

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：82670

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12660

研究課題名(和文) 脱細胞化技術による再構築幹細胞ニッチを用いたターンオーバーする皮膚モデルの開発

研究課題名(英文) Development of in vitro skin model with the ability of skin turnover by stem cell niche reconstituted by decellularization technique

研究代表者

干場 隆志 (Hoshiba, Takashi)

地方独立行政法人東京都立産業技術研究センター・研究開発本部機能化学材料技術部バイオ技術グループ・副主任研究員

研究者番号：00469769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに作製してきた角化細胞を培養し、脱細胞化処理により得た細胞外マトリックス(dECM)上では、特に継代数の少ない細胞由来のdECMに関して、複製ストレス(継代培養)および酸化ストレスによる細胞老化を抑制できることを見出した。また本dECM上において培養表皮を形成できることを確認できたが、生細胞数の維持効果は見られなかった。dECM上で培養された角化細胞のLRIG1(表皮幹細胞マーカー)の発現量が低下したことから、培養表皮中の生細胞の減少は表皮幹細胞数の減少によるものであると推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化粧品の開発において動物実験はほぼ禁止されている。したがって、動物試験の代替法が開発されているが、培養皮膚においては長期間維持できないため、皮膚の修復など、長期間の現象について評価することが困難であった。細胞老化を抑制することにより、試験の長期化および安定した試験結果の取得が見込まれるが、長期化については細胞老化の抑制に加え、表皮幹細胞の維持も重要であった。一方で培養基板の改良による培養皮膚の長期維持はあまり行われておらず、本研究において長期間維持できる培養皮膚を作製するための培養基板の必要要件を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：Decellularized extracellular matrix (dECM) has been developed by the culture of keratinocytes and decellularization technique. The dECM which is prepared by keratinocytes with younger passage number can suppress cellular senescence induced by replicative (passage culture) and oxidative stresses. Also, the dECM allow the formation of an in vitro epidermis layer. However, the viable cells were not maintained on the dECM after the long culture. LRIG1 (an epidermal stem cell marker) expression was decreased in the keratinocytes cultured on the dECM, indicating that the dECM could not maintain epidermal stem cells and decreased viable cells.

研究分野：生体材料学

キーワード：細胞外マトリックス 脱細胞化 皮膚モデル 細胞老化 表皮幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物福祉の問題から動物実験は禁止、縮小の傾向にあり、特に化粧品業界においては世界的に動物実験が禁止された。動物実験を代替できる実験法が開発されつつあるが、角化細胞を用いた培養表皮モデルもその1つである。この培養表皮モデルの利用により短期的な安全性、有効性評価が可能になったが、一方で細胞数や角化機能が低下してしまい、皮膚の修復などの長期間の評価ができない。その原因は、(a)培養系中の表皮幹細胞数の低下に伴う増殖能の低下、(b)表皮幹細胞の分化能の低下、(c)角化細胞の細胞老化による細胞増殖能、角化機能の低下が挙げられる。

細胞機能は生体内においては細胞外マトリックス(ECM)によっても制御されている。一方で、細胞外マトリックスを用いた培養表皮モデルの改良はあまり試みられていない。その理由として、ECMは多種類の分子により構築され、一般的な化学的手法により再構築するのは困難であったためであった。そのため、ECMを生体外で再構築するためには脱細胞化技術と呼ばれる、組織体から細胞だけを除去しECMを得るという方法が用いられる。

特に培養細胞を脱細胞化することで得た脱細胞化ECM(dECM)は幹細胞の維持効果、細胞老化の抑制効果が報告されているが、角化細胞に対する効果はわかっていない。

2. 研究の目的

上記を踏まえ、角化細胞由来のdECMを用いることで、ターンオーバーし長期間維持できる皮膚モデルの開発を試みた。特に本研究では、細胞老化の抑制、表皮幹細胞の維持に注目して検討を進め、培養表皮モデルの形成を試みた。

3. 研究の方法

3. 1. 角化細胞由来のdECMの作製

市販の角化細胞(3継代目および5継代目)を組織培養用プレート(TCOS)上で1週間培養することにより、細胞直下にECMを形成させ、その後、EDTAにより細胞間接着を弱くした後に、界面活性剤処理および核酸分解酵素処理により脱細胞化を行った。それぞれのdECMをP3-dECM、P5-dECMとした。

3. 2. 細胞機能の評価

細胞増殖：ヘキスト33342により細胞核を染色後、顕微鏡観察下で細胞核数を計測することにより評価した。

細胞老化：過酸化水素に24時間暴露あるいは継代操作を2回繰り返すことにより、酸化ストレスあるいは複製ストレスを与えた。その後、細胞の投影面積を、細胞形態をトレースすることにより計測することで、細胞老化の指標である細胞サイズの増大について評価した。さらに細胞老化の指標の一つである老化随伴β-ガラクトシダーゼ(SA-β-Gal)活性を染色により検出し、SA-β-Gal活性陽性細胞率を測定した。

細胞内ROSレベルの測定：角化細胞を1日培養後、過酸化水素を添加し、酸化ストレスを付与した。過酸化水素暴露後、ROSに反応する蛍光プローブH₂DCFDAを添加し、蛍光量を測定した。その後、蛍光量を全タンパク質量でノーマライズした。また、抗酸化に関する遺伝子の発現量をリアルタイムPCR法により測定した。

培養表皮の形成：角化細胞増殖培地と10%血清含有DMEM培地を1:1で混合後、1.8 mM CaCl₂を添加した培地(気液界面培養培地)を調製した。セルカルチャーインサート上に角化細胞を高密度で播種し、コンフルエントにした後、高濃度カルシウムを含む角化細胞増殖培地でさらに培養後、気液培養培地を用いて、気液界面培養を行うことで培養表皮を形成した。その後、組織切片をヘマトキシリン-エオジン(HE)染色後に観察した。

表皮幹細胞の評価：高濃度カルシウム存在下、非存在下において角化細胞を培養後、表皮幹細胞マーカーの一つであるLRIG1の発現量をリアルタイムPCR法により測定することで評価した。

4. 研究成果

4. 1. dECM 上での角化細胞の増殖

dECM 上で角化細胞が増殖するか確認するために、実際に角化細胞の増殖培養を行った。その結果、培養日数に伴い、角化細胞数は増加していったことから、本 dECM 上でも角化細胞の増殖培養は可能であると示された。さらに dECM 上における角化細胞の増殖能を比較したところ、dECM 上よりも TCPS 上のほうが多く細胞が観察された(図

1)。この原因として、1)細胞接着数が dECM 上では少ない、2)表皮幹細胞数が少ないことが考えられた。

4. 2. dECM 上での細胞老化

dECM が細胞老化に与える影響を調べるために、細胞老化を誘導する酸化ストレス(図 2)および複製ストレス(表 1)を与えたときの細胞老化を評価した。細胞老化の指標として、SA-β-Gal 陽性細胞率の測定を行った。また酸化ストレスへの影響の評価に際しては細胞サイズ(投影面積)の測定も行った。その結果、P3-dECM 上において、SA-β-Gal 陽性細胞率、細胞サイズの低下がみられた。本結果は、P3-dECM 上で細胞老化が抑制されることを示している。

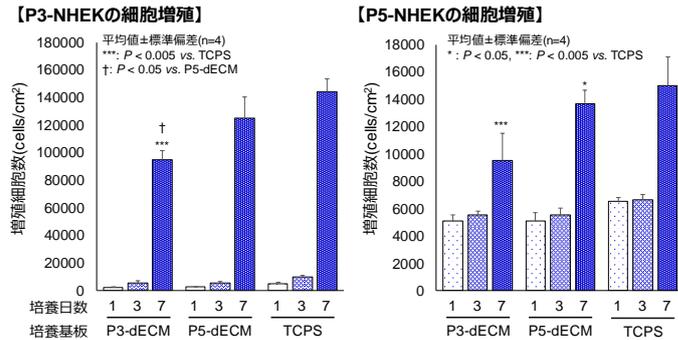


図 1 : dECM 上での角化細胞の増殖

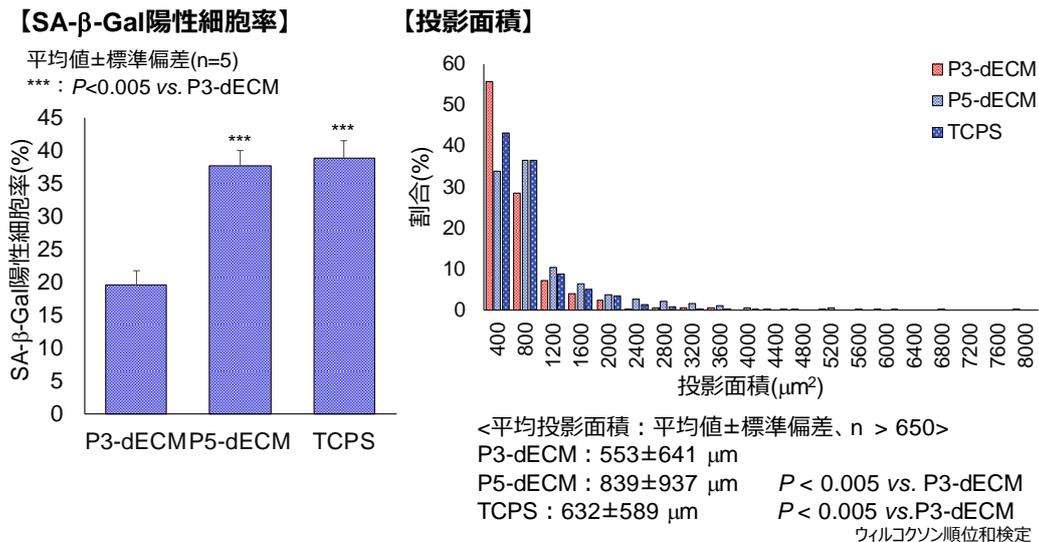


図 2 : 3 継代目の角化細胞に酸化ストレスを付与した際の細胞老化

表 1 : 2 継代目の角化細胞を 2 回継代した際の SA-β-Gal 陽性細胞率

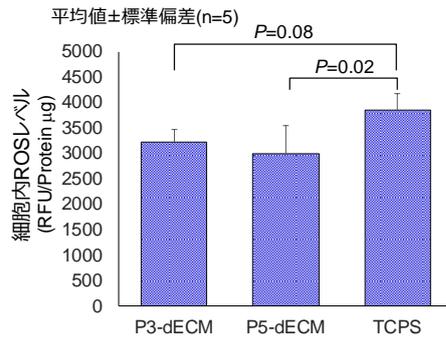
	P3-dECM	TCPS	P-values
#1	21.7 ± 3.6	30.7 ± 1.8	0.002
#2	27.1 ± 2.2	37.4 ± 2.2	0.00008
#3	21.8 ± 2.8	28.7 ± 2.1	0.002

4. 3. dECM 上での細胞内活性酸素種 (ROS) レベルの評価

細胞老化が生じる原因の一つとして酸化ストレスが挙げられる。そこで、本研究では dECM 上で抗酸化能が上昇しているのではないかと考えた。dECM 上での角化細胞内の ROS レベルを測定したところ、

【P3-NHEK : 酸化ストレス条件下】

2日間培養後、100 μMの過酸化水素を含む培地中で評価した。



【P5-NHEK : 基底状態】

3日間培養後、過酸化水素を添加しない培地中で評価した。

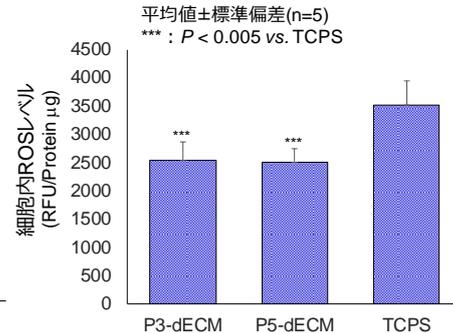


図 3 : dECM 上での細胞内 ROS レベル

ろ、細胞内 ROS レベルが顕著に低下した(図 3)。また抗酸化に関する酵素の発現量も増大していた。そのため、dECM 上で細胞老化が抑制される原因の一つとして、細胞内での抗酸化能の上昇が考えられた。一方で、細胞老化の抑制効果は P3-dECM の方が強いため、抗酸化能の亢進以外の機序の存在も考えられた。

4. 4. dECM 上での培養表皮の形成

P3-dECM のほうが細胞老化を強く抑制したため、P3-dECM 上で培養表皮を形成することができるか確認した。その結果、培養 7 日後には重層化した培養表皮が認められ、dECM 上でも培養表皮の形成が可能であることが示された。一方、10 日後には dECM 上では剥離が見られ、またヘマトキシリンで染色される生細胞層が薄くなっていた(図 4)。

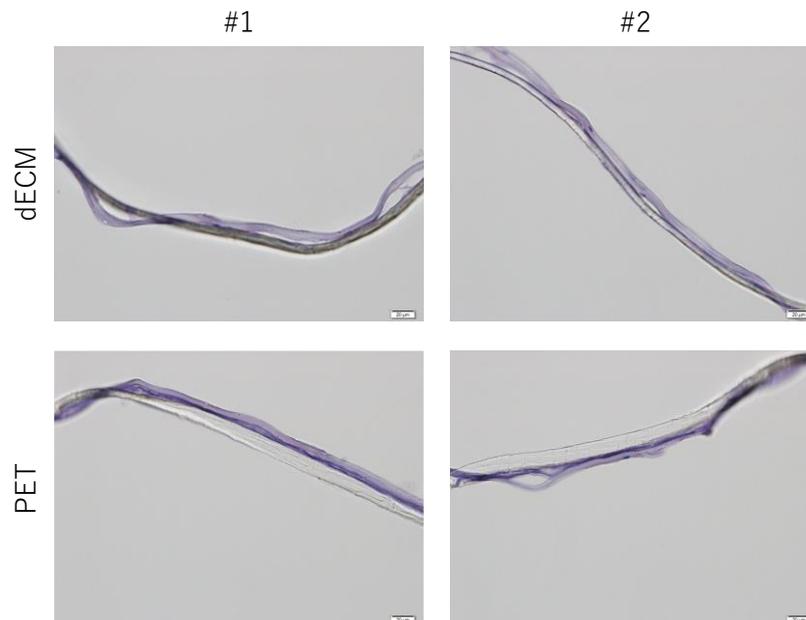


図 4 : dECM 上での培養表皮の HE 染色像

4. 5. dECM 上での表皮幹細胞マーカーの発現

培養表皮中の生細胞層が dECM 上で早く薄くなる原因を調べるために、表皮幹細胞マーカーである LRIG1 の発現量を評価した。その結果、分化誘導の有無に関わらず、dECM 上のほうが LRIG1 の発現量は TCPS 上よりも低下していた (data not shown)。間葉系幹細胞 (MSC) から作製した dECM 上では MSC の幹細胞性が維持されることが報告されている (R. Rakian et al., Stem Cell Res. Ther. 2015, 6, 235)。角化細胞の中には表皮幹細胞が存在しているため、表皮幹細胞の幹細胞性も維持できるのではないかと期待されたが、角化細胞と MSC では異なっており、角化細胞および表皮幹細胞への応用にはさらに工夫が必要であることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hoshiba Takashi	4. 巻 1
2. 論文標題 Deceellularized Extracellular Matrix for Stem Cell Culture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Engineering Materials for Stem Cell Regeneration	6. 最初と最後の頁 429 ~ 454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-16-4420-7_17	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hoshiba Takashi	4. 巻 17
2. 論文標題 Cultured cell-derived decellularized extracellular matrix (cultured cell-derived dECM): Future applications and problems ? a mini review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Opinion in Biomedical Engineering	6. 最初と最後の頁 100256 ~ 100256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cobme.2020.100256	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hoshiba Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 A decellularized extracellular matrix derived from keratinocytes can suppress cellular senescence induced by replicative and oxidative stresses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 6828 ~ 6835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2bm00897a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takashi Hoshiba
2. 発表標題 Stem Cell Differentiation on the Extracellular Matrix Formed by Cultured Stem Cells.
3. 学会等名 Materials Research Meeting 2021 (MRM2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 干場隆志
2. 発表標題 幹細胞培養脱細胞化マトリックスによる幹細胞分化制御
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 干場隆志
2. 発表標題 細胞老化を抑制する生体内環境を模倣した角化細胞用培養基板の作製
3. 学会等名 第47回日本化粧品学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 干場隆志
2. 発表標題 角化細胞の細胞老化を抑制する脱細胞化細胞外マトリックス基板の作製
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 角化細胞培養基板、角化細胞培養基板の製造方法、角化細胞の培養方法、培養表皮組織及び培養表皮組織の製造方法	発明者 干場隆志	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-057554	出願年 2022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
---------	---------