

発毛の再生医学

奈良県立医科大学寄生虫学教室

王 寺 幸 輝, 吉 川 正 英, 石 坂 重 昭

TISSUE ENGINEERING OF TRICHOGENESIS

YUKITERU OUJI, MASAHIDE YOSHIKAWA and SHIGEAKI ISHIZAKA

Program in Tissue Engineering, Department of Parasitology, Nara Medical University

Received February 13, 2008

Abstract: 21世紀は「再生医療」の時代といわれ、人類の熱き期待が注がれている。近年の細胞生物学・分子生物学的な解析法の発展により、器官あるいは臓器、個体レベルでの修復機構が明らかにされつつあり、臨床への応用も行われているほどである。特に人工皮膚などを用いる皮膚科学の分野は、いち早く再生医療を取り入れた例といえよう。しかしながら、皮膚付属器官である毛髪は、今のところ試験管で再生することができない。それは、複雑な器官(毛包)を形成する詳細なメカニズムが解明されていないためであろう。発毛再生医療に関する最終目標は、自己の細胞を利用して毛を生み出すことであり、その実現には発毛メカニズムを詳しく解析することが肝要である。本稿では、これまでに得られている知見を紹介し、さらに著者らのWntを用いた発毛再生について紹介する。

Key words : regeneration, tissue engineering, hair growth, trichogenesis, folliculogenesis

はじめに

毛は哺乳類特有の皮膚付属器であり、胎生期より表皮と真皮間の相互作用により毛包が形成され、成長期、退行期、休止期からなる毛周期を獲得した毛(髪)を生じ、発毛を繰り返す。この発毛メカニズムは細胞間あるいは組織間相互作用による現象であり¹⁾、器官形成のメカニズムを解析するためのモデルとしても、また毛の造成という増殖・分化のプロセスを解析する対象としても興味深い器官であると考えられる。しかしながら発毛のメカニズムは不明点が多く、現時点でも試験管で毛を造成することは不可能である。

近年、形態形成や初期発生、あるいは臓器形成に際し、Wnt(ウィント)と呼ばれる分子が重要であることが多数報告されており²⁾、発毛に関しても例外ではないことが明らかとなってきた。本稿では、毛包形成から発毛に至るまでのメカニズムについて、これまでの知見を述べ、さらに著者らのWntを用いた発毛再生に関するデータについて紹介する。

1. 発毛とは

発毛とは表皮細胞と真皮細胞(毛乳頭細胞)との相互作用により未熟な毛包が形成され、やがて増殖し続ける細胞が分化・角化してゆくことで毛に必要な各種タンパク質(ケラチン)により構成される毛(髪)を生じる現象である。

毛は、毛幹とそれを鞘のように包んでいる毛包(hair follicle)からなる(図1A)。毛包とは、多様な分化形態を持った表皮系細胞群と間葉系細胞である毛乳頭細胞などから構成された特徴的な3次元構造を有する器官である。毛包は、表皮基底細胞が真皮内に下方移動し、毛母細胞(hair matrix cell)となり、この毛母細胞が増殖・分化することで形成される。下方移動した基底細胞は外毛根鞘を形成し、毛球部で毛母細胞となる。一昔前までは、毛母細胞は毛包の組織幹細胞と呼ばれるべき細胞であり、活発に分裂することが知られていた(後述するが、実際の毛包幹細胞は別の場所に存在することが明らかとなっている)。毛球の最外層に位置する毛母細胞は分裂して内毛根鞘を生じる。その内側に位置する毛母細胞は、分裂し

て毛小皮というようにして、順次、毛皮質、そして中心部に毛髓を形成する。すなわち、毛母は毛幹の成長や再生を支えていると考えられている。毛乳頭は、毛球部の毛母細胞に囲われている間葉系組織であり、毛母細胞の分裂と毛包組織の分化や伸長に重要な働きをしている。毛包表皮細胞を特徴づけるタンパク質も多数知られており、特に毛特異的ケラチン(hair keratin)は、毛包分化の研究に有用である^{3, 4)}。

ヒトを含めたほとんどの動物で、毛包は周期的に成長と退縮を繰り返している(毛周期)。これによって個々の毛包から造成される毛の長さなどが規定されることになる。毛周期の分子レベルでのメカニズムははっきりしていないが、毛乳頭が重要な役割を果たしていると考えられている。成長期の短縮は毛包からの毛の造成期間の短縮を意味し、ヒトの男性型脱毛では成長期が異常に短縮してしまっていることから、男性型脱毛などその毛髪関連疾患治療薬の研究開発という観点からの研究も盛んである⁵⁾。

2. 発毛に関するシグナル

毛包の形成は表皮と真皮の連続的な相互作用によって進行する¹⁾(図1B)。初期毛包形成に重要なシグナルは真皮側からであることが、表皮と真皮の異所性組換え皮膚(heterotopic epidermal-dermal recombinant skin)と呼ばれる手法により解明されている⁶⁾。

毛包形成のきっかけは真皮がつくるという意味で、毛包形成に必須の真皮シグナルを第1真皮シグナルと呼ばれている^{7, 8)}。第1真皮シグナルを介して、真皮は胎児の表皮に毛包原基を形成させるために、“プラコードを作れ”というシグナルを送る。これによって表皮は下方に肥厚し、プラコードが形成される。プラコードは、下方の、第1真皮シグナルを発した真皮細胞(間葉系細胞)に、“凝集せよ”というシグナル(表皮シグナル)を発する。表皮シグナルを受けた真皮細胞は凝集し(真皮凝集塊)、プラコードに対して第2真皮シグナル“毛包をつくれ”というシグナルを伝達する。このシグナルに従ってプラコードは細胞分裂、細胞分化(毛母細胞と毛幹の諸細胞)、および組織成長を開始する。

興味あることに、マウス胚の真皮はニワトリ胚表皮に羽毛プラコードを、トカゲ表皮に鱗プラコードを誘導するように、第1真皮シグナルは動物種を越えて作用を示すことが明らかになっている。一方で表皮シグナルは、マウスの表皮はマウスの真皮のみに作用できるように、種特異的作用を示す⁹⁾。

第1真皮シグナルの候補として現在最も注目されてい

るのは、Wntシグナルである。このシグナル下流分子を制御することで、毛包形成に大きな影響を与えることが報告されている¹⁰⁾。第1真皮シグナルの他の候補因子としてNogginも考えられている¹¹⁾。Nogginは神経管誘導因子として知られており、骨形成因子BMPの誘導阻害作用を中和することにより誘導活性を示す。真皮凝集塊はNogginを発現しており、そのノックアウトマウスでは、プラコード形成は起きるが、形成されたプラコードの数は野生型の2割程度であり、プラコード形成以降の形態形成も遅れる。

また、Shh(Sonic hedgehog)は表皮シグナルの候補として考えられている¹²⁾。プラコードがこのシグナルで活性化され、下方へ増殖・成長し、毛包を形成する。Shhはまた、真皮に働き毛乳頭形成にも関与している。Shhノックアウトマウスでは、プラコードの細胞増殖が阻害され、未発達な毛乳頭しか形成されず、未熟な毛包となる。Shhノックアウトマウスの胎児皮膚を切り取り、ヌードマウスに移植しても、毛乳頭形成ならびに毛包形成がおこらず、発毛がみられない。

3. Wntシグナル

Wntタンパク質は、分子量約4万の分泌性糖タンパク質で、線虫やショウジョウバエから哺乳類に至るまで広く保存されており、初期発生や形態形成に重要な役割を果たしている^{13, 14)}。Wntの名はマウスの乳癌発生に関わる癌遺伝子int-1とショウジョウバエのセグメントポラリティー遺伝子winglessが類似していることに由来する。Wntは現在までに20種類近く知られており、それぞれが細胞膜上の7回膜貫通型レセプターFrizzledと1回膜貫通型レセプターLRP(low-density lipoprotein receptor-related protein)に結合する。FrizzledとLRPもファミリーを形成してWntとの間に特異的な組み合わせがあると考えられているが、その詳細は不明である。Wntシグナル経路を大別すると3種類ある(図2)。

① β -cateninの細胞内蓄積を介して転写因子TCFを活性化する β -catenin 経路

② 低分子量Gタンパク質Rhoファミリーを介してJNK(c-jun N-terminal kinase)やRhoキナーゼを活性化する PCP 経路

③ 細胞内 Ca^{2+} 動員を引き起こし、プロテインキナーゼCや Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼを活性化する Ca^{2+} 経路である

これらのうち、特に β -catenin経路については初期発生における背腹軸形成に重要な役割を果たすことが報告されており、最近では発毛に関するシグナルとして重要

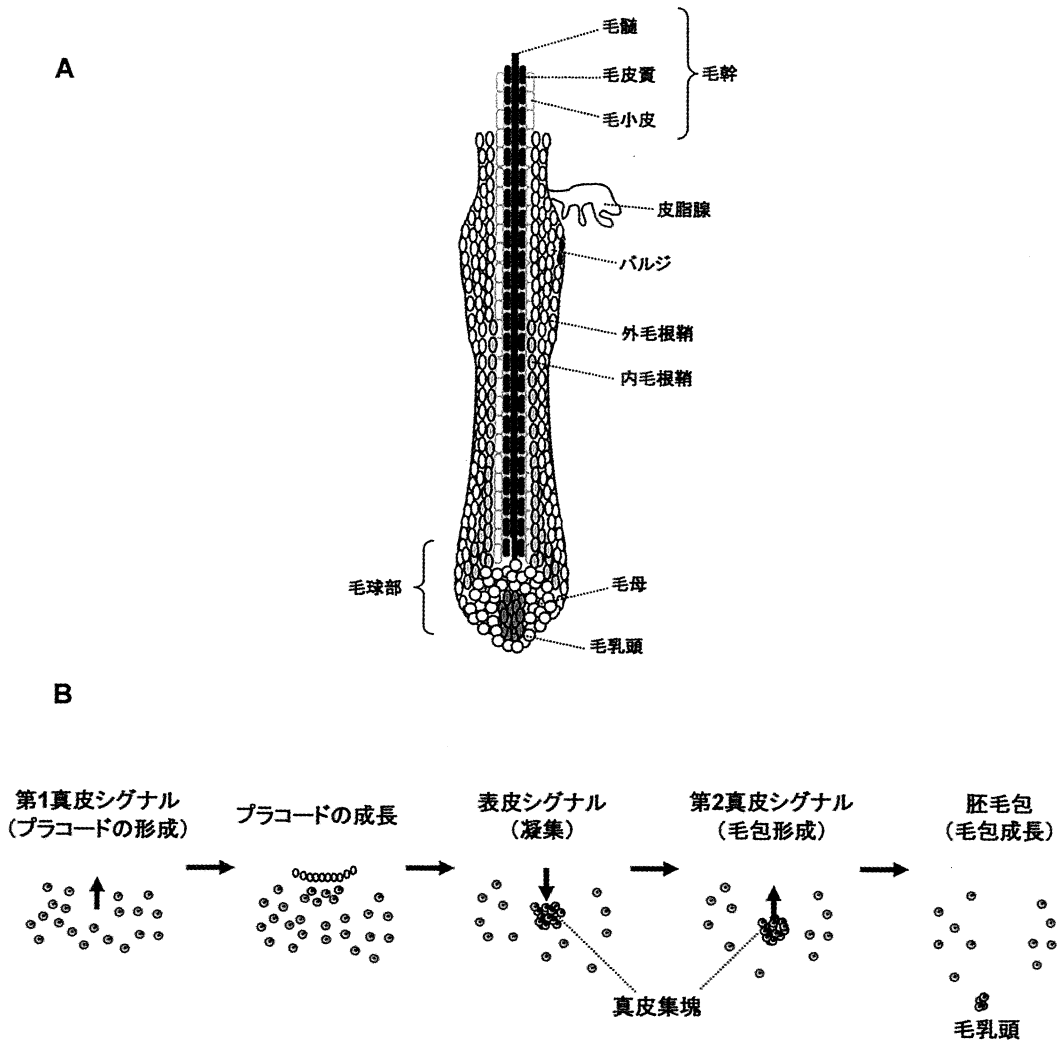


図1. 毛包の構造と発生

(A)成熟毛包の構造。(B)毛包の発生過程:胚皮膚は外胚葉由来の表皮と中胚葉由来の真皮から形成されており、マウスでは13.5日目に真皮シグナルが生じる(第1真皮シグナル)。その後、プラコードが形成され、表皮より真皮集塊を生じるシグナル(表皮シグナル)、続いて真皮集塊より毛包形成シグナル(第2真皮シグナル)が伝達され、毛包成長を遂げる。

視されている。

4. 発毛に関する Wnt シグナル

前述したが、現在のところ、発毛に関して最も有力視されているのは Wnt シグナルであろう。毛包発生過程における第1真皮シグナルはプラコード形成以前の未分化表皮に働いて、これをプラコードに分化させる。そのシグナルの候補遺伝子のひとつとして β -catenin が考えられている。 β -catenin は Wnt シグナルの下流に位置し、lymphoid enhance factor 1 (LEF1) と核内で複合体を形

成し、転写因子として働く。LEF1 は、最初 T cell-specific transcription factor (TCF) と共に T 細胞特異的遺伝子の発現を制御している転写因子として発見された。Wnt シグナルの下流で働く転写因子 LEF1 は、毛母、毛皮質および毛小皮で発現している毛特異的ケラチン (hair keratin) 遺伝子プロモーター領域に結合できることから、毛包発生との関係で注目されている¹⁵⁾。

LEF1 ノックアウトマウスの皮膚では、野生型マウスと同様、13.5日胚で正常な毛芽形成(プラコードと真皮凝集塊)が開始され、次いでプラコードは真皮内を下方成

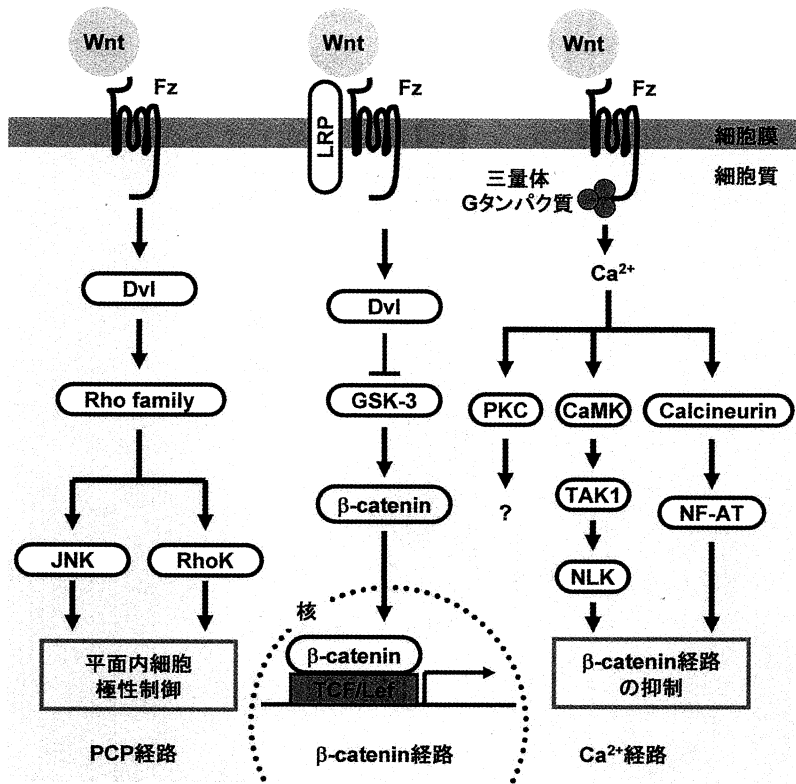


図2. Wnt シグナル伝達経路

PCP 経路: Wnt-11 がこの経路に属する. Rno ファミリーを介して, JNK や Rho キナーゼを活性化し, 平面内細胞極性を制御する. β -catenin 経路: 殆どどのファミリーにもこれに属する. Wnt が作用するとレセプターである Frizzled と LRP から下流の Dvl にシグナルが伝達され, GSK-3 の作用 (β -catenin のリン酸化) が制御される. その結果, β -catenin は分解されずに, 細胞質に蓄積され核内に移行し, 転写因子である TCF と結合して標的遺伝子の発現を促進する. Ca^{2+} 経路: Wnt-5a がこの経路に属する. 細胞内 Ca^{2+} の動員を引き起こし, PKC や calcineurin を活性化し, β -catenin 経路を抑制することが知られているが, その詳細は不明な点が多い.

長し, 18 日胚になると正常な胚毛包を形成する¹⁹⁾. しかしながら, 毛包の数が 3 分の 1 に減少し, 毛皮質と毛髄を欠いている. また生後 3 日目の毛包は短く, 毛の発生が途中で止まる. 特に頬鬚の発生停止は顕著であり, 生後 3 日目のノックアウトマウスは髭が全く無い. 一方で, β -catenin を表皮細胞に過剰発現させたトランスジェニックマウスでは, 新たな毛包形成が認められ多毛になる¹⁷⁾.

また, Kishimoto らは毛乳頭細胞の培養条件で Wnt シグナルが, 毛乳頭の活性状態を維持できることを報告している¹⁸⁾. 通常, 毛乳頭細胞を *in vitro* で培養すると, 毛包形成誘導能を消失してしまう. しかしながら, Wnt シグナルを発現させ培養すると, その誘導能は維持され

ることから, 毛乳頭に対する Wnt シグナルも重要であることがわかる. また, 後述するが, 我々¹⁹⁾や Ito ら²⁰⁾の研究で, Wnt シグナルが発毛再生過程において重要な因子であることが明らかとなってきた.

5. 実験動物を用いた発毛の再生

分子生物学や発生工学の発展に伴い, トランスジェニックやノックアウトマウスを用いた個体レベルでの研究は, 近年盛んに行われるようになった. 毛や毛包は, 外見上もまた組織学的にも異常を見つけやすいという面があり, ある遺伝子の制御に着目した研究で偶然, 新たな機能が見出されることも少なくはない. しかしながら, こうした知見の解釈にはさらなる厳密な解析が求められ

る。毛包の形成や機能発現に必要な因子であっても(あるいは直接の関係がなくても), それらの局在性の乱れや過剰な発現が毛包内のホメオスタシスを乱した場合には, 毛包の構造や機能に何らかの影響が出ると考えられるからである。すなわち, 動物個体で得られた知見を細胞や器官レベルで検証することも重要であると考えられる。男性ホルモンに対する応答性などを除くと, 毛の発生過程や毛周期を伴う再構築過程はマウスなどの実験動物とヒトとでかなり共通していることが, 近年の毛髪科学の成果によって明らかとなっている。また, 細胞培養・分離技術, 培養液の改良などにより, 毛包構成細胞の分離と培養も可能となり, それら単一細胞のキャラクタリゼーションや細胞移植に用いることで発毛メカニズムの解明が行われている。細胞の分離技術や個々の培養条件などについては個々の総説^{21, 22)}を参考にさせていただきたい。ここでは, 紙面の都合上, 現在までに行われている実験動物を用いた発毛再生について簡単に紹介する。

5.1 Skin graft assay

外科的処置を行う最も簡単な方法であるが, あくまで幼若な皮膚組織を移植することで発毛経過を観察するという点で, 実験内容も限られてくる。免疫不全マウスである SCID マウスあるいはヌードマウスの背中に皮膚組織を移植することで, 発毛の経過を調べるが, ドナーとなる幼若な皮膚組織は一般的にトランスジェニックマウスからの皮膚組織を移植することで発毛への影響を調べることが多い²³⁾。

5.2 Hair reconstitution assay

一方で, 細胞を一旦バラバラにしてヌードマウスの背中にシリコンチャンパーを用いて移植する方法があり, これを hair reconstitution assay と呼んでいる²⁴⁾。この手技は, 単離した細胞からの毛包構築となるため, ニードマウスの背中を「培養器」に見立てた環境で発毛再生を実現できる。実際に, 移植2週間後からの発毛を肉眼で観察できるのも利点であり, 著者らも初めて観察した時の

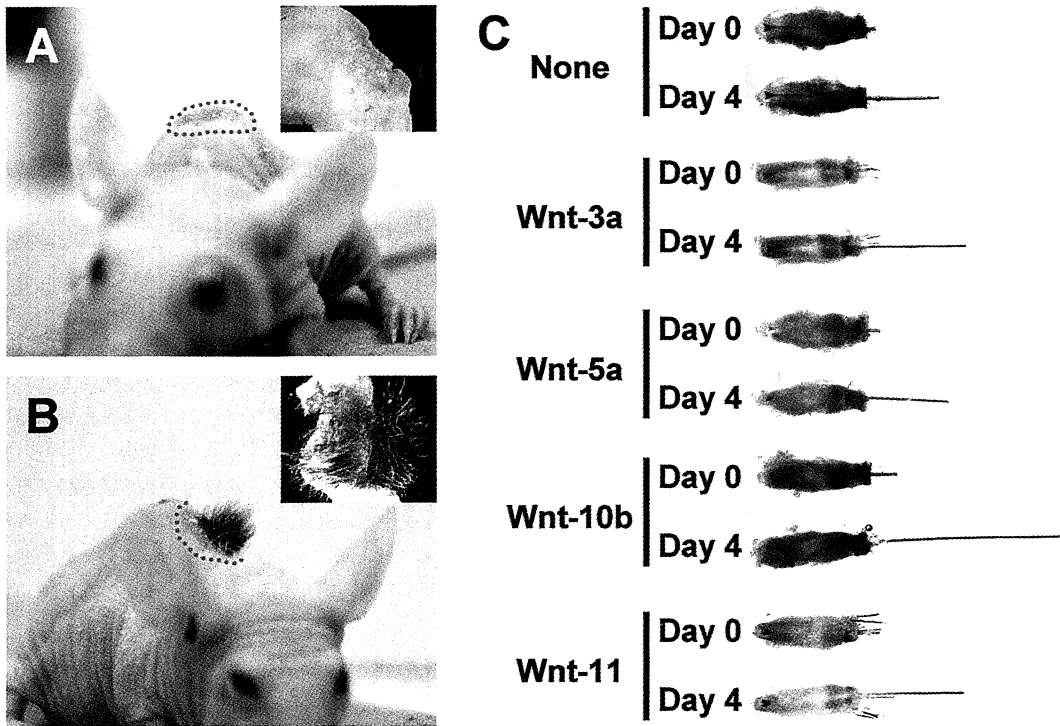


図3. Wnt シグナルによる発毛再生

(A, B) hair reconstitution による発毛再生実験. ニードマウスの背中に胎生マウスより調整した細胞と COS 細胞 (A) あるいは Wnt-10b を強制発現させた COS 細胞 (B) を同時に移植し, 移植後3週間経過後の肉眼的所見. 過剰な Wnt シグナルを作用させると発毛が促進された. 挿入図: 点線で囲んだ部分を摘出したもの. (C) マウス口髭より単離した毛包器官を種々の Wnt により培養した結果, Wnt-10b のみ毛軸の著名な伸長を認めた. Day0 は培養開始時, Day4 は, 培養4日目における毛包器官.

驚きは隠せない(図 3 A, B)。この方法の利点は、皮膚・発毛再構築過程がチャンバー内の「隔離された環境」で行われるため、正味の発毛の影響を調べることができる点であろう。著者らも Wnt を強制発現させた細胞を同時に移植することで発毛促進作用が確認できたため、毛包形成あるいは発毛に対して Wnt シグナルが重要であると考えている¹⁹⁾。

5.3 Patch assay

最近、前述した hair reconstitution assay に代替法として注目されているのが本法である²⁰⁾。本法における細胞調整法は hair reconstitution assay に準ずるが、ヌードマウスの皮下に移植することで皮下組織内に毛包・毛を有する“patch 状”に膨らんだ組織構築が生じる。つまり、皮下組織において特殊なチャンバーを用いずに発毛への影響を調べることができ、個体(マウスなど)の複数箇所に同様の処理を施すことができるという意味では、前述の hair reconstitution assay より簡便かつ迅速な方法であり、今後の発毛メカニズムを解析する上でも十分活用できると考えられる。

5.4 Follicle organ culture assay

培地に浮かべた透過性膜上でのヒトの頭髮成長期毛を器官培養(follicle organ)すると、1 週間以上にわたって生体内と同等の速度で成長が維持される²⁰⁾。つまり毛包は、構造も機能も保持したまま培養系で比較的長期に維持できる数少ない器官の一つであるといえる。マウス毛包器官では、背腹の毛包を単離することは困難であるため、一般的に口髭より単離する。器官なので in vivo と in vitro のちょうど中間の環境に位置し、毛軸の伸長を制御する因子の探索として有用なツールであることは言うまでもなく、製薬研究では、発毛促進薬のスクリーニングなどにも応用されている。

6. 毛包幹細胞

骨髄をはじめ、肝臓、脾臓、神経、歯、そして皮膚・・・あらゆる組織には幹細胞が存在するという報告が後を絶たない。もともと皮膚組織には上皮-真皮間の基底膜上に増殖力旺盛な未分化細胞が存在することが知られていた。一昔前まではこの未分化基底細胞が毛包幹細胞ではないかという説が有力であった。しかしながら、1990 年に、Cotsarelis らが毛包を構成する細胞の起源は、バルジと呼ばれる部位に限局しており(図 1A 参照)、普段はじっとした細胞であるが、一旦、毛乳頭などからのある種のシグナルを受けると活発に増殖し、種々の毛包構成細胞に分化してゆくという“バルジ仮説”が提唱された²¹⁾。最近のトランスジェニックマウスなどの解析に

より、確かにこの仮説のとおり、「毛包幹細胞」なる細胞集団が存在し、あらゆる細胞に分化できることも確認されている²⁰⁾。

ヒトの毛包幹細胞は、2006 年に Ohyama らが報告している²⁰⁾。マイクロダイセクション法と DNA チップアレイを組み合わせることで、ヒト毛包の様々な部位で網羅的遺伝子発現解析を行い、そのプロファイルを比較し、バルジに特異的に発現している表面マーカーの同定に成功し、これらのマーカーを用いてヒト毛包から増殖能に富んだバルジ細胞を分離することに成功している。

これまで広範囲熱傷患者に対しての救命は、大量培養により調製した表皮細胞が利用されていたが、表皮は再生されても皮膚付属器である毛、脂腺、汗腺は再生されず、整容的にも機能的にも不完全であった。しかしながら、バルジに局在する毛包幹細胞は表皮、脂腺、毛包の全ての層を形成する多分化能幹細胞であることから、今後、移植医療の現場において毛包幹細胞による皮膚の完全再生が可能になるのも、そう遠い未来ではないと考えられる。また、同時に多分化能毛包幹細胞の増殖、分化と遺伝子発現の関わりや、幹細胞自体の可塑性の解明が一層進むことで、発毛メカニズムの解明に寄与することが期待される。

7. Wnt シグナルによる発毛再生

Ito らは、2007 年に成体マウスの創傷治癒過程で新たな毛包が形成されることを報告している²⁰⁾。この現象は実は 50 年ほど前から知られてはいたが、決定的な証拠が見出されなかったため、そのメカニズムはないがしろにされていた。巧妙な遺伝子改変マウスを用いた分子生物学的手技により、この現象が解明され、その過程で興味あることに、Wnt シグナルを抑制すると、毛はもとより毛包形成自体が生じず、逆に Wnt シグナルを過剰に発現させると、毛包の数が増加することを報告している。すなわち、マウスにおいては、創傷の自然治癒過程で自己の Wnt シグナルが働き、自ら発毛再生できると考えられる。このように Wnt シグナルは毛包形成や発毛促進に重要な因子であることが明らかとなっているなかで、著者らが最近明らかにした事象について紹介したい。

マウスの皮膚・毛包形成過程は 13.5 日胚を境に上皮-真皮間でのダイナミックな細胞分化・細胞移動が観察される(図 1B)。この過程で、Reddy らは Wnt ファミリーの遺伝子発現を詳細に解析している³⁰⁾。彼らの解析から、毛包形成初期段階(14.5 日胚)で上皮に Wnt-10b が強く発現し、その後、毛母細胞と外毛根鞘に発現が限局してゆくことを報告している。そこで、我々は Wnt ファミ

リの中でも Wnt-10b に注目した。まず、マウスの皮膚より未熟な上皮細胞を単離し、*in vitro* において Wnt-10b の影響を調べた。驚くことに Wnt-10b は上皮細胞の増殖を著しく抑制し、分化を促進する働きがあることが明らかとなった³¹⁾。一方で、他の Wnt ファミリー (Wnt-3a, -5a, 11) についても同様の検討を行ったが、Wnt-10b のような作用は認められなかった³²⁾。

次に、マウス 10.5 日胚の皮膚培養により Wnt-10b の影響を調べたところ、毛包形成を早期に生じる、つまり毛包形成促進作用が認められた¹⁹⁾。また、毛包器官培養における Wnt の影響を調べたところ、Wnt-10b のみが特異的に毛軸の伸長を促進することを見出すことができた³²⁾ (図 3C)。Wnt シグナルを強制発現させた場合、多毛になるという報告から、hair reconstitution assay を用いて Wnt-10b 強制発現細胞を移植した結果、顕著な発毛促進効果があることが明らかとなった¹⁹⁾ (図 3A, B)。この結果は、Ito らが報告している Wnt シグナルによる毛包形成数の増加という結果と一致している。

これまでの知見と我々の結果を踏まえ、Wnt シグナルが毛包新生、すなわち毛包再生、発毛再生に重要なシグナルであることは言うまでもない。しかしながら、発毛における時間的、空間的制御機序の全貌を明らかにするためには、Wnt のレセプターである Frizzled との作用機序の解明、また、他のシグナルとのクロストークも考慮に入れるべきであろう。

おわりに

現在のほとんどの発毛研究は、「育毛」が中心である。しかしながら「育毛」には個人差があることをよく耳にする。この原因はやはり、『発毛』というダイナミックな現象が十分解明されていないためであろう。以前から毛乳頭は発毛再生のターゲットとして注目されてきたが、これまで述べてきたように、実は『発毛』には材料が必要であり、その材料を操るシグナルがさらに重要である。これらの候補として Wnt シグナルを紹介したが、さらなる解析が進み、培養細胞でも毛を新生することが可能になる日を目指して、著者らも研究を続けてゆきたい。また、国内外でも発毛に焦点を絞った研究者は少ないと認識しているが、組織間相互作用により生じる器官形成を解析できるモデルという意味で、毛包を対象にした研究者が増加することを期待してやまない。

文 献

- 1) Oliver, R.F. and Jahoda, C.A. : Dermal-epidermal interactions. *Clin. Dermatol.* **6** : 74-82, 1988.
- 2) Wodarz, A. and Nusse, R. : Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14** : 59-88, 1998.
- 3) Heid, H.W., Moll, I. and Franke, W.W. : Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. I. Human and bovine hair follicles. *Differentiation.* **37** : 137-157, 1988.
- 4) Langbein, L., Rogers, M.A., Winter, H., Praetzel, S. and Schweizer, J. : The catalog of human hair keratins. II. Expression of the six type II members in the hair follicle and the combined catalog of human type I and II keratins. *J. Biol. Chem.* **276** : 35123-35132, 2001.
- 5) Hibino, T. and Nishiyama, T. : Role of TGF-beta2 in the human hair cycle. *J. Dermatol. Sci.* **35** : 9-18, 2004.
- 6) Kollar, E.J. : The induction of hair follicles by embryonic dermal papillae. *J. Invest. Dermatol.* **55** : 374-378, 1970.
- 7) Hardy, M.H. : The secret life of the hair follicle. *Trends Genet.* **8** : 55-61, 1992.
- 8) Millar, S.E. : Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *J. Invest. Dermatol.* **118** : 216-225, 2002.
- 9) Sengel, P. : "Epidermal-dermal interaction" (Bereiter-Hahn, J., Matoltsy, A.G., Richards, K.S. eds.). Springer-Verlag, Berlin, pp. 374-408, 1986.
- 10) Jamora, C., DasGupta, R., Kocieniewski, P. and Fuchs, E. : Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature* **422** : 317-322, 2003.
- 11) Botchkarev, V.A., Botchkareva, N.V., Roth, W., Nakamura, M., Chen, L.H., Herzog, W., Lindner, G., McMahon, J.A., Peters, C., Lauster, R., McMahon, A.P. and Paus, R. : Noggin is a mesenchymally derived stimulator of hair-follicle induction. *Nat. Cell Biol.* **1** : 158-64, 1999.
- 12) St_Jacques, B., Dassule, H.R., Karavanova, I., Botchkarev, V.A., Li, J., Danielian, P.S., McMahon, J.A., Lewis, P.M., Paus, R. and McMahon, A.P. : Sonic hedgehog signaling is

- essential for hair development. *Curr. Biol.* **8** : 1058-1068, 1998.
- 13) Dale, T.C. : Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem. J.* **329** : 209-223, 1998.
- 14) Wodarz, A. and Nusse, R. : Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14** : 59-88, 1998.
- 15) Zhou, P., Byrne, C., Jacobs, J. and Fuchs, E. : Lymphoid enhancer factor 1 directs hair follicle patterning and epithelial cell fate. *Genes Dev.* **9** : 700-713, 1995.
- 16) van Genderen, C., Okamura, R.M., Fariás, I., Quo, R.G., Parslow, T.G., Bruhn, L. and Grosschedl, R. : Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes Dev.* **8** : 2691-2703, 1994.
- 17) Gat, U., DasGupta, R., Degenstein, L. and Fuchs, E. : De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell.* **95** : 605-614, 1998.
- 18) Kishimoto, J., Burgeson, R.E. and Morgan, B.A. : Wnt signaling maintains the hair-inducing activity of the dermal papilla. *Genes Dev.* **14** : 1181-5, 2000.
- 19) Ouji, Y., Yoshikawa, M., Shiroy, A. and Ishizaka, S. : Promotion of hair follicle development and trichogenesis by Wnt-10b in cultured embryonic skin and in reconstituted skin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345** : 581-587, 2006.
- 20) Ito, M., Yang, Z., Andl, T., Cui, C., Kim, N., Millar, S.E. and Cotsarelis, G. : Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature.* **447** : 316-20, 2007.
- 21) Randall, V.A., Sundberg, J.P. and Philpott, M.P. : Animal and in vitro models for the study of hair follicles. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **8** : 39-45, 2003.
- 22) Terskikh, V.V. and Vasiliev, A.V. : Cultivation and transplantation of epidermal keratinocytes. *Int. Rev. Cytol.* **188** : 41-72, 1999.
- 23) Wang, X., Zinkel, S., Polonsky, K. and Fuchs, E. : Transgenic studies with a keratin promoter-driven growth hormone transgene: prospects for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94** : 219-226, 1997.
- 24) Weinberg, W.C., Goodman, L.V., George, C., Morgan, D.L., Ledbetter, S., Yuspa, S.H. and Lichti, U. : Reconstitution of hair follicle development in vivo: determination of follicle formation, hair growth, and hair quality by dermal cells. *J. Invest. Dermatol.* **100** : 229-236, 1993.
- 25) Zheng, Y., Du, X., Wang, W., Boucher, M., Parimoo, S. and Stenn, K. : Organogenesis from dissociated cells: generation of mature cycling hair follicles from skin-derived cells. *J. Invest. Dermatol.* **124** : 867-76, 2005.
- 26) Philpott, M.P., Green, M.R. and Kealey, T. : Human hair growth in vitro. *J. Cell Sci.* **97** : 463-471, 1990.
- 27) Cotsarelis, G., Sun, T.T. and Lavker, R.M. : Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* **61** : 1329-1337, 1990.
- 28) Oshima, H., Rochat, A., Kedzia, C., Kobayashi, K., and Barrandon Y. : Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell* **104** : 233-245, 2001.
- 29) Ohyama, M., Terunuma, A., Tock, C.L., Radonovich, M.F., Pise_Masison, C.A., Hopping, S.B., Brady, J.N., Udey, M.C. and Vogel, J.C. : Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells. *J. Clin. Invest.* **116** : 249-260, 2006.
- 30) Reddy, S., Andl, T., Bagasra, A., Lu, M.M., Epstein, D.J., Morrisey, E.E. and Millar, S.E. : Characterization of Wnt gene expression in developing and postnatal hair follicles and identification of Wnt5a as a target of Sonic hedgehog in hair follicle morphogenesis. *Mech. Dev.* **107** : 69-82, 2001.
- 31) Ouji, Y., Yoshikawa, M., Shiroy, A. and Ishizaka, S. : Wnt-10b promotes differentiation of skin epithelial cells in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342** : 28-35, 2006.
- 32) Ouji, Y., Yoshikawa, M., Moriya, K., Nishiofuku, M., Matsuda, R. and Ishizaka, S. :

Wnt-10b, uniquely among Wnts, promotes
epithelial differentiation and shaft growth.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **367** : 299-304,
2008.