

学位論文

「Hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells can  
differentiate into beating cardiomyocyte sheets and  
cardiomyocyte subtypes (atrial and ventricular cardiomyocytes)」

(毛包幹細胞由来心筋シートの作成と、  
心房筋・心室筋細胞の分化誘導方法の確立)

DM20016 高岡 奈那子

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程  
臨床医科学群 皮膚科学  
指導教授 天羽 康之

## 著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

## 論文要旨

### 【背景】

心疾患は世界的にも死因の上位を占める。大量に心筋細胞を欠落すると心機能は著しく低下するが、心筋細胞はほとんど増殖能がなく、自己回復は臨めない。有効な治療法は少なく、重症例は心臓移植に頼っている現状だが、深刻なドナー不足により、心臓移植の件数にも限度がある。そのため、新規治療薬や再生医療に期待が高まっている。さらに、心房筋・心室筋のように分化した心筋細胞を作成することは、心筋サブタイプに関連する疾患へのアプローチに有用である。

Embryonic stem cells (ESC) や induced pluripotent stem cells (iPSC) を心筋細胞に分化誘導するプロトコルは公開されているが、倫理面や腫瘍化を考慮する必要があり、臨床応用の障壁となっている。一方、成体幹細胞由来心筋細胞の自家移植では、それらの問題を考慮する必要がないが、前述の幹細胞に比し、分化誘導法の十分な検討がなされていない。

当皮膚科学教室は、マウスの皮膚毛包バルジ領域と脂腺付着部位に分布しているネスチン陽性、ケラチン 15 陰性の毛包幹細胞を発見し、さらにマウス毛包幹細胞が角化細胞・神経細胞・グリア細胞・色素細胞・脂肪細胞・平滑筋細胞・心筋細胞に分化可能な多分化能を持つ成体幹細胞であることを明らかにした。

本研究では、心臓移植に代わる心疾患治療法の開発を目的とし、ラット毛包幹細胞から拍動する心筋シートの作成を試みた。さらに、ラット毛包幹細胞から、機能の異なるサブタイプ別の心筋（心房筋・心室筋細胞）への選択的分化誘導を行い、疾患により特化した創薬や再生医療の開発を試みた。

### 【方法】

#### 1) ラット毛包幹細胞の多分化能確認

F344/jcl ラット上唇髭毛包を採取し、毛包幹細胞領域を含む毛包上部を 10% FBS DMEM で 28 日間培養した。増殖した細胞が、角化細胞・神経細胞・グリア細胞・色素細胞・平滑筋細胞・心筋細胞に分化することを証明するため、それぞれの細胞に特異的な一次抗体と蛍光標識二次抗体を用いて免疫染色を行った。

## 2) ラット毛包幹細胞由来心筋細胞の培養条件の検討

ラット上唇髭毛包上部をガラスボトムシャーレに固定し、コントロール群は 10% FBS DMEM のみ、イソプロテレノール単独群は、10% FBS DMEM に isoproterenol のみを添加、4 種添加群は、10% FBS DMEM に isoproterenol, activin A, bone morphogenetic protein 4 (BMP4)、basic fibroblast growth factor (bFGF) を添加し、それぞれ 21 日間培養した。

得られた心筋細胞に対し、抗 cardiac troponin I (cTnI) 抗体を用いた免疫染色、Image J を用いた心筋量・心筋長の画像解析を行った。

## 3) ラット毛包幹細胞由来心筋シートの作成

ラット上唇髭毛包上部を 1.5、2.0、2.5、そして 3.0 mm 間隔でガラスボトムシャーレに固定し、10% FBS DMEM に isoproterenol, activin A, BMP4, bFGF を加え、計 28 日間培養した。心筋シートが得られるまでの期間と、シート形成率、シート面積を測定し、得られた心筋シートを抗 cTnI 抗体で免疫染色した。

## 4) ラット毛包幹細胞由来心房筋・心室筋細胞の分化誘導

ラット上唇髭毛包上部をガラスボトムシャーレに固定し、10% FBS DMEM に isoproterenol, activin A, BMP4, bFGF を加え、更に cyclosporin A (CSA) を添加し、21 日間培養することで心房筋細胞誘導を、Stem pro34 に activin A, BMP4, bFGF を加え、更に inhibitor of Wnt production-4 (IWP4) と vascular endothelial growth factor (VEGF) を添加し、21 日間培養することで心室筋細胞誘導を試みた。コントロール群は、10% FBS DMEM のみで 21 日間培養した。心房



筋・心室筋細胞への選択的分化を証明するため、myosin light chain 2a (MLC2a) や、myosin light chain 2v (MLC2v) のたんぱく質ならびに遺伝子発現を、免疫染色やリアルタイム RT-PCR で確認した。また、心筋細胞、心房筋細胞、心室筋細胞の構造を、抗 $\beta$ -catenin 抗体を含む免疫染色や、透過型電子顕微鏡で確認した。さらに、心筋細胞拍動に伴う細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

## 【結果】

### 1) ラット毛包幹細胞の多分化能の確認

免疫染色により、ラット毛包幹細胞由来の細胞が、角化細胞・神経細胞・グリア細胞・色素細胞・平滑筋細胞・心筋細胞に分化していることを確認し、ラット毛包幹細胞の多分化能を証明した。

### 2) ラット毛包幹細胞由来心筋細胞の培養条件の検討

各種培養条件下で、抗 cTnI 抗体陽性の心筋細胞が得られた。心筋量・心筋長は、コントロール群に比し、イソプロテレノール単独群と 4 種添加群が有意に多く、有意に長かった。コントロール群、イソプロテレノール単独群はシート形成に至らず、4 種添加群のみ心筋シートを呈した。

### 3) ラット毛包幹細胞由来心筋シートの作成

ガラスボトムシャーレに固定した 4 種添加群は、培養 14 日目に、抗 cTnI 抗体陽性の拍動する心筋シートを形成した。毛包間隔 2.0 mm 固定培養が、短期間でより大きい拍動する心筋シートを形成した。

### 4) ラット毛包幹細胞由来心房筋・心室筋細胞の分化誘導

各種培養条件下で得られた細胞の免疫染色では、心房筋誘導群において cTnI / MLC2a 陽性の心房筋細胞が、心室筋誘導群において cardiac troponin T (cTnT) / MLC2v 陽性の心室筋細胞が認められた。コントロール群の心筋細胞は、抗 cTnI

抗体ならびに抗 cTnT 抗体のみ陽性の心筋細胞であった。リアルタイム RT-PCR では、コントロール群と比較し、心房筋誘導群で *MLC2a*、心室筋誘導群で *MLC2v* 遺伝子発現量の有意な増加が認められた。透過型電子顕微鏡像では、コントロール群の心筋細胞は明瞭なサルコメア構造が見られなかった。一方で、心房筋・心室筋細胞には規則的なサルコメア構造が見られた。さらに、心室筋細胞では T 管様構造ならびに  $\beta$ -catenin 陽性の介在板が確認された。カルシウムイメージングでは、いずれの条件下の心筋細胞も、自発的な拍動に合わせて細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が変化した。心房筋・心室筋細胞では、それぞれ特徴的な波形が見られた。心房筋細胞は、脱分極後に速やかに再分極相に移行し、心室筋細胞で観察されるよりも高い頻度で自発的な活動を示した。心室筋細胞は、急速な活動電位のアップストロークと、再分極相へのゆるやかな移行を示した。心房筋・心室筋細胞は、コントロール群の心筋細胞と比較し、活動電位の持続時間のばらつき、活動電位の大きさのばらつき、静止膜電位のばらつきが有意に小さく、規則的な活動を示した。

## 【考察】

本研究結果から、ラット毛包幹細胞由来心筋細胞は、ESC や iPSC 由来心筋細胞のような紡錘形や星形の細胞ではなく、長く伸びた心筋線維を形成し、それらが機能的合胞体として拍動しており、成体心筋により近い構造を持つという特徴が確認できた。また、機能的合胞体を含む心筋シートの作成に成功したことにより、長い心筋線維の形状を維持しながら、心臓移植などの臨床応用へ繋げる研究の基盤を整えることに成功した。

心房筋・心室筋細胞に関しては、ESC や iPSC では、すでにサブタイプ別の心筋細胞を分化誘導するプロトコルがいくつか公開されているが、成体幹細胞由来のサブタイプ別の心筋作成は今までに報告がなく、十分な検討がなされていなかった。今

回、我々は世界に先駆けて、成体幹細胞由来心房筋・心室筋細胞の分化誘導を証明した。

成体幹細胞である毛包幹細胞は、ESC や iPSC の抱える倫理面や拒絶反応の問題を考慮する必要がなく、腫瘍化のリスクも非常に低いため、高い安全性が期待できる。また、凍結保存や自家移植が可能なことから、臨床応用の可能性が高い。これらの優れた性質から、毛包幹細胞を用いた再生医療研究は、独創性・実現性が非常に高いと考える。

### 【結論】

ラット毛包幹細胞から、拍動する心筋シートの作成と、サブタイプ別の心筋(心房筋・心室筋細胞)の分化誘導方法の確立に成功した。

これらの成果により、毛包幹細胞を用いた再生医療の臨床応用の実現性は一層高まり、また、心筋サブタイプ別の心毒性スクリーニングや、創薬に関わる研究の促進が期待できる。

## 目次

	頁
1. 序論 -----	1
2. 方法	
2-1. 動物 -----	2
2-2. ラット毛包採取 -----	2
2-3. ラット毛包培養(多分化能確認) -----	2
2-4. ラット毛包培養(培養条件検討、心筋シート作成) -----	3
2-5. ラット毛包培養(心房筋・心室筋細胞誘導)-----	3
2-6. 蛍光免疫染色 -----	4
2-7. フローサイトメトリー -----	5
2-8. 薬剤応答 -----	6
2-9. 細胞内カルシウムイメージング -----	6
2-10. 画像解析 -----	6
2-11. ウェスタンブロッティング -----	7
2-12. リアルタイム RT-PCR -----	7
2-13. 透過型電子顕微鏡 -----	8
2-14. 統計解析 -----	8
3. 結果	
3-1. ラット毛包幹細胞の多分化能確認 -----	8
3-2. ラット毛包幹細胞由来心筋細胞の特徴 -----	8
3-3. 各培養条件下での心筋細胞分化率の比較 -----	9
3-4. ラット毛包幹細胞由来心筋シート作成 -----	10
3-5. ラット毛包幹細胞由来心房筋・心室筋細胞の分化確認 -----	11
3-6. ラット毛包幹細胞由来心房筋・心室筋細胞の形態的特徴 -----	12
3-7. ラット毛包幹細胞由来心房筋・心室筋細胞の機能的特徴 -----	12
4. 考察 -----	13

5. 総括	15
6. 今後の課題	15
7. 謝辞	16
8. 引用文献	16
9. 業績目録	20
10. 図表	23



## 1. 序論

当皮膚科学教室は世界に先駆けて、マウスの皮膚毛包バルジ領域と脂腺付着部位に分布しているネスチン陽性、ケラチン 15 陰性の毛包幹細胞を発見し、同細胞が角化細胞・神経細胞・グリア細胞・色素細胞・脂肪細胞・平滑筋細胞・心筋細胞など様々な細胞へ分化可能な多分化能を持つことを明らかにした[1-5]。さらに我々は、マウス同様、ヒト毛包幹細胞も多分化能を持つことを証明した[6,7]。神経系においては、毛包幹細胞をマウスの切断坐骨神経及び脛骨神経間へ移植した際の末梢有髄神経の再生[1,8]や、脊髄損傷部への毛包幹細胞移植による運動機能の改善[9-11]、脳出血部位の修復[12]、ドパミン産生細胞の誘導[13]を証明している。また、マウス毛包から効率的に心筋細胞を誘導する方法を提唱した[14]。加えて、マウスを用いた脱毛箇所への毛包幹細胞移植による発毛の促進にも成功している[15]。これらの成果を元に、自己毛包幹細胞を用いた再生医療の実現に向け、研究を行っている。毛包幹細胞は皮膚毛包に分布するため非常に採取しやすく、患者本人の毛包幹細胞由来の細胞を移植すれば、拒絶反応の問題を考慮する必要がない。また、成体幹細胞である毛包幹細胞は、遺伝子操作を必須としないため、**embryonic stem cells (ESC)** や **induced pluripotent stem cells (iPSC)** と比較して腫瘍化のリスクが低い。加えて、凍結保存により多分化能を損なわれないため、毛包幹細胞バンクとしての利用も可能である[6,16]。これらの利点により、毛包幹細胞を用いた再生医療は早期の臨床応用が期待されている。

本研究では、有効な治療法の限られている心疾患の、心臓移植に代わる治療法の検討として、毛包幹細胞由来心筋シートの作成を、また、創薬や心臓再生医療の開発を目的として、機能的に分化したサブタイプ別の心筋(心房筋・心室筋細胞)の分化誘導を試みた。



## 2. 方法

### 2-1. 動物

4 週齢の F344/jcl 雌性ラット(体重 50g 以上)(CLEA Japan, 東京都)を用いた。ラットは温度  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 50-60%、明期 14 時間、暗期 10 時間で飼育した。安楽死は、米国獣医学会(American Veterinary Association : AVMA)に従い、炭酸ガス吸入による窒息により行った。ラットを用いたすべての実験は、the United States National Institutes of Health (NIH) ガイドラインおよび the Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) ガイドラインに準拠し、北里大学動物倫理委員会の承認を得た(許可番号 2020-035, 2021-024, 2022-043, 2023-010)。動物への負担を最小限に抑え、使用する動物の数を減らすよう努めた。

### 2-2. ラット毛包採取

F344/jcl ラットの麻酔には、0.375 mg/kg メデトミジン塩酸塩、2.0 mg/kg ミダゾラム、2.5 mg/kg 酒石酸ブトルファノール混合溶液を用い、下肢に筋肉内注射した。解剖用ハサミを用いて、毛包幹細胞を含む髭毛包が存在する両側上唇を切り取り、Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) (#D6429, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)を加えたシャーレに移した。実体顕微鏡下で、上唇の髭毛包をピンセットで真皮側に慎重に引き抜いた。1 匹のラットから、約 40 個の髭毛包を採取した。得られた髭毛包の周囲の組織を丁寧に除去し、上部 1/3 を切除した。すべての操作は、無菌環境下で行われた。

### 2-3. ラット毛包培養(多分化能確認)

採取したラット上唇髭毛包上部を、35mm ガラスボトム コラーゲンコート培養皿(#P35GCOL-0-10-C, MatTeK corporation, Ashland, MA)上に 4-5 個ずつ、マトリゲ

ル基底膜マトリックス(#356231, Corning Incorporated, Corning, NY, USA)で固定し、10%牛胎児血清(Fetal Bovine Serum (FBS))を含む DMEM に 50 µg/ml ゲンタマイシン塩酸塩(#15750-060, GIBCO, Grand Island, NY, USA)、2 mM L-グルタミン(#25030, GIBCO)、10 mM Hepes 緩衝液(#H0887, Sigma-Aldrich)を添加した培養液(10% FBS DMEM)を用いて、37℃、5 % CO<sub>2</sub> / 95 % Air の条件下で 28 日間培養した。

#### 2.4. ラット毛包培養(培養条件検討、心筋シート作成)

2.3.と同様に、採取したラット上唇髭毛包上部を、35mm ガラスボトム コラーゲンコート培養皿上に 4-5 個ずつ、マトリゲル基底膜マトリックスで固定した。コントロール群は 10% FBS DMEM のみ、イソプロテレノール単独群は 3 µM イソプロテレノール(isoproterenol)(#I6504, Sigma-Aldrich)のみを添加、4 種添加群は 3 µM isoproterenol、10 ng /ml 骨形成たんぱく質 4(bone morphogenetic protein 4 (BMP4)) (#GF003, HumanZyme, Chicago, IL, USA)、10 ng /ml アクチビン A(activin A ) (#338-AC-010, HumanZyme)、5 ng /ml 塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor (bFGF)) (#GF003, EMD Millipore Corporation, Temecula, CA, USA) を添加した。各群を 37℃、5 % CO<sub>2</sub> / 95 % Air の条件下で 21 日間培養し、心筋シートは 28 日間培養した。すべての添加剤は 3 日毎、計 4 回添加した(図 1)。

#### 2.5. ラット毛包培養(心房筋・心室筋細胞誘導)

2.3.と同様に、採取したラット上唇髭毛包上部を、35mm ガラスボトム コラーゲンコート培養皿上に 4-5 個ずつ、マトリゲル基底膜マトリックスで固定した。コントロール群は 10% FBS DMEM のみ、心房筋誘導群は 10% FBS DMEM に 3 µM

isoproterenol、10 ng/ml activin A、10 ng/ml BMP4、5 ng/ml bFGF を 4 日毎、計 2 回添加し、その後 1 µg/ml シクロスポリン A(cyclosporin A (CSA)) (#AG-CN2-0079, AdipoGen Life Sciences, San Diego, CA, USA) を 3 日毎、計 3 回添加した。心室筋誘導群は、StemPro-34(#10639011, GIBCO)に 50 µg/ml ゲンタマイシン塩酸塩、2 mM L-グルタミン、150 µg/ml トランスフェリン(#T0665, Sigma-Aldrich)、50 µg/ml アスコルビン酸(#49752, Sigma-Aldrich)、0.1mM 2-メルカプトエタノール(#21985-023, gibco)を添加した培養液に、12 ng/ml activin A、5 ng/ml BMP4、5 ng/ml bFGF を 3 日間添加し、次いで 1 µM Wnt シグナル阻害薬 4(inhibitor of Wnt production-4(IWP4)) (#13954, Cayman, ANN ARBOR, MI, USA) と 10 ng/ml 血管新生阻害薬(vascular endothelial growth factor (VEGF)) (#100-20, PEPROTECH, Cranbury, NJ, USA) を 2 日間添加、その後 5 ng/ml VEGF のみを 3 日毎に 3 回添加した。各群を 37°C、5 % CO<sub>2</sub> / 95 % Air の条件下で 21 日間培養した(図 2)。

## 2-6. 蛍光免疫染色

ラット毛包幹細胞由来の細胞を、4%パラホルムアルデヒドで 5 分間固定した。ブロッキング液(10% goat serum、0.05% Triton X-100 含有 PBS)で 10 分間処理し、一次抗体を室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄した後、二次抗体を室温で 30 分間、その後 4', 6-diamino-2-phenylindole(DAPI;1:5000)(#SE196, DOJINDO, Kumamoto, Japan)で 5 分間反応させ、Fluoromount(#DBS K024, Japan tanner, Osaka, Japan)で封入した。

一次抗体には、抗 nestin マウス monoclonal 抗体(1:250, #655102, BioLegend, San Diego, CA, USA); 抗 βIII-tubulin マウス monoclonal 抗体(1:500, #801213, BioLegend); 抗 glial fibrillary acidic protein(GFAP)マウス monoclonal 抗体(1:200, #14-9892-82, LAB VISION, Fremont, CA, USA); 抗 keratin 15 マウス monoclonal

抗体(1:200, #MS-1068-P0, ThermoFisher, Waltham, MA, USA); 抗 smooth muscle actin(SMA)マウス monoclonal 抗体(1:400, #MA1-06110, ThermoFisher); 抗 cardiac troponin I(cTnI)ウサギ polyclonal 抗体(1:200, #PAA478Ra01, Cloud-Clone Corp, Houston, TX, USA); 抗 cardiac troponin T(cTnT)マウス monoclonal 抗体(1:500, #GTX28295, Gene Tex, Irvin, CA, USA); 抗 myosin light chain 2a (MLC2a)マウス monoclonal 抗体(1:40, #565496, BD Biosciences, San Jose, CA, USA); 抗 myosin light chain 2v(MLC2v)ウサギ monoclonal recombinant 抗体(1:200, # 310 118, Synaptic Systems, Göttingen, Germany); 抗 Beta Catenin ウサギ polyclonal 抗体 (1:100, #51067, proteintech, Rosemont, IL, USA)を用いた。

二次抗体は、Alexa Flour 568® 標識抗マウス IgG 抗体 (1:400, #A11004, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA); Alexa Flour 568® 標識抗ウサギ IgG 抗体 (1:400, #A11011, Molecular Probes); Alexa Flour 488® 標識抗マウス IgG 抗体(1:400, #A-11001, Molecular Probes); Alexa Flour 488® 標識抗ウサギ IgG 抗体 (1:400, #A11008, Molecular Probes)を用いた。アクチンフィラメントの染色には、Phalloidin-iFluor™ 488 標識 (1:1000, #20549, Cayman Chemical) を用いた。

## 2-7. フローサイトメトリー

35mm ポリスチレン未処理培養皿(#430588, Corning Incorporated)を用いて、培養を行った。ラット毛包幹細胞由来の細胞をトリプシン-EDTA で剥離後、4 %パラホルムアルデヒドで固定した。その後、抗 cTnI ウサギ polyclonal 抗体(1:200)を室温で 30 分間反応させた。洗浄後、ビオチン標識抗ウサギ抗体(1:1,000, DAKO, Santa Clara, CA, USA)、さらに Brilliant Violet 421™ 標識ストレプトアビジン(1:500, BioLegend) を室温で 10 分間反応させた。これらを FACS Verse(BD Bioscience, San Jose, CA, USA)で測定し、FACS Suite™(BD Bioscience)を用いて解析した。洗浄お



よび抗体の希釈は 2% FBS、0.5% Tween-20、2 mM EDTA 含有 PBS を使用した。  
実験は繰り返し 3 回行った。

## 2-8. 薬剤応答

ラット毛包幹細胞由来心筋細胞に、最終濃度 200 nM isoproterenol と、200 nM プロプラノロール(propranolol)(#P0884, Sigma-Aldrich)を添加し、心筋細胞の拍動回数を測定した。心筋細胞の観察及び撮影は、microscope CK40(Olympus Corporation, Tokyo, Japan)、VCE-i700T (SHODENSHA, Osaka, Japan)で行った。拍動回数の測定は、繰り返し 4 回行った。

## 2-9. 細胞内カルシウムイメージング

ラット毛包幹細胞由来心筋細胞を、37°C で 2 mmol CaCl<sub>2</sub> 添加のアール平衡緩衝塩類溶液(Earle's balanced salt solution(EBSS))(GIBCO)で洗浄した後、1 μM Fluo-4AM(#F312, DOJINDO, Kumamoto, Japan)と 0.04% Pluronic F-127(#59004, FUJIFILM Wako, Osaka, Japan)を加え、37°C で 20 分間反応させた。細胞内 Fluo-4AM の蛍光強度(励起波長; 495 nm、蛍光波長; 518 nm)は、共焦点レーザー顕微鏡(Carl Zeiss)を用いて 5msec 間隔で撮影し、計測した。画像解析は LSM software ZEN (Carl Zeiss) を用いた。

## 2-10. 画像解析

細胞の観察および撮影は LSM 710 共焦点レーザー顕微鏡(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)で行い、画像解析は LSM software ZEN(Carl Zeiss)、image J(National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) を用いた。image J で使用した全ての画像は、背景の蛍光強度を差し引くため、閾値を 60 から 255 に設定した。

## 2-11. ウェスタンブロッティング

ラット毛包幹細胞由来細胞は、RIPA バッファー(Tris-HCl 50 mmol pH 7.6; NaCl 150 mmol; 1% Nonidet® P40; 0.5% sodium deoxycholate; 0.1% sodium dodecyl sulfate(SDS))に protease-inhibitor cocktail set III(1:1000, Merck, Darmstadt, Germany)を添加して溶解した。10 µg 細胞溶解液を 4-20% ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)(ATTO, Tokyo, Japan)で分離し、イモビロン P メンブレン (Immobilon-P membranes)(Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)に転写した。メンブレンは、一次抗体として抗 cTnI ウサギ polyclonal 抗体(1:4000)と、抗 $\alpha$ -actinin 2 ウサギ polyclonal 抗体(1:5000, Gene Tex, Irvine, CA, USA)と反応させた。次に、二次抗体として peroxidase-conjugated Protein A/G (1:40000, Pierce, Rockford, IL, USA)と反応させた。ローディングコントロールには、抗 GAPDH ウサギ polyclonal 抗体(1:4000, BioLegend)を用いた。メンブレンは ECL Select™ ウェスタンブロット検出試薬(ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent)(GE Healthcare, Bucks, UK)で検出した。画像は Light-Capture(ATTO)で撮影し、解析は CS Analyzer 4(ATTO)で行った。

## 2-12. リアルタイム RT-PCR

Total RNA は、21 日間培養した細胞を RNeasy® Plus Mini Kit(#74134, QIAGEN)で抽出した。その後、QuantiTect® Reverse Transcription(#205311, QIAGEN)で cDNA 合成を行った。リアルタイム PCR は、Power SYBR® Green PCR Master mix(#4367659, Applied Bio-systems, Waltham, MA, USA)を用いて行った。増幅は CFX96 Real-Time PCR Detection System(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)で 95°C 10 分間、次いで 95°C 10 秒間、その後 57°C 60 秒間を計 40 サイクル行い、Delta Delta Ct



法で解析した。実験は繰り返し3回行った。プライマーの配列は表1に示した。

### 2-13. 透過型電子顕微鏡

ラット毛包幹細胞由来心筋細胞を、2.5% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer を用いて4℃で30分間前固定し、1% osmium tetroxide を用いて4℃で1時間後固定した。次に2% uranyl acetate dihydrate に15分間浸漬した後、エタノールで脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。2% Uranyl acetate dihydrate と Reynolds lead citrate で二重染色した超薄切片(80 nm)を、透過型電子顕微鏡(#H-7650, Hitachi, Tokyo, Japan)で観察および撮影した。

### 2-14. 統計解析

解析には、Microsoft Excel for Windows version 2103 と、JMP Pro version 16 (SAS, Cary, NC, USA)を用いた。データは平均値 ± 標準偏差で示した。統計解析は、ANOVA、Student T 検定、Welch T 検定、Mann-Whitney U 検定を用いた。P 値 < 0.05 を有意と定義した。

## 3. 結果

### 3-1. ラット毛包幹細胞の多分化能確認

免疫染色により、ラット毛包幹細胞由来の細胞が、抗 cTnI 抗体陽性心筋細胞、抗 nestin 陽性神経細胞、抗 βIII-tubulin 陽性神経細胞、抗 GFAP 抗体陽性グリア細胞、抗 keratin15 抗体陽性角化細胞、抗 SMA 抗体陽性平滑筋細胞に分化していることが確認された(図 3a-g)。

### 3-2. ラット毛包幹細胞由来心筋細胞の特徴

フローサイトメトリーでは、ラット毛包幹細胞から分化した細胞の  $16.5 \pm 2.3\%$  が心筋細胞であることが示された(図 4a)。

ラット毛包幹細胞由来心筋細胞の自発的な拍動回数は、平均  $121 \pm 12.4$  回/分であった。イソプロテレノールの添加により、拍動回数は有意に 24%増加した(平均  $150 \pm 26.8$  回/分、 $p = 0.02$ )。イソプロテレノール添加で増加した拍動回数は、プロプラノロール添加で有意に 37%減少した(平均  $95 \pm 26.2$  回/分、 $p = 0.00001$ )(図 4b)。カルシウムイメージングでは、ラット毛包幹細胞由来心筋細胞に取り込ませたカルシウム感受性色素 Fluo-4-AM の蛍光強度が、心筋細胞の拍動に伴い変化している様子が確認された(図 4c)。

また、ラット毛包幹細胞由来心筋細胞は、Phalloidin-iFluor™ 488 標識でアクチンフィラメントが染色され、サルコメア構造が可視化された(図 4d)。

### 3-3. 各培養条件下での心筋細胞分化率の比較

コントロール群、イソプロテレノール単独群、4 種添加群の心筋細胞率を、Image J を用いて比較した。ラット毛包幹細胞由来の抗 cTnI 抗体陽性心筋細胞率は、コントロール群  $3.01 \pm 2.6\%$ 、イソプロテレノール単独群  $12.84 \pm 7.9\%$ 、4 種添加群  $11.35 \pm 6.4\%$  であった(図 5a)。ラット毛包幹細胞由来心筋細胞の分化率は、コントロール群と比較し、イソプロテレノール単独群と 4 種添加群で有意に増加していた( $p = 0.01$ ,  $p = 0.008$ ) (図 5b)。抗 cTnI 抗体陽性心筋細胞の長さは、コントロール群  $1266.5 \pm 397 \mu\text{m}$ 、イソプロテレノール単独群  $1642.3 \pm 401 \mu\text{m}$ 、4 種添加群  $1646.8 \pm 257 \mu\text{m}$  であり(図 5c)、コントロール群と比較し、イソプロテレノール単独群と 4 種添加群で有意に長かった( $p = 0.03$ ,  $p = 0.01$ ) (図 5d)。

次に、ウエスタンブロッティングで $\alpha$ -アクチニン 2( $\alpha$ -actinin 2)及び cTnI の発現量を解析した。発現量は、GAPDH の発現量で標準化した。 $\alpha$ -actinin 2 / GAPDH と

cTnI / GAPDH 発現量は、それぞれ、コントロール群  $1.00 \pm 0.0$ 、 $1.00 \pm 0.0$ 、イソプロテレノール単独群  $17.3 \pm 14.5$ 、 $1.79 \pm 0.3$ 、4 種添加群  $7.75 \pm 6.5$ 、 $1.52 \pm 0.3$  であった。GAPDH で標準化された  $\alpha$ -actinin 2 及び cTnI の発現量は、コントロール群と比較し、イソプロテレノール単独群 ( $p = 0.02$ ,  $p = 0.0007$ ) と 4 種添加群 ( $p = 0.03$ ,  $p = 0.01$ ) で有意に増加していた(図 5e)。

#### 3-4. ラット毛包幹細胞由来心筋シート作成

ラット上唇髭毛包上部を、isoproterenol、activin A、BMP4、bFGF の4種を添加し、培養した。ラット上唇髭毛包周囲に徐々に細胞が分化、増殖し、培養6日には心筋細胞の拍動が確認できた。培養11日目には毛包間に多数の心筋細胞を認め、培養14日目に、毛包間に長い心筋線維が架橋する拍動する心筋シートが観察できた(図6a)。次に、毛包間隔別の心筋シート形成率を、培養28日目に評価した。それぞれのシート形成率は、毛包間隔 1.5 mm で  $100 \pm 0 \%$  ( $n = 9/9$ )、毛包間隔 2.0 mm で  $90.0 \pm 14 \%$  ( $n = 9/10$ )、毛包間隔 2.5 mm で  $75.0 \pm 25 \%$  ( $n = 9/12$ )、毛包間隔 3.0 mm で  $66.7 \pm 33 \%$  ( $n = 6/9$ ) であった。シート形成に要した日数は、毛包間隔 1.5 mm で  $14.3 \pm 3.6$  日、毛包間隔 2.0 mm で  $17.3 \pm 2.4$  日、毛包間隔 2.5 mm で  $19.1 \pm 3.9$  日、毛包間隔 3.0 mm で  $22.7 \pm 2.7$  日であった(図6b)。実験は繰り返し3回行った。

移植などの臨床応用には、簡単に回収できるシートが適しているため、培養皿全体ではなく、心筋シートに含まれる心筋細胞に注目した。拍動する心筋シートの免疫染色像(図6c, d)から、心筋シート内に抗cTnI抗体陽性心筋細胞が平均  $24.3 \pm 12.2 \%$  分布していることが示された。実験は繰り返し4回行った。

さらに、毛包間隔別の心筋シート面積を評価した(図6e)。それぞれの毛包間隔で形成された心筋シート面積は、毛包間隔 1.5 mm で  $3.1 \pm 2.1 \text{ mm}^2$  ( $n = 3$ )、2.0 mm で  $21.2 \pm 6.9 \text{ mm}^2$  ( $n = 5$ )、2.5 mm で  $15.6 \pm 7.6 \text{ mm}^2$  ( $n = 4$ ) であった。毛包間隔 2.0 mm お

よび 2.5 mmの心筋シート面積は、1.5 mmの心筋シートと比較し、有意に大きかった( $p = 0.0052$ ,  $p = 0.04$ )(図6f)。

長い心筋線維を持つ拍動する心筋細胞シートは、コラーゲンコートされていない 27 mmガラスボトム未処理培養皿や、35 mm ポリスチレン未処理培養皿では形成されなかった。さらに、イソプロテレノール単独群では形成されず、isoproterenol、activin A、BMP4、bFGFの4種添加群でのみ形成された。よって、心筋シートは、コラーゲンコート培養皿上で、10 % FBS DMEM培養のラット毛包幹細胞にisoproterenol、activin A、BMP4、bFGFの4種を添加することによってのみ形成された。

### 3-5. ラット毛包幹細胞由来心房筋・心室筋細胞の分化確認

コントロール群、心房筋誘導群、心室筋誘導群の各培養条件で分化誘導したラット毛包幹細胞由来の細胞を、抗心筋細胞特異的抗体で免疫染色した。コントロール群の心筋細胞は、抗 cTnI 抗体と抗 cTnT 抗体陽性であり、全体に占める心筋細胞の割合は、 $cTnI / DAPI = 17.9 \pm 3.4\%$ であった。抗心房筋細胞特異的ミオシン軽鎖 2a (myosin light chain 2a (MLC2a))抗体と、抗心室筋細胞特異的ミオシン軽鎖 2v myosin light chain 2v (MLC2v))抗体は陰性だった(図 7a)。一方で、心房筋誘導群の心筋細胞は、抗 cTnI 抗体と抗 MLC2a 抗体陽性であり(図 7b)、全体に占める心筋細胞の割合は  $cTnI / DAPI = 23.4 \pm 8.9\%$ 、心筋細胞のうち心房筋細胞の占める割合は  $MLC2a / cTnI = 96.6 \pm 1.4\%$ であった。また、心室筋誘導群の心筋細胞は、抗 cTnT 抗体と抗 MLC2v 抗体陽性であり(図 7c)、全体に占める心筋細胞の割合は  $cTnT / DAPI = 6.6 \pm 1.4\%$ 、心筋細胞のうち心室筋細胞の占める割合は  $MLC2v / cTnT = 83.3 \pm 11.3\%$ であった。

リアルタイム RT-PCR で解析した *GAPDH* に対する *MLC2a* の発現量は、コントロール群で  $1.1 \pm 0.4$ 、心房筋誘導群で  $2.6 \pm 0.9$  であり、コントロール群と比較し、



心房筋誘導群で有意に増加していた(図 7d) ( $p = 0.02$ )。また、*GAPDH*に対する *MLC2v* の発現量は、コントロール群で  $1.0 \pm 0.1$ 、心室筋誘導群で  $2.6 \pm 0.9$  であり、コントロール群と比較し、心室筋誘導群で有意に増加していた ( $p = 0.002$ ) (図 7e)。

### 3-6. ラット毛包幹細胞由来心房筋・心室筋細胞の形態的特徴

ラット毛包幹細胞由来心房筋・心室筋細胞は、抗 cTnT 抗体陽性アクチンフィラメントと、抗 *MLC2a / 2v* 抗体陽性ミオシンフィラメントから成るサルコメア構造を形成していた(図 8a)。加えて、ラット毛包幹細胞由来心室筋は抗  $\beta$ -catenin 抗体陽性の介在板を有していた(図 8b)。

透過型電子顕微鏡では、コントロール群の心筋細胞は筋原線維を含んでいたが、明確な配列がなく、不規則な構造だった(図8c, d)。一方、心房筋・心室筋細胞は組織化されたZ帯、A帯、I帯、H帯、M帯を有する規則的なサルコメア構造を認めた(図8e, f)。さらに、心室筋細胞ではT管様構造も確認できた(図8g, h)。

### 3-7. ラット毛包幹細胞由来心房筋・心室筋細胞の機能的特徴

各培養条件下のラット毛包幹細胞由来心筋細胞はいずれも自発的な拍動を認め、カルシウムイメージングでは、拍動に合わせて細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が変化した。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化の波形は、コントロール群の心筋細胞では不規則な波形を示した(図 9a)。一方、心房筋・心室筋細胞においては、それぞれ特徴的な波形が見られた。心房筋細胞は、脱分極後に速やかに再分極相に移行し、心室筋よりも高い頻度で活動を示した(図 9b)。心室筋細胞は、急速な活動電位のアップストロークを有し、心房筋細胞に比べゆるやかに再分極相に向かった(図 9c)。心房筋・心室筋細胞は、コントロール群の心筋細胞と比較し、活動電位の持続時間のばらつき( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ) (図 9d, e)、活動電位の大きさのばらつき( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ) (図 9f, g)、静止膜電位のばらつき ( $p$

= 0.002,  $p = 0.001$ ) (図 9h, i)が有意に小さく、規則的な活動を示した。

#### 4. 考察

本研究では、はじめにラット毛包幹細胞が多分化能を持つことを証明し、ラット毛包幹細胞由来心筋細胞の臨床応用への可能性を検討した。

ラット毛包幹細胞由来心筋細胞は、サルコメア構造を有しており、自発的な拍動を認め、isoproterenol と propranolol 添加による薬剤応答を示したことから、 $\beta$ 受容体の存在が確認できた。また、カルシウムイメージングから、ラット毛包幹細胞由来心筋細胞の拍動が、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存的に生じていることが示唆された。以上の特徴は成体心筋細胞と共通していた。

成体心筋細胞は、長い心筋線維を有し、隣り合う心筋線維が機能的合胞体として収縮し、全身に効率よく血液を運搬している。しかし、Embryonic stem cells (ESC) や induced pluripotent stem cells (iPSC)由来心筋細胞は紡錘形や星形の細胞であり、成体心筋のように長い心筋線維は構築していない。それに対し、ラット毛包幹細胞由来心筋細胞は、10% FBS DMEM のみの培養でも、心筋線維を形成する性質を持っていた。そこで我々は、より成体に近い、長い心筋線維を誘導できる培養条件を検討したところ、コントロール群と比較し、isoproterenol 単独群と、isoproterenol、activin A、BMP4、bFGF の 4 種添加群から、より長い心筋線維を誘導することに成功した。さらに、コラーゲンコートされた培養皿上で、4 種を添加し培養したところ、長い心筋線維を有する拍動する心筋シートの培養が可能であった。一方、ラット毛包幹細胞由来心筋細胞は、コラーゲンコートのない培養皿上ではシート様構造を形成しなかった。黒津ら[17]は、成体心筋と類似した柔らかいマトリクス上で、心筋細胞を効率よく誘導できることを証明している。さらに三井ら[18-20]は、Gelform®という生体環境に似たスポンジゲルマトリクス上でマウス毛包幹細胞を培養すると、坐骨神経細胞が効



率よく誘導できることを証明している。これらの研究から、幹細胞の分化誘導は、細胞が置かれるマトリクスの材質に大きく影響されることが分かる。今回、コラーゲンコートされた培養皿上でのみ、心筋シートが形成されたことは、細胞外基質であるコラーゲンが足場として機能し、シート形成に関与したものと考えた。

また、毛包間隔別のシート形成率とシート面積を考慮すると、毛包間隔 **2 mm** が最も効率的であると考えた。

本研究結果から、ラット毛包幹細胞由来心筋細胞は、ESC や iPSC 由来心筋細胞と比較し、成体心筋により近い構造を持つという特徴が確認できた。また、機能的合胞体を含むシート様構造の作成に成功したことにより、長い心筋線維の形状を維持しながら、心臓移植などの臨床応用へ繋げる研究の基盤を整えることに成功した。

次に、我々は、より分化したサブタイプ別の心筋細胞である心房筋・心室筋細胞に着目した。ESC や iPSC では、すでにサブタイプ別の心筋細胞を分化誘導するプロトコルがいくつか公開されている。Yan ら[21]は ESC に、藤原ら[22]は iPSC に CSA を添加することで、心筋細胞および心筋前駆細胞の分化効率が向上することを報告している。本研究では、ラット毛包幹細胞に isoproterenol、activin A、BMP4、bFGF、CSA の 5 種を添加し、培養することで、心房筋細胞の選択的分化誘導に成功した。このことから、ラット毛包幹細胞は、心房筋細胞に分化しやすい傾向にある可能性が示唆された。Lee ら[23]は、心臓の左室と右室の分化に影響を与える Wnt シグナル阻害剤 2 (inhibitor of Wnt production-2 (IWP2)) および血管新生や血管形成を促進する VEGF を添加することで iPSC から心室筋細胞を分化誘導した。本研究では、ラット毛包幹細胞に IWP4 および VEGF を添加し、培養することで、心室筋細胞の選択的分化誘導に成功した。

ラット毛包幹細胞由来心房筋・心室筋細胞は、透過型電子顕微鏡像、免疫染色像で規則的なサルコメア構造を有していることが確認でき、隣り合う心筋線維が、機能

的合胞体として拍動していた。心室筋細胞は、 $\beta$ -catenin 陽性の介在板を有し、T 管様構造も確認できた。カルシウムイメージングでは、心房筋・心室筋細胞に特徴的な波形[24-26]を示しており、コントロール群と比較し、規則的な安定した活動を示していた。

毛包幹細胞は外胚葉である皮膚毛包に存在する幹細胞であるが、中胚葉である血管内皮細胞や心筋細胞にも、10% FBS DMEM のみの単純な培養で分化が可能なことを、マウスやヒトで既に証明している[6, 7]。これらの結果は、ヒト毛包幹細胞由来の心筋シート作成、心房筋・心室筋細胞の分化誘導に高い可能性を示している。

## 5. 総括

ラット毛包幹細胞から、長い心筋線維を有する拍動する心筋シートの作成と、サブタイプ別の心筋(心房筋・心室筋細胞)の分化誘導方法の確立に成功した。成体幹細胞由来心筋細胞の分化誘導は報告が少なく、非常に新規性が高い研究結果であるといえる。

成体幹細胞である毛包幹細胞は、ESC や iPSC の抱える倫理面や拒絶反応の問題を考慮する必要がなく、腫瘍化のリスクも非常に低い。また、凍結保存や自家移植が可能なことから、臨床応用の可能性が高い。これらの優れた性質から、毛包幹細胞を用いた再生医療研究は、独創性・実現性が非常に高いと考える。

今回の研究成果により、心筋シートを用いた心臓移植や、心筋サブタイプ別の心毒性スクリーニング、創薬に関わる研究の促進が期待でき、毛包幹細胞の臨床応用への実現性がより一層高まった。

## 6. 今後の課題

毛包幹細胞由来心筋シートの自家移植実験を行い、シート生着率を評価する必要がある。

ある。また、ラット毛包幹細胞由来心筋シートは、成体心筋に似た長い心筋線維を有しているが、シートの保有する心筋量は、ESC / iPSC 由来心筋シートと比較して少ないため、シートの有する心筋長・心筋量と、移植後の機能改善率にどのような相関があるかを評価する必要がある。

サブタイプ別心筋細胞に関しては、介在板が心房筋細胞では確認できず、心室筋細胞では確認できるものの、成体心筋や ESC / iPSC 由来心筋細胞に比較し、数が少なかった。しかしどちらも機能的合胞体として規則的な収縮を認め、カルシウムイメージングにおいても、特徴的な波形を示していた。以上のことから、介在板を介さず、隣接する心筋細胞間で脱分極が円滑に伝達されるメカニズムが存在する可能性が考えられ、パッチクランプなどを用いたより詳しい活動電位発生機序の解析が必要と考える。

## 7. 謝辞

本研究を進めるにあたりご指導いただきました、北里大学大学院医療系研究科皮膚科学 天羽康之教授に感謝申し上げます。また、ご支援ご協力いただきました北里大学医学部皮膚科学教室の諸先生方、ならびに、北里大学の諸先生方に深謝いたします。そして日々の実験および解析において多くのご助力をいただきました、北里大学医学部皮膚科学技術員 浜田祐子様、荒川伸子様、ならびに、皮膚科学技術員の皆様に、厚く御礼申し上げます。最後に、この研究にご支援いただきました、北里大学医学部けやき会の皆様、北里大学大学院医療系研究科院生プロジェクトの皆様、株式会社エスアールエルの皆様に、心より御礼申し上げます。

## 8. 引用文献

1. Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM. Multipotent

- nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:5530-4.
2. Hoffman RM. The Pluripotency of Hair Follicle Stem Cells. Cell Cycle 2006;5:232-3.
  3. Amoh Y, Kanoh M, Niiyama S, Kawahara K, Satoh Y, Katsuoka K, et al. Human and mouse hair follicles contain both multipotent and monopotent stem cells. Cell Cycle 2009;8:176-7.
  4. Amoh Y, Mii S, Aki R, Hamada Y, Kawahara K, Hoffman RM, et al. Multipotent nestin-expressing stem cells capable of forming neurons are located in the upper, middle and lower part of the vibrissa hair follicle. Cell Cycle 2012;11:3513-7.
  5. Yashiro M, Mii S, Aki R, Hamada Y, Arakawa N, Hoffman RM, et al. From hair to heart: nestin-expressing hair follicle associated pluripotent (HAP) stem cells differentiate to beating cardiac muscle cells. Cell Cycle 2015; 14: 2362-6.
  6. Obara K, Tohgi N, Mii S, Hamada Y, Arakawa N, Aki R, et al.  
Hair-follicle-associated pluripotent stem cells derived from cryopreserved intact human hair follicles sustain multilineage differentiation potential. Sci Rep 2019;9:9326.
  7. Tohgi N, Obara K, Yashiro M, Hamada Y, Arakawa N, Mii S, et al. Human hair-follicle associated pluripotent (hHAP) stem cells differentiate to cardiac-muscle cells. Cell Cycle 2016;16:95-9.
  8. Amoh Y, Li L, Campillo R, Kawahara K, Katsuoka K, Penman S, et al.  
Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:17734-8.



9. Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Hoffman RM. Multipotent hair follicle stem cells promote repair of spinal cord injury and recovery of walking function. *Cell Cycle* 2008;7:1865-9.
10. Obara K, Tohgi N, Shirai K, Mii S, Hamada Y, Arakawa N, et al. Hair-Follicle-Associated Pluripotent (HAP) Stem Cells Encapsulated on Polyvinylidene Fluoride Membranes (PFM) Promote Functional Recovery from Spinal Cord Injury. *Stem Cell Rev and Rep* 2019;15:59–66.
11. Obara K, Shirai K, Hamada Y, Arakawa N, Yamane M, Takaoka N, et al. Chronic spinal cord injury functionally repaired by direct implantation of encapsulated hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells in a mouse model: Potential for clinical regenerative medicine. *PLoS One* 2022;17:e0262755.
12. Obara K, Shirai K, Hamada Y, Arakawa N, Hasegawa A, Takaoka N, et al. Direct implantation of hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells repairs intracerebral hemorrhage and reduces neuroinflammation in mouse model. *PLOS ONE* 2023;18:e0280304.
13. Yamane M, Takaoka N, Obara K, Shirai K, Aki R, Hamada Y, et al. Hair-Follicle-Associated Pluripotent (HAP) Stem Cells Can Extensively Differentiate to Tyrosine-Hydroxylase-Expressing Dopamine-Secreting Neurons. *Cells* 2021; 10:864.
14. Yamazaki A, Yashiro M, Mii S, Aki R, Hamada Y, Arakawa N, et al. Isoproterenol directs hair follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells to differentiate in vitro to cardiac muscle cells which can be induced to form beating heart-muscle tissue sheets. *Cell Cycle* 2016;15:760–5.

15. Obara K, Reynoso J, Hamada Y, Aoki Y, Kubota Y, Masaki N, et al. Hair follicle associated pluripotent (HAP) stem cells jump from transplanted whiskers to pelage follicles and stimulate hair growth. *Sci Rep* 2022;12:21174.
16. Kajiura S, Mii S, Aki R, Hamada Y, Arakawa N, Kawahara K, et al. Cryopreservation of the Hair Follicle Maintains Pluripotency of Nestin-Expressing Hair Follicle-Associated Pluripotent Stem Cells. *Tissue Eng Part C Methods* 2015;21:825–31.
17. Kurotsu S, Sadahiro T, Fujita R, Tani H, Yamakawa H, Tamura F, et al. Soft Matrix Promotes Cardiac Reprogramming via Inhibition of YAP/TAZ and Suppression of Fibroblast Signatures. *Stem Cell Reports* 2020;15:612– 628.
18. Mii S, Uehara F, Yano S, Tran B, Miwa S, Hiroshima Y, et al. Nestin-Expressing Stem Cells Promote Nerve Growth in Long-Term 3-Dimensional Gelfoam®-Supported Histoculture. *PLOS ONE* 2013;8:e67153.
19. Mii S, Duong J, Tome Y, Uchugonova A, Liu F, Amoh Y, et al. The role of hair follicle nestin-expressing stem cells during whisker sensory-nerve growth in long-term 3D culture. *Journal of Cellular Biochemistry* 2013;114:1674–84.
20. Mii S, Duong J, Tome Y, Uchugonova A, Liu F, Amoh Y, et al. Nestin-Expressing Hair-Follicle-Associated Pluripotent (HAP) Stem Cells Promote Whisker Sensory-Nerve Growth in Long-Term 3D-Gelfoam® Histoculture. *Methods Mol Biol* 2016;1453:39–47.
21. Yan P, Nagasawa A, Uosaki H, Sugimoto A, Yamamizu K, Teranishi M, et al. Cyclosporin-A potently induces highly cardiogenic progenitors from



embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;379: 115-120.

22. Fujiwara M, Yan P, Otsuji TG, Narazaki G, Uosaki H, Fukushima H, et al. Induction and Enhancement of Cardiac Cell Differentiation from Mouse and Human Induced Pluripotent Stem Cells with Cyclosporin-A. *PLoS ONE* 2011;6: e16734.
  23. Lee JH, Protze SI, Laksman Z, Backx PH, Keller GM. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Atrial and Ventricular Cardiomyocytes Develop from Distinct Mesoderm Populations. *Cell Stem Cell*. 2017;21:179-194.e4.
  24. Cyganek L, Tiburcy M, Sekeres K, Gerstenberg K, Bohnenberger H, Lenz C, et al. Deep phenotyping of human induced pluripotent stem cell-derived atrial and ventricular cardiomyocytes. *JCI Insight* 2018;3: e99941.
  25. Fukushima H, Yoshioka M, Kawatou M, López-Dávila V, Takeda M, Kanda Y, et al. Specific induction and long-term maintenance of high purity ventricular cardiomyocytes from human induced pluripotent stem cells. *PLOS ONE* 2020;15: e0241287.
  26. Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, Koonce CH, Yu J, Palecek SP, et al. Functional Cardiomyocytes Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Circ Res* 2009;104: e30-41.
9. 業績目録
1. Takaoka N, Yamane M, Hasegawa A, Obara K, Shirai K, Aki R, Hatakeyama H, Hamada Y, Arakawa N, Tanaka M, Hoffman RM., Amoh Y. Rat hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells can differentiate into atrial or ventricular cardiomyocytes in culture controlled by specific

supplementation. PLoS One. 19(1):e0297443,2024.

2. Obara K, Shirai K, Hamada Y, Arakawa N, Hasegawa A, Takaoka N, Aki R, Hoffman RM., Amoh Y. Direct implantation of hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells repairs intracerebral hemorrhage and reduces neuroinflammation in mouse model. PLoS One. 18(1):e0280304, 2023.
3. Obara K, Shirai K, Hamada Y, Arakawa N, Yamane M, Takaoka N, Aki R, Hoffman RM., Amoh Y. Chronic spinal cord injury functionally repaired by direct implantation of encapsulated hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells in a mouse model: Potential for clinical regenerative medicine. PLoS One. 17(1): e0262755, 2022.
4. Takaoka N, Yamane M, Obara K, Shirai K, Aki R, Hamada Y, Arakawa N, Hoffman RM., Amoh Y. Hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells differentiate into mature beating cardiomyocyte sheets on flexible substrates in vitro. Med Mol Morphol. 55(3):248-257,2022.
5. 金淵優樹, 樋口奈那子, 中野敏明, 新井達, 上出良一: レボフロキサシン水和物内服により感作されたと考えられたレボフロキサシン水和物点眼による多形滲出性紅斑. 皮膚科の臨床, 64(13): 2133-2136, 2022.
6. Yamane M, Takaoka N, Obara K, Shirai K, Aki R, Hamada Y, Arakawa N, Hoffman RM., and Amoh Y. Hair-Follicle-Associated Pluripotent (HAP) Stem Cells Can Extensively Differentiate to Tyrosine-Hydroxylase-Expressing Dopamine-Secreting Neurons. Cells. 10(4):864-871, 2021.
7. 飼沼実優, 増澤真実子, 高岡奈那子, 白井京美, 早田格, 柳澤宏人, 天羽康之: 頭部血管肉腫局所再発例に対するドキソルビシン単独療法 日本皮膚科学会雑誌. 131(12): 2589-2593, 2021.

8. 高岡奈那子, 中野敏明, 新井達, 上出良一: メトトレキサートを含む多剤併用が有効であった, 小児に生じた Generalized morphea 皮膚病診療. 43(3):248-251, 2021.
9. 樋口奈那子, 津村協子, 中野敏明, 新井達, 丸山隆児: 病巣感染の治療で軽快した乳児汎発性膿疱性乾癬の1例. 皮膚病診療, 61(12):1877-1882,2019.
10. 金淵優樹, 樋口奈那子, 津村協子, 中野敏明, 新井達: 水疱性エリテマトーデスの1例. 皮膚科の臨床, 61(7):1131-1135, 2019.
11. 樋口奈那子, 新井達, 松下一仁: 陰茎に生じた硬化性萎縮性苔癬. 皮膚病診療, 40(10):991-994,2018.
12. 樋口奈那子, 新井達: 全身性エリテマトーデス. Visual Dermatology, 17(6):553-555,2018.
13. 樋口奈那子, 金淵優樹, 百瀬葉子, 中野敏明, 新井達, 大竹尚之, 鈴木高祐: 疣贅状表皮発育異常症. 皮膚病診療, 40(2):157-160,2018.
14. 樋口奈那子, 屋代未佳, 朱膳寺典子, 三井純雪, 児玉華子, 天羽 康之: 分枝状皮斑を呈した顕微鏡的多発血管炎の1例. 皮膚科の臨床, 59(5):554-558, 2017.

10. 図表

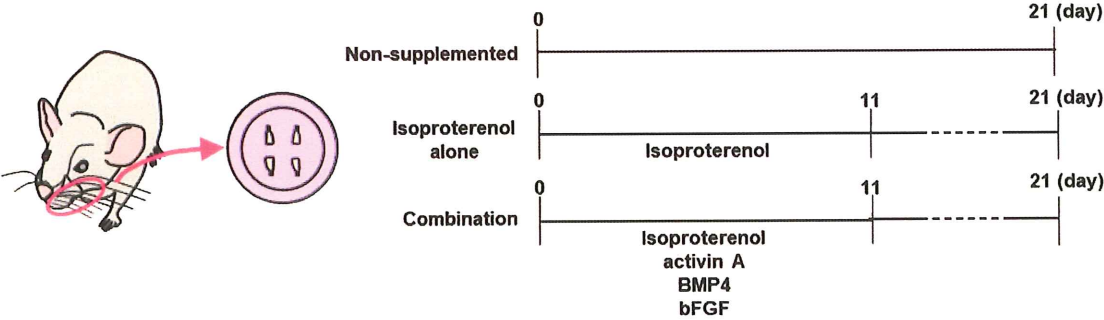


図 1 ラット毛包幹細胞の培養条件の検討

毛包幹細胞を含むラット上唇髭毛包上部の培養スケジュール。

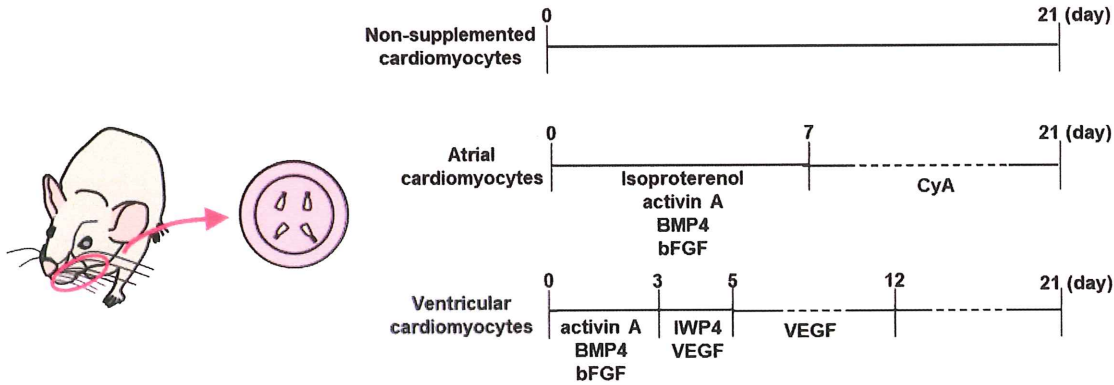


図 2 ラット毛包幹細胞由来心房筋・心室筋細胞の分化誘導方法

毛包幹細胞を含むラット上唇髭毛包上部の培養スケジュール。



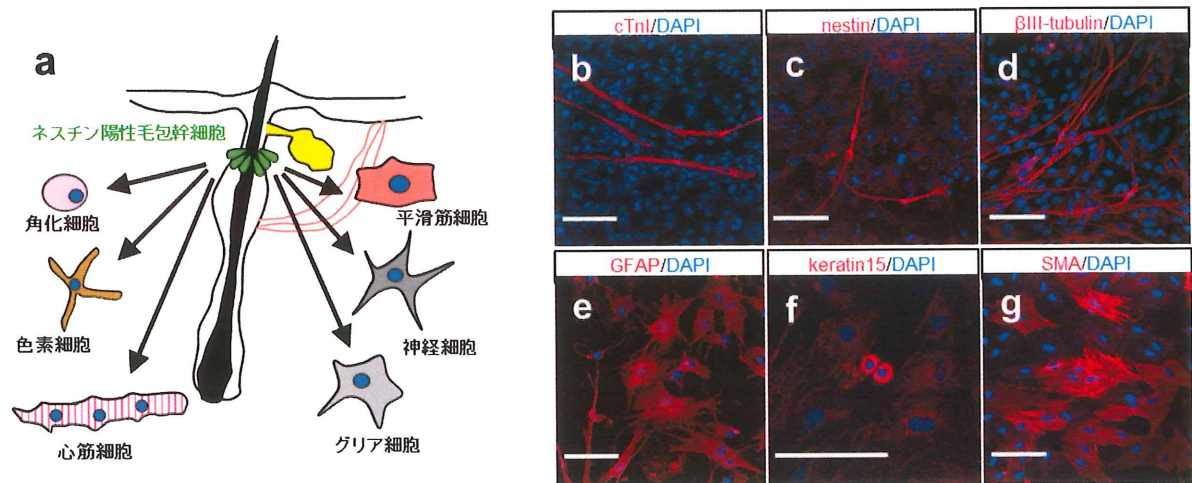


図3 ラット毛包幹細胞の多分化能確認

(a) ラット毛包幹細胞から分化誘導した細胞の概略図。

(b-g) 28日間培養後のラット毛包幹細胞由来細胞の免疫染色像。

ラット毛包幹細胞は、(b)cTnI 陽性心筋細胞、(c)nestin 陽性神経細胞、(d)βIII-tubulin 陽性神経細胞、(e)GFAP 陽性グリア細胞、(f)keratin15 陽性角化細胞、(g) SMA 陽性平滑筋細胞への分化を示した。

核 ; DAPI (青)、スケールバー ; 100 μm

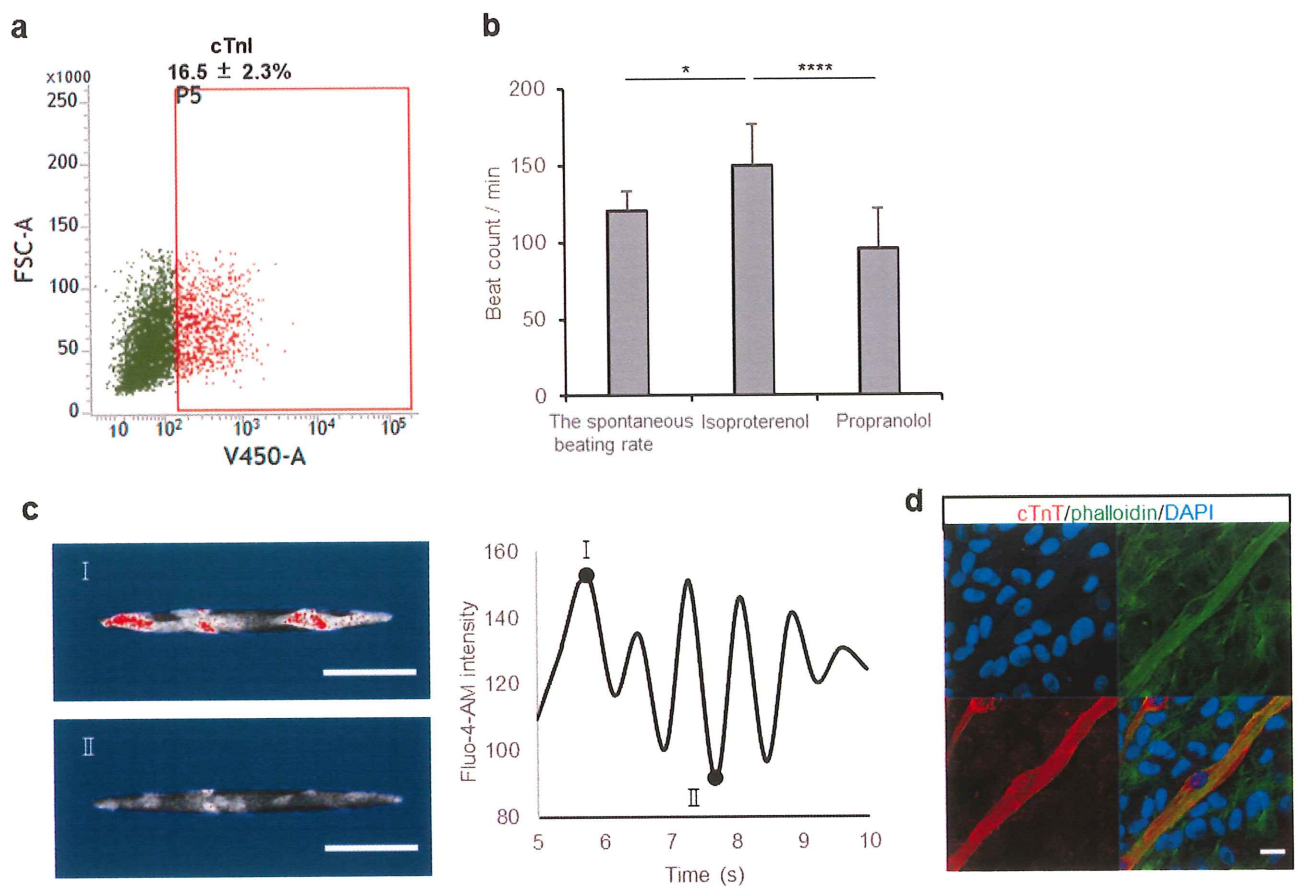


図 4 ラット毛包幹細胞由来心筋細胞の特徴

(a) フローサイトメトリーで測定した cTnI 陽性心筋細胞率。

(b) isoproterenol と propranolol 添加が、心筋細胞の拍動に及ぼす影響を、分散分析 (ANOVA) で解析した。\*  $p < 0.05$ 、\*\*\*\*  $p < 0.00005$ 。自発的な拍動の  $n = 8$ 、isoproterenol 添加後の  $n = 11$ 、isoproterenol 添加後の  $n = 11$ 。

(c) ラット毛包幹細胞由来心筋細胞のカルシウムイメージング。

Fluo-4-AM を負荷した心筋細胞の位相差画像 (左図)。スケールバー ; 100  $\mu\text{m}$

Fluo-4-AM の蛍光強度変化のグラフ (右図)。

画像は、グラフで示した I, II の 2 か所で撮影した。

(d) phalloidin-iFluor<sup>TM</sup>(緑)陽性、cTnT(赤)陽性心筋細胞。phalloidin-iFluor<sup>TM</sup> 染色では、Z 帯を含むサルコメア構造が確認できた。

核 ; DAPI (青)、スケールバー ; 20  $\mu\text{m}$

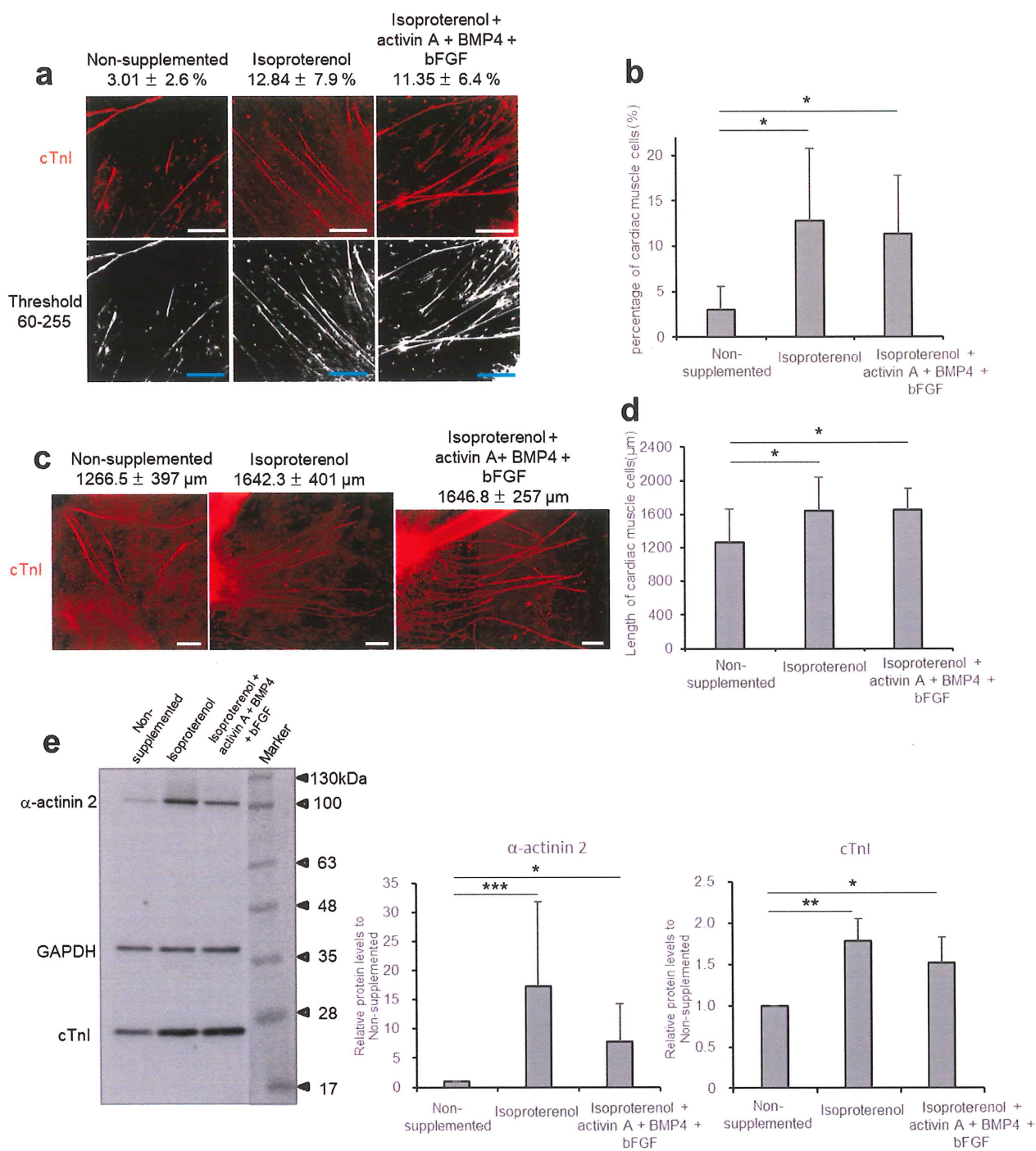


図5 ラット毛包幹細胞由来心筋細胞の培養条件の検討

(a) 各培養条件下の、培養 21 日目の cTnI 陽性心筋細胞率。

スケールバー ; 100 μm

(b) 各培養条件下の cTnI 陽性心筋細胞率の比較。

Welch T 検定で解析した。\*  $p < 0.05$ 。各培養条件の  $n = 8$ 。

(c) 各培養条件下の、培養 21 日目の cTnI 陽性心筋細胞の長さ。

スケールバー ; 200  $\mu\text{m}$

(d) 各培養条件下の cTnI 陽性心筋細胞の長さの比較。Student T 検定で解析した。

\*  $p < 0.05$ 。各培養条件の  $n = 12$ 。

(e) 各培養条件下の  $\alpha$ -actinin 2、cTnI の発現量を、ウェスタンブロッティングで測定し、Welch T 検定で解析した。発現量は GAPDH で標準化した。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.005$ 。

$\alpha$ -actinin 2 / GAPDH の  $n = 7$ 、 cTnI / GAPDH の  $n = 6$ 。



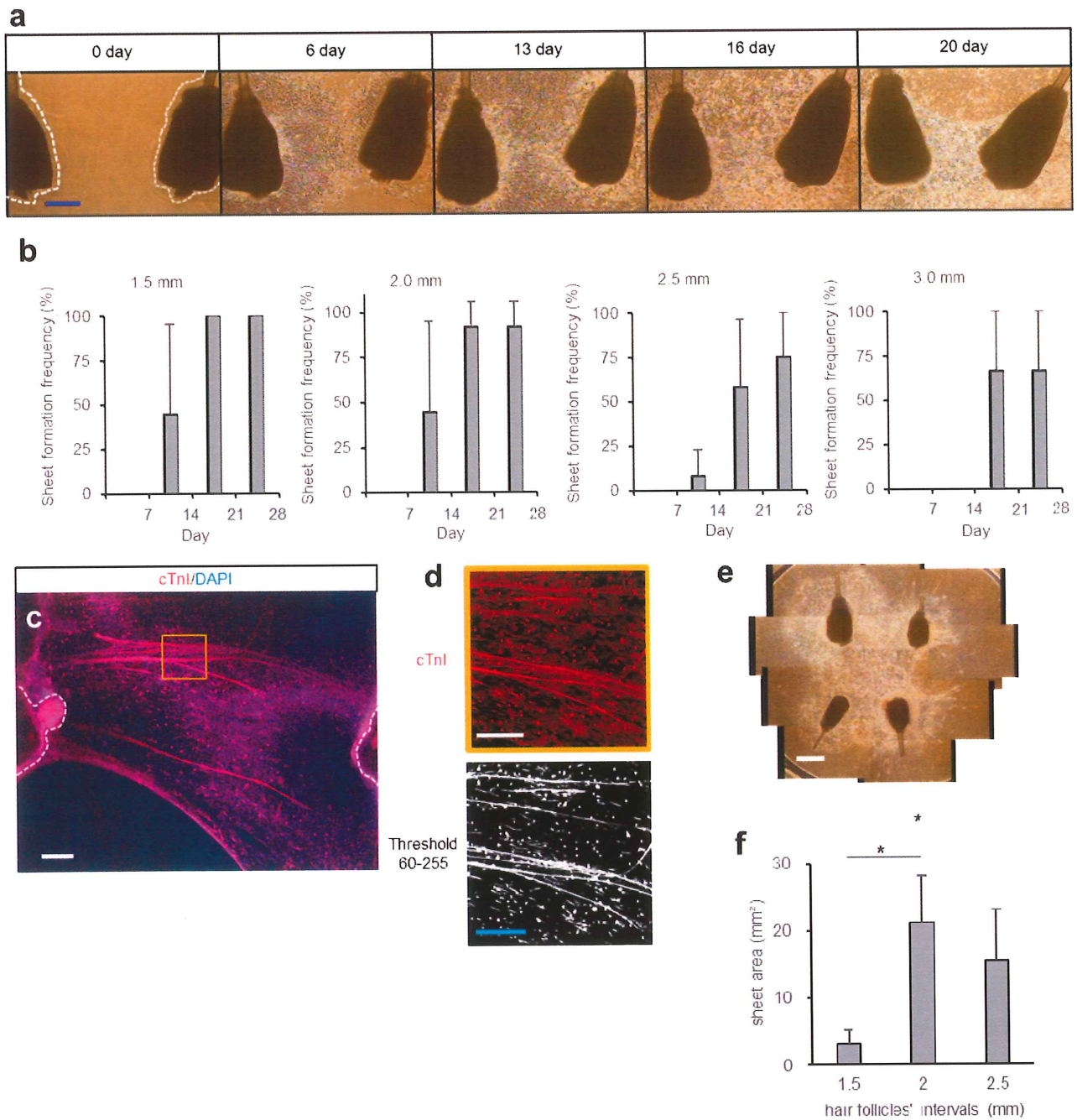


図 6 ラット毛包幹細胞由来心筋シートの作成

(a) ラット毛包幹細胞由来心筋シート形成までの経過の画像。

毛包間隔 2.5 mm。破線；ラット上唇髭毛包。スケールバー；500  $\mu$ m。

(b) 心筋シート形成率と、形成に要した日数。シート形成率は、培養 28 日目に評価した。心筋シート作成実験は 3 回行った。

(c) 培養 25 日目の心筋シートの免疫染色像。

シート内に cTnI 陽性の長い心筋線維が認められた。核；DAPI（青）、破線；ラット上唇髭毛包。スケールバー；500  $\mu\text{m}$

(d) (c)の枠線部分の拡大像。スケールバー；100  $\mu\text{m}$

(e) 心筋シートの全体画像。毛包間隔 2.0 mm。スケールバー；1 mm

(f) 各毛包間隔で形成されたシート面積。Student T 検定で解析した。\*  $p < 0.05$ 。

毛包間隔 1.5 mm の  $n = 3$ 、毛包間隔 2.0 mm の  $n = 5$ 、毛包間隔 2.5 mm の  $n = 4$ 。

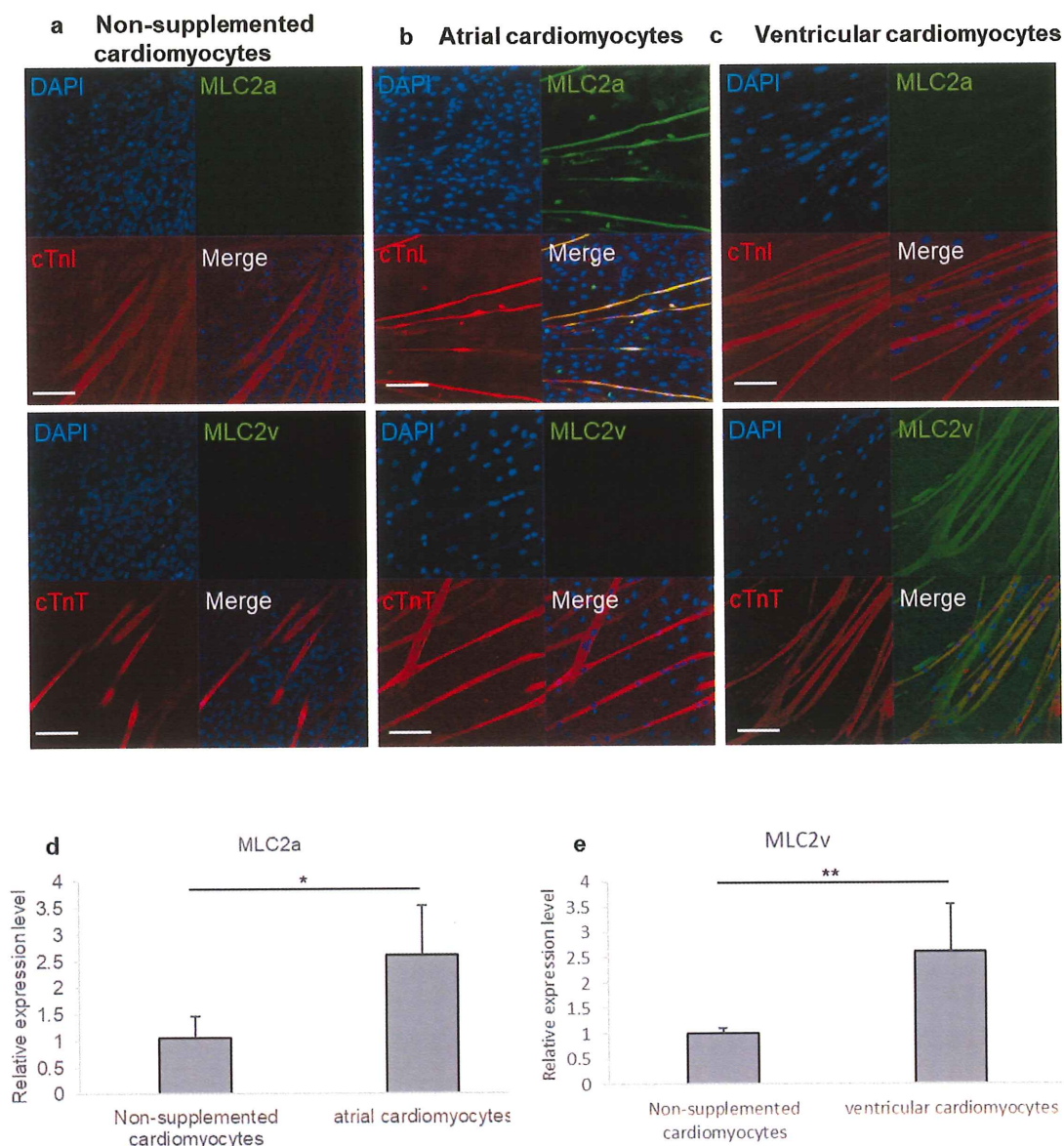




図 7 ラット毛包幹細胞由来心房筋・心室筋細胞の分化誘導

(a-c)ラット上唇毛包幹細胞を各種条件で 21 日間培養後の免疫染色像。

(a) cTnI (上段, 赤)、cTnT (下段, 赤)陽性 コントロール群心筋細胞

(b) cTnI (上段, 赤)、cTnT (下段, 赤)、MLC2a(上段, 緑)陽性 心房筋細胞

(c) cTnI (上段, 赤)、cTnT (下段, 赤)、MLC2v(下段, 緑)陽性 心室筋細胞

核 ; DAPI (青)、スケールバー ; 100  $\mu$ m。

(d-e) ラット毛包幹細胞由来心筋細胞のリアルタイム RT-PCR 解析結果。

MLC2a、MLC2v の発現量を、Student T 検定で解析した。

発現量は GAPDH で標準化した。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.005$ 。各培養条件の  $n = 4$ 。

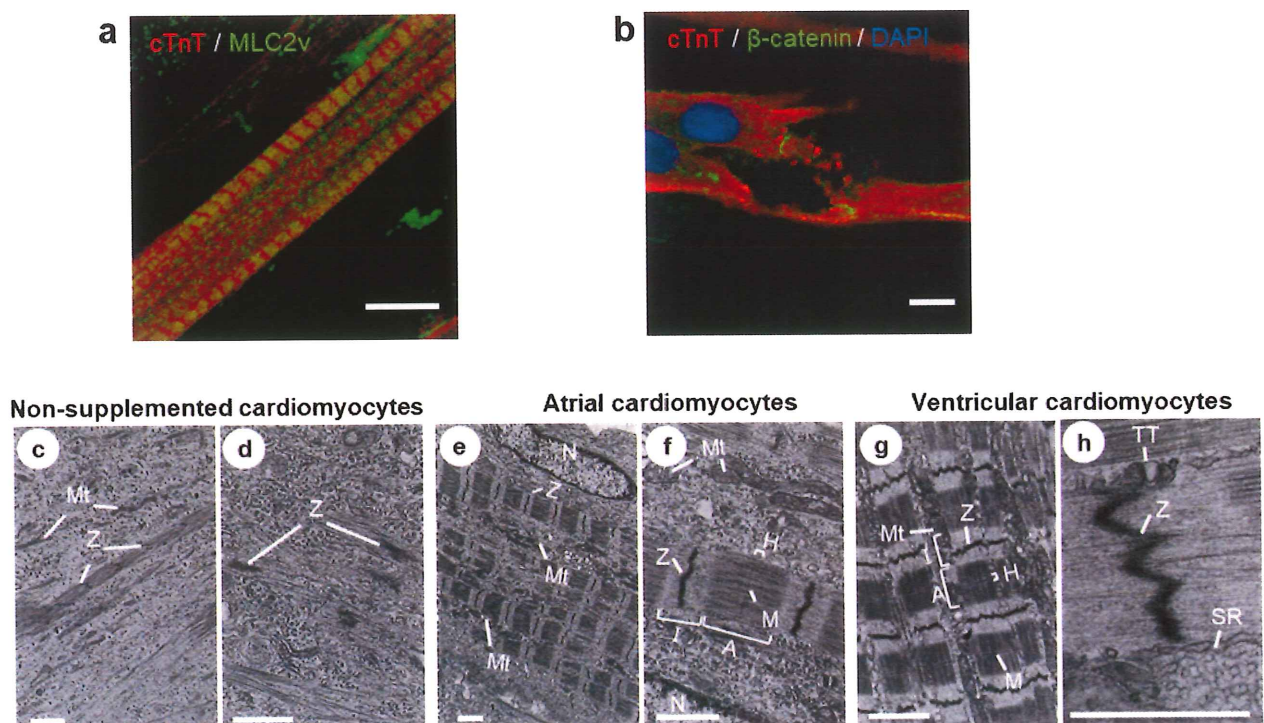


図 8 ラット毛包幹細胞由来心房筋・心室筋細胞の形態的特徴

(a, b) 心室筋細胞の免疫染色像

(a) cTnI(赤)と MLC2v(緑)陽性の二重染色像。I 帯に存在する cTnT と、A 帯に存在す

る MLC2v は交互に染色され、サルコメアの配列パターンを示した。スケールバー ; 10  $\mu\text{m}$ 。

(b) cTnI(赤)と $\beta$ -catenin (緑)陽性の二重染色像。核; DAPI (青)、スケールバー; 10  $\mu\text{m}$ 。

(c-h) 透過型電子顕微鏡像

(c, d) 非誘導心筋。Z 帯(Z)が散在する筋原線維と、小型のミトコンドリア(Mt)

(e-h) 心房筋及び心室筋。規則正しい Z 帯(Z)を有する筋原線維と、組織化された A 帯(A)、I 帯(I)、H 帯(H)、M 帯(M)。複雑な内部構造を持つ大きなミトコンドリア(Mt)。心室筋は T 管様構造(TT)と筋小胞体(SR)を有していた。

N ; 核。スケールバー ; (c, e, g) 2  $\mu\text{m}$ 、(d, f, h) 1  $\mu\text{m}$



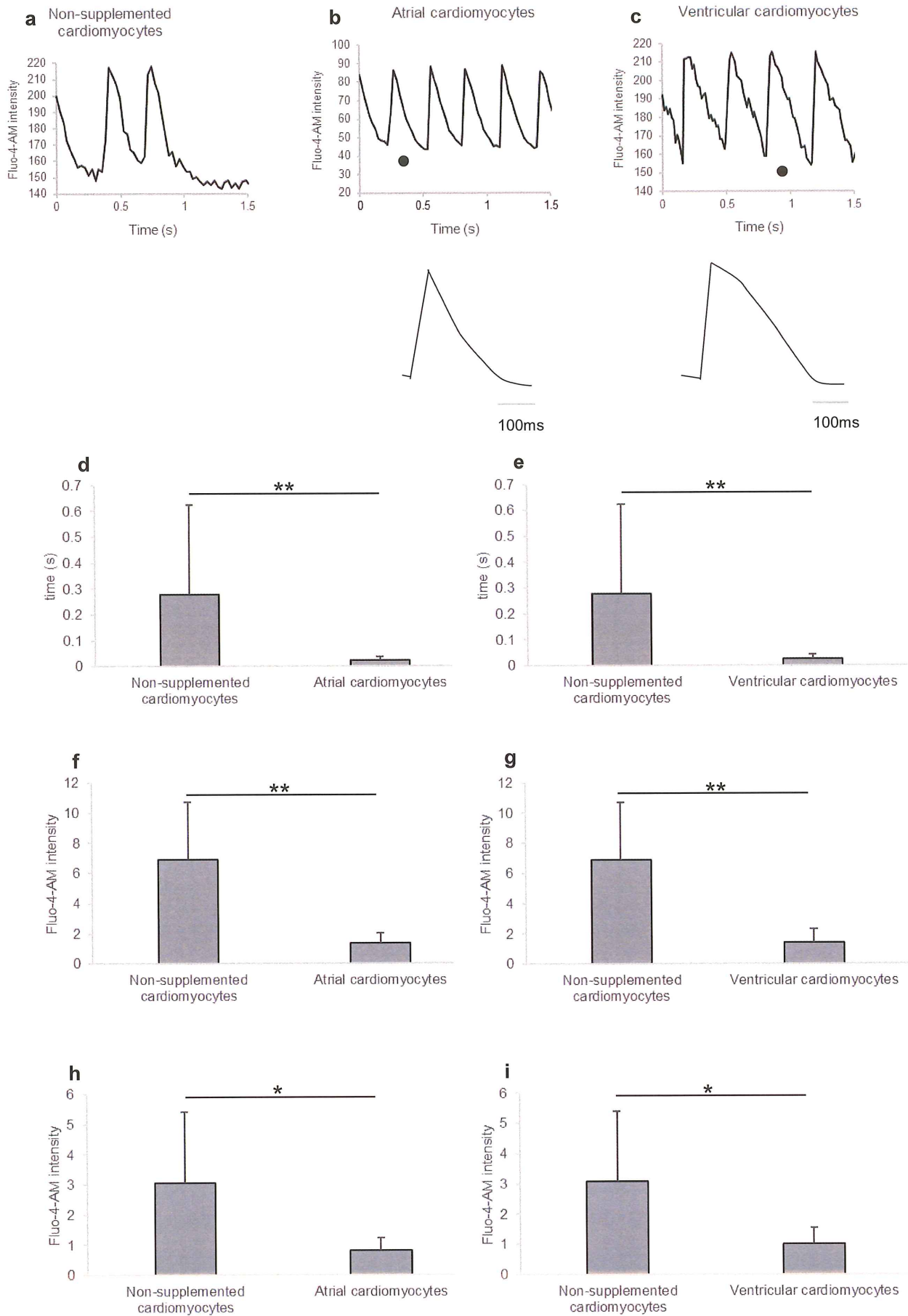


図9 ラット毛包幹細胞由来心筋細胞の  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性拍動の特徴

(a-c) 心筋細胞内 Fluo-4-AM の蛍光強度変化のグラフ。下段；上段(●)で示した波形の拡大。コントロール群心筋細胞  $n=5$ 、心房筋細胞  $n=3$ 、心室筋細胞  $n=3$ 。画像は 5msec 間隔で取得。

(a) コントロール群心筋細胞の不規則な活動。

(b) 心房筋細胞の代表的な波形。脱分極後に速やかに再分極相に移行し、心室筋細胞で観察されるよりも高い頻度で自発的な活動を示した。

(c) 心室筋細胞の代表的な波形。急速な活動電位のアップストロークを示し、心房筋と比較し、ゆるやかに再分極相へ移行した。

(d, e) 各心筋細胞の活動電位持続時間のばらつき。コントロール群：心筋細胞の拍動回数の標準偏差  $n=17$ 、心筋細胞の拍動回数  $n=51$ 。心房筋細胞：拍動回数の標準偏差  $n=25$ 、拍動回数  $n=75$ 。心室筋細胞：拍動回数の標準偏差  $n=27$ 、拍動回数  $n=81$ 。

Mann-Whitney U 検定で解析した。  $** p < 0.001$ 。

(f, g) 各心筋細胞の活動電位のばらつき。コントロール群：心筋細胞の拍動回数の標準偏差  $n=17$ 、心筋細胞の拍動回数  $n=51$ 。心房筋細胞：拍動回数の標準偏差  $n=25$ 、拍動回数  $n=75$ 。心室筋細胞：拍動回数の標準偏差  $n=27$ 、拍動回数  $n=81$ 。Welch T 検定で解析した。  $** p < 0.001$ 。

(h, i) 各心筋細胞の静止膜電位のばらつき。コントロール群：心筋細胞の拍動回数の標準偏差  $n=17$ 、心筋細胞の拍動回数  $n=51$ 。心房筋細胞：拍動回数の標準偏差  $n=27$ 、拍動回数  $n=81$ 。心室筋細胞：拍動回数の標準偏差  $n=27$ 、拍動回数  $n=81$ 。Welch T 検定で解析した。  $* p < 0.005$ 。

表 1 プライマー配列

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
<i>MLC2a</i>	AGG CCA TCC TGA GTG CTT TC	GTC AGG TCC ATG GGT GTC AG
<i>MLC2v</i>	CGC TGA AGG CCG ACT ATG T	TCG ATC TCT TCT TTG GAG AAC CTC
<i>GAPDH</i>	GCA TCT TCT TGT GCA GTG CC	GAT GGT GAT GGG TTT CCC GT