

コラーゲンの高機能化や、コラーゲン以外のタンパク質生産の可能性についても実証することができた。これらフェーズ II までの成果をもとに、フェーズ III では本格的な実用化の研究を進める。全長コラーゲンや熱安定性コラーゲンの生産、生産量向上化など残された基礎的研究課題は、知的クラスター創成事業の中で継続すると共に、ベンチャー企業（名称 マトリフェニックス）を立ち上げ事業化の準備を推進する。

2-3．発毛因子の探索 /毛髪再生療法の開発

皮膚の付属器官である毛髪は、皮膚が分化したものであり、胎児期において表皮細胞と真皮（間充織）細胞との相互作用によって形成された毛包から産生される。毛包は、形態的に見分けられる数種の組織から構成され、毛髪を包む鞘のようなものである。毛髪は、毛包基部に存在する毛母細胞が盛んに増殖することにより、表層へ向けて押し上げられるように伸長する。上皮組織である毛母に覆われるように存在する、毛乳頭（パピラ）と呼ばれる間充織組織は、毛包組織の分化・成長や毛周期の進行に重要な働きを持っていると考えられている。我々はこれまでに、ラット頬髭パピラ細胞の毛包誘導能を失うことなく、活発に増殖させるパピラ細胞の長期継代培養法を確立した。パピラ細胞に由来する毛包誘導因子の実体を明らかにするために、この因子の活性を検出するアッセイ法の開発を行った。

毛包誘導能を確認できる *in vivo* アッセイ法として、ラット足裏皮膚の表皮真皮間隙にパピラ細胞を挿入し、ヌードマウス背部に移植する方法を開発した。アッセイ結果の判定をより確実にするために、蛍光色素を用いた核染色により宿主（マウス）組織と移植組織片（ラット）を区別する方法を導入した。さらに、パピラ細胞を蛍光色素標識して足裏皮膚に詰め込み、移植片に蛍光標識された細胞由来の毛包構造が形成されていたことを確認した。これにより、足裏皮膚移植法が *in vivo* アッセイ法として有用であると証明した。

培養パピラ細胞が毛包誘導能のみならず、表皮を突き破る毛幹伸長を誘導することを確認しなければならない。そこで、培養パピラ細胞による発毛能を可視化できるアッセイ法としてグラフトチャンバーアッセイを導入した。これは、酵素処理によって細胞接着を解離したラット新生児表皮細胞と培養パピラ細胞を混合し、ヌードマウス背部に移植したグラフトチャンバー内に移植する方法である。この方法により、我々の培養技術によって長期継代培養したパピラ細胞が発毛能を保持していることが証明された。

実験動物皮膚への移植では、煩雑な操作や実験結果のばらつきを排除することが出来ない。そこで、完全に制御された培養環境下で作成した人工皮膚において毛包構造を形成させる *in vitro* アッセイ法の開発を行った。この人工皮膚に組織から単離したパピラあるいは培養パピラ細胞を人工皮膚に埋め込む方法を確認し、組織から単離したパピラを埋め込むと、パピラの周りの表皮細胞が肥厚し、パピラを包み込むような組織像が観察された。陰性対照群として、線維芽細胞のペレットを埋め込んだ人工皮膚では、表皮細胞の形態変化は観察されなかった。継代培養パピラ細胞のペレットを埋め込んだ人工皮膚は、パピラを埋め込んだものに比べて程度は低いものの、パピラ細胞ペレットを包み込むように表皮が増殖、肥厚していた。

培養パピラ細胞の毛包誘導能検定法として、ラット足裏皮膚による *in vivo* アッセイおよびグラフトチャンバーアッセイを用いた場合、結果を判定するまでに数週間を要する。そのため、多種の候補因子を線維芽細胞などの培養細胞に強制発現させて、その毛包誘導

能を解析するには不向きである。そこで、数日間で表皮の形態変化が観察された人工皮膚による *in vitro* アッセイを応用した、検定方法の開発が必要となる。人工皮膚内でパピラによって誘導された表皮の構造が毛包分化の初期段階であることを証明するために、ラットやマウス胎児の毛包発生において、表皮細胞が毛包型の細胞に分化する際に発現する遺伝子群の検出を行った。その結果、いくつかの遺伝子群を *in situ* ハイブリダイゼーションにより検出することができ、人工皮膚を用いたアッセイシステムの有効性が示された。

我々は、パピラ細胞を表皮細胞の培養上清や増殖因子を添加して培養することにより、その毛包誘導能を維持できることを上述した 3 種類の方法で証明した。また、増殖因子等を添加しない培養法で継代培養を続けたパピラ細胞は、毛包誘導能を消失することが知られている。発毛因子候補探索のために、毛包誘導能を維持しているパピラ細胞と消失したパピラ細胞を比較することを考え、表皮細胞培養上清や増殖因子も添加せずに、継代培養を行ったパピラ細胞（無添加培養パピラ細胞）の毛包誘導能について、足裏皮膚 *in vivo* アッセイ法とグラフトチャンバー法で調べた。その結果、無添加培養パピラ細胞は毛包形成能が全く見られなかった。

以上のように、毛包誘導能の有無を確定した培養パピラ細胞とラット皮膚繊維芽細胞を材料に、毛包誘導活性を担っている遺伝子候補をみつけることを目的に、DNA マイクロアレイを用いた解析を行った。これらの解析結果から、いくつかの条件を設定して毛包誘導能を持ったパピラ細胞特異的といえる遺伝子を絞り、RT-PCR による遺伝子発現の確認を行った。

また、発現遺伝子の分析と平行して、プロテオーム解析技術の利用によって、分泌タンパク質を網羅的に解析することで毛包形成誘導因子と毛幹伸長に関わる因子の候補を探索した。分泌タンパク質のプロテオーム解析を行うために、基礎培地にいくつかの添加物を加えて無血清培養する技術開発を行った。

この無血清培養系を用いて、短時間パピラ細胞を無血清培養しても、毛包誘導能が保持されていることが確認された。このパピラ細胞無血清培養上清のプロテオーム解析を行ったところ、パピラ細胞が線維芽細胞と比較して、いくつかの特異的なタンパク質を分泌していることが確認された。これらのパピラ細胞特異的分泌タンパク質は毛包形成誘導あるいは毛幹伸長に関与する因子の候補であると考えられた。

毛髪をつくり出す毛包組織は、胚の発生過程において表皮と間充織との相互作用によって形成される。ラット胎児皮膚をヌードマウスの背部に移植する実験を行ったところ、毛芽形成前の胎児皮膚では、発毛が観察されなかったのに対し、毛芽形成以降の胎児皮膚では発毛が観察された。この点に着目し、毛包形成に関わる上皮—間充織相互作用を調べるため、発生段階の異なる胎児皮膚の表皮と真皮を組み換えてヌードマウスに移植した。その結果から、表皮細胞からなる毛芽が未分化な真皮細胞をパピラ細胞に誘導することが観察された。そこで、GFP トランスジェニックラットを用いた、胎児皮膚組み換え移植実験を行い、毛芽による真皮集塊誘導を証明した。

我々は、本プロジェクトにおいて、毛包誘導因子や毛幹伸長に関わる因子探索を行うために必要なパピラ細胞培養技術、毛包誘導実験系、毛包誘導因子候補の網羅的な情報を得ることが出来た。これらを用いることで、毛髪再生療法開発に大きなアドバンテージを得ることが出来ると考えられた。そこで、我々は、これまでにラットパピラ細胞において確立したパピラ細胞継代培養技術や、毛包誘導実験技術を応用して、ヒト培養ヒトパピラ細

胞の移植による毛髪再生療法開発を行うこととした。この研究は、(1) 頭皮摘出からパピラ単離・細胞培養法の確立、(2) 継代培養パピラ細胞の毛包誘導および発毛に関する機能の確認、(3) 培養パピラ細胞の加工法および移植法開発、に分けて推進した。

ヒトパピラ単離法の習熟および培養法の確立を最初に行い、これによってヒトパピラ細胞もラットと同様に十分研究開発に利用できることとなった。ヒトパピラ細胞の初代培養・継代培養では、ラットパピラ細胞と同様に、CM5 による細胞増殖効果が認められた。この技術を用いることで、数十本の毛包より毛髪再生事業には十分な量を培養増殖させることが可能であることが示された。

毛髪再生療法を実現するためには、このヒト継代培養ヒトパピラ細胞が毛包誘導能のみならず、表皮を突き破る毛幹伸長を誘導することを確認しなければならない。そこで、グラフトチャンバーアッセイで継代培養ヒトパピラ細胞がラット新生児表皮を、種を越えて毛包に分化誘導させて発毛するかどうかを実験した。その結果、培養ヒトパピラ細胞は新生児ラット表皮を毛包に分化させ、皮膚表面より発毛することが確認できた。ヒト特異的 DNA プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションおよび蛍光色素による標識法により毛包のパピラはヒト毛髪由来であることが証明された。

ヒトパピラ細胞のヒト皮膚への移植法を開発するに当たり、パピラ細胞の毛包誘導能と同時に成体表皮シートの毛包分化能も問題となる。そこで、ラット足裏皮膚を用いた *in vivo* アッセイにて、継代培養ヒトパピラ細胞の成体表皮シートに対する毛包誘導能を検定した。ヒトインタクトパピラでラット足裏アッセイを行うと、ラット頬髭インタクトパピラと比較して低いながらも毛包誘導能が認められた。

またヒトパピラ細胞より人工パピラ加工法を開発した。この人工パピラを、継代培養ヒトパピラ細胞で作成し、ラット足裏アッセイを行ったところ、毛包誘導能が認められた。いずれの場合でも毛包様構造は構築されるが、ヘアシャフトが表皮を破って発毛する像は得られなかった。これらの結果より、ヒトパピラ細胞は成体ラット表皮シートを毛包に分化誘導することができることが示され、ヒト皮膚内への培養パピラ細胞移植による毛包再生について可能性が示唆された。

これらの動物を使ったアッセイ法では、ヒトパピラ細胞による発毛制御を確認するには種々の限界がある、またヒト頭皮皮膚への移植法の検討も兼ねてヒトインタクトパピラの自家移植実験を行った。3 名の被験者には微細な発毛が観察され、ヒトパピラはヒト皮膚を誘導して発毛させることが出来ることが示された。この実験を行うに当たり、注射によるパピラの皮内注入法を開発し、高い注入効率を得ることができた。

ヒトパピラ細胞を利用した実験動物においては、常に同じ条件での培養パピラ細胞の利用がふさわしいが、ヒトパピラ細胞には継代寿命があり、毛包誘導能と発毛能を維持して利用できる細胞の継代数は限定される。そこで、ヒト肝細胞などで実績があるヒトテロメラーゼ遺伝子導入によるヒトパピラ細胞の継代可能数延長について検討した。ヒトテロメラーゼ遺伝子導入パピラ細胞は継代培養可能限界を超えて長期間の継代培養が可能であった。このヒトテロメラーゼ遺伝子導入パピラ細胞の毛包誘導能と発毛誘導能をグラフトチャンバーアッセイにて観察したところ、毛包誘導、発毛誘導能共に維持していることが観察された。

我々は、本プロジェクトにおいて、ヒトパピラ細胞もラット頬髭パピラ細胞と同様に毛包誘導能、発毛誘導能を保持して大量培養可能であることを証明し、臨床応用への橋渡し

となる成果を得ることが出来た。これらの結果により、培養パピラ細胞の大量培養と細胞移植による毛髪再生療法事業実現の可能性を示すことが出来た。

2-4．トランスジェニック人工皮膚の開発

本研究は、科学技術振興事業団創造科学技術振興事業吉里再生機構プロジェクト（1992年10月～1997年9月）において、新しい遺伝子治療の方法を開発する目的で研究が行われた＜インスリン分泌性ハイブリッド型人工皮膚の構築（吉田進：平成5年4月20日～平成9年3月31日）＞の成果をさらに発展させ、実用化することを目標とし研究を行ってきた。

フェーズ I では、主にインスリン分泌性人工皮膚の作製を実験を行った。臨床応用を視野に入れ、実際に臨床応用例のあるレトロウイルスベクターを遺伝子導入システムとし、また、臨床現場で取り扱うヒトの皮膚線維芽細胞を用いてデータの収集を行い、次の結果を得た。

- 1) インスリン分泌性人工皮膚の作製に成功した。
- 2) レトロウイルスベクターによる複数回の遺伝子導入操作により細胞レベルでのインスリン分泌量の増加に成功した。また、人工皮膚内の細胞密度をこれまでの2倍にすることで人工皮膚レベルでのインスリン分泌量の増加が左脳であることが明らかとなった。
- 3) フリン感受性ヒトインスリン遺伝子を導入したヒト皮膚線維芽細胞から分泌されるインスリン様物質全体の約9割が前駆体のプロインスリンからインスリンへ変換されていることを明らかにした。
4. 我々が作製したインスリン分泌性人工皮膚をストレプトゾトシン投与により糖尿病を誘発したヌードマウスに移植したが、有意な血中インスリンレベルの上昇や血糖値降下などの治療効果は得られなかった。これは人工皮膚単位面積当たりのインスリン分泌量が低いことが主な原因と予想された。

フェーズ I の結果を踏まえ、フェーズ II では、臨床応用に必要不可欠である「動物実験での治療効果の実証」を目標にし、1) インスリン分泌性人工皮膚の単位面積当たりのインスリン分泌量向上、2) 生体内での半減期が比較的長く微量で治療効果が期待できるエリスロポエチン分泌性人工皮膚の作製およびその有効性の実証を行った。そして次の結果を得た。

- 1：エリスロポエチン分泌性人工皮膚の作製に成功した。
- 2：エリスロポエチン分泌性ヒト皮膚線維芽細胞が分泌したエリスロポエチンは生物学的に機能することをヒトエリスロポエチン依存的に増殖する株細胞を用いて示した。
- 3：エリスロポエチン分泌性人工皮膚を移植したヌードマウスで、有意な血中エリスロポエチン濃度の上昇と治療効果であるヘマトクリット値の上昇を確認し、「動物実験での治療効果」を実証した。
- 4：ヌードマウスへの組み換え体エリスロポエチン投与実験との比較から、恒常的にエリスロポエチンを体内に供給する人工皮膚システムは有効であることが示唆された。
- 5：エリスロポエチン分泌性人工皮膚の移植後後1日目から7日目までに急速に血中エリスロポエチン濃度が低下し、その比較的緩やかに低下したことから、人工皮膚移植7日目