

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12794

研究課題名(和文) 異種動物間の組織形成クロストーク解析に基づく皮膚付属器再生原理の解明

研究課題名(英文) Tissue reconstruction using mouse and chick skin cells

研究代表者

片岡 健 (Kataoka, Ken)

岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号：10293317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題の研究期間前半で方法を確立したマウス妊娠16日目の単一表皮細胞と単一真皮細胞を用いて形成したスフェロイドを、人工皮膚として豚由来のコラーゲンスポンジ基材に播種して培養を行った。この基材に事前にヒト正常線維芽細胞を播種しておくことスフェロイドの定着率は向上した。一方で、ニワトリの表皮細胞及び真皮細胞の分離・回収とスフェロイド作製には成功したものの、ヌードマウスに移植しても羽毛や鱗などの形成は認めなかった。最終的に目的としていたマウス細胞とニワトリ細胞の混合培養を実施してみたが、これについても動物種が合致した組み合わせと合致しなかった組み合わせで細胞生物学的な差を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに研究代表者が開発したin vivoマウス皮膚形成モデルを発展させて、in vitroで複数種の細胞を混合して凝集塊すなわちスフェロイドを形成する評価モデルを開発した。このモデルを用いたマウス皮膚細胞とニワトリ皮膚細胞の混合培養では残念ながら期待された結果には至らなかったが、評価モデルの開発は研究領域において有用性が高い。

研究成果の概要(英文)：Spheroids which made from isolated mouse keratinocytes and fibroblasts were cultured on the collagen sponge material. Inoculation of mouse fibroblasts into the collagen sponge increased capability of adaptation of the spheroids on mouse skin. The chick skin cells were isolated and inoculated into mouse skin, but there were no difference between them. Mixed culture of mouse and chick cells made no difference in cell biological behavior.

研究分野：細胞培養学

キーワード：皮膚 ケラチノサイト 線維芽細胞 スフェロイド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

皮膚は動物の体表面を覆う機能を基本としているが、動物種によってその付属器の形態は大きく異なる。例えば哺乳類の皮膚付属器として毛嚢があり体表面に毛を有することで体温を維持しているが、鳥類では付属器として羽毛が存在し保温だけでなく飛翔する機能を担っている。研究代表者はこれまでマウス皮膚組織の再生に注目して研究を進め、*in vivo* マウス皮膚形成モデルを開発した。これは胎児マウスの皮膚より調製した表皮細胞と真皮細胞をヌードマウスの背部へ移植し、付属器を有する皮膚組織を形成させる実験系である。この実験系により、マウス皮膚組織の形成にはシンクロナイズした上皮(表皮)細胞と間葉(真皮)細胞同士のクロストークが重要であることがわかった。このモデルを用いて、我々はヌードマウス背部にヒト表皮細胞とマウス真皮細胞を移植してハイブリッド皮膚組織を形成することにも成功している。以上の研究基盤を利用して、本研究課題はマウスとニワトリの胎児皮膚より調整した異種動物細胞をハイブリッド移植することで組織形成時のクロストークを詳細に解析する。本研究の進展は動物種による皮膚付属器の多様性だけでなく様々な組織形成原理の解明につながり、発生学等基礎生物学の進展のみならず再生医療等臨床医学への波及が期待される。

### 2. 研究の目的

本研究は異種動物細胞を混合して移植することで、上皮-間葉だけでなく幹細胞とそのニッチ間のクロストークを詳細に解析する。このことは動物種による皮膚付属器形成の多様性だけでなく、自発的秩序形成や自己組織化による形態形成の原理を解明することに繋がる。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス/ニワトリ混合細胞を用いた *in vivo/in vitro* 皮膚形成システムの構築

これまでの先行研究で我々は、胎児マウスの皮膚より調製した表皮細胞と真皮細胞をヌードマウス背部皮膚に移植する *in vivo* マウス皮膚形成モデルを開発した。この実験系は発生と再生の両方の過程を反映しており、*in vivo* モデルにも関わらず因子を単純化して評価することが可能である。さらにこのモデルを発展させて、*in vitro* で複数種の細胞を混合して凝集塊すなわちスフェロイドを形成する評価モデルを開発する。既に予備的な検討として、Choung らのグループによる過去の報告を参考に3次元組織培養により *in vitro* で羽毛芽の形成を行った。

本研究計画ではマウス/ニワトリ胎児よりそれぞれ表皮細胞と真皮細胞を調製して *in vivo* マウス皮膚形成モデルに適用する。そこで、まずマウス胎児14日目とニワトリ胎児9日目より皮膚組織を採取した後、酵素処理により調製した表皮細胞と真皮細胞を *in vivo* マウス皮膚形成モデルに用いる。マウス表皮細胞とマウス真皮細胞の移植を毛嚢が形成される陽性コントロールとして、最初にニワトリ表皮細胞とニワトリ真皮細胞を移植した場合に皮膚付属器として羽毛が形成されることを確認する。さらに表皮細胞と真皮細胞のソースをマウス/ニワトリで交差させてハイブリッド移植し、皮膚付属器の形成(毛嚢形成・羽毛形成・形成なし)のパターンを詳細に観察する。

#### (2) 低酸素が皮膚付属器幹細胞に与える影響と動物実験

皮膚細胞の増殖と分化に酸素条件が影響を与えている可能性があるため、マウスおよびニワトリの表皮細胞と線維芽細胞の低酸素培養を行い増殖等について検討を行う。また通常酸素条件と低酸素条件で培養したマウス細胞とニワトリ細胞の混合培養を行い、作製されたスフェロイドをヌードマウスに移植して皮膚付属器(毛のう、羽毛)の形成について検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) マウス/ニワトリ混合細胞を用いた *in vivo/in vitro* 皮膚形成システムの構築

まず、*in vitro* 皮膚形成モデルを構築し、幹細胞マーカーである Collagen 17 の発現でケラチノサイトの幹細胞性を評価した。マウス妊娠16日目の母体より摘出した胎児マウスの皮膚を採取し、ディスパーゼ処理により表皮組織と真皮組織を分離した。さらに表皮組織はディスパーゼ処理の継続、真皮組織はコラゲナーゼ処理を行うことにより組織から単一細胞を回収することができた。回収された表皮組織由来単一細胞のみ(E)と真皮組織由来単一細胞のみ(D)及びその混合細胞(E+D)を浮遊培養しスフェロイド作成を試みたところ、培養3日でスフェロイドが形成された。このスフェロイド内で表皮幹細胞のマーカーである Collagen 17 の発現を確認した

ところ、培養 3 日目では E+D が最も強く、次いで D に強い発現を認めた。E では Collagen 17 の発現はほとんど認められなかった。形成されたスフェロイド(E+D)をヌードマウスに移植したところ、毛嚢形成が認められた。これら一連の実験で、表皮幹細胞を in vitro の培養系で維持し、生体に移植して付属器形成をさせたことに成功した。しかし形成された毛嚢は方向が不規則で、また最終的にわずかしか発毛していなかったため、今後は付属器形成能の高いスフェロイドを作製する培養方法を開発する必要がある。一方で、ニワトリ胎仔由来細胞を用いてスフェロイドを作製する実験については、表皮細胞及び真皮細胞の分離と回収には成功しスフェロイド作製には成功したものの、ヌードマウスに移植しても羽毛や鱗などの形成は認めなかった。

マウス妊娠 16 日目の単一表皮細胞と単一真皮細胞を用いて形成したスフェロイドを、人工皮膚として豚由来のコラーゲンスポンジ基材であるペルナック G プラスに播種して培養を行った。ただスフェロイドを播種しただけでは定着率は低かったが、この基材に事前にヒト正常線維芽細胞を播種しておくことでスフェロイドの定着率は向上した。しかし、この方法を用いても培養内で毛のうなどの皮膚付属器を人工的に形成することはできなかった。

## ( 2 ) 低酸素が皮膚付属器幹細胞に与える影響と動物実験

皮膚細胞の増殖と分化に酸素条件が影響を与えている可能性があるため低酸素培養を行い、表皮細胞と線維芽細胞の増殖等についてマウスおよびニワトリの細胞を用いて検討したが、明らかな差は認めなかった。最終的に期待していたマウス細胞とニワトリ細胞の混合培養を試行してみたが、これについても動物種が合致した組み合わせと合致しなかった組み合わせで細胞生物学的な差を認めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 多田 真由美, 谷生 好隆, 中原 菜摘, 岩井 良輔, 片岡 健
2. 発表標題 CATコーティング法を用いた層構造を有する皮膚組織様スフェロイドの作製
3. 学会等名 日本組織培養学会第92回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡 健
2. 発表標題 細胞培養基盤教育委員会主催 細胞培養指導士講習会
3. 学会等名 日本組織培養学会第93回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本組織培養学会	4. 発行年 2020年
2. 出版社 じほう	5. 総ページ数 180
3. 書名 細胞培養実習テキスト 第2版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------