であることを示唆していた。

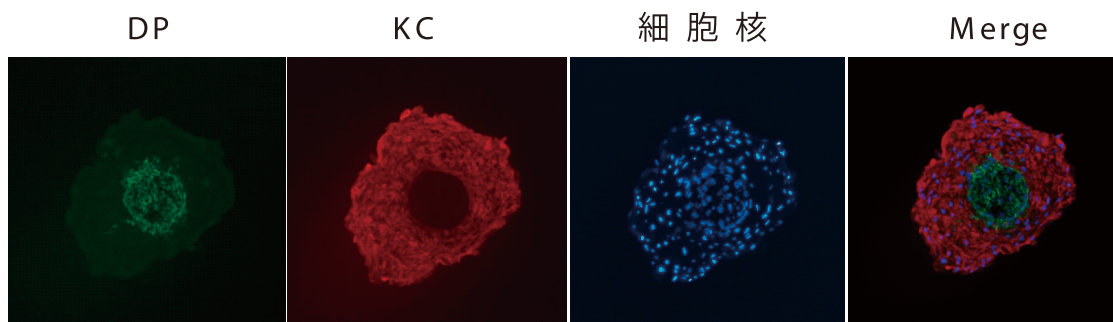


図3 スフェア内の間葉系細胞(hDP)と上皮系細胞(hKC)の局在

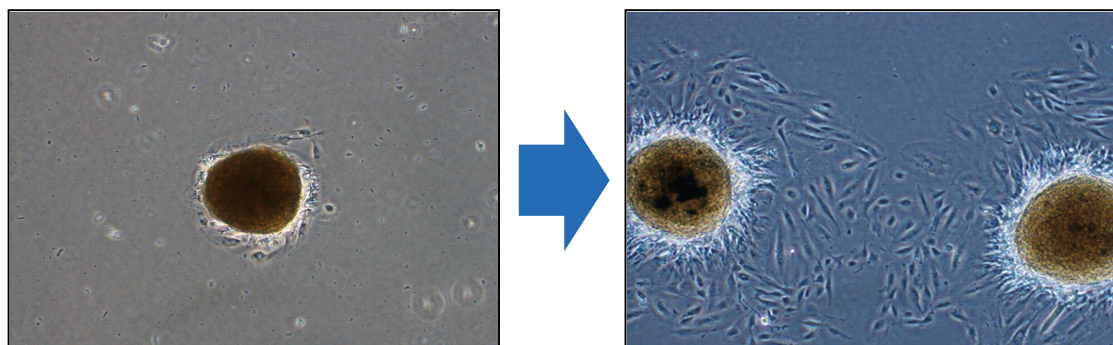


図4 静置1日のhDPスフェア(左)、および静置10日のhDPスフェア

3.5. 毛乳頭細胞単独のスフェアにCsAを添加した時の毛周期関連遺伝子の発現特性

スフェア化したhDPに発毛薬剤CsA¹³⁾を添加(50ng/ml)の有無での休止期維持因子(BMP-4)、成長期維持因子

(ALP、血管内皮細胞増殖因子[VEGF])¹⁴⁾、退行期誘導因子(TGF-β2、FGF5)の発現をreal time PCRで評価した(図6)。スフェア化したhDPにCsAを添加(50ng/ml)することで、①休止期維持因子であるBMP-4の発現は有

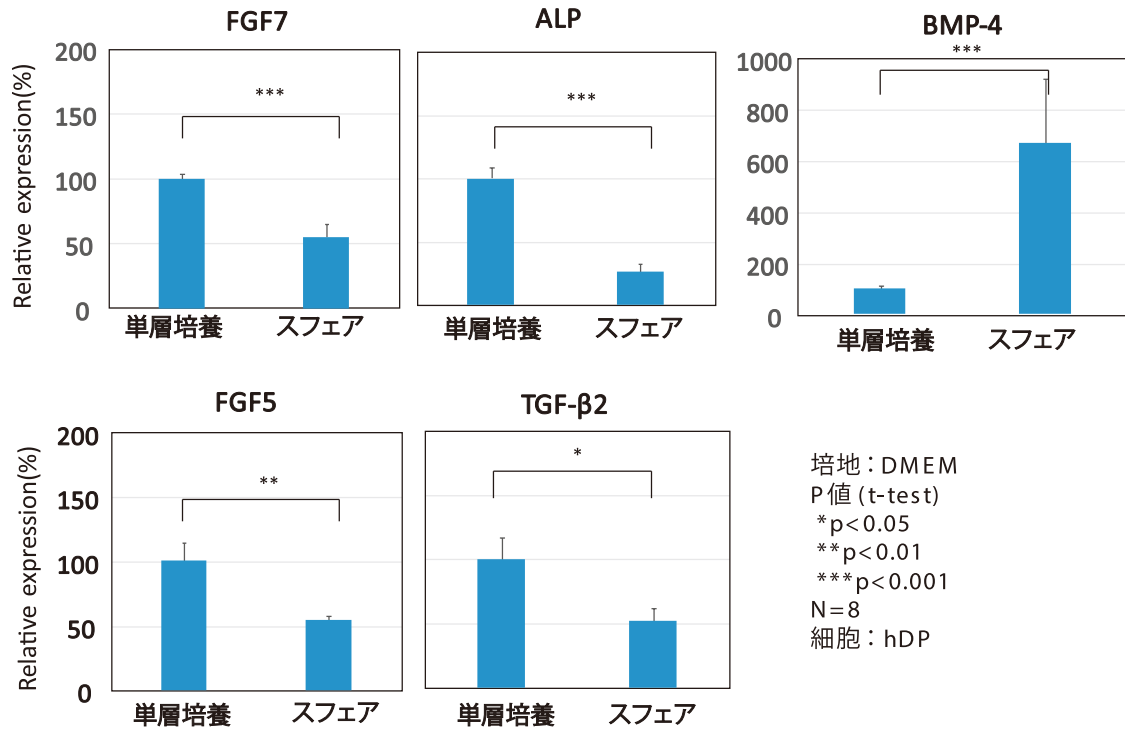


図5 単層培養とスフェアしたhDPでの各種毛周期関連遺伝子の発現比較

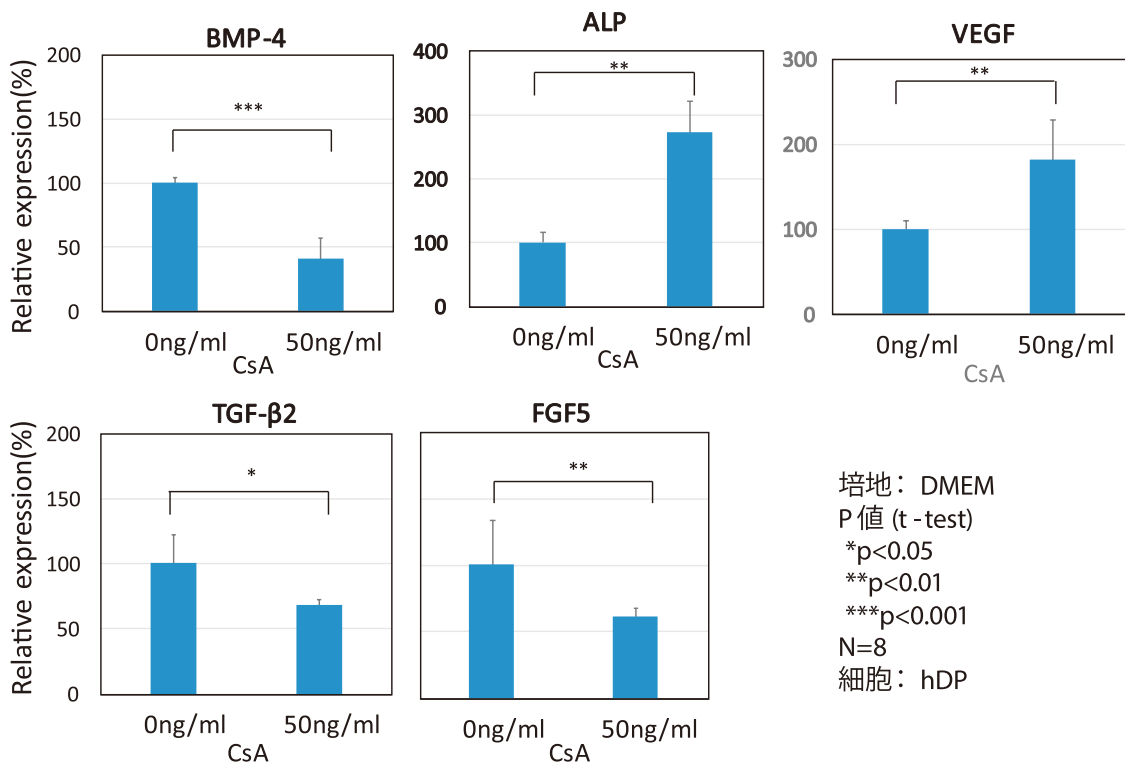


図6 スフェア化hDPにCsAを添加した時の各種毛周期関連遺伝子の発現比較

意に低下、②成長期維持因子であるALPとVEGFは有意に亢進、③退行期誘導因子であるTGF-β2とFGF5は有意に低下した。これらの結果は、①BMP-4の発現低下はCsA添加によって成長期極初期に近い状態になることを、②ALPとVEGFの発現更新はCsA添加によって成長期極初期に近い状態になることを、③TGF-β2とFGF5の発現低下は成長期後期から退行期以外の時期に似ていることを示唆していた。以上より、スフェア化したhDPに発毛薬剤CsAを添加すると、成長期初期に類似した遺伝子発現特性を示すことが明らかとなった。

4. 考 察

女性由来の毛乳頭細胞を用い、3次元培養(スフェア化)を行うことによって*in vitro*発毛評価系の構築を試みた。毛乳頭細胞を単独および上皮系細胞と混合でスフェア化すると呼吸活性が低下し、休止期毛包と類似した状態となった。さらに、混合でのスフェアは実際の毛球部と同様に毛乳頭細胞が中心部に凝集し、その周囲を上皮系細胞が取り囲む構造を呈した。

ヒトの毛乳頭細胞を単離し、初代培養を行うと細胞が集塊を形成し盛り上がってくる現象が観察される。また、この盛り上がり部にはALPが強く発現していることが知られている。毛乳頭細胞は凝集化すると形質が変化する性質があることが予想される。本検討において、3次元培養によって細胞集塊(スフェア)を人為的に形成させることによって何らかの変化を生じさせたことが考えられた。これらのことから、形態的には毛乳頭細胞のスフェアを用いて*in vitro*での発毛評価系を構築できる可能性が出てきた。

スフェア化した毛乳頭細胞における毛周期関連遺伝子の発現特性を検討した結果、休止期に類似した遺伝子発現特性を示していることが確認された。さらに、発毛薬剤CsAによって、遺伝子発現特性が成長期の極初期に類似した状態に変化することが確認された。毛乳頭細胞のスフェア化によってなぜこのような反応が起こるのか詳細は不明だが、細胞接着が毛周期関連遺伝子の発現に関与している可能性が考えられる。細胞接着を強くし過ぎないように働くコンドロイチン硫酸プロテオグリカン的一种であるパーシカンが、毛乳頭細胞の毛包誘導能の維持に関与している例がある¹⁵⁾。何らかの毛乳頭細胞間の接着機構が単層培養の毛乳頭細胞とスフェア化した毛乳頭細胞の特性の違いとなって現れていると思われる。

形態学的特性、スフェア化による毛周期関連遺伝子の発現特性変化、発毛薬剤による毛周期関連遺伝子の発現特性変化の結果から、スフェア化した毛乳頭細胞はヒトでの発毛を*in vitro*で評価できる実験系と成り得る可能性が強く示唆された。

(引用文献)

- 1) Ishino A, Takahashi T, Suzuki J, Nakazawa Y, Iwabuchi T, Tajima M. Contribution of hair density and hair diameter to the appearance and progression of androgenetic alopecia in Japanese men. *Br. J. Dermatol.* 171: 1052-1059. (2014)
- 2) Tajima M, Hamada C, Arai T, Miyazawa M, Shibata R, Ishino A. Characteristic features of Japanese women's hair with aging and with progressing hair loss. *J. Dermatol. Sci.* 2007; 45: 93-103. (2007)
- 3) Birch MP, Messenger JF, Messenger AG. Hair density, hair diameter and the prevalence of female pattern hair loss. *Br. J. Dermatol.* 144: 297-304. (2001)
- 4) Courtois M, Loussouarn G, Hourseau C, Grollier JF. Hair cycle and alopecia. *Skin Pharmacol.* 7: 84-89. (1994)
- 5) Silver AF, Chase HB. DNA synthesis in the adult hair germ during dormancy (telogen) and activation (early anagen). *Dev. Biol.* 21: 440-451. (1971)
- 6) Tezuka M, Ito M, Ito K, Tazawa T, Sato Y. Investigation of germinative cells in generating and renewed anagen hair apparatus in mice using anti-bromodeoxyuridine monoclonal antibody. *J. Dermatol. Sci.* 2: 434-443. (1991)
- 7) Mohammadi P, Youssef KK, Abbasalizadeh S, Baharvand H, Aghdami N. Human hair reconstruction: close, but yet so far. *Stem Cells Dev.* 25: 1767-1779. (2016)
- 8) Zhang J, He XC, Tong WG, Johnson T, Wiedemann LM, Mishina Y, Feng JQ, Li L. Bone morphogenetic protein signaling inhibits hair follicle anagen induction by restricting epithelial stem/progenitor cell activation and expansion. *Stem Cells.* 24: 2826-2839. (2006)
- 9) Danilenko DM, Ring BD, Yanagihara D, Benson W, Wiemann B, Starnes CO, Pierce GF. Keratinocyte growth factor is an important endogenous mediator of hair follicle growth, development, and differentiation. Normalization of the nu/nu follicular differentiation defect and amelioration of chemotherapy-induced alopecia. *Am. J. Pathol.* 147: 145-154. (1995)
- 10) Hamada K, Suzuki K. Evaluation of biochemical indices as a hair cycle marker in C3H mice. *Exp. Anim.* 45: 251-256. (1996)
- 11) Soma T, Tsuji Y, Hibino T. Involvement of transforming growth factor-beta2 in catagen induction during the human hair cycle. *J. Invest. Dermatol.* 118: 993-997. (2002)

- 12) Hébert JM, Rosenquist T, Götz J, Martin GR. FGF5 as a regulator of the hair growth cycle: evidence from targeted and spontaneous mutations. *Cell*. 78: 1017-1025. (1994)
- 13) Iwabuchi T, Maruyama T, Sei Y, Adachi K. Effect of immunosuppressive peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) inhibitors, cyclosporin A, FK506, ascomycin and rapamycin, on hair growth initiation in mouse: immunosuppression is not required for new hair growth. *J. Dermatol. Sci*. 9: 64-69 (1995)
- 14) Yano K, Brown LF, Detmar M. Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. *J. Clin. Invest*. 107: 409-417. (2001)
- 15) Kishimoto J, Ehama R, Wu L, Jiang S, Jiang N, Burgeson RE. Selective activation of the versican promoter by epithelial-mesenchymal interactions during hair follicle development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 96: 7336-7341. (1999)