

公開

## 研究終了報告書

### 「白髪治療に向けたメラニン微粒子の輸送システムの解明」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：景山 達斗

#### 1. 研究のねらい

白髪は、ヒトの「見た目年齢」を大きく左右するため、高齢化が進む本国において、その治療へのニーズは非常に高い。そもそも髪の色は、毛根部に存在する色素細胞がメラノソーム（メラニン色素を合成・貯蔵するオルガネラ）を生成し、これを隣接する毛母細胞に輸送することで着色される。白髪はこのメラノソームの生成・輸送プロセスの異常により生じるため、これらのメカニズムを理解することは白髪の治療戦略を考える上で重要となる。先行研究では、培養ディッシュに接着した細胞のメラノソームの動態を観察することで、メカニズムの理解をしようと研究が進められてきた。しかし、培養ディッシュに接着した細胞は生体と異なる挙動を示すことも多く、得られた結果が生体の現象を反映していない場合も多い。そこで我々は、生体での現象をよりリアルに再現できる培養モデルが開発することで、メラノソームの生成・輸送プロセスのメカニズムの理解が進むのではないかと考えた。そこで本研究では、生体外で毛包を再生する技術を開発し、メラノソーム輸送の観察や関連遺伝子のスクリーニングに適用可能な系であることを示すとともに、白髪発生に関わるメラノソームの輸送システムを理解することを目的とした。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

本研究では、研究開始時に設定した4つのテーマ、1)メラノソーム輸送を可視化できる毛包オルガノイドの開発、2)メラノソーム輸送の異常モデル(白髪モデル)の開発、3)メラノソーム輸送に関わる遺伝子の同定、4)メラノソーム輸送を向上させる薬剤の探索、に関して研究開発を行った。1)に関して、毛包オルガノイドを効率よく作製する技術の開発に成功し、メラノソームを可視化できることを確認した。従来の毛包オルガノイドでは生体外で毛包を再生することは難しく、その効率は1%未満(300個の組織のうち1個の組織で確認)と非常に低かった。我々は、毛包オルガノイドを構成する2種類の細胞をつなぐ役割を担うタンパク質を低い濃度で混ぜて培養すると、2種類の細胞が形成する毛包オルガノイドの空間配置パターンが変化し、100%(300個の組織のうち300個の組織で確認)の効率で毛包が再生できることを見出した。再生した毛包をタイムラプス顕微鏡で観察すると毛根部でメラノソームが毛母細胞へ輸送される様子を捉えることができた。2)に関して、毛包オル

ガノイドを過酸化水素で処理し、活性酸素による白髪発生を再現したモデルを構築した。毛包オルガノイドが活性酸素に応答する濃度を最適化することで、白髪が形成する条件を見出した。この系では、メラノソームの輸送に関わるタンパク質の発現が抑制されており、メラノソームの輸送が徐々に低下する様子も捉えることができた。3) に関して、毛包オルガノイドを用いて、メラノソームの輸送に関わる遺伝子を解析した。毛包オルガノイドに siRNA をリポフェクションにより導入し、メラノソームの輸送に関わる既存の遺伝子をノックダウンすると、毛包オルガノイドから形成する毛幹の色が黒色から白色に変化する様子が観察された。この評価系を用いて、メラノソームの輸送に関わる遺伝子を探索するため、複数の siRNA を投与しスクリーニングを行ったところ、いくつかの候補遺伝子の関与を見出すことができた。4) に関して、毛包オルガノイドにメラノソーム輸送を促進させるための薬剤の候補をいくつか追加し、毛包オルガノイドから形成する毛幹の色を濃くする物質をピックアップした。

## (2) 詳細

### 研究テーマ1「メラノソーム輸送を可視化できる毛包オルガノイドの開発」

メラノソーム輸送のメカニズムを理解するためには、その様子を可視化できる培養モデルが必要である。研究テーマ1では、生体外で毛包を高効率で再生できる毛包オルガノイドの構築とそれを用いたメラノソーム輸送プロセスの可視化を目標とした。

我々は先行研究において、胎児期における毛髪の発生過程を生体外で再現することで毛包原基を調製する技術を開発し、これを移植することで毛周期を繰り返す毛髪を再生する方法を報告した (T. Kageyama et al. *Biomaterials*, 154, 291-300, 2018)。本研究では、この毛包原基を長期培養することにより、生体を模した毛髪モデルの構築を目指した。すなわち、毛包の2種類の幹細胞（上皮系細胞と間葉系細胞）を丸底ウェルのスフェロイド培養器で培養を行った。2種類の細胞は、ウェル内で毛包原基を形成した後、23日間の培養中に数百 $\mu\text{m}$ 程度の毛幹様の構造を伸長させる様子が観察された。しかし、毛幹の形成効率は1%未満（300個の組織のうち1個の組織で確認）と非常に効率が低かった。我々は、培養方法の最適化を行う中で、偶然にも低濃度の細胞外マトリクスを添加した際に、毛包がほぼ100%の確率で再生することを見出した (T. Kageyama et al. *Science Advances*, 2022, 8, eadd4603)。この毛幹の長さは30日で約5mmまで達し、マウスの皮膚に移植すると生着し、生え代わりを繰り返すことも確認した。このように長毛を高効率に再生する組織体を毛包オルガノイドと名付け、メラノソームの可視化に利用できるか検討を行った。興味深いことに、毛包オルガノイドから再生する毛包は毛根部を先端にして伸長する。そのため、生体では皮下に埋没している毛根部を鮮明に可視化できる。実際に、タイムラプス顕微鏡を用いて、毛根部を観察すると毛球部でメラノソームが輸送される様子を可視化することが可能であった。

### 研究テーマ2「メラノソーム輸送の異常モデル(白髪モデル)の開発」

メラノソーム輸送の乱れを毛包オルガノイドで再現できれば、メラノソーム輸送が原因で生じる白髪を理解が深まり、その治療法を開発することが可能になる。研究テーマ2では、毛包オルガノイドを用いて白髪を再現することを目的とした。

加齢や喫煙、食生活の乱れなどで増加する活性酸素は白髪の1つの原因であり、メラノソームの輸送に影響を与えることが報告されている。我々は活性酸素により生じる白髪を再現するため、毛包オルガノイドに過酸化水素を暴露しながら培養する実験系を構築した。通常、細胞内の抗酸化酵素により活性酸素のほとんどが除去され、メラノソーム輸送が進行するが、過酸化水素の暴露により活性酸素が増加した場合、そのすべてを処理できず、メラノソーム輸送が停滞してしまう。その結果、過酸化水素に暴露した期間で形成した毛幹の色が薄くなる様子が観察された。実際に、メラノソームの輸送に関わる既知の遺伝子の発現が抑制されることも確認している。この培養系(白髪モデル)を用いることで、活性酸素により生じる白髪を抑制する薬剤のスクリーニングも可能になり、白髪研究のための有用なツールになると考えられる。この研究に関しては、2022年度より製薬企業と共同研究を開始して白髪を抑制する薬剤の開発を進めている。

### 研究テーマ3「メラノソーム輸送に関わる遺伝子の同定」

白髪の形成に関わる遺伝子は、毛色の異なるマウスの遺伝子を解析することで同定されてきたが、動物実験には時間がかかり、スループット性に欠けることが課題である。また、化粧品業界で精力的に進められている動物実験代替の流れを踏まえると、今後は培養モデルを用いた遺伝子の解析が必要となるだろう。研究テーマ3では、毛包オルガノイドがメラノソーム輸送に関わる遺伝子を評価する培養系としての有用性を評価し、メラノソーム輸送に関わる遺伝子の解析を行った。

毛包オルガノイドは、増殖させた培養細胞から大量に組織を調製できるため、siRNA技術を用いれば、網羅的に遺伝子を解析することが可能になる。そこで、毛包オルガノイドへのsiRNAの導入方法を検討し、既存のメラノソーム輸送に関わる遺伝子のノックダウン実験を行った。siRNAの導入方法や試薬について最適化を行った結果、培養2日目の毛包オルガノイドに10%FBSを添加したリポフェクション試薬でsiRNAを導入する方法が最も効率が良いことが確認できた。この方法で、メラノソーム輸送に関わる遺伝子であるMyo10, PAR2をノックダウンすると、毛包オルガノイドから白色の毛幹が形成した。以上の結果より、毛包オルガノイドに標的遺伝子のsiRNAを導入することでメラノソームの輸送に関わる遺伝子をスクリーニングできることが確認された。現在、本スクリーニング系を利用した解析において、いくつかの遺伝子がメラノソーム輸送に関与する可能性を見出している。今後、これらの遺伝子を制御する方法を見出し、白髪を治療する方法として適用できるよう研究を継続する予定である。

### 研究テーマ4「メラノソーム輸送を向上させる薬剤の探索」

研究テーマ4では、開発した毛包オルガノイドが白髪の治療薬を評価するためのスクリーニングツールとして利用できるか評価を行った。培養2日目の毛包オルガノイドの培養液にメラノソーム輸送を向上させる薬剤であるメラノサイト刺激ホルモン( $\alpha$ -MSH)を添加したところ、色素合成に関わる遺伝子の発現が向上し、毛母細胞に輸送され毛幹に蓄積されるメラノソーム量が優位に増加した。実際に、この毛包オルガノイドを用いて、メラノソーム輸送を向上させる薬剤のスクリーニングを行ったところ、メラノソーム輸送が亢進する薬剤が数種類ピックアップされた。

### 3. 今後の展開

本研究では、メラノソーム輸送のメカニズムについて明らかにすることを目標とし、毛包オルガノイドを用いて、メラノソーム輸送に関わる遺伝子やメラノソーム輸送を促進する薬剤候補を見出した。今後、これらの知見をもとに白髪に対する治療薬を企業等と連携して開発していく予定である。また、本研究期間内には達成できないかもしれないが、メラノソームが色素細胞からどのように放出され、どのように毛母細胞に取り込まれるかを毛包オルガノイドにより可視化し、生体現象の理解につなげていきたい。また、毛包オルガノイドを再生医療の用途に用いることで、白髪の改善も可能になるだろう。すなわち、黒髪の細胞を増幅させ、毛包オルガノイドを作製した後、これを白髪と置換する形で移植することで、黒髪の再生が可能になる。これらの研究を進めることで、白髪に対する新たな治療法を開発できるよう努力していきたい。

### 4. 自己評価

本研究で開発した毛包オルガノイドは、生体外で高効率に長毛を再生することが可能な培養系であり、毛包のメラノソーム輸送を観察するための新たな培養モデルとして有用性が高い。その研究成果はScience Advances誌(Impact factor: 14.957)に出版され、複数の国内外のメディアで報道された。また、毛包オルガノイドは白髪の進行を抑制する薬のスクリーニングにも利用でき、その開発に向けた取り組みとして、製薬企業との共同研究も2022年から開始している。また、本研究で開発した毛包オルガノイドを用いれば、メラノソームの輸送に関する遺伝子を網羅的に解析することができるようになり、メラノソーム輸送に関わる重要な遺伝子の理解が可能になるだろう。このように、本研究で得られた成果の科学技術及び社会・経済への波及効果は大きく、白髪研究のためのプラットフォームを提供することができたと考えている。

### 5. 主な研究成果リスト

#### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:11件

1. **Tatsuto Kageyama**, Akihiro Shimizu, Riki Anakama, Rikuma Nakajima, Kohei Suzuki, Yusuke Okubo and Junji Fukuda, Reprogramming of three-dimensional microenvironments for in vitro hair follicle induction. *Science Advances*, 2022, 8, eadd4603, <https://www.science.org/doi/epdf/10.1126/sciadv.add460>

試験管内で毛包をほぼ 100%の効率で再生できる毛包オルガノイドの作製方法を見出した。この毛包オルガノイドは、メラノソームの動態観察やメラノソーム輸送を促進させる薬剤の効果を評価することが可能であった。

2. **Tatsuto Kageyama**, Riki Anakama, Hideru Togashi, and Junji Fukuda, Impacts of manipulating cell sorting on in vitro hair follicle regeneration. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2022, in press, <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.09.004>

毛包オルガノイドの形成メカニズムとして、上皮-間葉相互作用を支配するカドヘリン分子の関与を明らかにし、オルガノイド形成には毛包を構成する2種類の細胞の空間配置が重要であることを示した。

3. Yinghui Zhou, Monami Yamane, Kohei Suzuki, Ayaka Nanmo, Shan Tu, **Tatsuto Kageyama** and Junji Fukuda, Effects of exosomes derived from dermal papilla cells on hair follicle stem cells and hair follicle organoids. *AATEX: Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, 2022, 27, 1, p.1-13 <https://doi.org/10.11232/aatex.27.1>

独自の3次元培養システムを用いて、毛乳頭細胞のエクソソームを効率よく回収する方法を見出した。このエクソソームは、毛乳頭細胞や毛包上皮幹細胞の活性を向上させ、毛包オルガノイドの発毛能力を向上させることができた。

(2)特許出願

研究期間全出願件数: 4件(特許公開前のもも含む)

1	発明者	福田淳二, 景山達斗, 清水亮啓, 中嶋陸満, 穴竈理樹
	発明の名称	毛包原基及びその製造方法
	出願人	神奈川県立産業技術総合研究所, 横浜国立大学
	出願日	2019/05/07
	出願番号	特願 2019-087747
	概要	
2	発明者	福田淳二, 景山達斗, 穴竈理樹, 肥高龍彦
	発明の名称	毛髪再生能を有する細胞凝集塊の製造方法及びこれに関連する方法
	出願人	神奈川県立産業技術総合研究所, 横浜国立大学
	出願日	2021/10/08
	出願番号	特願 2021-165888
	概要	

(3)その他の成果(主要な学会発表, 受賞, 著作物, プレスリリース等)

【受賞】

1. TERMIS-AP 2022 (国際組織工学・再生医療学会), Best Poster Presentation Award  
受賞演題: Engineering hair follicle organoids through microenvironmental reprogramming

受賞者 : 景山達斗

受賞年月: 2022年10月

2. 第29回日本色素細胞学会 Best Presentation Award

受賞演題: 薬剤スクリーニングのための毛包オルガノイド

受賞者 : 景山達斗

受賞年月: 2019年11月

【著作物】

3. 景山達斗, 福田淳二, 実験医学 多様な細胞外小胞 髪の色を決めるメラノソーム-白髪の発生機序とその治療に向けたアプローチ, 2021, 39, 20, pp. 3222-3228

[https://jglobal.jst.go.jp/detail?JGLOBAL\\_ID=202102238811396179](https://jglobal.jst.go.jp/detail?JGLOBAL_ID=202102238811396179)

【プレスリリース】

4. 体外で高効率に長毛を生み出す毛包オルガノイドの作製技術を開発  
～白髪や脱毛症の治療薬開発, 毛髪再生医療に期待～

<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20221024/index.html>

[https://www.kistec.jp/wp/wp-content/uploads/press\\_20221024.pdf](https://www.kistec.jp/wp/wp-content/uploads/press_20221024.pdf)

<https://www.ynu.ac.jp/hus/koho/28803/detail.html>

【新聞・メディア】

5. NHK 2022年10月22日

体外で人工的に髪を毛作成に成功 脱毛症治療など期待 横浜国大

<https://www3.nhk.or.jp/news/html/20221022/k10013866881000.html>

6. 日本経済新聞電子版 2022年11月2日

毛を作り出す組織, 人工的に 毛髪再生医療へ応用

<https://www.nikkei.com/article/DGXZQOUC24AXU0U2A021C2000000/>