

80. 遺伝子導入を伴わない毛乳頭細胞のリプログラミング

西江 渉

*北海道大学病院 皮膚科

Key words : ラミニン 511, インテグリン $\beta 1$, 組織幹細胞

緒 言

皮膚の毛包の毛球部に存在する毛乳頭細胞 (dermal papilla cells, DP 細胞) は、Sox2、Klf4、c-Myc、ALP を内因性に発現する特殊な組織幹細胞であり、*Oct3/4* のみ遺伝子導入すると初期化可能であることが報告されている¹⁾。近年、遺伝子導入せず化合物等を用い初期化する試みが報告されているが、DP 細胞を用いると初期化の可能性が高まるのではないかと予想される。しかし DP 細胞を一旦培養系で維持すると、組織幹細胞としての特性を急速に失ってしまうという点が解決すべき課題である。本研究では、遺伝子細胞を伴わない DP 細胞の初期化を目指し、組織幹細胞としての特性を維持可能な DP 細胞の培養法の確立を試みた。最初に、生体内で DP 細胞が置かれる環境に着目し、ECM タンパクとしてラミニン 511 上で幹細胞培地を用い培養することで、組織幹細胞としての特徴を維持した状態で増殖可能であることを明らかにした。次に培地へ FGF-2 や BMP4、ルテオリンを添加することで、遺伝子導入を伴わずに *Oct3/4*、*Nanog* 発現量が増加することを確認した。

方法および結果

1. ラミニン 511 による DP 細胞の増殖効果

毛乳頭に存在する DP 細胞は、ALP を発現する特殊な組織幹細胞である (図 1A)。初代 DP 細胞 (C-12071, PromoCell) を *in vitro* で培養すると、継代に伴い ALP 発現陽性細胞数は減少し、10 継代 (P10) では ALP 陽性細胞数は 10% 未満へ低下した (図 1B)。この結果は、一般的に DP 細胞に使用される培地 (DMEM, 10% FCS, FGF-2)、DP 細胞に特に有用とされる培地 (AmniomaxC-100) いずれも同様だった。一方、幹細胞培地 (MEF-CM) を用いると、ALP 陰性細胞の増殖は抑制され、ALP 陽性細胞が比較的高率に維持された。しかし DP 細胞の増殖は緩徐であった (図 1C)。そこで、ヒト毛乳頭部にはラミニン 511 発現が多く (図 1D) 豊富な細胞外基質 (ECM) 中に DP 細胞が存在する点に着目し、ラミニン 511 コーティング上で幹細胞培地を用い培養したところ、良好な増殖を認めた (図 1E、F)。以上の結果から、ラミニン 511 上で幹細胞培地を用いると ALP 陽性の DP 細胞を効率よく培養可能であることが判明した。

*現所属：北海道大学 大学院医学研究院 皮膚科

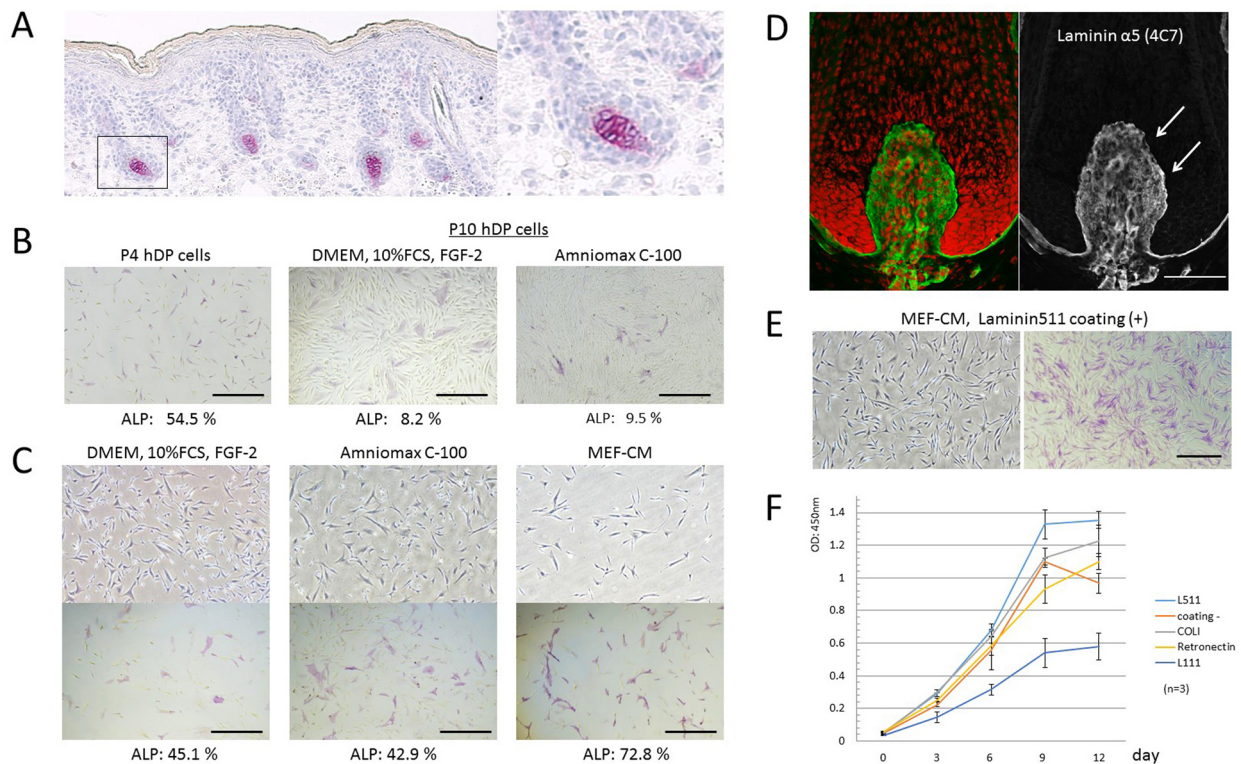


図 1. ラミニン 511 による DP 細胞の増殖効果

(A) マウス皮膚組織における DP 細胞 (紫: ALP 陽性細胞)。(B) 継代に伴い ALP 発現 (紫) 陽性細胞数は減少する。(C) 異なる培地で 4 日間培養した P4 の DP 細胞。幹細胞培地 (MEF-CM) では高い ALP 発現を維持しているが増殖は乏しい。(D) ヒト毛乳頭部におけるラミニン 511 の発現 (矢印、抗ラミニン $\alpha 5$ 鎖抗体を用いた染色)。(E) 幹細胞培地を用い、ラミニン 511 コーティング上で培養した DP 細胞。ALP 陽性細胞が増殖している。(F) 幹細胞培地を用い各種コーティング基質上で培養した DP 細胞の増殖。ラミニン 511 (L511) 上で培養した細胞が最も増殖能が高い。スケールバー: $200 \mu\text{m}$ (B, C, E)、 $80 \mu\text{m}$ (D)。

2. ラミニン 511 による DP 細胞の増殖機序

幹細胞培地を用いラミニン 511 上で培養した DP 細胞を蛍光体法で免疫染色すると、活性型 $\beta 1$ インテグリン、リン酸化 FAK (p-Y397)、Vinculin の発現が亢進していた (図 2A)。活性型 $\beta 1$ インテグリンはラミニン 511 と結合後、FAK、AKT のリン酸化シグナル伝達経路を介し細胞増殖を来することが知られている。そこで各種 ECM タンパク上で DP 細胞を培養し解析したところ、ラミニン 511 上で培養した DP 細胞細胞では、レトロネクチンや I 型コラーゲン上で培養した際に比べ、リン酸化 FAK (p-Y397) と AKT (p-S472) の増加を認めた (図 2B)。次に、 $\beta 1$ インテグリンとラミニン 511 の結合程度を明らかにする目的で、抗 $\beta 1$ インテグリン機能阻害抗体を用い、DP 細胞と基質との結合能を評価した。その結果、レトロネクチンおよび I 型コラーゲンと $\beta 1$ インテグリンとの結合は機能阻害抗体でブロックされたが、ラミニン 511 との結合は抗 $\beta 1$ インテグリン機能阻害抗体では阻害されなかった (図 2C)。同様に、siRNA を用い DP 細胞での $\beta 1$ インテグリンをノックダウンしても、ラミニン 511 との接合は阻害されなかった (提示せず)。これらの結果から、DP 細胞とラミニン 511 との結合は $\beta 1$ インテグリン以外の分子も関与している可能性が推測された。その他の可能性として、ラミニン 511 と $\beta 1$ インテグリンの結合が機能阻害抗体や siRNA を用いたノックダウンではブロックできないほど強固である可能性が予想された。

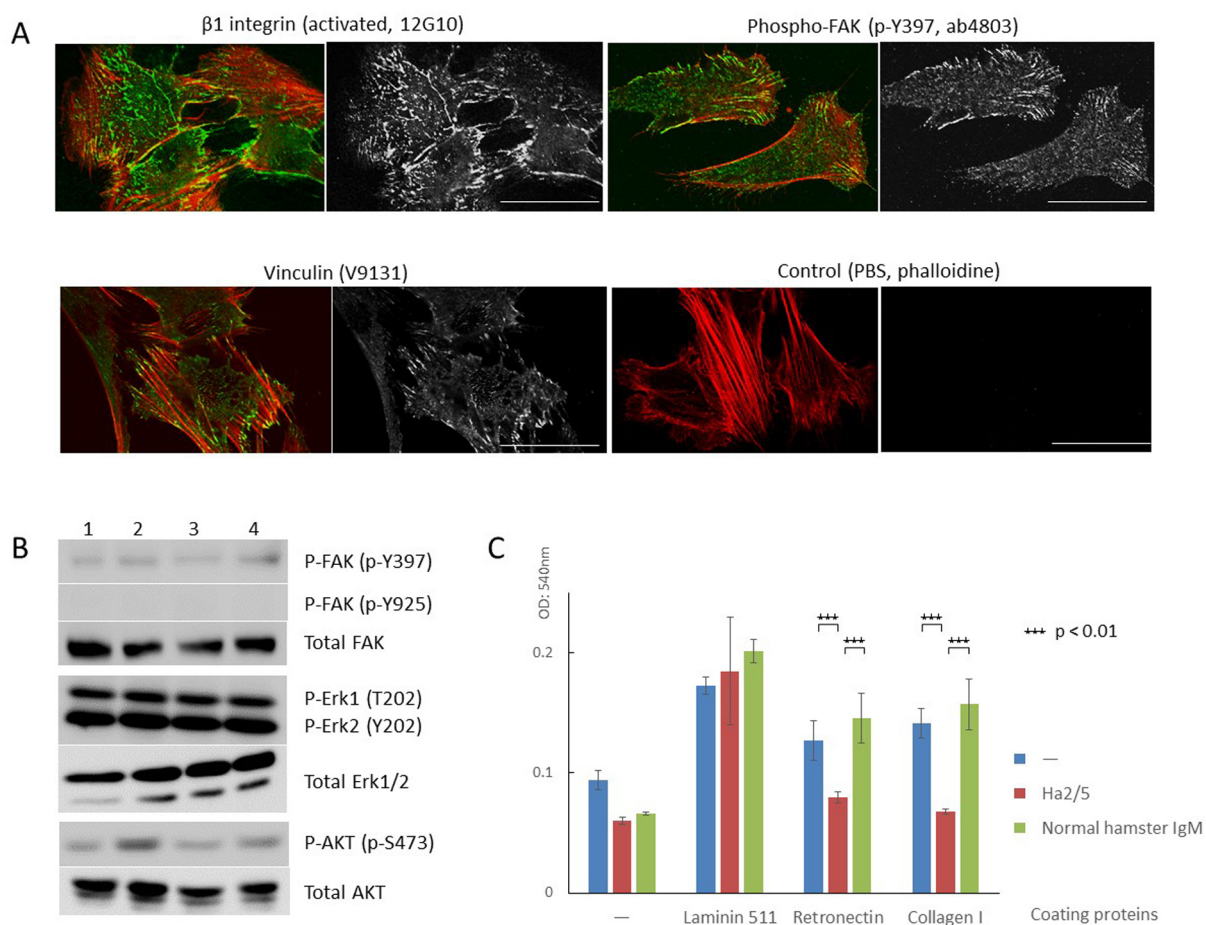


図2. ラミニン 511 上で培養した DP 細胞の $\beta 1$ インテグリンと関連シグナル分子の発現

(A) ラミニン 511 上で幹細胞培地を用い培養した DP 細胞。活性型 $\beta 1$ インテグリン、リン酸化 FAK (p-Y397)、Vinculin が発現している。(B) FAK (p-Y397) と AKT (p-S472) のリン酸化を認める。レーン 1 : コーティング無し、2 : ラミニン 511、3 : レトロネクチン、4 : I 型コラーゲン。(C) 抗 $\beta 1$ インテグリン機能阻害抗体 (Ha2/5) を用いた細胞接着競合。レトロネクチンと I 型コラーゲン上では DP 細胞は $\beta 1$ インテグリンを介し細胞接着していることが解るが、ラミニン 511 上では機能阻害抗体では細胞接着は阻害されない。

3. *In vivo* における培養 DP 細胞による毛包誘導能の評価

次に培養した DP 細胞が組織幹細胞としての機能を維持していることを確認する目的で、CellTracker (CM-Dil, Molecular Probes) を用い赤色蛍光標識した 2×10^5 の DP 細胞を (図 3A)、 2×10^6 の新生仔マウス表皮基底細胞と共に免疫不全マウス皮下へ移植した。移植 2 週後に観察したところ、投与マウス皮下において多数の新生毛を認めた (図 3B)。移植部を病理組織学的に観察したところ、毛乳頭部に一致して赤色蛍光を認め、培養 DP 細胞が実際に *in vivo* 皮下で新規毛包を誘導可能であることを確認した (図 3C)。

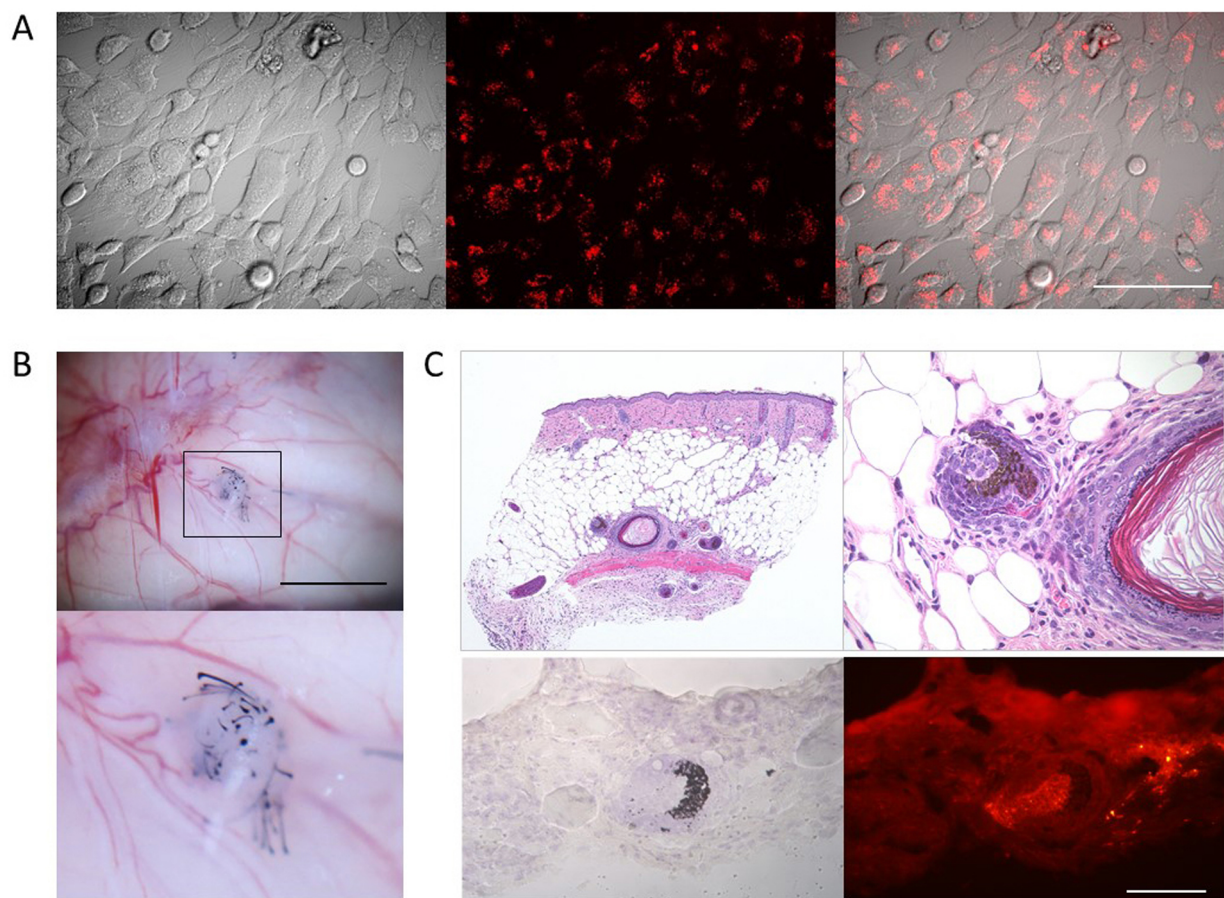


図 3. *In vivo* 皮下における培養 DP 細胞の発毛能

(A) CellTracker (CM-Dil, Molecular Probes) を用い赤色蛍光標識した培養 DP 細胞。スケールバー：100 μ m、(B) 新生仔マウス表皮基底細胞と赤色標識した DP 細胞を混合し免疫不全マウス皮下へ移植 2 週後、多数発毛を認める。スケールバー：400 μ m。(C) 移植した細胞の組織学所見。毛乳頭部に一致して赤色蛍光を認める。スケールバー：100 μ m。

4. 遺伝子導入を用いない DP 細胞リプログラミングの試み

組織幹細胞としての機能を維持可能な DP 細胞の培養条件を用い、遺伝子導入を用いないリプログラミングを試みた。ラミニン 511 コーティング上で FGF-2 に加え、歯根膜細胞において Oct3/4 発現を増強することが知られている BMP4 [2\)](#)、ルテオリン [3\)](#) を含む幹細胞培地 (MEF-CM) で DP 細胞を培養し、各種幹細胞マーカーの RNA 発現量を解析した (Human Pluripotent Stem Cell Assessment Primer Pair Panel Kit, R&D)。その結果、MEF-CM では DMEM を用いた通常の培養条件 (DMEM) に比較し、Nanog や Oct3/4 発現の増加を認めた。形態学的には明らかな幹細胞様のコロニーは生じなかった。

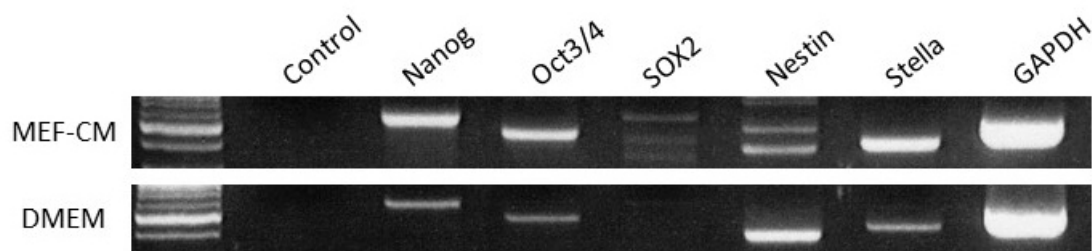


図 4. DP 細胞における幹細胞マーカーの発現

ラミニン 511 コーティング上で FGF-2、BMP4、ルテオリンを含む幹細胞培地で DP 細胞を培養すると（MEF-CM）、DMEM を用いた通常の培養条件（DMEM）に比較し、Nanog や Oct3/4 の発現が増加している。

考 察

皮膚の毛包の毛球部に存在する DP 細胞は、山中 4 因子のなかで Oct3/4 のみ発現を欠く特殊な組織幹細胞である。従って、Oct3/4 のみ発現誘導させることでリプログラミング可能であり¹⁾、近年、研究が進められている遺伝子導入を用いない初期化の試みに有用と考えられる。しかし DP 細胞を一旦培養系で維持すると、組織幹細胞としての特性を急速に失ってしまうため、遺伝子導入を用いない初期化へ応用するためには、組織幹細胞としての特性を維持可能な培養手法の確立が必須である。本研究では、最初に生体内で DP 細胞が置かれる環境に着目し、ラミニン 511 上で幹細胞培地を用い培地することで、組織幹細胞としての特性を維持可能であることを明らかにした。次に、特定の細胞で Oct3/4 等の幹細胞マーカー発現を増加することが知られている BMP4 やルテオリンを添加すると、5 回継代した DP 細胞の Oct3/4、Nanog 発現量が増加することを確認した。今回の検討では、iPS 細胞に類似したコロニーの出現には至らなかったが、今後、培養条件を更に最適化し、遺伝子導入を伴わない DP 細胞のリプログラミングを目指していきたい。

共同研究者

本研究の共同研究者は、北海道大学大学院医学研究院の清水宏、国立成育医療研究センター再生医療センター生殖医療研究部の阿久津英憲である。阿久津先生には、今後、リプログラミングに成功した際、幹細胞としての評価を頂く予定です。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文 献

- 1) Tsai SY, Bouwman BA, Ang YS, Kim SJ, Lee DF, Lemischka IR, Rendl M. Single transcription factor reprogramming of hair follicle dermal papilla cells to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2011;29(6): 964-71. doi: 10.1002/stem.649. PMID: 21563278
- 2) Liu LI, Wei X, Huang R, Ling J, Wu L, Xiao Y. Effect of bone morphogenetic protein-4 on the expression of Sox2, Oct-4, and c-Myc in human periodontal ligament cells during long-term culture. *Stem Cells Dev*. 2013;22(11):1670-7. doi: 10.1089/scd.2012.0548. PMID: 23311397
- 3) Liu L, Peng Z, Huang H, Xu Z, Wei X. Luteolin and apigenin activate the Oct-4/Sox2 signal via NFATc1 in human periodontal ligament cells. *Cell Biol Int*. 2016;40(10):1094-106. doi: 10.1002/cbin.10648. PMID:27449921