



皮膚毛包幹細胞による再生医療の可能性

はじめに

皮膚毛包には毛包再生を司る幹細胞が存在すると古くから考えられていた¹⁾。筆者らは、毛包の毛隆起（バルジ領域）に分布する毛包幹細胞がネスチンを強く発現しており、多分化能を持つことを明らかにした²⁻⁴⁾。ネスチンはクラスVIの中間径フィラメントで、神経領域では神経幹細胞の最も重要なマーカーとして注目されている。毛包幹細胞は幹細胞培養液を用いて分離することが可能で、培養液を血清含有RPMI1640培養液へ変えると神経細胞、グリア細胞、ケラチノサイト、平滑筋細胞、メラノサイトに分化する。毛包幹細胞は他臓器の成体組織幹細胞と比較して、皮膚という最も扱いやすい部位に分布している。さらに、神経障害や皮膚欠損を持つ患者本人の皮膚毛包から採取した自己幹細胞を直接病変部へ使用できるため、ES細胞で大きな問題となっている倫理面や拒絶反応の問題がない。筆者らは、毛包幹細胞の組織再生能を明らかにするため、移植後も緑色蛍光タンパク質（green fluorescent protein (GFP)）の発現が安定しているグリーンマウス（ β -アクチンのプロモーターを用いてGFPを全身の細胞に発現させたトランスジェニックマウス）の髭毛包からネスチンを発現する毛包幹細胞を分離し、移植実験に用いた。グリーンマウスから分離した毛包幹細胞は多分化能を有しており、切断した坐骨神経や脛骨神経間へ移植したところ、この毛包幹細胞は主にグリア細胞に分化し、シュワン細胞となって既存の神経軸索の伸長を促し、末梢有髄神経を再生した⁵⁾。毛包幹細胞を用いた再生医療は、他の成体幹細胞と比較して患者からの採取の危険が少なく、最近注目されているウイルスによる遺伝子導入を用いた幹細胞（Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Mycの4因子のレトロウイルスによる導入によって作成

される誘導多能性幹（induced pluripotent stem (iPS)）細胞）の作成で重大な問題となるウイルスの宿主への感染や遺伝子異常に伴う腫瘍化の危険性も少ないことから臨床に応用しやすい。本稿では、毛包幹細胞による移植再生医療の臨床応用の可能性について考えてみたい。

1. 皮膚毛包の多分化能を有する幹細胞の分離

これまで、皮膚毛包幹細胞は³Hチミジンやプロモデオキシウリジンを繰り返し投与することによって標識される分裂の遅い細胞であり、この細胞群は皮膚毛包の毛隆起（バルジ領域）に分布し、ケラチノサイト系の細胞に分化して毛包を形成すると考えられていた¹⁾。皮膚における多分化能を有する幹細胞の存在に初めて気づいたのはTomaら⁶⁾で、彼らは神経細胞、グリア細胞、平滑筋細胞、脂腺細胞に分化し得る、マウス皮膚真皮に分布する幹細胞の存在を明らかにした。その後、Fernandesら⁷⁾やSieber-Blumら⁸⁾は毛包毛隆起や毛乳頭に分布する神経堤由来の細胞が多分化能を有することから、これらの部位に幹細胞が分布しているのではないかと考えた。しかし何れの実験系においても、皮膚における正確な幹細胞の分布は明らかにされていない。

筆者らは、ネスチン遺伝子のプロモーターと第2イントロンの間にGFPを組み込んだトランスジェニックマウス（ネスチン-GFP-Tgマウス）を用いて、皮膚毛包の幹細胞がネスチンを強く発現していることを発見した²⁻⁴⁾。ネスチンはクラスVIの中間径フィラメントで、中脳などの中枢神経の神経幹細胞に強く発現していることから、神経幹細胞の重要なマーカーとして注目されている。近年、中脳由来、ネスチン陽性の神経幹細胞が神経系の再生に重要な役割を果たすことが明らかにされた。中枢神経由来、ネスチン陽性の神経幹細胞はドーパミンを産生する神経細胞にも分化することができ、パーキンソン病のモデルラットの線条体へ移植を行ったところ、病状の改善が認められている。

筆者らは、脂腺直下、毛隆起直上に分布する毛包幹細胞とそれに連結する真皮血管網にネスチンが強く発現しており、毛周期に伴って血管新生を誘導し、毛包再生に重要な役割を果たしていることを明らかにした³⁾。毛包幹細胞が分布する脂腺直下、毛隆起（バルジ領域）直上の領域は毛包幹細胞領域（multipotent hair follicle stem cell area (MHFSCA)）であり、今まで考えられてきた毛隆起（バルジ領域）はケラチノサイト前駆細胞が分布する領域であると考えられた（図1）。我々は初めて毛包における毛包幹細胞の正確な分布と、毛包幹細胞による強力な血管新生

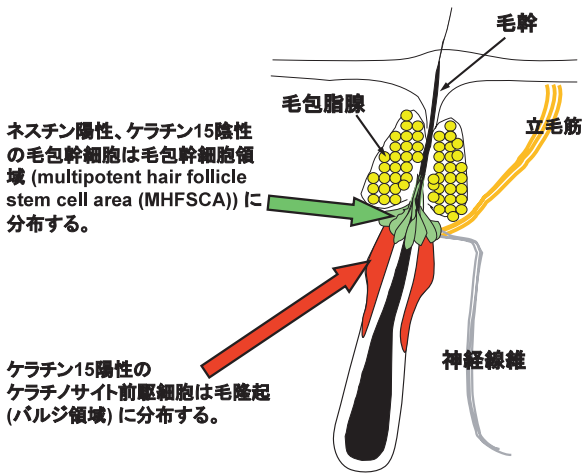


図1 毛包幹細胞領域 (MHFSCA) に分布する毛包幹細胞
 ネスチン陽性、ケラチン15陰性の毛包幹細胞は毛包幹細胞領域 (MHFSCA) に分布する (緑矢印で示す領域)。ケラチン15陽性のケラチノサイト前駆細胞は毛隆起 (バルジ領域) に分布する (赤矢印で示す領域)。

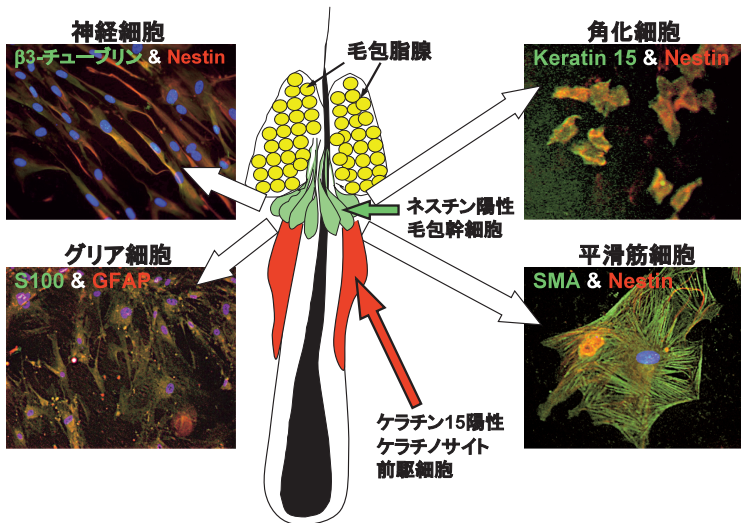
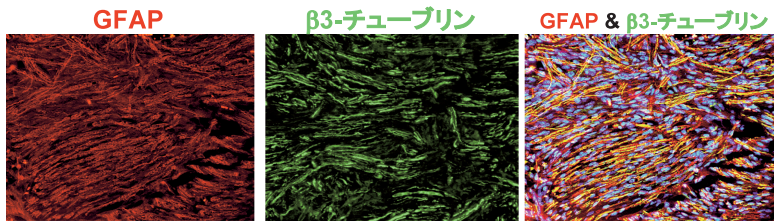


図2 毛包幹細胞の多分化能
 ヒト頭部皮膚から分離した毛包幹細胞は、β3-チューブリンを発現する神経細胞、S100とGFAPを発現するアストロサイト、ケラチン15を発現するケラチノサイト、SMAを発現する平滑筋細胞などに分化する。

ヒト頭部皮膚由来毛包幹細胞を切断した坐骨神経間に移植



毛包幹細胞を移植しなかったもの

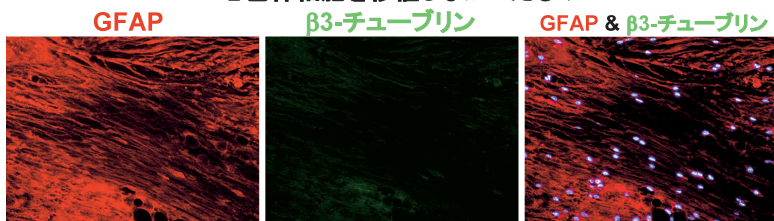


図3 毛包幹細胞を用いた末梢神経損傷部の再生
 ヒト頭部皮膚から分離した毛包幹細胞を切断した坐骨神経間に移植して8週間後、毛包幹細胞によって接合した坐骨神経の切片を染色した。移植群では毛包幹細胞由来のシュワン細胞が増殖して既存軸索の再生が認められる。一方、移植しなかった群ではグリア瘢痕を形成して軸索の再生がほとんど認められない。

の制御の仕組みが明らかにした^{3,9)}。ネスチンを発現する毛包幹細胞は、生体内では毛包や表皮の再生の他に、真皮血管網を毛周期に応じて制御している^{3,9)}。さらに我々は毛包幹細胞の多分化能を明らかにするため、ネスチン-GFP-Tgマウスの髭毛包と背部皮膚の毛包からネスチン-GFPを発現する毛包幹細胞の分離培養を行った⁴⁾。ネスチン-GFPを発現する毛包幹細胞を神経幹細胞培養液（無血清培養用サプリメント B-27 を含有するダルベッコ修正イーグル培地と F12 培地の合成培養液（DMEM/F12, 混合比 1:1）に遺伝子組換え塩基性線維芽細胞増殖因子（basic fibroblast growth factor (bFGF)）を 2 日おきに加えたもの）で 4 週間培養するとコロニーを形成し、血清含有 RPMI1640 培養液に交換すると神経細胞、グリア細胞（アストロサイト、オリゴデンドロサイト）、ケラチノサイト、平滑筋細胞、メラノサイトに分化した^{4,5)}。毛包幹細胞は毛包周囲組織を再生する能力を有しており、損傷した毛包や周囲の皮膚の再生ではケラチノサイトやメラノサイトに分化し、毛の感覚器官としての機能維持には、毛包を支配する神経の再生のため神経細胞やグリア細胞へ、立毛筋や栄養血管の周皮細胞を再生するため平滑筋細胞へ分化する能力を持つと考えられる。

2. 毛包幹細胞の分布と毛包形成における役割

マウスの髭毛包や背部皮膚毛包の MHFSCA に分布するネスチン-GFP を発現する毛包幹細胞は CD34 陽性、ケラチン 15 陰性である。一方、毛隆起（バルジ領域）に分布するケラチノサイト前駆細胞は CD34 陰性、ケラチン 15 陽性である。さらに外毛根鞘の外側には、毛包幹細胞と同様にネスチン-GFP を発現し、CD34 陽性、ケラチン 15 陰性の細胞が、外毛根鞘を一層で取り囲むように分布している。

Morris ら¹⁰⁾や Blanpain ら¹¹⁾は、fluorescence-activated cell sorter (FACS) で分離した CD34 強陽性の細胞をマウス皮膚へ移植し、毛包や毛包脂腺への分化を確認している。これらの実験も、毛包の CD34 の発現が保たれている細胞が、毛包を形成する能力を持つことを示している。Morris らの実験ではケラチン 15 を発現するケラチノサイトを GFP で標識して分離、（分離した 90% 以上の細胞が CD34 を発現している。）マウス皮膚へ移植し、毛包、毛包脂腺、毛包周囲の表皮への分化を確認している¹⁰⁾。毛包幹細胞から分化し、ケラチン 15 を発現し始めたケラチノサイト前駆細胞（多くの細胞は、まだ CD34 の発現も保っている。）は毛包や毛包脂腺を形成する能力を持つが、神経細胞、グ

リア細胞、平滑筋細胞やメラノサイトに分化する能力をすでに失っていると考えられる。最近、毛隆起（バルジ領域）に分布するケラチン 15 を発現するケラチノサイト前駆細胞は、創傷治癒における表皮再生において重要な役割を果たすことが明らかにされている¹²⁾。

3. 毛包幹細胞による末梢神経や中枢神経の再生

筆者らは毛包幹細胞を神経損傷部へ移植した場合の組織再生能を明らかにするため、グリーンマウスから毛包幹細胞の分離を行った。グリーンマウスの MHFSCA から分離した毛包幹細胞を、同系マウスの切断した坐骨、脛骨神経間へ移植したところ、坐骨、脛骨神経を再生することを確認した⁵⁾。毛包幹細胞は主に glial fibrillary acidic protein (GFAP) と 2'-3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CN-Pase) の双方に陽性のミエリン鞘を有するシュワン細胞として既存の軸索を支持するように増殖していた。坐骨神経切断部へ毛包幹細胞を移植して 4 週間後には、接合部上流への電気刺激による腓腹筋収縮能が回復した。腓腹筋収縮は、接合部をテトロドトキシン溶解液に浸すことでブロックされた。坐骨神経切断部に毛包幹細胞を移植しなかったものや、坐骨神経切断部へグリーンマウスの坐骨神経から培養したグリア細胞を移植したものでは GFP を発現する細胞はほとんど増殖せず、腓腹筋収縮能の回復もわずかであった。さらに毛包幹細胞を切断した脛骨神経間へ移植することによって、足跡の形状（print length factor, intermediate toe spread factor）は、毛包幹細胞を移植しないものと比較して有意に改善した。毛包幹細胞は神経軸索を包むミエリン鞘を有するシュワン細胞に分化して増殖し、既存の神経軸索の再生を誘導して、末梢有髄神経の再生を促進したと考えられた⁵⁾。本手法を用いた毛包幹細胞の移植は末梢神経再生医療に有用と思われる。

毛包幹細胞による中枢神経再生の動物モデルとしては、Sieber-Blum ら¹³⁾が神経堤を起源とし多分化能を有するマウス由来の毛包幹細胞を脊髄損傷部へ移植したところ、脊髄損傷部で GABA 産生神経細胞に分化し、ミエリン鞘の再生も促進したと報告している。我々もネスチンを発現する毛包幹細胞を脊髄損傷部へ移植したところ、機能改善はわずかであるものの、移植した毛包幹細胞はグリア細胞となって脊髄損傷部の再生を助けることを確認している。最近、Biernaskie ら¹⁴⁾も同様に皮膚由来の幹細胞（その本体は我々が分離に成功した毛包幹細胞であることを我々は確認している。）を脊髄損傷部に移植すると脊髄機能の改善がみられることを報告している。毛包幹細胞の分化の程度

や移植部の環境を調整して、より効率よく毛包幹細胞により中枢神経の再生が促進される手技の確立が期待される。

4. ヒト頭部毛包における毛包幹細胞の分布と再生医療への応用の可能性

我々は、マウスと同様にヒト頭部皮膚由来毛包幹細胞においてもネスチン陽性、ケラチン 15 陰性の毛包幹細胞はMHFSCAに分布し、ケラチン 15 陽性のケラチノサイト前駆細胞は毛隆起（バルジ領域）に分布することを明らかにした（図1）。Yuら¹⁵⁾はネスチン、ES細胞の転写因子であるNanogとOct-4を発現しているヒト頭部毛包幹細胞を分離することに成功した。ヒト頭部毛包幹細胞は、筆者らの開発したネスチンを発現する毛包幹細胞の分離法と同じ手法を用いて幹細胞培養液で培養するとコロニーを形成して増殖し、分化誘導後に神経細胞、平滑筋細胞、メラノサイトに分化した¹⁵⁾。我々もヒト頭部毛包のMHFSCAから分離した毛包幹細胞が、β3-チューブリンを発現する神経細胞、S100とGFAPを発現するアストロサイト、ケラチン15を発現するケラチノサイト、平滑筋アクチン（smooth muscle actin; SMA）を発現する平滑筋細胞などに分化することを明らかにした（図2）。さらに我々は多分化能を有するヒト頭部皮膚由来毛包幹細胞をヌードマウスの切断した坐骨神経間に移植したところ、移植しないものがグリア瘢痕となって軸索がほとんど再生しないのに対して、有意に損傷部の軸索の再生が促進されることを確認した（図3）。今回の我々の研究成果から、ヒト頭部毛包幹細胞が損傷皮膚や末梢神経の再生医療に有用である可能性が示唆された。

おわりに

皮膚毛包の幹細胞は、皮膚という採取の危険が少ない部位から幹細胞を取り出すことができる。さらに、毛包幹細胞を用いた再生医療は、再生医療を希望する患者の頭部などの毛包を含む皮膚から分離した毛包由来自己幹細胞を病変部に移植できることから、ES細胞のような倫理面の縛りを受けず、拒絶反応も起こらない、ウイルスを用いた遺伝子導入による幹細胞の作製で重大な問題となるウイルス感染や腫瘍化の危険性も少ないことから、毛包幹細胞は、末梢神経、脊髄、皮膚損傷部の修復において臨床応用しやすい。今後、臨床応用にむけた更なる研究が進むことが期待される。

本研究の一部は、2007年日本研究皮膚科学会フェロー

シップ資生堂賞によって行われた。

- 1) Cotsarelis, G., Sun, T., & Lavker, R.M. (1990) *Cell*, 61, 1329-1337.
- 2) Li, L., Mignone, J., Yang, M., Matic, M., Penman, S., Enikolopov, G., & Hoffman, R.M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 9958-9961.
- 3) Amoh, Y., Li, L., Yang, M., Moossa, A.R., Katsuoka, K., Penman, S., & Hoffman, R.M. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 13291-13295.
- 4) Amoh, Y., Li, L., Yang, M., Moossa, A.R., Katsuoka, K., Penman, S., & Hoffman, R.M. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 5530-5534.
- 5) Amoh, Y., Li, L., Campillo, R., Kawahara, K., Katsuoka, K., Penman, S., & Hoffman, R. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 17734-17738.
- 6) Toma, J.G., Akhavan, M., Fernandes, K.J., Barnabé-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D.R., & Miller, F.D. (2001) *Nat. Cell. Biol.*, 3, 778-784.
- 7) Fernandes, K.J., McKenzie, I.A., Mill, P., Smith, K.M., Akhavan, M., Barnabé-Heider, F., Biernaskie, J., Junek, A., Kobayashi, N.R., Toma, J.G., Kaplan, D.R., Labosky, P.A., Rafuse, V., Hui, C.C., & Miller, F.D. (2004) *Nat. Cell. Biol.*, 6, 1082-1093.
- 8) Sieber-Blum, M., Grim, M., Hu, Y.F., & Szeder, V. (2004) *Dev. Dyn.*, 231, 258-269.
- 9) Amoh, Y., Li, L., Katsuoka, K., & Hoffman, R.M., (2007) *J. Invest. Dermatol.*, 127, 11-15.
- 10) Morris, R.J., Liu, Y., Marles, L., Yang, Z., Trempus, C., Li, S., Lin, J.S., Sawicki, J.A., & Cotsarelis, G. (2004) *Nat. Biotechnol.*, 22, 411-417.
- 11) Blanpain, C., Lowry, W.E., Geoghegan, A., Polak, L., & Fuchs, E. (2004) *Cell*, 118, 635-648.
- 12) Ito, M., Yang, Z., Andl, T., Cui, C., Kim, N., Millar, S.E., & Cotsarelis, G. (2007) *Nature*, 447, 316-320.
- 13) Sieber-Blum, M., Schnell, L., Grim, M., Hu, Y.F., Schneider, R., & Schwab, M.E. (2006) *Mol. Cell. Neurosci.*, 32, 67-81.
- 14) Biernaskie, J., Sparling, J.S., Liu, J., Shannon, C.P., Plemel, J. R., Xie, Y., Miller, F.D., & Tetzlaff, W. (2007) *J. Neuroscience*, 27, 9545-9559.
- 15) Yu, H., Fang, D., Kumar, S.M., Li, L., Nguyen, T.K., Acs, G., Herlyn, M., & Xu, X. (2006) *Am. J. Pathol.*, 168, 1879-1888.

天羽 康之, 勝岡 憲生
(北里大学医学部皮膚科学)

Strong possibility of regenerative medicine by hair follicle stem cells

Yasuyuki Amoh and Kensei Katsuoka (Department of Dermatology, Kitasato University School of Medicine, 1-15-1 Kitasato, Sagamihara, Kanagawa 228-8555, Japan)