

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580393
 研究課題名（和文） 三次元培養ヒト皮膚モデルの細胞機能と形態形成に及ぼす GSK-3 制御薬剤の作用
 研究課題名（英文） Effect of GSK-3 inhibitor on cell function and structural formation in human skin-equivalent model
 研究代表者
 西山 敏夫（NISHIYAMA TOSHIO）
 東京農工大学・農学部・教授
 研究者番号：60372455

研究成果の概要：皮膚細胞機能や皮膚再生への作用が明らかになりつつある Wnt/ β -catenin シグナルが、三次元培養ヒト皮膚モデルの細胞機能と形態にどのように影響するかを明らかにすることを目的とする。Wnt/ β -catenin シグナルを促進する GSK-3 阻害剤を作用させると、表皮ケラチノサイトは増殖促進のみならず分化も促進され、また、線維芽細胞は増殖促進されることがわかった。さらに、三次元培養ヒト皮膚モデルの表皮重層化が維持され、基底膜タンパク質の分泌促進と基底膜構造が維持されるために皮膚モデルの課題であった長期間培養の可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：(1) 三次元培養 (2) 皮膚モデル (3) Wnt/ β -catenin (4) ケラチノサイト (5) 線維芽細胞 (6) GSK-3 (7) BIO (8) 増殖分化

1. 研究開始当初の背景

(1)我々は、ヒト細胞とコラーゲン線維ゲルを用いて、基底膜形成、表皮分化、真皮構造などに及ぼす因子の作用機序解明を行い、バイオアッセイ系としての三次元培養皮膚モデル系の確立を目指している。しかし、細胞培養系であるために、表皮、真皮形態は2～3週間位しか維持できない、長期間かかる構造形成を検討できない、など問題点が残る。(2)Wnt シグナル系は、動物の胚発生を制御す

るだけでなく、発生過程から組織・器官形成にいたるまで広く関与している。成体での細胞増殖制御に対しても Wnt シグナル系は重要であり、最近では再生医学との関連も深くなり多くの研究がなされている。Wnt/ β -catenin シグナル経路の一つが、皮膚ケラチノサイト、線維芽細胞や毛乳頭細胞、さらには皮膚創傷治癒における皮膚の再表皮化や毛包形成に関与していることが示されている。このシグナル系が GSK-3 阻害剤などで促

進されると、ケラチノサイトの増殖促進・分化抑制、線維芽細胞の増殖促進、さらには創傷皮膚での表皮ケラチノサイトからの毛包形成の可能性が示唆されている。

(3) Wnt/ β -catenin シグナルの活性化は、GSK-3 阻害剤がよく使用される。選択的阻害剤として特異性の高い 6-bromoindirubin 類がよく使用されており、6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO) は細胞膜透過性を改良した化合物で、低濃度で特異的に作用することが報告されている。

2. 研究の目的

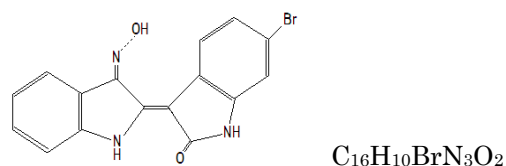
このような背景のもと、本研究では以下のことを明らかにすることを目的とする。

- (1) ヒト新生児皮膚ケラチノサイト (HEK) ならびにヒト新生児皮膚線維芽細胞 (HF) の単層培養系での細胞活性に及ぼす GSK-3 阻害剤 (BIO) の影響を明らかにする。増殖性や表皮細胞分化への影響、また、形態形成との関連で細胞外マトリックス関連分子 (分解酵素系も含む)、への影響を検討する。
- (2) 三次元培養皮膚モデル系を用いて、GSK-3 阻害剤 (BIO) で Wnt/ β -catenin シグナルの活性化し、表皮重層化や最終分化の角化状態、基底膜形成状態など、形態形成への影響を組織学的に解析する。また、長期間培養した皮膚モデルの表皮、基底膜、真皮線維などの構造解析と形成機構の解析を行い、長期間培養の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) GSK-3 阻害剤

GSK-3 阻害剤として BIO ($(2'Z,3'E)$ -6-Bromoindirubin-3'-oxime, $C_{16}H_{10}BrN_3O_2$ CALBIOCHEM) を用いた。



(2) 細胞培養

線維芽細胞は正常ヒト新生児包皮由来線維芽細胞 (HF) (クラボウ) の Passage5~7 を用いた。表皮角化細胞は正常ヒト新生児包皮由来表皮角化細胞 (HEK) (クラボウ) の Passage2~3 を用いた。

(3) 細胞増殖への影響

HF、HEK ともに播種後、それぞれの至適培地で培養し、BIO または DMSO を添加し培養した。所定の時間後、細胞数をカウントして、細胞増殖を測定した。

(4) HEK 接触阻害分化誘導

HEK を 60mm ϕ ディッシュに約 5,000 cells/cm² で播種し、培養 3 日目、7 日目で形

態観察し、細胞を回収した。

(5) 培地内 Ca^{2+} 濃度依存的分化誘導

HEK 培養において、培地内の Ca^{2+} 濃度を 0.03mM から 2.0mM に上昇させ分化を誘導した。薬剤添加実験では、播種翌日に薬剤添加培地に交換し 24 時間処理した後、薬剤を含む Ca^{2+} 高濃度培地に交換した。培地交換後は 48 時間培養し分化させた。

(6) RNA 抽出

HF および HEK は、60mm ϕ ディッシュ 1 枚あたり TRIZOL Reagent 1ml を用いて溶解し、プロトコールに従い細胞の総 RNA を抽出した。

(7) cDNA 合成

HEK から抽出した総 RNA サンプルは、RNase-free DNase I (Roche) で処理し、サンプル中の DNA を分解させ、逆転写により cDNA の合成をした。

(8) 定量的リアルタイム PCR による遺伝子発現解析

遺伝子発現の定量的解析を行うため、リアルタイム PCR 装置 (Thermal Cycler Dice RealTime System TP800 TaKaRa) を用いた。得られ各遺伝子の発現量は、18S rRNA (18S) または Mitochondrial Ribosomal Protein L-19 (MRPL-19) の発現を内部標準とし、その値に対する相対値として算出した。

(9) 統計学的処理

値は平均値 \pm 標準誤差 (S.E) で示した。各実験により得られた結果は、2 群間の比較であればスチューデント t 検定を行い、3 群以上の比較については一元分散分析を行った後、ニューマン・キュールス検定を行い統計学的処理した。危険率 5%未満をもって有意な差と判定した。

(10) 三次元培養皮膚モデル

① 真皮モデル：正常ヒト新生児包皮由来線維芽細胞 (HF) を I 型コラーゲンゲル内で培養し、収縮したゲルを真皮モデルとして使用した。

② 皮膚モデル：皮膚モデルは、正常ヒト新生児包皮由来表皮角化細胞 (HEK) を真皮モデル上で培養して作製した。角層形成させるために、皮膚モデルを気-液境界培養し、表皮層のみ空気に曝露した。その後、MMP 阻害剤とセリンプロテアーゼ阻害剤を添加し、培養を継続した。培養 14 日目、28 日目に皮膚モデルを処理し、組織形態学的解析に供した。

(11) 組織学的解析

4%パラホルムアルデヒド、0.2%ピクリン酸溶液 (0.1 M PB) の Zamboni 固定液を作製し、皮膚モデルを固定した。皮膚モデルを、パラフィン切片用、凍結切片用、電子顕微鏡観察用、に切り分けそれぞれ 4°C に保存した。パラフィン切片は、HE 染色で皮膚モデルの全体構造や表皮重層構造を解析した。凍結切片は、表皮分化マーカーや基底膜成分の免疫

染色に供した。電子顕微鏡観察用切片は、表皮細胞間構造、表皮内構造、基底膜構造の微細構造解析など、透過型電子顕微鏡解析に用いた。

4. 研究成果

①線維芽細胞増殖への GSK3 阻害剤の影響

単層培養系での線維芽細胞 (HF) の増殖への影響を調べた。線維芽細胞を播種後、10% FBS の存在下でコンフルエントに達した細胞に、BIO を作用させた。2 日後に細胞数を測定した結果を図 1 に示した。細胞増殖に対する濃度依存性を検討したところ、コントロールに比べ、0.1 μM 、0.3 μM で 1.2 倍、0.5 μM で約 1.6 倍の細胞増殖が促進されていた。それよりも高い濃度では、若干増殖促進が観察されたが、有意な差ではなかった。

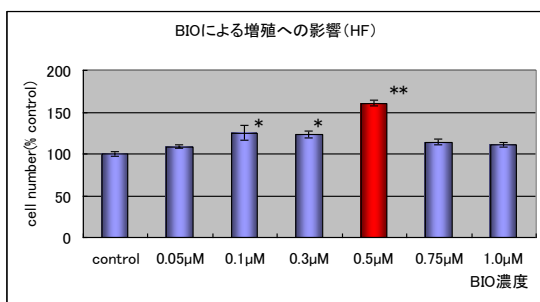


図 1 BIO の線維芽細胞増殖への影響
値はコントロールを 100 とした相対値。
(Bar: S.E. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n = 3$)

②表皮角化細胞増殖への GSK3 阻害剤の影響

三次元培養皮膚モデルに導入することも考慮し、表皮角化細胞への影響を検討した。表皮角化細胞 (HEK) はコンフルエントまで増殖すると、接触阻害により細胞は分化誘導され、一部は角化してしまう。そのため、BIO 添加 4 日目で細胞を回収するため、その時点でコンフルエントにならないように、培養条件を設定した。その結果を図 2 に示した。0.1 μM の濃度で細胞増殖が約 1.4 倍促進された。HF で増殖促進効果のあった 0.5 μM の濃度では増殖が阻害された。細胞の形態の観察により、BIO 添加の影響がないことを確認した。

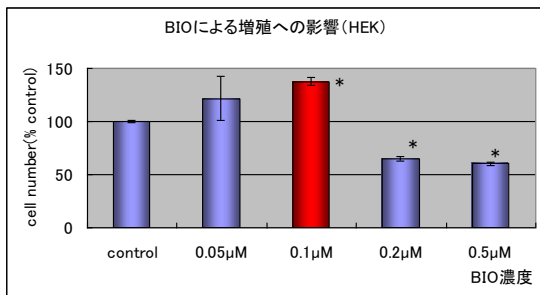


図 2 BIO の表皮角化細胞増殖への影響
値はコントロールを 100 とした相対値。
(Bar: S.E. * $p < 0.05$, $n = 3$)

これらの増殖促進作用の原因を明らかにするために CyclinD1 発現解析を行ったが、両細胞ともに増殖促進と関係付ける結果は得られなかった。

③表皮角化細胞分化への GSK3 阻害剤の影響

BIO による HEK 分化への影響を検討するため、接触阻害による分化誘導法と高濃度 Ca^{2+} による分化誘導法の二つの分化誘導方法を用いて分化マーカー遺伝子発現を定量的に解析した。

表皮角化細胞の分化マーカー遺伝子解析から、今回の実験条件では、低濃度 Ca^{2+} (0.03mM) では分化マーカー遺伝子の発現は 48 時間の培養で変化しないこと、また高濃度 Ca^{2+} (2.0mM) で 48 時間培養することで最終分化までは誘導できないが分化移行を誘導できることが示された。

この結果をもとに、増殖促進作用を示す 0.1 μM の BIO の HEK に及ぼす影響を検討した。BIO で 24 時間前処理後、BIO 存在下で高濃度 Ca^{2+} 48 時間の分化誘導を行った。低濃度 Ca^{2+} (0.03mM) ではコントロールよりも BIO 添加で細胞形態がより立体的で増殖性が高い HEK に特徴的な形態を示した。一方、高濃度 Ca^{2+} (2.0mM) ではコントロールも BIO 添加でもほとんど変化はなく、多くの細胞が扁平で広がった Ca^{2+} 分化誘導特異的な形態を示した。

次に分化マーカーの遺伝子発現を検討した。低濃度 Ca^{2+} 条件下では BIO は増殖作用を反映するようにケラチン 5 の発現の上昇傾向がみられたが、一方、ケラチン 10、インボルクリン、トランスグルタミナーゼ 1、フィラグリンで有意な発現上昇がみられた。以上から、低濃度 Ca^{2+} 下での増殖性の高い HEK の分化を BIO が促進することが示された。

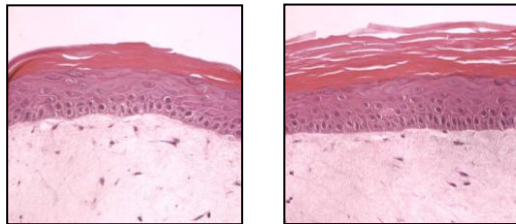
高濃度 Ca^{2+} で分化を誘導した HEK では、ケラチン 5 の発現は BIO を添加しても影響はみられなかった。分化マーカーのケラチン 10 は BIO によりその発現が大きく促進されていた。一方、インボルクリン、トランスグルタミナーゼ 1、フィラグリンは若干上昇するがほとんど変化はみられなかった。このように、高濃度 Ca^{2+} により分化が誘導された細胞では低濃度 Ca^{2+} でみられたような BIO による分化マーカーの発現促進作用は観察されなかった。

以上のように、低濃度 Ca^{2+} の培養系で BIO の GSK-3 阻害により、増殖も分化も促進される結果が得られたことから、表皮角化細胞のステージにより BIO の作用が異なり、表皮幹細胞や Transit Amplifying (TA) 細胞には増殖促進に作用し、一方で TA 細胞の分化細胞への移行を促進している可能性が考えられた。

④三次元培養皮膚モデルの形態におよぼす GSK3 阻害剤の影響

単層培養系への影響から、皮膚細胞 (HEK, HF) の増殖を促進する作用および HEK の分化を促進する作用が確認できた。次に、構造形成への影響を検討するために三次元培養皮膚モデルでの解析を行った。GSK3 阻害剤の添加濃度は皮膚モデルの HF と HEK の両細胞への効果を考慮し、単層培養系で HF も HEK もともに有意に増殖促進される 0.1 μ M の濃度を選択した。

2 週間培養した皮膚モデルの HE 染色結果を図 3 に示した。表皮と真皮の接着状態にも、表皮層の様子にも、GSK3 阻害剤の添加による違いは特に観察できなかった。



BIO(-) BIO(+)
図 3 三次元培養皮膚モデルの HE 染色 (培養 2 週間目)

基底膜構成成分である IV 型コラーゲン (図 4)、VII 型コラーゲン、ラミニン 5 の免疫染色結果は、BIO を添加した皮膚モデルでも、表皮真皮境界部への基底膜成分の局在が確認されたが、BIO を添加していない皮膚モデルと比較して染色強度が減少していた。

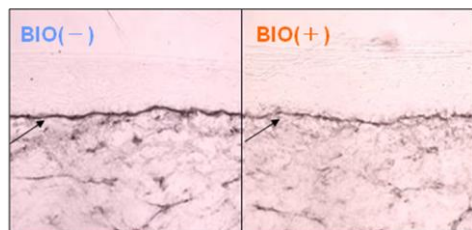
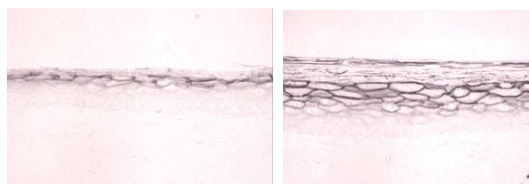


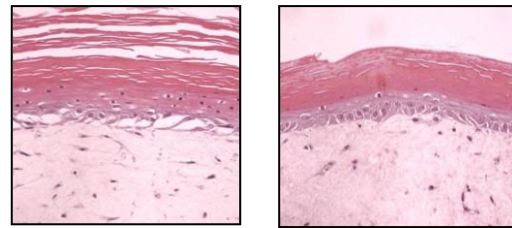
図 4 IV 型コラーゲンの免疫染色

表皮分化マーカーであるトランスグルタミナーゼとフィラグリンの免疫染色結果から、BIO を添加した皮膚モデルでは、トランスグルタミナーゼの発現領域が拡大していた。また、フィラグリンの発現は角層直前の顆粒層に局在していたが、その発現領域は同じく拡大していた。



BIO(-) BIO(+)
図 5 トランスグルタミナーゼの免疫染色

4 週間培養した皮膚モデルの HE 染色結果から、通常の培養では、表皮と真皮の結合状態が悪く、立方体状の表皮基底細胞が少なく、また核の凝縮が多く観察された。BIO を添加した皮膚モデルでは、表皮層と真皮層の結合状態がよく、2 週間培養の場合と比較すると細胞層が 3~4 層と少ないが、立方体状の基底細胞も確認することができた (図 6)。



BIO(-) BIO(+)
図 6 三次元培養皮膚モデルの HE 染色 (培養 4 週間目)

基底膜構成成分である IV 型コラーゲン、VII 型コラーゲン、ラミニン 5 の免疫染色結果から、通常の培養では、皮膚モデルの表皮真皮境界部への基底膜成分の局在が確認されたが、2 週間培養の場合と比較すると、その染色性は低下していた。それに対して、BIO を添加した場合、各成分とも染色強度、染色の直線性が維持されていた。

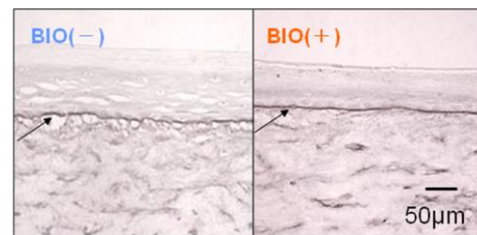


図 7 IV 型コラーゲンの免疫染色

表皮分化マーカーであるトランスグルタミナーゼとフィラグリンの免疫染色結果から、通常の培養では、細胞の状態が悪く、染色が不均一であった。一方、BIO を添加した場合は、トランスグルタミナーゼ、フィラグリンの発現は表皮層上層に局在していた。BIO を添加した場合、表皮層が密にパッキングされていることから、これらの分化マーカーがより局在して観察された。

⑤ 三次元培養皮膚モデルの微細構造に対する GSK3 阻害剤の影響

光学顕微鏡での形態観察の結果、4 週間の培養で BIO の添加により表皮層と真皮層の結合状態が改善されていたことが明らかとなった。さらに微細な構造に与える影響を調べるため、透過型電子顕微鏡で観察を行った。2 週間の培養では、基底表皮細胞の基底面に厚さ 30 nm ほどの電子密度の高い連続的な

ラミナデンサがほぼ全域にわたって観察された。BIO を添加により、基底膜のラミナデンサは電子密度が低くなり、発達したコラーゲン線維の進入により連続的でない部分も見られた。基底膜側の表皮細胞の細胞膜周辺にはいくつもの小さな小胞が見られ、小胞内には顆粒の存在も確認できた (図8)。

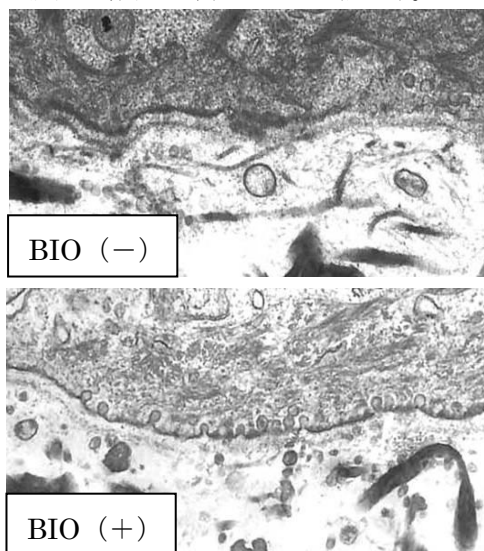


図8 基底膜周辺の微細構造観察 (培養2週間目)

4週間の培養では、基底膜のラミナデンサは連続的だが、電子密度が低くなっていた。BIO を添加した皮膚モデルでは、2週間培養時に観察されたラミナデンサと大きな変化は見られなかったが、基底細胞の基底面にはヘミデスマソーム様構造が発達し、表皮細胞内に基底面付近までケラチン線維が発達していた。また、2週間培養時に表皮細胞内に観察された小胞は確認できなかった (図9)。

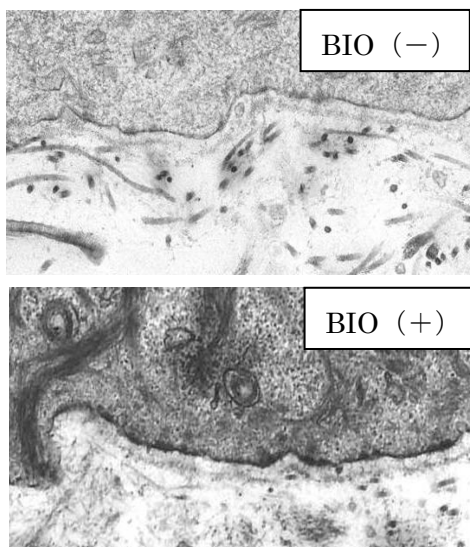


図9 基底膜周辺の微細構造観察 (培養4週間目)

⑥ 研究成果のまとめ

以上の結果から、Wnt/ β -catenin シグナルを促進する GSK-3 阻害剤 (BIO) の添加により、表皮角化細胞 (HEK) および真皮線維芽細胞 (HF) が増殖促進され、さらに HEK の Transit Amplifying (TA) 細胞から分化細胞への移行が促進されることが明らかとなった。さらに三次元培養皮膚モデルにおける表皮重層構造や基底膜構造が長期間維持され、GSK-3 阻害剤 (BIO) の添加により皮膚モデルの長期培養の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1件)

- ① Ogura Y, Matsunaga Y, Nishiyama T, Amano S: Plasmin induces degradation and dysfunction of laminin 332 (laminin5) and impaired assembly of basement membrane at the dermal-epidermal junction. *Br. J. Dermatol.* 159:49-60, 2008. (査読あり)

[学会発表] (計 2件)

- ① 土屋博之、伊藤嘉奈子、新井浩司、安達栄治郎、西山敏夫: 三次元培養ヒト皮膚モデルの細胞機能と構造形成に及ぼす GSK-3 阻害剤の影響、第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会、平成 21 年 12 月 10 日、神戸
- ② 伊藤嘉奈子、高野寛、安達栄治郎、西山敏夫: 三次元培養皮膚モデルの表皮構築ならびに基底膜構造形成におけるマトリックス分解酵素阻害剤の影響、第 39 回日本結合組織学会学術大会、第 54 回マトリックス研究会合同学術集会、平成 19 年 5 月 10 日、東京

[図書] (計 0件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

なし

○取得状況 (計 0件)

なし

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 敏夫 (NISHIYAMA TOSHIO)
東京農工大学・農学部・教授
研究者番号：60372455

(2) 研究分担者

安達 栄治郎 (ADACHI EIJIRO)
北里大学・医学系研究科・教授
研究者番号：30110430

(3) 連携研究者

なし