

【論文】

化粧品原料としての幹細胞培養上清液利用技術開発

——産学連携による地域貢献——

森田勇人*・田中邑樹**・森修平***・佐藤麻紀**・三井幸雄**

キーワード：幹細胞培養上清液、ミトコンドリア、毛包幹細胞

1. はじめに（共同研究の目的と背景）

【共同研究の目的】

“幹細胞培養上清液”は、臍帯血・脂肪・歯髄など体内に存在する幹細胞を専用の培養液中で培養し、培養後の培養液から幹細胞を取り除き、滅菌処理を行なった上澄み液である。「幹細胞」は、多様な種類の細胞へ分化する能力を持っているだけでなく、細胞の生理活性を調節するシグナル分子や細胞成長を促す増殖因子などを産生し、血液を介さず、組織液を介して拡散させるため（傍分泌作用）、培養上清液中にも活性因子が豊富に含まれている¹⁾。このことから“幹細胞培養上清液”は、上皮組織の活性化等による新たな治療技術の開発に繋がることを期待されている。例えば、頭皮への直接塗布においては、毛包幹細胞の活性化に伴い、AGA（AndroGenetic Alopecia）の予防・改善効果が見られると期待されている。

本研究は、共同研究機関である(株)ホルスにおいて独自に同定された“ヒト頭皮由来幹細胞（毛包幹細胞（図1））”の培養上清液が、毛包周辺組織の活性化による頭髮再生や、色素細胞の機能不全を解消し白髪への黒髪への転換等を誘導するかについて細胞生理学的見地から検証することを目的とした。

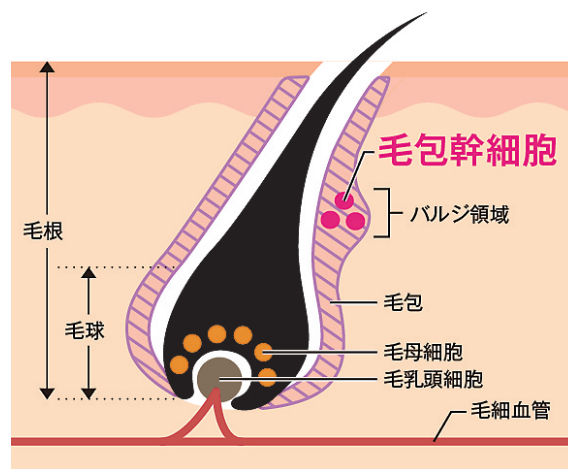


図1 成長期における毛包と毛包幹細胞

【共同研究の背景】

本共同研究は、当研究室の卒業生であり、共同研究機関である(株)ホルスに所属する田中氏の訪問をきっかけに始まった。(株)ホルスは化粧品や健康食品を構成する原料の製造販売業を手掛け、医学の最先端技術を取り入れ、データや実例を検証しながら、安全で確実に効果のある原料を市場に先駆けて生み出すことに注力しており、技術支援や共同開発の協力先を探している経緯があった。そこで田中氏の母校である城西大学と勤務先である(株)ホルスで共益関係のコラボレーションが望めるのではない

* 城西大学理学部化学科分子分光学研究室教授

** 株式会社ホルス

*** 城西大学理学部化学科分子分光学研究室4年生

かと話が広がり、当研究室の研究インフラを用いた、製品の機能評価（育毛剤などにおける新たな化粧品原料としての可能性の評価など）を行う共同研究をスタートするに至った。この共同研究においては、研究室の卒業生が両機関の仲介役を果たすことで、「幹細胞培養上清液」の機能解析という学術的側面と解析された機能の販促への応用という営業的側面をシームレスにつないだ、理想的な“産学連携プロジェクト”として運用することが可能となった。さらに、(株)ホルスは、生産工場と研究所を埼玉県入間市に構えていることから本共同研究体制の確立は、“地元企業”のニーズへの地元大学である城西大学の知的インフラの貢献という観点から「“地域に根差した大学”による“地域貢献”」の実証例となるものと考え（地域との協創）。

2. 実験方法

これまで述べてきたように本共同研究の目的は、(株)ホルス製「幹細胞培養上清液」の機能評価である。ここでいう機能とは、培養上清液を作製するために用いた幹細胞がヒト頭皮由来であることから、「加齢などにより生理活性が低下した毛包幹細胞の生理活性の上昇（*e.g.* 若いころの生理活性を維持する *or* 処理しないときより生理活性の低下の割合が低い）」と定義した。

この定義を念頭に置いて目的を達成するために、最初に、ホルスで同定した毛包幹細胞の安定継代培養系を確立するとともに、若い世代（第2世代）と老化の進んだ世代（第12世代）の細胞ストックを作製し液体窒素ベッセル内に保存した。

毛包幹細胞の生育状態に対する幹細胞培養上清液の添加効果は、培養液への「幹細胞培養上清液」の添加量を0.0%、2.5%、5.0%、10.0%と変化させて培養を行い、明視野下での細胞形態の変化をもとに評価した。また、各生育条件下における毛包幹細胞の生理活性評価はミトコンドリア膜電位（=ATP合成活性）で行うこととした。目的の継代数に到達後、16時間培養しコンフルエンスが50~60%となったことを確認後、Cell Count Normalization Kit (DOJINDO) を用いて細胞の核DNA染色（青色）を行った。その後、MT-1 MitoMP Detection Kit (DOJINDO) を用いて、ミトコンドリア膜染色（赤色）を行い、蛍光強度を計測することで膜電位の変化を計測した。青と赤の二重の蛍光が得られた細胞の輝度の積算値から、1細胞当たりの平均蛍光強度を求め、細胞培養液への「幹細胞培養上清液添加」濃度との相関について加重平均法を用いて統計解析した。

これらの解析にあたり、明視野並びに蛍光観察には、オールインワン蛍光顕微鏡BZ-X800L (Keyence) を用いた。蛍光強度解析には、専用の解析アプリケーション BZ-H4AのハイブリットセルカウンタBZ-H3Cを、加重平均法を用いた統計解析には、Excel (Office365: Microsoft) を用いた。

3. 実験結果

図2に、「幹細胞培養上清液」の含有率と細胞一つ当たりが占める面積比の相関を示す。このグラフから、「幹細胞培養上清液」を幹細胞の培養液に添加することで、幹細胞の単位時間当たりの成長速度が加速化され、1細胞当たりが占める面積が広がったことが分かった。

この結果から、「幹細胞培養上清液」を添加することで、幹細胞の細胞成長の促進を誘導している

可能性が示唆されたことから、次に、「幹細胞培養上清液」の添加が幹細胞の生理活性の上昇につながるミトコンドリア膜電位の上昇を誘導するかを解析した。その結果、図3に示すように、「幹細胞培養上清液」の添加割合が上昇するにつれ、ミトコンドリア膜電位が再現性良く上昇することが分かった。このことは、「幹細胞培養上清液」を添加することで細胞内のATP合成活性が高まり、結果、細胞成長の促進が誘導されることを示している。この結果は、図2に示す結果と整合性が取れていると考えた。また、「幹細胞培養上清液」を蛍光強度測定に用いた幹細胞と同じ幹細胞で作製した場合と、異なるドナー由来の幹細胞で作製した場合とでは、異なる幹細胞で作製した場合の方が、添加効果は顕著に表れた。

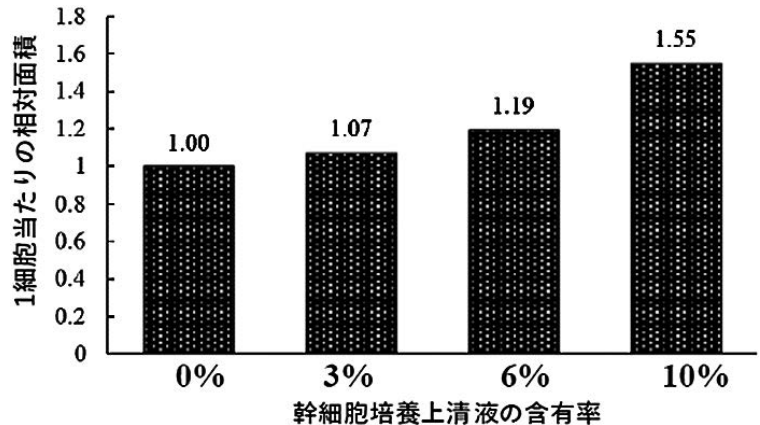


図2 「幹細胞培養上清液」の含有率と1細胞当たりの相対面積比の相関
含有率の上昇に伴い、1細胞あたりの占有面積が広がった

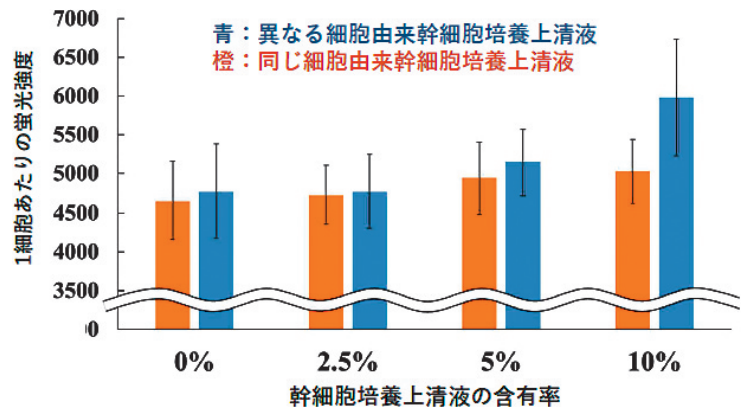


図3 「幹細胞培養上清液」の含有率と1細胞当たりの相対面積比の相関
青色は、「幹細胞培養上清液」を蛍光強度観測に用いた幹細胞と異なるドナー由来の幹細胞を用いて製造した場合を、橙色は、「幹細胞培養上清液」を蛍光強度観測に用いた幹細胞と同じ幹細胞を用いて製造した場合の結果を示している。

4. 考察

今回の研究結果から、「幹細胞培養上清液」が毛包幹細胞の生理活性を高める効果を持つことを、細胞の大きさの変化と、ミトコンドリア膜電位の上昇の2つの観点から初めて実験的に確認することができた。今後は、この活性化により、細胞の老化速度がどのように変化するか、一度老化が進み活性が低下した細胞の生理活性を再度高めること（＝若返り）が可能かなどについて、テロメア長の変化や β ガラクトシダーゼの蓄積の観点から検証を進める。これにより、「幹細胞培養上清液」が“A G Aの改善”や“白髪を再度黒くすること”にどの程度の効果が期待できるかを学術的に検証することを進める。

これにより、現在市場に出回っている様々な“幹細胞培養上清液”関連材料の一つの商品価値基準の設定につながることを期待される。

5. 発表業績

- 1) 第46回日本分子生物学会年会 (2023), 1P-603, 神戸 2023年12月06日.
- 2) 第47回日本分子生物学会年会 (2024), 2P-583, 福岡 2024年11月28日.

参考文献

- 1) Kraskiewicz H. *et al.*, (2020). Can supernatant from immortalized adipose tissue MSC replace cell therapy? An in vitro study in chronic wounds model. *Stem Cell Res Ther*, 11-29.

Utilization Technology Development of Stem Cell Conditioned Media for Cosmetic Material

- Local Contribution via Industry-Academia Collaboration

MORITA Eugene Hayato*, Tanaka Yuki**, MORI Shuhei*, SATO Maki**,
MITSUI Yukio**

Key words : Stem cell conditioned media, mitochondrion, human hair follicle stem cells

Abstract

“Stem cell conditioned media” is obtained from the specialized culture media in which stem cells, such as those derived from umbilical cord blood, adipose tissue, or dental pulp, are cultured. After the cultivation process, stem cells are removed from the medium, and the remaining liquid is subjected to sterilization processes. Stem cells not only have the ability to differentiate into various types of cells but also produce signaling molecules that regulate cellular biological activity, as well as growth factors that promote cellular proliferation. These factors diffuse through interstitial fluid rather than through the bloodstream (paracrine signaling). Hence, the culture supernatant is also rich in bioactive factors.

Due to these properties, stem cell conditioned media are expected to contribute to the development of new therapeutic technologies, by the activation of epithelial tissues. For example, when applied directly to the scalp, it is anticipated that the activation of hair follicle stem cells may prevent or improve AGA (AndroGenetic Alopecia).

The Aim of this study is to investigate, from a cell physiology perspective, whether the culture supernatant derived from “human scalp stem cells (hair follicle stem cells)” — which have been uniquely identified by our research partner, Horus Co. Ltd. — induces hair regeneration through the activation of the tissue surrounding the hair follicle or the conversion of gray hair to black hair through the resolution of pigment cell dysfunction.

* Dept. Chem., Fac., Sci. Josai Univ.,

** Horus Co. Ltd.