

# 化粧品原料の次世代スクリーニング用細胞の創製： ES/iPS 細胞の多重遺伝子加工

関西学院大学理工学部生命医化学科

平井 洋平

Primary cultured normal human epidermal keratinocytes (NHEK) have been widely used for evaluation of activities of cosmetic components, however, these cells have considerable lot-to-lot variations and readily to lose differentiation potential upon serial passages. This study aimed to prepare a novel iPS-derived cell system for effective screening of cosmetic compounds. We generated iPS cells that were stably transfected with tet/dox-inducible expression cassette for BMP4 (Tet-BMP4-iPS), so that these cells can be maintained as iPS cells in conventional medium, but undergo differentiation into ectodermal lineages after treatment with retinoic acid (RA) and subsequently into *krt14*-positive keratinocyte progenitors upon treatment with dox. We found that thus generated keratinocyte progenitors were unstable and spontaneously differentiate into several epidermal lineages. To detect the appearance of the specific epidermal lineage, e.g., hair cortex, Tet-BMP4-iPS cells were further introduced with differentiated cell-specific promoter, e.g., KRT31 promoter for hair cortex, which had been connected with luciferase reporter. When treated simultaneously with RA, dox and soluble factors from dermal papilla cells, Tet-BMP4-iPS cells quantitatively increase the expression of luciferase up to three days, suggesting that activity of any soluble components for hair cortex differentiation could be evaluated by this cell system. To find the optimal condition of RA and dox treatment for sensitive detection of hair differentiation, we then developed a model of differentiation process of pluripotent iPS cells into terminally differentiated hair cortex cells.

## 1. 緒言

本研究は、初代培養細胞や細胞株に比べ遥かに優れた次世代の化粧品評価モデルを創出し、最終的には種々の化粧品研究に新たなブレークスルーを与えることを目指したものである。現在、業界として実験動物が使えないため化粧品材料の評価には培養細胞に多くを頼らざるを得ない状況がある。一方で、汎用される初代培養ケラチノサイトはヘテロな分化状態の細胞が混在しているだけでなく、継代可能回数に限りがあるため遺伝子操作による均一細胞の樹立も難しい。本研究では、未分化な表皮前駆細胞が十分量確保でき、さらに表皮構成成分への分化を容易にモニター可能な系の確立を試みた。具体的には、低分子化合物の添加のみでES/iPS細胞から表皮前駆細胞を作製し、かつ、表皮前駆細胞から目的細胞への分化を容易に定量追跡できる系を確立することにした。分化万能性を有するES/iPS細胞が表皮前駆細胞に分化するためには、まず中・内胚葉ではなく外胚葉へ変化し、次に神経系ではなく表皮系へと分化する必要がある。前者についてはレチノイン酸の添加が、また、後者については細胞近傍の一時的なBMP4の濃度上昇が効果的であるとされる<sup>1)</sup>。

そこで、本研究では必要に応じてiPS細胞表面でBMP4

を発現誘導できるような仕掛けを予め施し、導入したBMP4の遺伝子発現をオフの状態ですべて増殖させ、そこに外胚葉への分化を促すためのレチノイン酸と、外胚葉から表皮系列に向かわせるBMP4を発現誘導することにした。また、得られる細胞には表皮前駆細胞以外の細胞も含まれると考えられるため、表皮前駆細胞からの分化プロセスを高感度にモニターできるように、表皮分化マーカーのプロモーターにレポーター遺伝子を連結させた遺伝子の導入も併せて行った。本研究では、表皮前駆細胞から変化する分化細胞として、特に培養系での分化誘導が困難とされる毛/毛包に着目し、毛のケラチンであるKRT31のプロモーターを適応させることにした。さらに、万能細胞の分化数理モデルを作成してその分化誘導効率の向上についても検討した。本研究のコンセプトによって作成されたiPS細胞は、培養液に2種類の安価な低分子化合物を添加し、レポーター遺伝子の発現追跡を行うだけで分化状態を定量的に把握できるため、薬剤候補物質をこの系に添加することでその分化誘導活性を評価できると期待される。

## 2. 方法

### 2.1. iPS細胞の遺伝子加工 I

未分化な万能細胞は生理活性分子に敏感に応答することや遺伝子の導入・発現が難しいことを考慮して、テトラサイクリン/ドキシサイクリンを添加した時だけ導入遺伝子の発現が可能になるシステム (Tet-on system) を採用し、強制的にゲノムに遺伝子挿入できるPiggybacトランスポゾンの活性<sup>2)</sup>を利用することにした。そのため、まずPB-tetベクターをベースにしたコンストラクトを構築し



The next-generation screening cells for cosmetic components: ES/iPS cells with multiple gene-manipulations

Yohei Hirai

Department of Biomedical Chemistry,  
Kwansei Gakuin University

た(図1)。次に調製したコンストラクトをrtTA、トランスポゼース、薬剤耐性ベクターと共にマウスiPS細胞に導入し、テトラサイクリン/ドキシサイクリンの添加によりBMP-4の発現量がON/OFFできる安定細胞を作製した(tet-BMP4-iPS細胞)。また、この細胞がテトラサイクリン/ドキシサイクリン非添加状態では未分化状態を保ちながら通常のiPS細胞として扱えることを確認し、十分に増殖させたものをストックした。

## 2. 2. iPS細胞の遺伝子加工IIと分化の検出

本研究では、特に培養下で未分化表皮細胞/表皮前駆細胞からの分化が困難とされ特殊な表皮付属物である毛/毛包

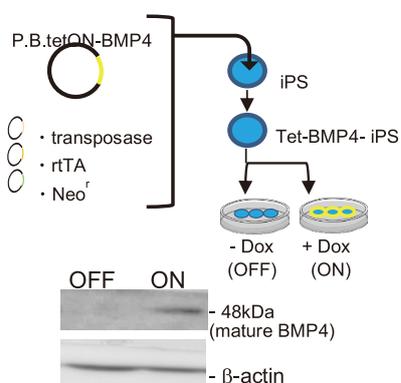


図1 コンストラクトおよび遺伝子導入細胞(tet-BMP4-iPS)

包への分化をモデルに選び、その分化プロセスを簡便に追跡できる系への展開を試みた。細胞から毛/毛包への分化が高感度に検出できるように、表皮前駆細胞が毛へ分化する際に発現するケラチン31のプロモーター活性を定量追跡できるように、まずゲノムからケラチン31のプロモーター領域を抽出しルシフェラーゼレポーターを連結したプラスミドを作成しこれを細胞に導入した。

## 2. 3. ES/iPS細胞の分化プロセスのモデル化

まず、多能性幹細胞であるiPS細胞から外胚葉、内胚葉、中胚葉への3胚葉分化と、外胚葉から神経前駆細胞や表皮前駆細胞への分化、さらには表皮前駆細胞から表皮細胞、毛包・毛髪細胞への分化のプロセスを考慮した細胞系譜図を作成した(図2)。次に、この図のD32/D33を目的の毛包・毛髪細胞と設定しグループ分けを行った。グループ分けの第1段階として(ステージ2) group1の一つの細胞集団が3種類の細胞に分化すると仮定し、その仮定に基づいてD32/D33の分化に関与しないグループ(group2)と関与するグループ(group3)に分けた。さらに、第2段階として(ステージ3)、group3の中でもD32/D33の分化に関与しないグループ(group5)と関与するグループ(group6)に分け、group6が直接的にD32/D33に分化するとプログラムした。また、初期の細胞数を便宜上100個とし、条件として各ステージの細

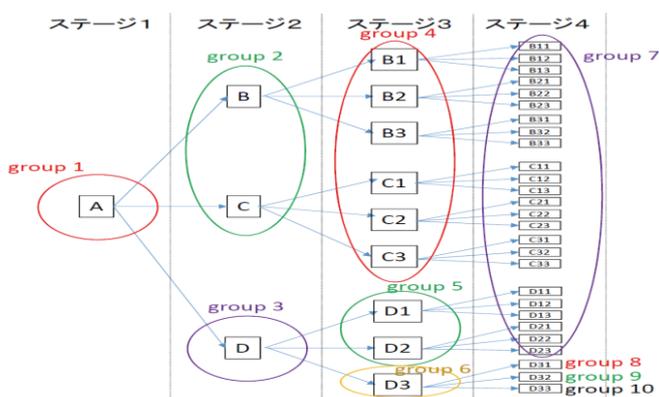


図2 iPS細胞から各細胞への分化モデル

左：分化プロセスの区分け

A; 多能性幹細胞(iPS細胞)(group1) B,C; 内胚葉もしくは中胚葉(group2) D; 外胚葉(group3) B1~B3, C1~C3; B11~B33もしくはC11~C33の前駆細胞(group7) D1,2; D11~D23の前駆細胞(group5) D3; 表皮前駆細胞(group6) D31; 表皮細胞(group8) D32, D33; 毛包(group9)もしくは毛髪細胞(group10)

右：シミュレーションのパラメータ

分裂割合; 事象が起こる際に細胞が分裂する割合。1, 2, 3への分化割合; 事象が起こる際に分化する割合(例えばDがD1へ分化する割合を1への分化割合。D2へ分化する割合を2への分化割合。D3へ分化する割合を3への分化割合としている)。現状維持割合; 事象が起こる際にそのステージにとどまり変化をしない割合。

状態	グループ	row1	row2	row3	div	df1	df2	df3	維持割合	消滅割合
state	group	row1	row2	row3	div	df1	df2	df3	stay	dis
A	1	2	3	4	0.01	0.25	0.25	0.25	0.24	0
B	2	5	6	7	0.15	0.25	0.25	0.25	0.1	0
C	3	8	9	10	0.15	0.25	0.25	0.25	0.1	0
D	4	11	12	13	0.15	0.25	0.25	0.25	0.1	0
B1	4	14	15	16	0.15	0.25	0.25	0.25	0.1	0
B2	4	17	18	19	0.15	0.25	0.25	0.25	0.1	0
B3	4	20	21	22	0.15	0.25	0.25	0.25	0.1	0
C1	4	23	24	25	0.15	0.25	0.25	0.25	0.1	0
C2	4	26	27	28	0.15	0.25	0.25	0.25	0.1	0
C3	4	29	30	31	0.15	0.25	0.25	0.25	0.1	0
D1	5	32	33	34	0.15	0.25	0.25	0.25	0.1	0
D2	5	35	36	37	0.15	0.25	0.25	0.25	0.1	0
D3	6	38	39	40	0.15	0.25	0.25	0.25	0.1	0
B11	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
B12	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
B13	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
B21	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
B22	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
B23	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
B31	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
B32	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
B33	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
C11	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
C12	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
C13	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
C21	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
C22	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
C23	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
C31	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
C32	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
C33	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
D11	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
D12	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
D13	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
D21	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
D22	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
D23	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
D31	8	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
D32	9	NA	NA	NA	0	0	0	0	0.9	0.1
D33	10	NA	NA	NA	0	0	0	0	0.9	0.1

胞は1日ごとにそれぞれある割合で(1)“分裂”(2)“次のステージに移行”(3)“現状維持”のいずれかの事象を起こすと仮定した。また、D32/D33は分裂しないため(1)“分裂”の条件は適用されず、さらに毛包や毛髪細胞は脱核し、mRNAの発現がなくなることから(4)“消滅”を条件として付け加えた(図2)。

### 3. 結果

従来から、分化万能性を有する細胞はレチノイン酸(RA)の添加で外胚葉へ、外胚葉は細胞近傍のBMP4の刺激で各種の表皮由来細胞のソースである表皮前駆細胞に分化しやすいことが知られている。そこで、本研究ではフィーダーフリーで安定して増殖させることができるマウスiPS細胞を出発材料に選び、これにRAとBMP4を作用させることで表皮前駆細胞の安定供給を試みることにした。RAは低分子化合物で容易に取り扱えるのに対し、BMP4は不安定で高価なタンパク質である。そこで、今回はiPS細胞自身にBMP4を生産・分泌させる系を構築した。具体的には、低分子化合物によってBMP4遺伝子の発現を人工的に制御できるようにtet onシステムを用いて細胞に安定的な遺伝子導入を行った。樹立した遺伝子導入細胞

(Tet-BMP4-iPS細胞)はテトラサイクリン(tet)/ドキシサイクリン(Dox)の添加に応じてBMP4を発現し、BMP4の下流のsmad1/5/8も速やかにリン酸化されることが確認できた。また、未分化マーカー *nanog* と神経前駆マーカー *nestin* のmRNA発現を指標に、この細胞を外胚葉に分化誘導するための至適RA濃度を決定した。次に、導入遺伝子の発現誘導により表皮前駆細胞への分化が促進されるかを調べることにした。RAと同時にDoxを添加し神経前駆細胞のマーカー *nestin* と表皮前駆細胞のマーカー *krt14* の発現変動をqRT-PCR法にて解析したところ、DoxがRAによる神経前駆細胞への分化を抑制し表皮前駆細胞への分化を促進することが確認できた。次に、RAとDoxを添加し24時間、48時間、72時間で各種マーカーのmRNA発現変動ならびに *krt14* 免疫蛍光染色やFACSによる解析を行った。その結果、分化誘導24時間で未分化マーカー *nanog* の発現が低下し未分化性が失われていること、神経細胞マーカー *tuj1* の発現は変わらないこと、*krt14* の発現が増加していくことがわかった。免疫蛍光染色やFACS解析では、KRT14の発現細胞の割合も日を追うごとに増加していくことも判明した(図3)。次に、Tet-BMP4-iPS細胞由来の表皮前駆細胞は通常の表皮前

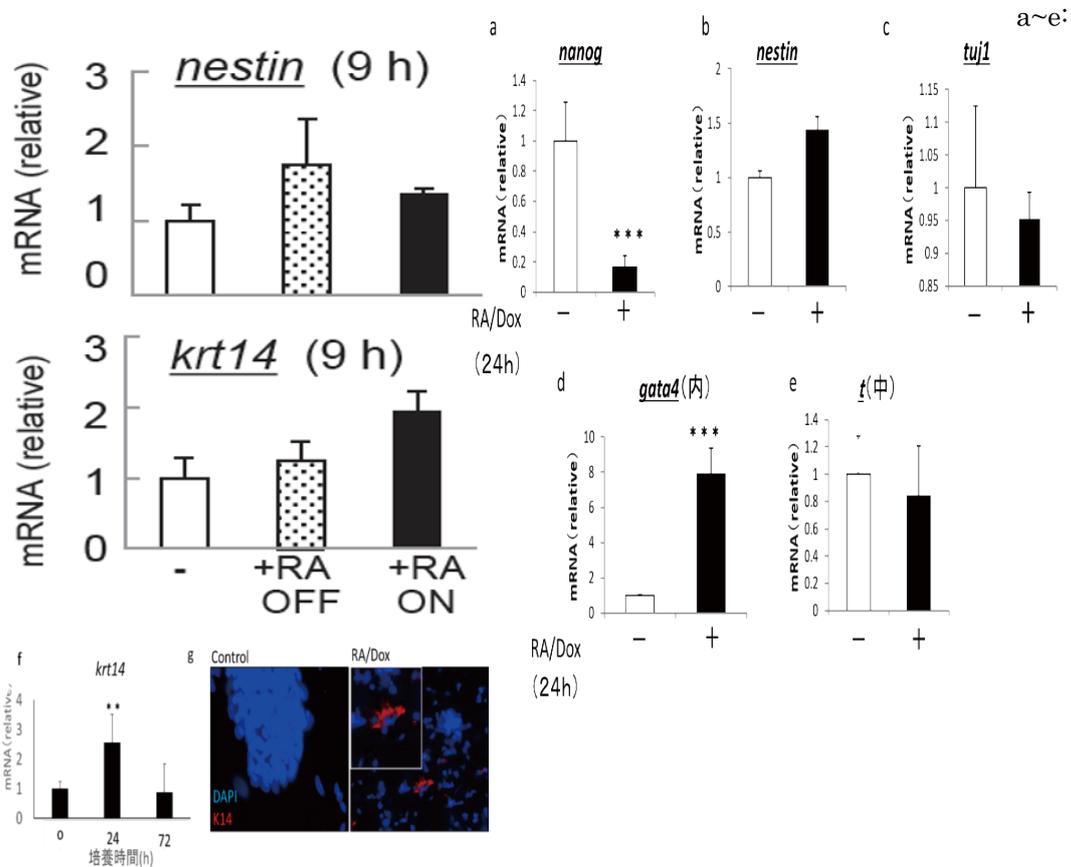


図3 tet-BMP4-iPSの分化誘導

上:各種マーカーの発現 *nanog* (未分化マーカー)、*nestin* (神経前駆マーカー)、*tuj1* (神経系マーカー)、*gata4* (内胚葉マーカー)、*t* (中胚葉マーカー) N=3 \*\*\* $p < 0.001$

*krt14* (表皮前駆マーカー) N=4 \*\* $p < 0.01$

下: KRT14の免疫蛍光染色。controlではKRT14ポジティブな細胞が確認できなかったが、RA/Doxによる分化誘導によってKRT14ポジティブな細胞が確認された。

駆細胞と同様に成長因子による増殖や、次のステージへの分化が可能であるかを調べた。Tet-BMP4-iPS細胞をRAとDoxで刺激する際に同時にkeratinocyte growth factor (KGF) (100ng/ml)を添加すると、*krt14*の発現がさらに上昇したことから、分化誘導された表皮前駆細胞はKGFにより増殖が促されると考えられる。ただし、*krt14*の発現量は72時間を超えると減少に転じ、角化した表皮のマーカーであるトランスグルタミナーゼ1 (TGase1)の発現が開始されていたことから、得られた表皮前駆細胞はこの段階で自発的に次のステージへ分化したと考えられた。以上の結果より、RA/Dox非添加系で安定して増殖・維持できるTet-BMP4-iPS細胞は、RA/Doxの添加に応答して生体内の表皮前駆細胞と同様な性質を有する細胞へと簡単に分化することがわかった。次に、Tet-BMP4-iPS由来の表皮前駆細胞が、初代培養表皮細胞では分化しにくい毛包・毛髪細胞に分化誘導が可能なのかを調べた。生体内において表皮前駆細胞は毛乳頭細胞との相互作用することにより毛包・毛髪細胞へと分化することが知られている<sup>3,4)</sup>。その現象を模倣するため、多孔膜メンブレンを使って毛乳頭細胞との共培養を行い、Tet-BMP4-iPS由来細胞内の毛包マーカー*krt75*ならびに毛髪のマーカー*krt31*, *krt33a*のmRNA発現をqRT-PCR法で解析した。その結果、共

培養1日で*krt75*の発現が増加し、3日目でピークに達した後ゆるやかに発現が減少した。一方、*krt31*, *krt33a*の発現は4日でピーク達しその後減少した(図4)。この結果は、Tet-BMP4-iPS由来の表皮前駆細胞は毛乳頭細胞と共培養をすることで、まず毛包へ、そして少し遅れて毛髪細胞へと分化することを示唆している。ちなみに、生体内でも未分化な表皮から毛包/毛が発生する過程で同様の挙動を示すことが知られている。本研究で用いた共培養系においてはTet-BMP4-iPS由来細胞は毛乳頭細胞とは多孔質膜を隔てて存在していること、毛乳頭細胞以外の細胞を使って共培養しても毛包/毛へと分化誘導されないことから、毛乳頭細胞から分泌される液性因子(拡散性因子)の中に毛包や毛髪細胞へ分化させる物質が存在していると考えられる。現在、毛乳頭細胞から放出される毛/毛包形成因子の1つとしてWnt5aが着目されている<sup>5)</sup>。そこで、RA/Dox存在下で単独培養したTet-BMP4-iPS細胞にWNT5a (100ng/mL)を添加したところ、*krt75*の発現は有意に増加したが*krt31*の発現には変化が見られなかった。また、前述のKGFについては、*krt14*に対する*krt75*/*krt31*両方の相対的な発現量変動に影響を与えないことがわかった。これらの結果は、WNT5aは発毛誘導活性を有すると考えられるが実際には毛包細胞への分化を

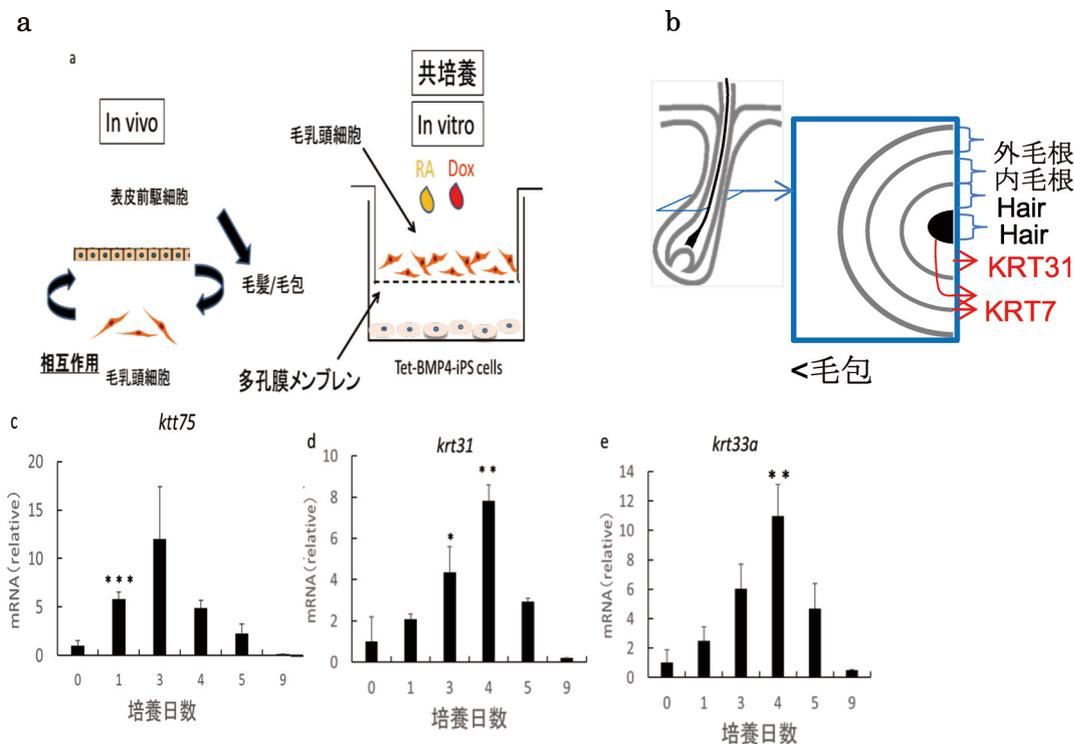


図4 毛乳頭細胞が分泌する因子による毛包・毛への分化誘導

a; 共培養の模式図。Tet-BMP4-iPS細胞は毛乳頭細胞の分泌する発毛誘導因子の影響を受ける。  
 b; 毛包・毛髪の構造における各遺伝子の発現場所の簡易図。*krt75*は毛包細胞への分化マーカー*krt31*または、*krt33a*は毛髪細胞分化マーカーとして使用した。  
 c~e; 毛包 (*krt75*) / 毛髪 (*krt31*, *krt33a*) 細胞分化マーカーの発現変化。これらのマーカーの発現が有意に増加することから、毛包・毛髪細胞への分化が進行していることが確認できる。  
 N=3 \*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001

促進させる一方で毛髪細胞への分化には影響しないこと、KGFは表皮前駆細胞の増殖のみに関わり毛/毛包への分化に関わらないことを示唆する。ただし、この実験系では産生される表皮前駆細胞の割合が十分とはいえず（表皮前駆細胞の割合は10%程度）、高感度の分化追跡法の確立（以下の3.2.）、ならびに分化誘導条件の再検討（以下の3.3.）が必要と考えられた。

### 3. 2. 毛への分化の高感度追跡系

前述の通り、表皮前駆細胞の産生効率が低いことを考慮し、次に、最終的な表皮由来の目的細胞（モデルケースでは毛髪細胞）への分化プロセスを高感度にモニターできる系の構築に取り組んだ。具体的には、毛髪細胞への分化に応答して特異的に発現開始されるKRT31のプロモーターにレポーターのルシフェラーゼ遺伝子を連結したコンストラクトをTet-BMP4-iPS細胞に導入する方法を採用した。まず、KRT31のプロモーターと予想される領域1700bpをPCRでマウスゲノムより取得し、それにルシフェラーゼ遺伝子を連結したコンストラクトプラスミド（KRT31pr-Luc）を作製しこれをTet-BMP4-iPS細胞へ遺伝子導入した（Tet-BMP4-KRT31-Luc-iPS細胞）。このTet-BMP4-KRT31-Luc-iPS細胞をRA/Doxで刺激し毛乳頭細胞との共培養処理を行うことで、毛髪細胞分化が高感度で継続的にモニターできるようになった（図5）。また、

KGFによって表皮前駆細胞の数を増やすことにより、さらに顕著に毛髪細胞分化が追跡できることも確かめられた。これらの結果は、Tet-BMP4-KRT31-Luc-iPS細胞を用い、毛乳頭細胞との共培養処理の代わりに試験物質の薬剤候補因子を添加することで試験物質の発毛誘導活性を高感度にモニターできる可能性を示唆している（図5）。

### 3. 3. ES/iPS細胞の分化モデルと分化誘導条件の検討

Tet-BMP4-iPS細胞から表皮前駆細胞への分化効率を向上させるためには、RAならびにDoxの最適添加条件を決めることが必要と考えられた。そこで、iPS細胞から毛/毛包への分化プロセスの数理モデル化を行い、そこから添加条件を抽出することにした。「2.方法」の項で述べたパラメータから毛包・毛髪細胞(D32, 33)のmRNAの発現パターンはある一定期間増加しピークを迎えた後、ゆるやかに減少していくと予想できた（図2）。そこで、この縦軸（発現量）を上げる、即ち、効率的に毛包・毛髪の細胞への分化を促進させるためにgroup1（A）からgroup2（B, C）、group3（D）への分化パラメータを変化させた。その結果、group1から3（D）への分化割合を変動させることで、D32の縦軸が大きく変動するが（赤枠で囲った図）、group1, 2（B, C）への分化割合を変化させてもD32の変動が小さい結果となり（緑枠で囲った図）、group1か

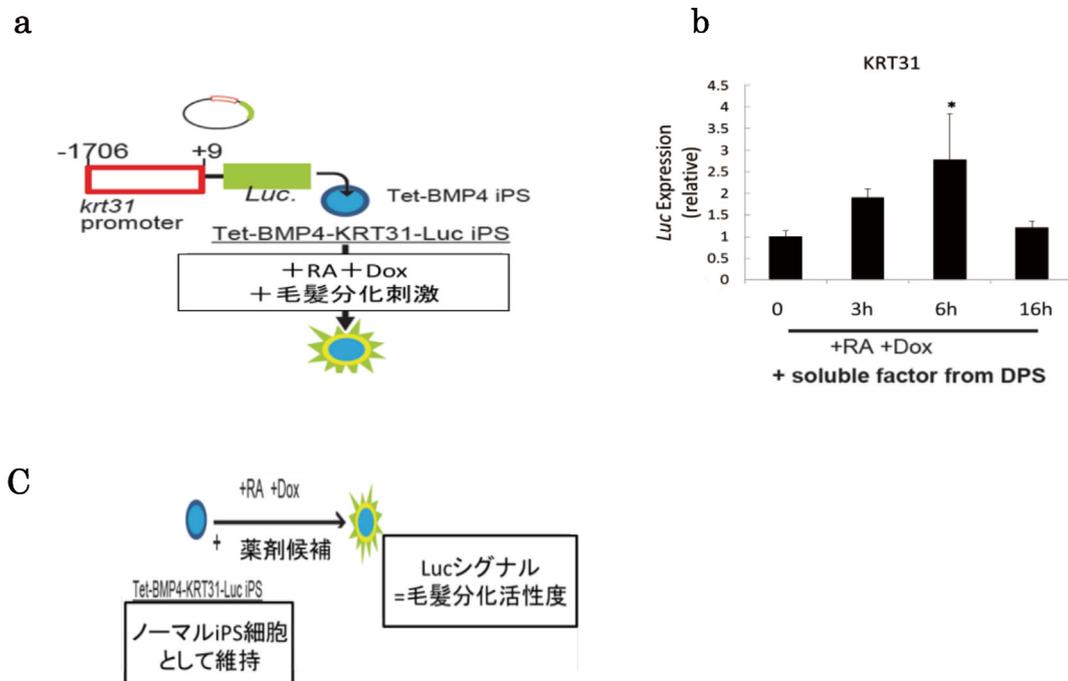


図5 系の概略図

- a; tet-BMP4-KRT31-LUC iPS細胞の調製と毛髪細胞への分化追跡 KRT31 プロモーター配列をLucの遺伝子上流に挿入し、tet-BMP4-iPS細胞に導入した。この細胞にRA, Doxと発毛誘導剤を作用させるとルシフェラーゼが発現する。インターナルコントロール、 $\beta$ -gal
- b; 毛乳頭細胞からの分泌因子による発毛誘導の追跡 N=3 \* $p$ <0.05
- c; 毛髪細胞への分化能をもつ薬剤スクリーニング系の簡略図。

ら group3 (D) への分化を促すことでより毛包・毛髪の細胞への分化誘導効率を上げることができると予想された(図2)。同様の解析を行うと、① group1 から group3 への分化を促す、② group3 から group6 への分化を促す、③ group6 から group9 や 10 への分化を促す、の3つのことが最も有効であり、各プロセスを加速させても D32/D33 の発現はまず増加してピークを迎え、その後ゆるやかに減少するパターンをとると考えられた。これらの結果を鑑み、まず RA のみを 120 時間作用させて外胚葉分化誘導を十分にした後、Dox のみを 72 時間作用させたところ、RA と Dox を同時に 192 時間作用させたものと比べて KRT14 陽性細胞の割合が 14% から 34% にまで増加した(図6)。

#### 4. 考 察

本研究で iPS 細胞に多重の遺伝子加工を施すことで、安定して増殖・維持でき、しかも低分子化合物の添加のみで機能的な表皮前駆細胞を産生できる細胞が準備できるようになった。また、元来表皮前駆細胞は非常に不安定で、特別な分化誘導なしに自発的に各種表皮由来細胞に分化してしまうが、本研究で得られた細胞は毛髪細胞に変化したときのみレポーター遺伝子が発現するため、毛髪分化を加速もしくは抑制する因子のスクリーニング細胞として有用なものと考えられる。もちろん、ここで考案したシステム

は極めて単純なアイデアをベースにしたものであり、用いたプロモーターを他の目的細胞特異的タンパク質のものに換えることで毛髪以外の表皮由来細胞への分化プロセスも容易に定量追跡できるはずである。ただし、これまで発毛活性が認められてきた WNT5a には毛髪分化誘導能は検出されず、また、同様の活性が指摘されている Shh<sup>5-7)</sup> にも明らかな活性は認められなかった(データ示さず)。一方で、WNT5a には表皮前駆細胞から毛包細胞への分化を促すことが確認され、これらの因子群のもつ発毛誘導活性は毛髪を生み出すことによるのではなく、毛髪細胞の支持細胞を生み出すことによる間接的なものである可能性もある。

本研究では、表皮前駆細胞の状態で安定的に維持することができないことが確認された。この、表皮前駆細胞の自然分化を引き起こす原因としては培養液中のカルシウム濃度が適切でなかった可能性がある。一般的に、未分化な表皮細胞は低カルシウムの培養液(0.15mM以下)で維持され、高濃度のカルシウムイオン存在下(1mM以上)では自然に分化してしまうことが知られている<sup>8)</sup>。本研究で使用している iPS 細胞はカルシウム濃度の低い初代表皮細胞用培地中では生存できず、約 1mM のカルシウムイオンを含んだ培地を用いて培養を行った。将来的には、分化誘導のあるタイミングで低カルシウムの培養液に交換することが有効である可能性がある。

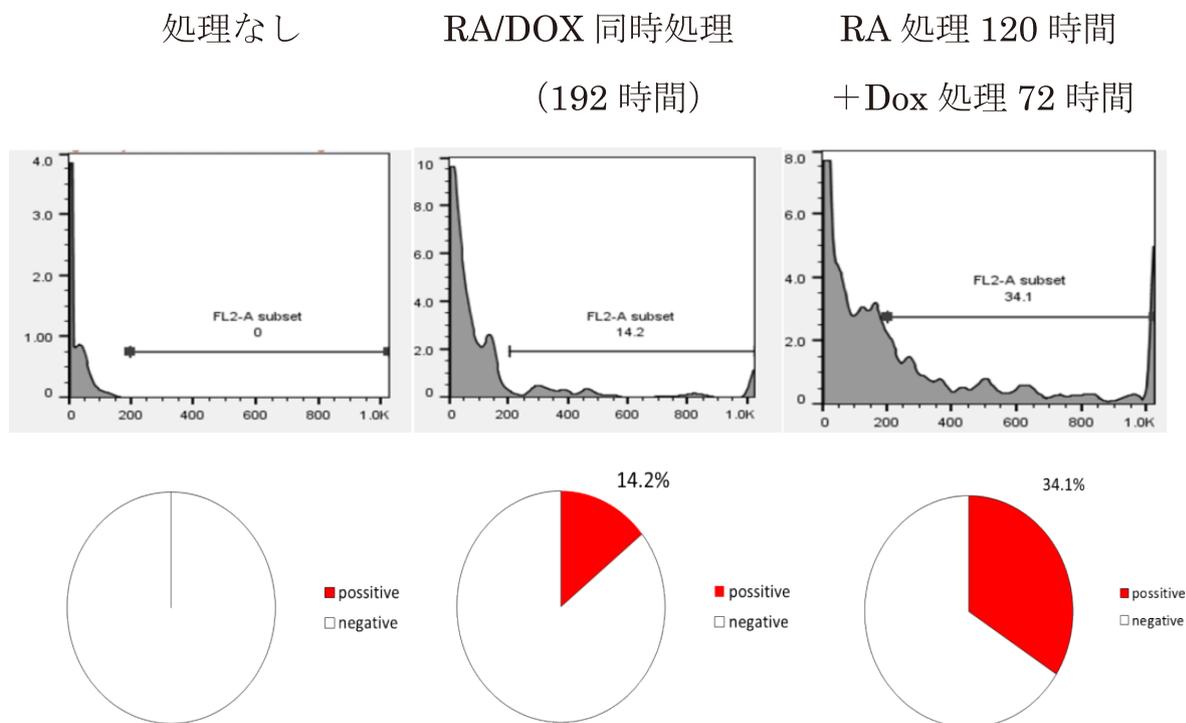


図6 RA, Doxの処理条件の最適化 KRT14陽性細胞のFACS解析(上)とそれをグラフ化したもの(下) RAによる外胚葉分化処理を120時間行った後、Doxを72h処理したものは、RA/DOX72h処理に比べてKRT14陽性細胞の割合が増加した。

## 5. 総括

本研究で示した Tet-BMP4-KRT31-Luc-iPS細胞は、通常のiPS細胞として安定して増殖、維持できるだけでなく、RA（120時間）とDox（72時間）で前処理することで、毛髪への分化誘導に応答してルシフェラーゼを発現するため、簡便で優れた発毛剤のスクリーニング系に利用できると思われる。

### 謝辞

本研究は大学院生の城戸拓巳君が中心となって行ったものであり、数理モデルの構築は関西学院大学の吉野公三准教授の助言を受けました。ここに感謝いたします。

### (引用文献)

- 1) Veraitch O, Kobayashi T, Fau-Imaizumi Y, Imaizumi Y, Fau-Akamatsu W, Akamatsu W, Fau-Sasaki T, Sasaki T, Fau-Yamanaka S, Yamanaka S, Fau-Amagai M, et al.: Human induced pluripotent stem cell-derived ectodermal precursor cells contribute to hair follicle morphogenesis in vivo.
- 2) Randolph LN, Bao X, Zhou C, Lian X: An all-in-one, Tet-On 3G inducible PiggyBac system for human pluripotent stem cells and derivatives. *Scientific reports* 7: 1549, 2017.
- 3) Enshell-Seijffers D, Lindon C, Kashiwagi M, Morgan BA: beta-catenin activity in the dermal papilla regulates morphogenesis and regeneration of hair. *Developmental cell* 18: 633-642, 2010.
- 4) Rendl M, Polak L, Fuchs E: BMP signaling in dermal papilla cells is required for their hair follicle-inductive properties. *Genes & development* 22: 543-557, 2008.
- 5) Reddy S, Andl T, Bagasra A, Lu MM, Epstein DJ, Morrisey EE, et al.: Characterization of Wnt gene expression in developing and postnatal hair follicles and identification of Wnt5a as a target of Sonic hedgehog in hair follicle morphogenesis. *Mechanisms of development* 107: 69-82, 2001.
- 6) Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, Cotsarelis G, Birchmeier W: beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell* 105: 533-545, 2001.
- 7) Telerman SB, Rognoni E, Sequeira I, Pisco AO, Lichtenberger BM, Culley OJ, et al.: Dermal Blimp1 Acts Downstream of Epidermal TGFbeta and Wnt/beta-Catenin to Regulate Hair Follicle Formation and Growth. *J Invest Dermatol* 137: 2270-2281, 2017.
- 8) Elsholz F, Harteneck C, Muller W, Friedland K: Calcium--a central regulator of keratinocyte differentiation in health and disease. *European journal of dermatology* : EJD 24: 650-661, 2014.

