

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20113

研究課題名（和文）不死化筋上皮細胞による汗腺老化メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of sweat gland aging using immortalized sweat gland myoepithelial cells.

研究代表者

早川 智久（Hayakawa, Tomohisa）

大阪大学・薬学研究科・特任助教（常勤）

研究者番号：60773132

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は汗腺老化メカニズム解明のために不死化汗腺筋上皮細胞を樹立することを目的としている。本研究において、汗腺筋上皮細胞の不死化細胞株の樹立に成功した。当該細胞は通常の汗腺細胞を超える期間の培養が可能であり、試験マテリアルとしての有用性が示された。また、樹立した細胞はプライマリーの筋上皮細胞と同様に分化能を持っていることが示された。この細胞に関わる成果は、論文で発表され、また関連する特許も取得されている。また、細胞販売の企業との協力により、全世界向けの販売に成功している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトのように汗腺を体温調節に利用している生物は馬に見られる程度で哺乳類全体として珍しい機構と言える。そのため、ヒト汗腺の研究のための手法は限られていた。今回、我々の研究で樹立した不死化筋上皮細胞は3次元スフェロイド培養に対応できるため、より実際のヒト汗腺に近い試験モデルとなり得る。不死化筋上皮細胞は、今後の汗腺研究における汗腺機能の理解、また制汗製品の開発に寄与するものと言える。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is the establishment of immortalized sweat gland myoepithelial cells for elucidating the mechanism of sweat gland aging. In this study, we succeeded in establishing the immortalized cells of sweat gland myoepithelial cells. These cells can be cultured for a longer period of time than normal sweat gland cells, indicating their usefulness as a test material in sweat gland study. In addition, the established cells were shown to have the differentiation potential, like primary myoepithelial cells. The outcomes related to this cell line have been published in a paper. Additionally, the patents related to this cell line had been applied. Moreover, we succeeded in selling of the cells worldwide.

研究分野：老化基礎科学

キーワード：老化 汗腺 細胞株

1. 研究開始当初の背景

汗腺の老化は発汗能力の低下を引き起こし、体温の抑制を破綻させる。その結果、高齢者では熱中症をはじめとする高体温症のリスクを増大する。組織の老化を引き起こすメカニズムとしては幹細胞の減少が知られており、汗腺では筋上皮細胞が該当する。従って、筋上皮細胞の減少メカニズムの解明は汗腺老化のプロセスを明らかにするとともに、汗腺老化の抑制技術の開発にも繋がる。しかしながら、筋上皮細胞の機能解明には技術的な障壁がある。それは筋上皮細胞の生体外での培養が困難なことである。筋上皮細胞は一般的な二次元培養下では細胞が変質してしまう。加えて、細胞の分裂回数に上限があるため長期間の維持が困難であった。

そのため、汗腺筋上皮細胞を変質させず、長期間維持できるようにする方法が必要である。当研究室の過去の研究で、筋上皮細胞を浮遊スフィアにより培養環境で維持できることが明らかになった。しかしながら、この方法でも培養環境で維持できる期間は3-4継代が限界であった。そこで我々はスフィア培養状態の筋上皮細胞に不死化遺伝子を導入することで、長期間培養可能な不死化筋上皮細胞の作製を目指した。また、樹立した不死化筋上皮細胞から汗腺老化メカニズム解明のための老化汗腺モデルを作製し、汗腺において筋上皮細胞が減少するメカニズムの解明を目指す。

2. 研究の目的

(1)安定して生体外で培養できる筋上皮細胞である不死化筋上皮細胞を樹立する。

(2)その不死化筋上皮細胞から汗腺モデルを作製し、さらに汗腺老化を再現した汗腺老化モデルを構築する。

(3)そして、確立した汗腺老化モデルを用いて汗腺の老化メカニズムの解明と汗腺老化を抑制できる有効成分の候補をスクリーニングし、汗腺老化を予防する新規手法を提案する。

3. 研究の方法

(1)第一ステップでは筋上皮細胞の性質を維持しながら、長期間増殖できる不死化筋上皮細胞を樹立する。プライマリーの培養汗腺細胞にレンチウイルスを利用した遺伝子導入により不死化を行う。長期の継代培養における増殖能、スフィア形成能から長期培養能の獲得を評価する。また、作製した不死化筋上皮細胞が生体内の筋上皮細胞の性質を保持しているかを分子マーカーの発現から検討する。

(2)次のステップでは不死化筋上皮細胞を用いて汗腺を再現した汗腺モデルを作製する。作製方法としては薬剤、あるいは細胞外基質を利用する。

(3-1)さらに汗腺モデルに老化を誘導することで汗腺老化モデルを作製する。老化誘導方法としては薬剤、放射線を利用する。

(3-2)作成した汗腺老化モデルを利用して汗腺老化に対する有効成分のスクリーニングを行う。

4. 研究成果

(1-1)本研究において、不死化遺伝子を導入することで培養汗腺細胞の培養寿命の延長に成功した。不死化遺伝子を導入した汗腺細胞は通常の汗腺細胞と違い、4回目の継代後も増殖とスフィアの形成能を維持した(図1)。

(1-2)樹立した細胞における筋上皮細胞特有のタンパクの発現を調べたところ、筋上皮細胞を特徴づけるタンパクの発現が確認された(図2)。更に一般的な細胞株と同様に凍結保存が可能であり、またタンパク発現の性質も維持されていた。以上のことから樹立した細胞は筋上皮細胞の生理機能を解析する上での新しい手段となり得る。

(1-3)また、樹立した細胞は通常の汗腺筋上皮細胞と同様に別種細胞への分化能が確認できた(図3)。この細胞の樹立と機能解析に関わることは論文として、Scientific reports より

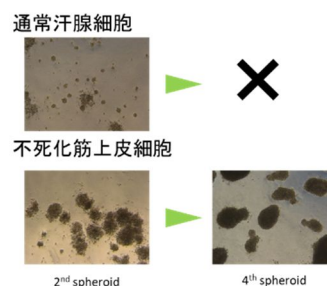


図1 不死化筋上皮細胞の長期増殖能

発表した。本細胞はまた、カナダのバイオ研究マテリアルの企業から全世界向けに販売している。この細胞および樹立技術とその分化方法に関しては特許を3報申請している。

α-SMA	+
Integrin β1	+
Keratin 14	+
M3 receptor	+

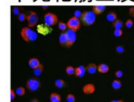
(2)不死化筋上皮細胞から汗腺様構造のモデルの樹立を試みた。細胞外基質と薬剤の組み合わせによって、筋上皮細胞と分化細胞から構成された汗腺様の構造体を作製することに成功した。当該技術の一部は特許として申請している。

図2 不死化筋上皮細胞の発現タンパク

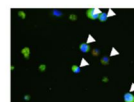
(3-1)放射線を利用した不死化筋上皮細胞への老化誘導方法を検討し、必要な放射線の条件を検討した。当該技術は細胞の世代による影響があり、未だ安定していないため更なる検討が必要である。

(3-2)上記のように老化汗腺モデルが不安定であるため本格的な有効成分のスクリーニングは実施できていない。しかしながら、プレ試験での結果からある種の抗がん剤成分が汗腺老化の抑制に寄与する可能性を見出した。

不死化筋上皮細胞



不死化筋上皮細胞+分化刺激



△=分化細胞

図3 不死化筋上皮細胞の分化能

<引用文献>

「Establishment and characterization of immortalized sweat gland myoepithelial cells.」 Tomohisa Hayakawa, Fumitaka Fujita, Fumihiro Okada, Kiyotoshi Sekiguchi. Scientific Reports, DOI : 10.1038/s41598-021-03991-5, 2022 年

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hayakawa Tomohisa, Fujita Fumitaka, Okada Fumihito, Sekiguchi Kiyotoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Establishment and characterization of immortalized sweat gland myoepithelial cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-03991-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tomohisa Hayakawa
2. 発表標題 Generation of immortalized sweat gland myoepithelial cells and eccrine sweat gland research model
3. 学会等名 49th Annual ESDR Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohisa Hayakawa
2. 発表標題 Establishment of sweat gland myoepithelial cell line to study sweat gland aging
3. 学会等名 6th International Cell Senescence Association（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 分化誘導方法、分化誘導剤、及びその利用	発明者 早川 智久	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-157576	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 分化誘導方法及びその利用	発明者 早川 智久	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-157577	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------