

平成 22年 6月 2日現在

研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2008～2009
課題番号：	20791319
研究課題名(和文)	安全で高性能な毛髪付複合型培養皮膚の開発に関する実験的研究
研究課題名(英文)	Development and Study <i>in vitro</i> for the cultured skin substitute with hair
研究代表者	
	藤森 靖 (Fujimori Yasushi)
	大阪医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：	70351393

研究成果の概要(和文)：細胞径の小さな表皮細胞を得るために20 μ mおよび10 μ mのポアサイズのナイロンフィルターをもちいて分取した。フィルターを透過した細胞群と、フィルターを透過しなかった細胞群を、フローサイトメトリー、長期培養、コロニー形成能で比較した。その結果、細胞径の小さな表皮細胞を含んだ群が径の大きな細胞群に対して有意差をもって表皮幹細胞/前駆細胞の性質を示した。無細胞真皮に、各細胞群を播種して培養し、それぞれの群の表皮形成能を確認した(n=2)。小さい径の細胞群においてより厚い表皮が形成された。

研究成果の概要(英文)：

Small diameter characterizes epidermal progenitor/stem cells. We have developed Gravity Assisted Cell Sorting to simply enrich small-sized epidermal progenitor/stem cells. The cells sorted by this way were characterized by fluorescence-activated cell sorting analysis, and cultured for up to 7 weeks. The cultured cells were then used for fabrication of the artificial skin. A keratinocyte suspension was sized into 2 groups: cells trapped by a 20 μ m filter (trapped cells), and cells flowing through both a 20 and 11 μ m filter (non-trapped cells). These cells were characterized by FACS. Viability of the trapped cells was 64 \pm 15%, compared to the non-trapped cells (93 \pm 2%). 61% of the trapped cells were <40 μ m, compared to 91% of the non-trapped cells. Culture of cells showed that cultures originating from the trapped cells senesced after approximately 15 days while the non-trapped keratinocytes grew for up to 40 days. In terms of the regenerative capability of sorted cells, non-trapped cells were significantly thicker than the trapped cells. These results indicate that sorted cells by this way is simple and useful to enrich epidermal progenitor/stem cell population, more efficient in cells in culture condition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
総計	1,400,000	420,000	1,820,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：培養皮膚、角化細胞、上皮幹細胞、前駆細胞、無細胞真皮、再生医療

1. 研究開始当初の背景

近年、再生医療は日進月歩の発展を遂げている。中でも皮膚領域は最も進んでいる分野の一つである。われわれは2001年より同種培養真皮の多施設臨床試験（厚生労働省ミレニアムプロジェクト 皮膚部門 北里大学黒柳能光教授）に参加し、その有効性を確認した。また2002年より患者自身の真皮層から線維芽細胞を採取して、自家培養真皮の作製と基礎実験を行い、2003年より小児の広範囲熱傷後瘢痕拘縮に対して倫理委員会の承認を受け、臨床応用を行ってきた（2003～2004年度科学研究補助金 #15791030）。これらの培養真皮はコラーゲンとヒアルロン酸からなるスポンジマトリックス（スキヤフォールド）に培養した線維芽細胞を播種して作製したものであった。線維芽細胞から産生される各種サイトカインによって血流の良好な肉芽組織（移植床）が形成されるため、同部に従来法よりも薄い自家分層植皮片を移植することが可能になった。これは植皮片の採取部分に瘢痕を残さずに、質のよい植皮を行うことが出来ることを意味する。しかしながら、この方法では培養真皮を移植する手術と、植皮を行う手術の2回の手術が必要となることが短所であった。また、狂牛病問題により線維芽細胞の培養にウシ血清を使用することは、今後再生医療を臨床的に展開していく上で解決することが不可欠な問題となった。現在、皮膚角化細胞は生体より採取してフラスコに播種し、細胞がフラスコ底部に生着する際に少量の血清を利用するだけで、以後は無血清培養が可能である。そこで本研究において、自家血清で培養した表皮細胞と、無細胞真皮を組み合わせた複合型培養皮膚を作製し、臨床応用への前段階となる基礎実験をおこない、その有用性を確認することを計画した。さらには遺伝子誘導した細胞を播種し毛髪付培養皮膚作成のための基礎実験をおこなうことを目標とした（今回は毛髪付培養皮膚まではいたらなかった）。

2. 研究の目的

(1) 複合型培養皮膚の足場（スキヤフォールド）の作製

まず培養した表皮を播種する足場となるマトリックスの作製方法を検証した。これまで我々が使用してきたコラーゲンとヒアルロン酸を加工して作製した人工真皮では基底膜の再現に限界があった。本研究ではマウスの皮膚（有毛部と無毛部）を全層で採取し、表皮角化細胞を採取した後に、真皮層を無細胞化して無細胞真皮を作製することにした。

無細胞真皮は基底層やコラーゲン構築が一番生理的な状態に近いという点で優れている。

(2) 表皮細胞培養方法（表皮幹細胞に富む細胞懸濁液の獲得法）の検討

(1)で作製したスキヤフォールドに播種する表皮細胞を獲得する方法について検討した。採取した皮膚から得られる表皮細胞の培養をおこなった。この培養を行う際には、将来の臨床応用を見据えて無血清低カルシウム培養液を使用した。ただし、サンプルから採取した細胞をはじめてフラスコ内に播種する際には血清が必要となるので、ここでは自家血清を使用した。

表皮細胞を繰り返し継代し培養すると細胞は徐々に分裂能を失う。しかしながら表皮幹/前駆細胞に富む細胞群を培養すると分裂回数と生存日数が通常の表皮細胞群よりも有意に増加する（第50回日本形成外科学会総会 於東京にて発表）。表皮幹細胞を純粋に分離することは未だ不可能であるが、表皮幹/前駆細胞に富む細胞懸濁液を得ることは、細胞表面マーカーやType IVコラーゲンへの吸着性などの表皮幹細胞特有の性質を利用することで可能である。表皮幹/前駆細胞に富む細胞懸濁液を培養皮膚に使用すると、上皮化能にすぐれた培養皮膚となることが予想された。本研究では、“表皮幹/前駆細胞は他の表皮細胞に比べてその細胞径が小さい”という特徴に着目した。現在フローサイトメトリー（FACS）をもちいて分離する方法がもっとも正確で主流である。しかしながらFACSにはコンタミネーションを起こすことがしばしばある、時間がかかる、振り分けの過程で細胞がダメージを受け、振り分けられたサンプルを培養しようとしても育たないことがある、高価である、といった短所があげられる。このため臨床応用に用いるには不向きであると思われた。本研究では、いくつかの種類のパイロンネットフィルターを目の粗いものから段階的に透過させ、直径の小さい細胞に富む懸濁液を得る方法を検討した。振り分けられた細胞について、サイズ、分裂能などの計測を行い評価した。

(3) 複合型培養皮膚の作製

(1)で作製した無細胞真皮上に(2)で得られた表皮細胞を播種して三次元培養をおこない、複合型培養皮膚を作製し臨床応用の可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 複合型培養皮膚の足場 (スキヤフォールド) の作製

マウスの背部 (有毛部) および足底 (無毛部) 皮膚を全層で採取し、1M 塩化ナトリウム溶液中に 48 時間、37°C でインキュベートし表皮細胞層を剥離した。その後、0.5% TritonX-100 (SIGMA) 溶液中で 1 週間インキュベートすることで真皮内残存細胞を溶解除去した。作成した無細胞真皮を HE 染色像で評価した。(ブタ由来無細胞真皮マトリックスを担体としたヒト複合型培養皮膚の開発. 山口亮, 高見佳宏ほか 医学と生物学 第 148 号 第 7 巻 12-18, 2004.)

(2) 表皮細胞培養方法 (表皮幹細胞に富む細胞懸濁液の獲得法) の検討

細胞径の小さな表皮細胞を、安全かつ効率よく集めることにより表皮幹/前駆細胞を多く含む細胞懸濁液を用意し、複合型培養皮膚を作製する準備をおこなった。

- ①マウス全層皮膚を採取し、抗生剤含有 PBS に 3 時間浸した。
- ②0.125% トリプシン含有 PBS 溶液に一晩浸した (室温)。
- ③2% マウス血清 (自家) 含有低カルシウム培地でトリプシン作用を阻害し洗浄した。
- ④メスで表皮層を剥離し、培養液を 600rpm、37°C 5 分間遠心分離した。上清を吸引除し 10% 血清含有低カルシウム培養液で懸濁液とした。
- ⑤25 cm² フラスコに 1.0×10^5 cell/15mL となるように細胞を播種した。
- ⑥3~4 日後、フラスコ底に細胞が生着していることを確認したら、無血清低カルシウム培養液に交換し、以降は無血清培養とした。80% コンフルエントに達したら 0.025% トリプシンおよび 0.01% EDTA 含有 PBS をもちいて継代した。同様に第 6 代まで継代した。
- ⑦6 代目で得られた表皮細胞懸濁液を 1.0×10^6 cell/mL となるように調整し 20 μ m のポアサイズをもつナイロンネットフィルターを透過させた。透過した細胞懸濁液をさらに 11 μ m のナイロンネットフィルターに透過させた。両方のフィルターを透過した細胞群を Non-Trapped Cells、20 μ m のフィルターを透過しなかった細胞群を Trapped Cells として、両群の細胞を以下の方法で比較した。

(a) フローサイトメトリーによる比較

PI (Propidium Iodide) をもちいて細胞を標識し、両群の細胞の大きさ、生存率を測定し Non-Trapped cells と Trapped Cells を比較した。

(b) 長期培養による比較

両群を無血清低カルシウム培養で長期培養し生存日数、分裂回数 (Cumulative Population Doubling ; CPD) を比較した。

(c) コロニー形成能の比較

Non-Trapped cells と Trapped Cells それぞれ少数の細胞を播種 (1000 個/10cm²) し、7 日間で 32 個以上の細胞を含むコロニーがいくつ形成されるかを測定した。(コロニー形成能が高いほど表皮幹/前駆細胞を含む可能性が高い。)

(3) 複合型培養皮膚の作製

(1) で得られた無細胞真皮上に (2) で得られた表皮細胞を播種し複合型培養皮膚を作製した。

①無細胞真皮内の空気をなくすように PBS 内に浸し 2 時間洗浄した。

②48 穴プレートに無細胞真皮をセットし、Type IV コラーゲン含有 PBS に浸し一晩冷蔵庫内でインキュベートした。

③翌日、各 well に細胞 1.5×10^4 cells ずつ播種し、高カルシウム (1.2M) 無血清培地で満たした (高カルシウム培地で分化を促進する)。4 日間培養した。

④エアリキッド用のトランスウェル、インサートを用意し上記の複合型培養皮膚をエアリキッド環境で 3 次元培養した。

4. 研究成果

(1) 複合型培養皮膚の足場 (スキヤフォールド) の作製

HE 染色像において、有毛部においても無毛部においても基底膜を残したまま無細胞真皮を作成できたことを確認した。

(2) 表皮細胞培養方法 (表皮幹細胞に富む細胞懸濁液の獲得法) の検討

①顕微鏡所見：継代を繰り返した細胞を顕微鏡で観察するとコンフルエントに達した状態で大小さまざまな大きさの細胞が存在していることが観察できた (図 1)。

Non-Trapped cells と Trapped Cells の細胞浮遊液をそれぞれ観察すると明らかに大きさの違いがあることを観察できた (図 2)。

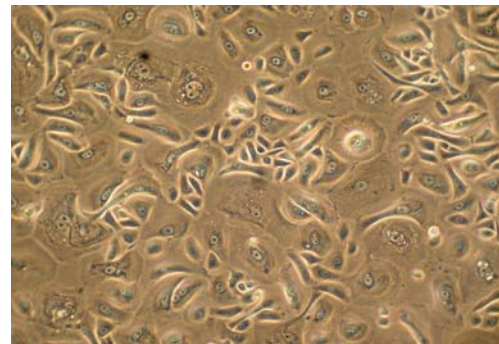


図 1 コンフルエントの状態

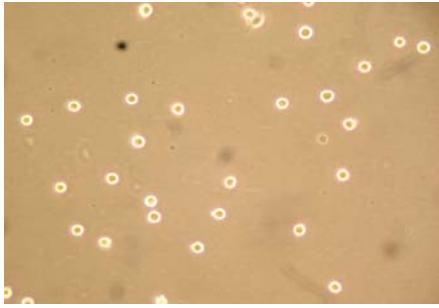


図 2 a. Non-Trapped cells (浮遊液)

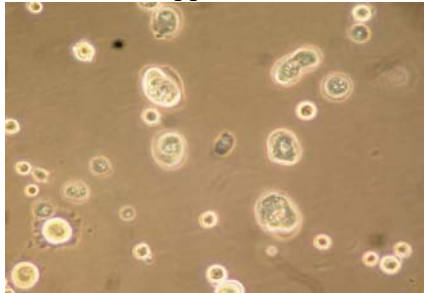


図 2 b. Trapped Cells (浮遊液)

②フローサイトメトリーによる測定の結果
細胞径：Non-Trapped Cells ($9.8 \sim 57.8 \mu\text{m}$)の方が Trapped Cells ($9.8 \sim 88.3 \mu\text{m}$)に比べて有意に径の小さい細胞が存在した ($n=4, p<0.01$)。

細胞浮遊液中の各細胞生存率：
Non-Trapped Cells (93.1%)の方が Trapped Cells (64.3%)に比べて有意に高い生存率であった ($n=4, p<0.01$)。

③長期培養による比較

Non-Trapped cells の平均生存日数は 44.2 ± 5.3 日で Trapped Cells (16.4 ± 7.8 日)に比べて有意に長かった ($p<0.05, n=5$)。Trapped Cells 5 症例のうち 2 症例の細胞ではコロニーの形成が見られたが継代までには至らなかった。Non-trapped Cells の平均 CPD は 6.5 ± 1.0 で Trapped cells (1.4 ± 0.6)に比べて有意に大きかった ($p<0.01, n=5$) (図 3)。

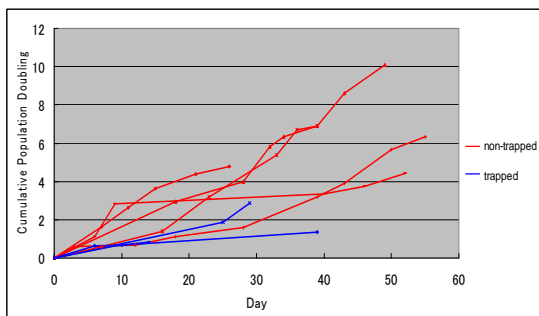


図 3：長期培養の結果

④コロニー形成能の比較

Non-Trapped cells のコロニー形成能 ($0.73 \pm 0.13\%$)は Trapped Cells のコロニー形成能 ($0.15 \pm 0.10\%$)と比べて優位に優れていた

($p<0.01, n=3$) (図 4、5)

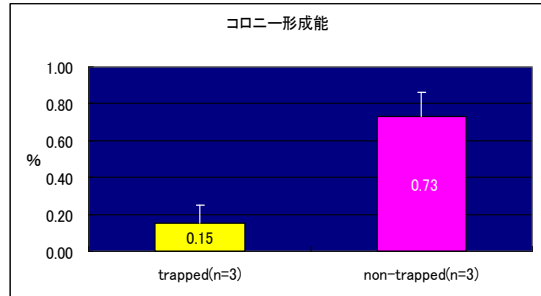


図 4 コロニー形成能

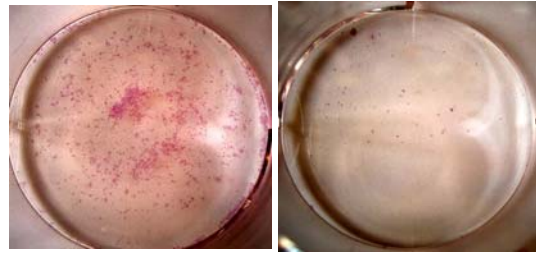


図 5 コロニー形成能 (染色後)
左;Non-Trapped Cells 右;Trapped Cells

(3) 複合型培養皮膚の作製

Non-Trapped Cells の上皮層は Trapped Cells の上皮層に比べて厚く形成されていた。(図 6)

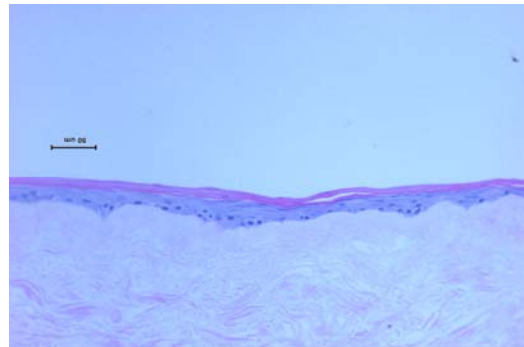


図 6 a. Non-Trapped Cells 培養 11 日目

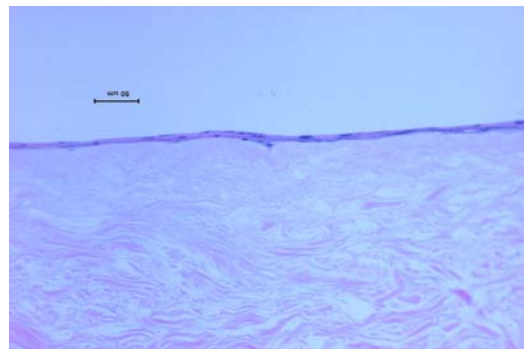


図 6 b. Trapped Cells 培養 11 日目

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)

Fujimori, Y., Izumi, K., Feinberg, SE., Marcelo, CL. Isolation of small-sized human epidermal progenitor/stem cells by Gravity Assisted Cell Sorting (GACS). Journal of Dermatological Science, 査読有、56, 2009, 181-187.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤森 靖 (Fujimori Yasushi)
大阪医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：70351393