

学位論文

「ヒト毛包幹細胞 (hHAP stem cell) の心筋細胞への分化能」

指導教授名 天羽康之

申請者氏名 東儀那津子

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。

要旨

近年、幹細胞は生物の自己回復により組織の恒常性を保つために重要であることが明らかにされ、その利用は遺伝子治療、創傷治癒、臓器移植への幅広い応用につながっている。当教室の天羽らは、神経特異的な幹細胞マーカーであるネスチン遺伝子のプロモーターを用いた GFP 遺伝子導入トランスジェニックマウス (ND-GFP マウス) を用いて、毛包隆起部にネスチン陽性の毛包幹細胞が発現していることを明らかにした。さらに、この毛包幹細胞が、*in vitro* において神経細胞、グリア細胞、角化細胞、平滑筋細胞、色素細胞に分化することを明らかにした (Y. Amoh et al.: Proc Natl Acad Sci USA 102, p.5530-4, 2005)。この多分化能を有する毛包幹細胞を、我々は hair follicle-associated-pluripotent (HAP) stem cells と名付けた。我々は、マウスモデルにおいて、髭の毛包由来の幹細胞 (HAP stem cells) から分化誘導したシュワン細胞が、切断した末梢神経を修復することを明らかにした。さらに、脊髄損傷部においても、髭の毛包幹細胞から分化誘導したシュワン細胞により、損傷した脊髄神経が修復されることを明らかにした。これらの結果から、毛包幹細胞が末梢神経や脊髄神経損傷部の再生医療に応用できることが期待されている。さらに最近我々は、世界で初めて、マウスの毛包幹細胞から拍動する心筋シートを作製できることを明らかにした (A. Yamazaki et al. Cell Cycle 15, p.760-5, 2016)。これらの研究成果は、今後の毛包幹細胞を用いた、神経損傷部や心不全に対する再生医療への臨床応用の重要な礎となりうると考えられる。

今回我々は、ヒトの頭部毛包から分離した毛包幹細胞 (human HAP (hHAP) stem cells) を用いて、心筋細胞への分化能を検討した。対象は、北里大学病院皮膚科を受診した、頭部皮膚良性腫瘍の 5 人の成人患者であり、インフォームドコンセントを得た上で、腫瘍切除時の余剰検体からヒト頭皮標本を採取した。5 人の患者の年齢は 42-63 歳 (中央値 49.8 ± 8.7 歳)、男女比は 3 : 2 であった。毛包全体を分離するため双眼実体顕微鏡下でメスを用いて頭皮から毛髪を切り取り、毛包を 1 本ずつ切離した。頭皮の標本サンプルの大きさは 5 ミリ角であり、1 人の患者から 80 ± 26 本の毛包を分離した。分離した毛包全体から毛包幹細胞を含む毛包上部を分離し、10% ウシ胎仔血清 (FBS) を含む DMEM 培地で 4 週間培養した結果、毛包幹細胞が、神経細胞、グリア細胞、角化細胞、平滑筋細胞、さらに心筋細胞へ分化したことを抗ネスチン抗体、抗 β III チューブリン抗体、抗グリア線維性酸性タンパク (GFAP) 抗体、抗ケラチン 15 (K15) 抗体、抗平滑筋アクチン (SMA) 抗体、抗心筋トロポニン (cTnT) 抗体の免疫蛍光染色を用いて確認した。

そして、これらの分化した細胞を、FBS を含まない B27 含有の DMEM/F12 培地に移し basic fibroblast growth factor (bFGF) を加え、さらに 1 週間培養した結果、分化した細胞は多数のコロニーを形成した。形成されたコロニーは抗ネスチン抗体などのヒト幹細胞マーカーを用いた免疫染色で陽性となり、毛包幹細胞 (hHAP stem

cells)であることを確認した。更に hHAP stem cells から成る毛包幹細胞コロニーを、10%FBS を含む DMEM 培地に移し 2 週間培養すると細胞の分化が認められ、分化した細胞が抗ネスチン抗体、抗 β III チューブリン抗体、抗 GFAP 抗体、抗 K15 抗体、抗 SMA 抗体、抗 cTnT 抗体の免疫蛍光染色により、神経細胞、グリア細胞、角化細胞、平滑筋細胞、心筋細胞であることを同定し、hHAP stem cell が多分化能を有していることを証明した。

hHAP stem cell を用いた再生医療は、皮膚という最も採取しやすい部位に分布している毛髪から簡便な方法で採取、利用することができる。また、hHAP stem cell を用いた再生医療の臨床応用においては、自己の毛包幹細胞を活用することができるため、拒絶反応の問題が少なく、他の生体幹細胞、iPS 細胞や ES 細胞と比較して、腫瘍化の危険性が少なく、倫理面の縛りを受けず、安全性の高い治療法になることが期待される。

目次

	頁
1. 序論	1
2. 方法	
2-1. ヒト毛包幹細胞(hHAP stem cell)の分離・培養.....	2
2-2. ヒト毛包上部からの hHAP stem cell の分離・培養.....	2
2-3. hHAP stem cellコロニーとhHAP stem cellから分化した細胞の免疫蛍光 染色とFACS解析.....	2
2-4. 統計分析.....	3
3. 結果	
3-1. 毛包上位部から得られる hHAP stem cell の心筋細胞と様々な種類の細 胞への分化	3
3-2. ヒト毛包上位部からの hHAP stem cell コロニーの形成	3
3-3. hHAP stem cell コロニーの心筋細胞と様々な 種類の細胞への分化	3
4. 考察	3
5. 総括	4
6. 今後の課題	4
7. 謝辞	5
8. 引用文献	5
9. 業績目録	7
10. 図表	9

1. 序論

幹細胞とは自己複製と分化の2つの性質を有する細胞であり、近年、再生医療における有用性が明らかにされている。幹細胞は多能性幹細胞と成体幹細胞に分類される。多能性幹細胞には胚幹細胞 (ES 細胞)、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) がある。ES 細胞は動物の発生初期段階である胚盤胞期の胚の一部に属する内部細胞塊より作られる幹細胞であり、様々な種類の細胞に分化し、奇形腫を形成する能力を持つ¹。一方、iPS 細胞は分化に関連した遺伝子を導入した成体細胞から形成される幹細胞である^{2,3}。ゲノムに組み込まれたレトロウイルスベクターの影響により、それから作製された臓器細胞を移植に用いることで、その細胞が悪性化する可能性がある³。

Li ら⁴と我々は、多分化能を有する毛包幹細胞 hair follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells がマウス毛包のバルジ領域にあることを発見した。我々は、マウスの HAP stem cell がネスチンを発現しており、*in vitro* で神経細胞、グリア細胞、角化細胞、平滑筋細胞、そしてメラノサイトに分化する能力を持つ幹細胞であることを確認した^{5,6}。さらに、マウスの HAP stem cell はマウスモデルにおける神経修復^{7,8}や脊髄の再生能力があることを明らかにした⁹。近年、我々はマウスの HAP stem cell が拍動する心筋細胞に分化できることを発見し¹⁰、イソプロテレノール添加によりマウスの HAP stem cell は心筋細胞への分化が促進することも明らかにした。さらに、イソプロテレノールに加え、アクチビン A、骨形成蛋白 4、塩基性線維芽細胞増殖因子と共培養することで、分化した心筋細胞から拍動する心筋細胞の組織シートの形成にも成功した¹¹。

Yoshida ら¹²は低酸素状態では iPS 細胞の増殖効率が增加することを示している。我々もまた、マウスの HAP stem cell が低酸素状態では、酸素濃度が正常な状態と比べて高率にトロポニン陽性の心筋細胞が分化することを証明した。しかし、この低酸素状態は他種類の細胞への分化能に影響しなかった¹³。また、加齢によってマウスの HAP stem cell の心筋細胞への分化効率は低下した。

ヒトにおける human HAP stem cell (hHAP stem cell) の研究においても、我々は *in vitro* で hHAP stem cell もマウスの HAP stem cell と同様に、神経細胞、グリア細胞、角化細胞、平滑筋細胞、色素細胞に分化することを明らかにした。hHAP stem cell をマウスの切断された坐骨神経に移植すると、グリア線維性酸性蛋白 (GFAP) 陽性のシュワン細胞に分化し、既存の軸索の回復が促進され、神経を再生する。再生した神経は機能を回復し電気刺激を与えると腓腹筋を収縮させることができた⁹。

Yu ら¹⁴も同様に、ヒト毛包バルジ領域の毛包幹細胞が、*in vitro* で神経細胞、平滑筋細胞、色素細胞へ分化し、またヒト毛包幹細胞の神経細胞への分化は神経関連遺伝子の発現増加を誘導することを示した。これらの分化したヒト神経細胞をマウス脳内に移植すると、移植後 28 日目でもマウス脳内で生存し神経分化マーカーを発現していた¹⁵。このように、hHAP stem cell は自家移植による再生医療の資源として供

給することが可能と考えられる。

今回の研究では、hHAP stem cell をヒト頭部毛包から分離するとともに、hHAP stem cell が神経細胞、グリア細胞、角化細胞、平滑筋細胞、さらに心筋細胞に分化しうる能力を有することを明らかにした。

2. 方法

2-1. hHAP stem cell を有するヒト頭部毛包上部の分離

5 人の外科的切除された頭皮組織の正常頭皮から毛包を分離した。5 人の患者は男性 3 人、女性 2 人であり、患者の年齢は 42-63 歳で平均値 49.8 ± 8.7 歳であった。組織採取にあたり、当該患者には、北里大学医学部倫理委員会の規定に則り、インフォームドコンセントを取得し、生体試料の実験的使用はヘルシンキ宣言の指針に従い行った。頭皮の毛髪を双眼実体顕微鏡下でメスを用いて毛包 1 本ずつ、正常頭皮組織から分離し、hHAP stem cell が分布する毛包上部で切離した。頭皮の標本サンプルの大きさは約 $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ cm 大で、1 人の患者から 80 ± 26 本の毛包全体を分離した。すべての外科的切除は無菌操作下で行った。

2-2. ヒト頭部毛包上部の培養と hHAP stem cell コロニーの分離・培養

hHAP stem cell を分離・培養するために、6 ウェル平底細胞培養皿 (Corning, Kennebunk, ME) を用いて、10% ウシ胎仔血清 (FBS)、50 μ g/ml ゲンタマイシン (Gibco, Grand Island, NY)、2mM L-グルタミン (Gibco)、2mM ヘペス緩衝液 (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) を含む DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 培地を用いて、毛包上部のみを培養した。

培養4週間後、Accumax (Innovative Cell Technologies, Inc., San Diego, CA) を用いて接着細胞を剥離した。剥離した細胞を、2%B27 (Gibco)、5ng/ml 塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) (Millipore, Temecula, CA) を加えたFBSを含まない DMEM/F12培地を用いて非接着プレートで培養した。1週間後、培養細胞は多くの hHAP stem cellコロニーを形成した。次に、DMEM+10%FBS培地にhHAP stem cellコロニーを移して2日後、hHAP stem cellコロニーは分化を開始し、2週後には様々な種類の細胞に分化した。hHAP stem cellコロニーから分化した細胞は免疫蛍光染色を用いて解析した。

2-3. ヒト頭部毛包上部から分化した細胞と hHAP stem cellコロニーから分化した細胞の免疫蛍光染色とFACS解析

hHAP stem cellコロニーにおいて、40, 6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) (Molecular Probes)とともに表1aに示す幹細胞マーカーである抗SSEA1抗体、抗SSEA3抗体、抗SSEA4抗体、抗Nanog抗体、抗Oct3/4抗体、抗ネスチン抗体と表1bの二次抗体を使用して免疫蛍光染色を行った。また、ヒト頭部毛

包上部から分化した細胞とhHAP stem cellコロニーから分化した細胞は、DAPIとともにそれぞれ表2aで示した神経系マーカー；抗βIIIチューブリン抗体、グリア細胞マーカー；抗GFAP抗体、角化細胞マーカー；抗K15抗体、平滑筋細胞マーカー；抗SMA抗体、さらに心筋細胞マーカー；抗cTnT抗体と表2bの二次抗体を用いて免疫蛍光染色にて分化を確認した。

表3a、3bの抗体を用いてFACS解析を行った。

2-4. 統計分析

実験データは平均値±標準偏差（SD）で示した。

3. 結果

3-1. ヒト頭部毛包上部からの心筋細胞、神経細胞、グリア細胞、角化細胞、平滑筋細胞への分化

ヒト毛包上部を分離し 10%FBS を含む DMEM で培養した（図 1）。培養後、hHAP stem cell はそれぞれ cTnT 陽性の心筋細胞、ネスチン、βIII チューブリン陽性の神経細胞、GFAP 陽性のグリア細胞、K15 陽性の角化細胞、SMA 陽性の平滑筋細胞に分化した（図 2）。FACS 解析でも心筋細胞、神経細胞、グリア細胞、角化細胞、平滑筋細胞への分化が明らかになった（表 4）。

3-2. ヒト頭部毛包上部からの hHAP stem cell コロニーの形成

毛包上部を DMEM+10%FBS で培養し、培養 4 週後に FBS を含まない DMEM/F12 培地にヒト毛包上部から増殖した細胞を移した。その 1 週後に hHAP stem cell のコロニーを数多く形成した（図 3）。hHAP stem cell コロニーは SSEA1 陰性、SSEA3、SSEA4、Nanog、Oct3/4、ネスチン陽性であった（図 4a）。

3-3. ヒト毛包上部から形成された hHAP stem cell コロニーの心筋細胞、神経細胞、グリア細胞、角化細胞、平滑筋細胞への分化

hHAP stem cell コロニーを 1 週間 2 日毎に bFGF を加えた B-27 を含む DMEM/F12 培地から DMEM+10%FBS 培地に移して 2 日後にネスチン陽性の hHAP stem cell コロニーから分化しつつある細胞が見られた（図 3）。hHAP stem cell コロニーはトロポニン陽性の心筋細胞、ネスチン、βIII チューブリン陽性の神経細胞、GFAP 陽性のグリア細胞、K15 陽性の角化細胞、SMA 陽性の平滑筋細胞に分化した（図 4b）。FACS 解析でも心筋細胞、神経細胞、グリア細胞、角化細胞、平滑筋細胞への分化が明らかになった（表 4）。

4. 考察

我々は、ネスチン遺伝子のプロモーターを用いた緑色蛍光タンパク遺伝子導入ト

ランスジェニックマウス内に、緑色蛍光に標識されたネスチン発現細胞が、毛髪の成長期 (anagen) に毛包のバルジ領域より上部かつ脂腺付着部より下部に存在することを報告した^{5,8}。このネスチンを発現している細胞は免疫組織化学染色で角化細胞マーカーである K15 の発現は陰性であり、*in vitro* 培養にてコロニーを形成し、神経細胞、グリア細胞、角化細胞、色素細胞、平滑筋細胞に分化したことから成体幹細胞であることを証明した^{5,8}。

我々が開発した、ヒト毛包上部から多分化能を有する hHAP stem cell コロニーを形成する新しい方法によって、ヒトの毛包から十分な量の hHAP stem cell を分離できることが明らかになった。さらに毛包幹細胞を有するヒト頭部毛包上部や hHAP stem cell コロニーから心筋細胞が分化することを発見した。

我々の研究室では心筋細胞を分離するのに最適な毛包を明らかにするため、加齢によって毛包幹細胞の心筋分化能がどのように変化するかを 4, 10, 20, 40 週齢マウス髭毛包上部を用いて心筋分化能を比較検討した。4 週齢から採取した毛包は、10, 20, 40 週齢から採取した毛包よりも心筋細胞が有意に多く分化する傾向にあった。このことから、ヒトでも若年齢由来の毛包幹細胞のほうが心筋細胞への分化効率が上昇する可能性がある。本研究の研究対象は平均年齢 49.8 歳の正常頭皮から得られた毛包幹細胞を用いた結果であるため、今後、若年齢の対象者の毛包幹細胞からの心筋細胞の分化能を比較検討し、将来的に心臓疾患や損傷における再生医療に活用するために、hHAP stem cell から心筋細胞へのさらに効率的な分化誘導法を確立させる必要があり、現在、若年者由来の毛包幹細胞の検討も行っている。

毛包幹細胞による再生医療の利点は、患者から最も容易に採取できる幹細胞であり、腫瘍化の問題がなく、外来遺伝子の挿入の必要性や道徳的問題もないため ES 細胞や iPS 細胞よりも臨床応用に適した幹細胞と考えられる。近い将来、我々が発見した hHAP stem cell は再生医療において使用される重要な幹細胞になることが期待される。

5. 総括

今回の我々の研究では、hHAP stem cell が心筋細胞と同様、神経細胞、グリア細胞、角化細胞、平滑筋細胞に分化したことを示した。加えて hHAP stem cell がコロニーを形成し、そのコロニーが幹細胞であることとコロニーから心筋細胞、神経細胞、グリア細胞、角化細胞、平滑筋細胞に分化することを明らかにした。これらの結果は、今後臨床の現場で、心疾患における再生医療の礎となりうると考えられる。

6. 今後の展望

ヒト毛包幹細胞を用いた再生医療は、倫理面や拒絶反応の問題がなく早期の臨床応用が期待される。そのためには、ヒト毛包幹細胞からの心筋分化能を高める培養条件の確立が重要である。最近、多能性幹細胞の分化能を調整する研究が進んでおり、ヒ

トiPS細胞における心筋細胞の分化誘導方法が明らかにされてきている。我々はこれらの知見をもとに、安全性の高いヒト毛包幹細胞からの心筋への効率の良い分化誘導方法を開発し、心筋シートを作成し、機能不全や損傷した心筋に移植する、ヒト毛包幹細胞を用いた再生医療の早期実現を目指している。

7. 謝辞

この研究において、終始ご教授頂いた北里大学医学部皮膚科学天羽康之先生、ならびにカルフォルニア大学サンディエゴ校医学部外科学ロバート・ホフマン教授に深謝いたします。また、研究にお力添え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、技術員方に厚く御礼申し上げます。

8. 引用文献

1. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-7.
2. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007;448:313-7.
3. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 2008;322:949-53.
4. Li L, Mignone J, Yang M, Matic M, Penman S, Enikolopov G, Hoffman RM. Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:9958-61.
5. Amoh Y, Li L, Yang M, Moossa AR, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM. Nascent blood vessels in the skin arise from nestin-expressing hair follicle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:13291-5.
6. 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 USA* 2005;102:5530-4.
7. Amoh Y, Li L, Campillo R, Kawahara K, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM. Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:17734-8.

8. Amoh Y, Kanoh M, Niiyama S, Hamada Y, Kawahara K, Sato Y, Hoffman RM, Katsuoka K. Human hair follicle pluripotent stem (hfPS) cells promote regeneration of peripheral-nerve injury: An advantageous alternative to ES and iPS cells. *J Cell Biochem* 2009;107:1016-20.
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. Yashiro M, Mii S, Aki R, Hamada Y, Arakawa N, Kawahara K, Hoffman RM, Amoh Y. 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.
11. Yamazaki A, Yashiro M, Mii S, Aki R, Hamada Y, Arakawa N, Kawahara K, Hoffman RM, Amoh Y. 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.
12. Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2009;5:237-41.
13. Shirai K, Hamada Y, Arakawa N, Yamazaki A, Tohgi N, Aki R, Mii S, Hoffman RM, Amoh Y. Hypoxia enhances differentiation of hair follicle-associated-pluripotent (HAP) stem cells to cardiac muscle cells. *J Cell Biochem* 2017;118:554–558.
14. Yu H, Fang D, Kumar SM, Li L, Nguyen TK, Acs G, Herlyn M, Xu X. Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. *Am J Pathol* 2006;168:1879-88.
15. Yu H, Kumar SM, Kossenkova AV, Showe L, Xu X. Stem cells with neural crest characteristics derived from the bulge region of cultured human hair follicles. *J Invest Dermatol* 2010;130:1227-36.

9. 業績目録

(I) 原 著

- 1. Yamazaki A, Obara K, Tohgi N, Shirai K, Mii S, Hamada Y, Arakawa N, Aki R, Hoffman M. R, Amoh Y : Implanted hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells encapsulated in polyvinylidene fluoride membrane cylinders promote effective recovery of peripheral nerve injury. Cell cycle、2017. Epub ahead of print
- ◎2. Tohgi N, Obara K, Yashiro M, Hamada Y, Arakawa N, Mii S, Aki R, Hoffman M. R, Amoh Y : Human hair-follicle associated pluripotent (hHAP) stem cells differentiate to cardiac-muscle cells. Cell cycle、16:1, 95-99, 2017.
- 3. Shirai K, Hamada Y, Arakawa N, Yamazaki A, Tohgi N, Aki R, Mii S, Hoffman M. R, Amoh Y : Hypoxia Enhances Differentiation of Hair Follicle-Associated-Pluripotent (HAP) Stem Cells to Cardiac-Muscle Cells. Journal of Cellular Biochemistry、118:554-558, 2017.

(II) 著 書

な し

(III) 総説・講座

- 1. 東儀那津子 : 【見逃してはいけない皮膚疾患 その判断の仕方と対応法 第 1 回 細菌感染症・ウイルス感染症】 細菌感染症 ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群. ナーシング、34 : 2, 72-73, 2014

(IV) 症例・臨床治験・その他

- 1. 宮澤恵理子、渡会 晃、東儀那津子、三井純雪、天羽康之、平野修平 : 外陰部膿皮症に伴った機種性膀胱炎の 1 例. 皮膚科の臨床、58 : 12, 1803-1805, 2016
- 2. 東儀那津子、高須 博、天羽康之 : 手掌に生じた類上皮肉腫. 皮膚病診療、37 : 11, 1101-1104, 2015
- 3. 東儀那津子、高須 博 : ヘルペス髄膜炎を合併した帯状疱疹. 皮膚病診療、35 : 9, 845-848, 2013
- 4. 東儀那津子、高須 博、勝岡憲生、鴻池奈津子、根本 充、武田 啓 : 免疫組織学的にポリオマウイルスが陽性であった Merkel 細胞癌の 2 例. Skin Cancer、28 : 1, 29-33, 2013
- 5. 東儀那津子、徳永 千春、長瀬彰夫、向井治文 : 両側小陰唇に生じた子宮内膜症

の 1 例. 皮膚科の臨床、53 : 6, 891-894, 2011

6. Tohgi N, Eto H, Maejima H, Saito N, Nakamura M, Katsuoka K : allergic contact dermatitis induced by topical hydrocortisone butyrate propionate mimicking acute generalized exanthematous pustulosis. European Journal of Dermatology、19 : 5, 518-519, 2009

10. 図表

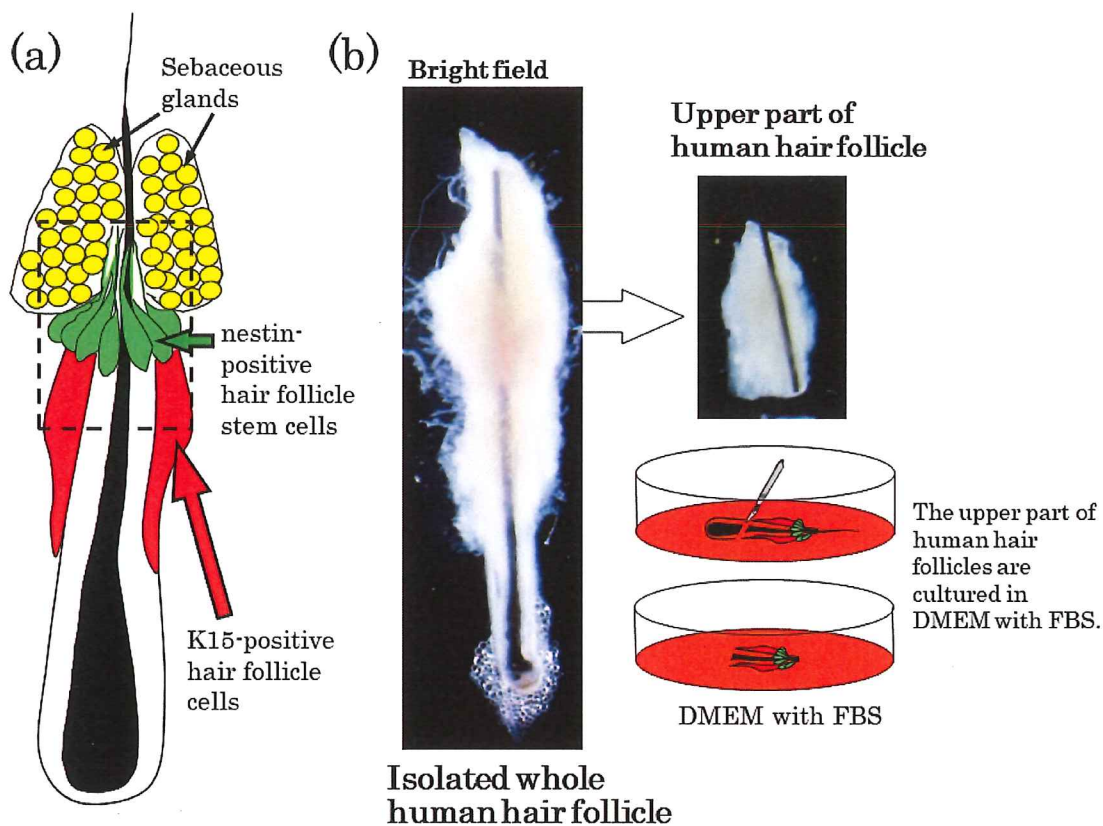


図 1. ヒト頭部皮膚から分離された頭部毛包と毛包上部の培養。

- (a) ヒト頭部毛包のシェーマ：ネスチン陽性の毛包幹細胞は毛包脂腺の直下、ケラチン 15 陽性細胞の上部に分布している。
- (b) ヒト頭部毛包から毛包上部を分離し DMEM+10%FBS で培養した。

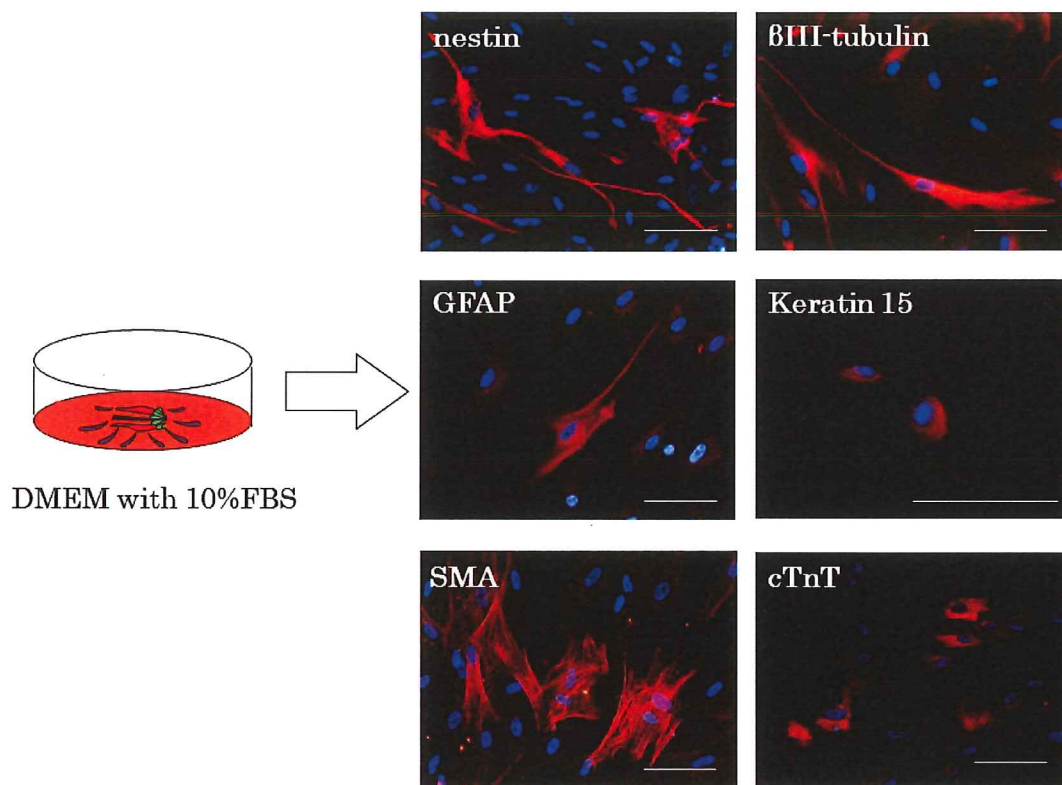
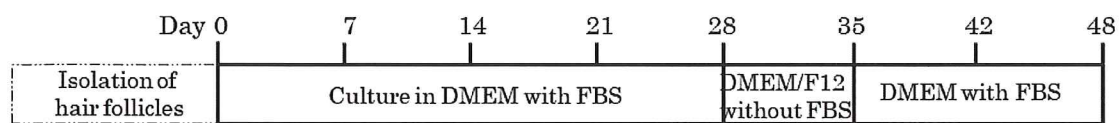


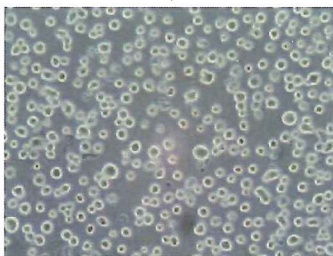
図 2. 毛包幹細胞を有するヒト毛包上部からの心筋細胞、神経細胞、グリア細胞、角化細胞、平滑筋細胞への分化。

DMEM+10%FBS で培養 4 週後に、ヒト毛包上部から cTnT 陽性の心筋細胞、ネスチン、BIII チューブリン陽性の神経細胞、GFAP 陽性のグリア細胞、K15 陽性の角化細胞、SMA 陽性の平滑筋細胞が分化した。

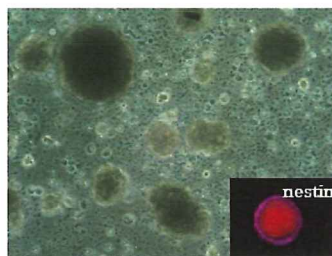


Four weeks after culture the upper part of human hair follicle with in DMEM with FBS.

↓ Detach the growing cells and then transfer cells to DMEM/F12 without FBS.



Just after detachment, hHAP stem cells float individually in DMEM/F12 without FBS.



One week after culture in DMEM/F12 without FBS, the growing cells formed many hHAP stem cell colonies.



Two days after transfer to DMEM with FBS, the hHAP stem cell colonies started to differentiation.

図 3. ヒト頭部毛包上部からの hHAP stem cell コロニーの作成。

ヒト毛包培養手順：分離したヒト頭部毛包上部を DMEM+10%FBS 培地で培養し、4 週間後に FBS を含まない DMEM/F12 培地に細胞を移した。FBS を含まない DMEM/F12 培地で培養し 1 週間後に細胞は hHAP stem cell のコロニーを数多く形成した。DMEM+10%FBS 培地に移して 2 日後に hHAP stem cell コロニーは分化を始めた。

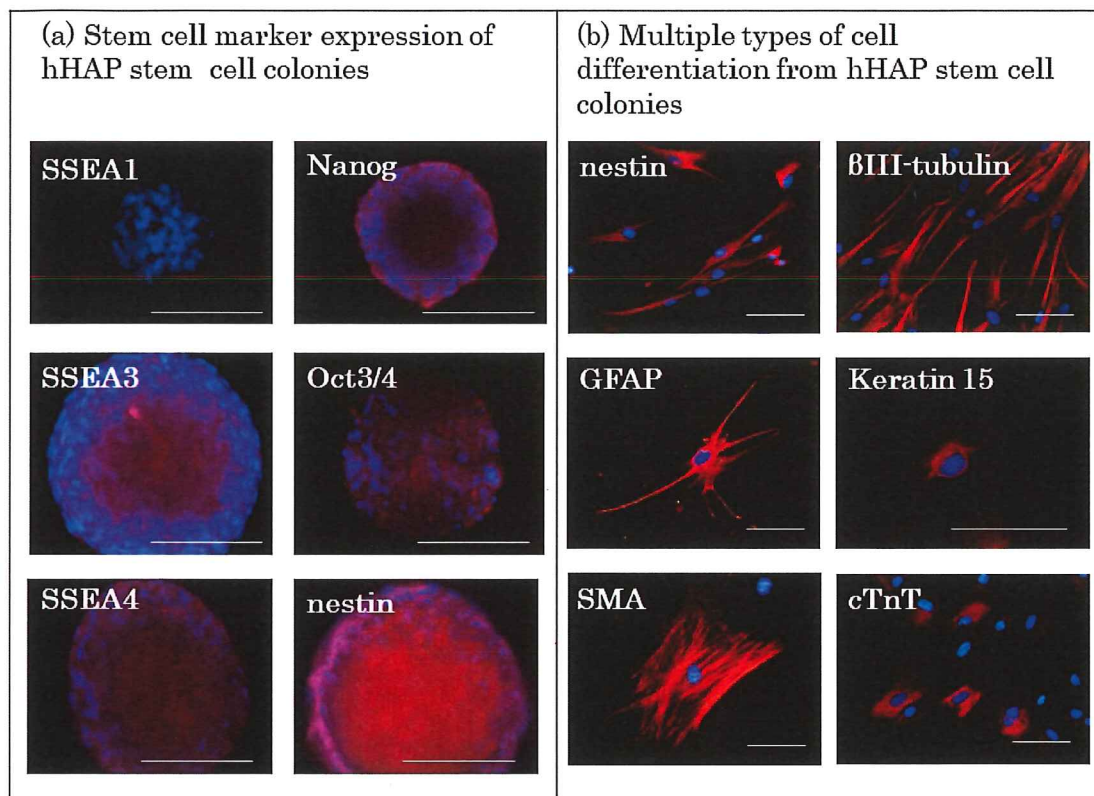


図 4. hHAP stem cell コロニーにおける幹細胞マーカーの発現と hHAP stem cell コロニーから分化した細胞。

- (a) hHAP stem cell コロニーにおける幹細胞マーカーの発現。hHAP stem cell コロニーは SSEA1 陰性、SSEA3、SSEA4、Nanog、Oct3/4、ネスチン陽性であった。
- (b) DMEM+10%FBS 移して 2 週間後、hHAP stem cell コロニーは cTnT 陽性の心筋細胞、ネスチン、βIII チューブリン陽性の神経細胞、GFAP 陽性のグリア細胞、K15 陽性の角化細胞、SMA 陽性の平滑筋細胞に分化した。

表 1a. hHAP stem cell コロニーの免疫染色に使用した一次抗体

一次抗体	希釈率	製造元
抗SSEA1 マウス モノクローナルIgM	1:100	BioVision, Milpitas, CA
抗SSEA3 ラット モノクローナルIgM	1:100	Millipore, Temecula, CA
抗SSEA4 マウス モノクローナルIgG	1:100	BioLegend, San Diego, CA
抗Nanog ヤギ ポリクローナル	1:100	R&D, Minneapolis, MN
抗Oct3/4 ヤギ ポリクローナル	1:100	R&D, Minneapolis, MN
抗nestin ウサキ ポリクローナル	1:50	IBL, Gunma, Japan

表 1b. hHAP stem cell コロニーの免疫染色に使用した各一次抗体に対応する二次抗体

一次抗体	二次抗体	標識	希釈率	製造元
抗SSEA1	ヤギ 抗マウスIgM	Alexa Fluor® 594	1:400	Molecular Probes, Eugene, OR
抗SSEA3	ヤギ 抗ラットIgM	Alexa Fluor® 594	1:400	Molecular Probes, Eugene, OR
抗SSEA4	ヤギ 抗マウスIgG	Alexa Fluor® 568	1:400	Molecular Probes, Eugene, OR
抗Nanog 抗Oct3/4	ロバ 抗ヤギIgG	Alexa Fluor® 568	1:400	Molecular Probes, Eugene, OR
抗nestin	ヤギ 抗ウサギIgG	Alexa Fluor® 568	1:400	Molecular Probes, Eugene, OR

表 2a. ヒト毛包上部と hHAP stem cell コロニーから分化した細胞の免疫染色に使用した一次抗体

抗体	希釈率	製造元
抗nestin ウサギ ポリクローナル	1 : 50	IBL, Gunma, Japan
抗βIII-Tubulin マウス モノクローナルIgG (clone: TUJ1)	1 : 500	Covance, San Leandro, CA
抗GFAP マウス モノクローナルIgG (clone: GA-5)	1 : 200	Lab Vision, UK
抗K15 マウス モノクローナルIgG	1 : 200	Lab Vision, UK
抗SMA マウス モノクローナルIgG	1 : 400	Lab Vision, UK
抗cTnT マウス モノクローナルIgG	1 : 500	GeneTex, Taiwan

表 2b. ヒト毛包上部と hHAP stem cell コロニーから分化した細胞の免疫染色に使用した各一次抗体に対応する二次抗体

一次抗体	二次抗体	標識	希釈率	製造元
抗nestin	ヤギ 抗ウサギIgG	Alexa Fluor [®] 568	1:400	Molecular Probes, Eugene, OR
抗βIII-Tubulin				
抗K15				
抗SMA	ヤギ 抗マウスIgG	Alexa Fluor [®] 568	1:400	Molecular Probes, Eugene, OR
抗cTnT				
抗GFAP				

表 3a. FACS 解析に使用した一次抗体

抗体	希釈率	製造元
抗βIII-Tubulin マウス モノクローナルIgG (clone: TUJ1)	1:500	Covance, San Leandro, CA
抗GFAP チキン ポリクローナル	1:300	Abcam, UK
抗K15 マウス モノクローナルIgG	1:200	Lab Vision, UK
抗SMA マウス モノクローナルIgG	1:400	Lab Vision, UK
抗cTnT マウス モノクローナルIgG	1:500	GeneTex, Taiwan

表 3b. FACS 解析に使用した二次抗体

一次抗体名	抗体名	標識	希釈率	製造元
抗βIII-Tubulin				
抗K15	ヤギ 抗マウスIgG	PE	1:500	Abcam, Cambridge, UK
抗SMA				
抗cTnT				
	ヤギ 抗チキンIgY	ビオチン	1:500	R&D, Minneapolis, MN
抗GFAP	ストレプトアビチン	Brilliant Violet 421™	1:500	BioLegend, San Diego, CA

表 4. ヒト毛包上部と hHAP stem cell コロニーから分化した細胞の FACS 解析

分化細胞	ヒト毛包上部 (培養4週後)	hHAP stem cell コロニー (培養2週後)
神経細胞	39.2±7.3%	75.7±13.7%
グリア細胞	34.9±3.8%	9.5±4.5%
角化細胞	3.4±1.5%	4.5±5.1%
平滑筋細胞	13.9±4.0%	6.6±5.6%
心筋細胞	0.4±0.3%	0.3±0.2%