

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500492

研究課題名(和文) 表皮バリア機能発達過程解析をモデルにしたオポッサム皮膚への遺伝子導入法の開発

研究課題名(英文) Research and development of gene-transduction methods into the opossum skin for studying the developmental process of the skin barrier function.

研究代表者

松崎 貴 (Matsuzaki, Takashi)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：90241249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：オポッサムの新生仔では生後2日目に真皮が一度薄くなったのち、徐々に皮膚の厚みが増した。皮膚水分量は生後2日以降安定して低い値を示した。レクチン染色により、生後0日までの体表は表皮細胞ではなくペリダー姆様細胞によって覆われ、これが外れる1日目以降、表皮角化が急速に進行してバリアが完成することがわかった。創傷治癒様式が変化する生後8日から皮下脂肪組織が発達し始めた。各種皮膚細胞の培養および器官培養を試みたが、細胞の生存率や増殖速度はとても低かった。皮膚を酵素処理したのちに遺伝子導入を試みたところ、より効率良く導入できた。さらに、CUBIC法の溶液組成と処理時間を改変することで皮膚を透明化できた。

研究成果の概要(英文)：The dermis of newborn opossums became thinner on two days after birth (2d), then the skin thickness increased again with age. The water contents of the skin became stable at a low value after 2d. The lectin-histochemistry revealed that the cell layer covering the skin surface until 0d would be composed of periderm-like cells but not keratinocytes. The skin barrier seemed to be established by 1d when the layer fell away and the keratinocytes rapidly keratinized. The subcutaneous fat tissue emerged around 8d when the types of wound healing change, suggesting a close relation between them. We tried culturing various types of cells and thin strips of the skin. The viability and proliferation of the cells and tissues were terribly low. Gene transduction efficiencies were improved by administration of collagenase/dispase in the skin before injecting the reporter genes. The experiments making the skin transparent were partially successful by improving the conditions of CUBIC method.

研究分野：発生生物学

キーワード：オポッサム 新生仔 皮膚バリア レクチン 免疫組織化学 器官培養 遺伝子導入 透明化

## 1. 研究開始当初の背景

有袋類は生理・形態的形質が真獣類(有胎盤類)に類似するものの、胎盤が未発達であるため仔が未熟な状態で出産されることや尿道と生殖孔が肛門上部で一体化していることなど、独自の特徴を数多く持っている。また、真獣類と異なり、紫外線照射によって生じたチミンダイマーを元に戻すことで突然変異を防止する光回復能を持つことが知られている<sup>1)</sup>など、哺乳類の進化を解明する上で貴重な位置を占めている。こうしたことから、2007年にハイロジネズミオポッサム(以下オポッサム)の全ゲノム配列が解読されたのを皮切りに<sup>2)</sup>、ワラビー、タスマニアンデビル、バンデカートでゲノム解析が行われている。

子宮での哺育期間の長い真獣類と比べ、有袋類の新生仔は真獣類の胎仔に相当する発生段階で生まれる。特に、ラットほどの大きさのオポッサムは、有袋類とは言うものの哺育嚢を持たないため、新生仔の観察や手術などの実験操作が容易であり、胎仔期の発生過程などを研究する上で有用であると考えられている(図1)。有袋類の新生仔は未熟な状態で産み落とされ、その後体外で急速に成長する(図2)。したがって、体表からの乾燥を防ぐためにいち早く表皮を分化させ、バリア機能を高める必要があると思われる。



図1 出生直後のオポッサム

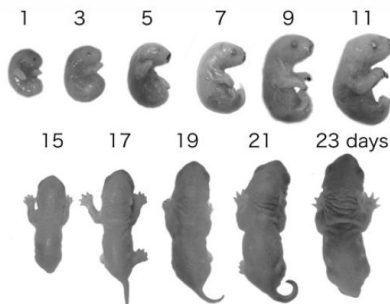


図2 オポッサム新生仔の発達段階

また、免疫系が未発達なまま生まれることから、ディフェンシンなど抗菌ペプチドの遺伝子ファミリーがゲノム解析で多数見つかっており<sup>3)</sup>、真獣

類とは異なる防御機構を持っている可能性が高い。さらに、未熟状態で生まれるものの、乳首まで自力で移動するため、前肢は既に十分発達しているのに対し、後肢は分化途中であり指の分岐も不十分である。このような特性は、四肢の分化過程を研究するのに好都合である。

こうした様々なユニークな特徴を持つオポッサムを、分子から個体レベルで解析することで、真獣類の体制進化などの理解がさらに進むことは間違いはない。しかし、オポッサムを研究する上で解決しなければならない問題点が数々ある。まず、真獣類と遺伝的に離れているため、既存の抗体や遺伝子マーカーなどが使えるかどうか不明なことが多く、逐次検証し、場合によっては新規に作成する必要がある。細胞培養や器官培養の条件についても同様の問題がある。また、胚発生についての情報が乏しいため、ES細胞の作成はおろか、胚操作などの発生工学的な手法や遺伝子操作といった生命科学の強力な手法が使えないデメリットがある。しかし近年、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)を用いたゲノム編集技術が開発され<sup>4)</sup>、ターゲット遺伝子の塩基配列さえ分かれば、ES細胞などを使わずとも遺伝子ノックアウトやノックインが可能になってきた。オポッサムでは既にゲノム解析が終了していることから、簡単に遺伝子操作ができる可能性が見えてきた。

そこでまず、オポッサム細胞への遺伝子導入方法を検討しておくことが重要である。また近年急速に発達してきた組織を透明化する手法と<sup>5)</sup>、蛍光タンパク質による標識法を組み合わせることで、組織を丸のまま三次元観察することが可能になってきた。皮膚の透明化技術は確立されていないが、もし応用が可能となれば、皮膚の機能解析が各段に容易になると思われる。さらに、オポッサム新生仔の皮膚分化を解析するための分化マーカーを見つけることも有用である。

## 2. 研究の目的

有袋類の皮膚に関する研究は紫外線耐性およびメラノーマに関するものがほとんどで、創傷治癒に関する研究が1報あるものの<sup>6)</sup>バリア機能に関する報告は見当たらない。そこで本研究では、ハイロジネズミオポッサムの実験動物としての有用性を高めるため、未熟な状態で生まれてくる仔の体表のバリア機能の解析を題材に、1) 蛍光タンパク質遺伝子の導入法ならびに蛍光タンパク質

標識細胞の三次元的解析法の確立、2) レクチンならびに免疫組織化学的手法の条件検討、および3) ZFN を用いた遺伝子改変法の導入に向けた、オポッサム皮膚への遺伝子導入法に関する基礎的研究を行う。これらの成果を元に、哺乳類の中でも特異な位置を占めるオポッサムとマウス等の比較研究がより高度なレベルで行える環境を整える。

### 3. 研究の方法

#### (1) オポッサムの飼育

オポッサムは未熟な状態で生まれるため、温湿度管理のできる動物飼育環境調節装置(KCLP-1400AR-SP、日本医科器械)の中で維持した。成体は1匹ずつウッドチップを敷いたTPX製ラットケージに入れて、フェレットフードと水、および巣材として細切したペーパータオルを与えて飼育した。交配はオス1匹とメス1匹を1週間同居させたのち分離し、プラグチェックによる交尾確認ができないためメスの体重変化から妊娠を確認して、毎日出産の有無を確認した。

#### (2) 新生仔皮膚の組織構造解析

母オポッサムをイソフルランでガス麻酔したのち、生後0日~12日の新生仔を乳首から剥がして水中で冷却した。断頭して安楽死させたのち、背部皮膚を採取した。皮膚は4%パラホルムアルデヒドで固定後に、パラフィン包埋して細切切片を作成し、HE染色を行って組織構造を観察した。

#### (3) 皮膚水分量の測定

オポッサム新生仔の皮膚バリア機能の発達過程を調べるために、皮膚水分計(MY-808S, Scalar社)の計測センサー面に2mm四方の窓を開けたメンディングテープを貼り、窓部分を新生仔皮膚に密着させる方法で皮膚水分量を調べた。新生仔は離乳まで母親の乳首をくわえたまま過ごすことから、測定時に母親をイソフルランでガス麻酔し、仰向けに寝かせて、新生仔の背中皮膚の水分量を計測した。計測は生後1日から10日目まで毎日1回、夕刻に行った。

#### (3) 免疫組織染色およびレクチン組織染色

オポッサムの生後1~12日の新生仔を上述のように安楽死させ、背部皮膚を採取した。皮膚はHOPE液(Polyscience社)で固定したのち低融点パラフィンに包埋し、5 $\mu$ mの薄切切片とした。脱パラフィン後、ブロックエース(DSファーマバイオメディカル)でブロッキングしたのち、サイトケラ

チン(CK)5、ロリクリン、インボルクリン、フィラグリン、ラミニン5に対する抗体で処理し、次に蛍光色素標識した抗マウスIgG抗体またはウサギIgG抗体と反応させた。

レクチン染色は、上述のように固定・包埋・薄切した皮膚サンプルに、FITC標識した各種レクチンABA, Con-A, ECA, PHA-L4, LCA, PHA-E4, PNA, SBA(J-オイルミルズ)を反応させた。陽性シグナルは蛍光顕微鏡(オリンパスBX51N-34-FL)で観察し、Leica製冷却モノクロデジタルカメラ(DFC345FX)で写真撮影した。

#### (4) 皮膚細胞の初代培養

オポッサムの生後1~5日の新生仔を上述のように安楽死させ、体表を外科用イソジンと70%エタノールで清拭したのち、背部皮膚を切り取り、70%エタノールで滅菌してリン酸緩衝生理食塩水中で洗浄した。皮膚はディスペーゼで表皮と真皮に分離し、トリプシン-EDTAで処理して細胞を解離した。遠心分離して回収した細胞を各種培養液とともに、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>のインキュベーター内で培養した。

#### (5) 皮膚の器官培養

マウスまたはオポッサムの成体をガス麻酔したのち安楽死させ、背部被毛をバリカンで刈毛した。体表を外科用イソジンと70%エタノールで清拭したのち、背部皮膚を切り取り、70%エタノールで滅菌してリン酸化緩衝生理食塩水中で洗浄し、滅菌したシリコンゴムに針で固定した。6枚の片刃剃刀と5枚のスペーサーを交互に挟んで固定した道具を滅菌後、皮膚に押しつけてスライドさせて正中線に平行な細切り皮膚片を作成し(図3A)、これを別のシリコンゴム片に微針でとめて(図3B,C)、各種培養液で培養した。皮膚片を毎日実体顕微鏡下で観察・写真撮影して、毛の伸長を指標に培養系の評価を行った。

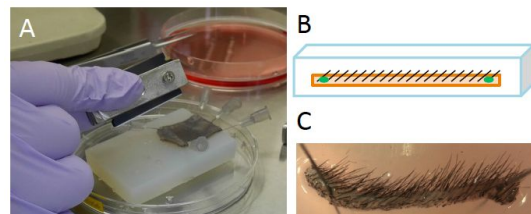


図3 細切皮膚片の器官培養

#### (6) 培養液

真皮系の細胞培養には10%ウシ胎児血清を加えたDMEMを用い、表皮細胞の培養には3社の表皮細胞専用培地を用いた。また、皮膚の器官培養には

WE 培地に 1%ウシ胎児血清、インスリン、ハイドロコルチゾンを経々の濃度で添加して用いた。

#### (7) 遺伝子導入

オポッサム皮膚への遺伝子導入効率を指標するために、pEF1 コビキタスプロモーターによって赤色蛍光タンパク質 tdTomato を発現するベクターを、トランスフェクション試薬と混合して投与した。培養細胞に対しては直接培養液に添加する方法を用い、動物実験では 31 ゲージの注射針を付けたシリンジで、新生仔および成体の皮膚に導入した。細胞外基質を部分破壊することでベクターの組織浸透効率を上げるため、一部の個体では、前もってコラゲナーゼ/ディスペラーゼを皮膚組織内に注入し、15~20 分後にベクター溶液を注入した。また滅菌済みの 12 本針を付けた DermaPen(Oster 社)で皮膚表面から 1.5mm の深さまで連続して細かい穴を空けることで、表皮細胞層へのベクター液の浸透を図った。ベクター注入の 3 日後に皮膚を外部から蛍光顕微鏡で観察するとともに、皮膚サンプルを採取して導入効率を評価した。

#### (8) 皮膚の透明化

マウス皮膚細胞を 4%パラホルムアルデヒド固定し、CUBIC 法<sup>7)</sup>に準じて透明化した。原法を改変し、1液は尿素 15%、N,N,N',N'-テトラキスエチレンジアミン (TKED) 35%、トリトン X-100 を 15%とし、2液はスクロース 50%、尿素 25%、2,2',2''-ニトリロトリエタノール(NTE)10%、トリトン X-100 を 0.1%、それぞれ超純水に溶解して作成した。まず、固定した皮膚を 1 液に浸漬し、37 °C で 1 日処理したのち、2 液に移して 37°C で 1~3 週間処理した。

### 4. 研究成果

#### (1) 皮膚バリアの発達

オポッサム新生仔の HE 染色組織切片の観察ならびに各部位の計測結果から、生後 2 日目に真皮が一度薄くなったのち、時間とともに真皮が発達することで皮膚の厚みが増すことが分かった(図 4)。また、生後 8 日からは皮下脂肪組織が発達し始めた。こうした変化がオポッサム皮膚の治癒様式の変化する時期<sup>8)</sup>と一致することは興味深い。

そこで皮膚バリア機能の発達度合いを、皮膚水分計を用いて水分量を計測することで指標することを試みた。オポッサム新生仔は体長が 7mm 程しかないため、2mm 四方の窓を開けたセロファンテ

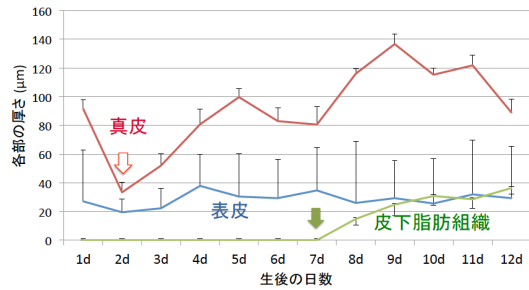


図4 オポッサム新生仔の皮膚組織構造の発達

ープをセンサー面に貼り、窓を新生仔皮膚に密着させる方法で皮膚水分量を調べた。測定面積が小さいことから正確な計測が難しかった。生後 1 日では測定値のバラツキが大きかったがほぼ 10% 以下の値を示し、生後 2 日以降は約 8% で安定した。マウスでは生後 7 日から 10 日にかけて水分量が 30% から 7% 程度に減少することから、オポッサム新生仔の皮膚バリア機能は、出生後急速に発達するものと考えられる。

#### (2) 皮膚分化マーカー

オポッサム新生仔の皮膚バリア機能発達過程における表皮細胞の変化を調べるために、皮膚分化過程を指標するマーカーを探索した。パラホルムアルデヒド固定よりも抗原性保持に優れる HOPE 固定を施したオポッサム皮膚を薄切切片にし、マウスやラットと交差する市販の抗体を用いて免疫

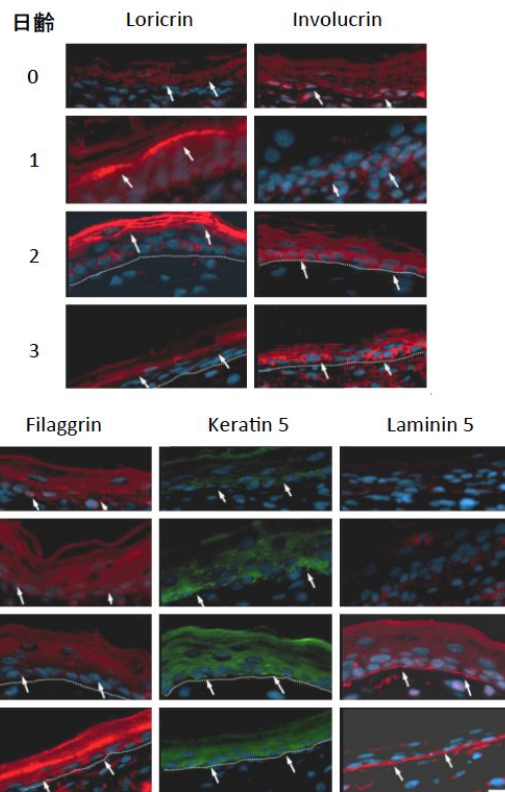


図5 オポッサム新生仔皮膚における表皮分化マーカーの発現

組織染色を行った。その結果、OK5、ロリクリン、インボルクリン、フィラグリン、ラミニン5に対する抗体が交差性を示したが、交差しない抗体も多かった。陽性シグナルはマウスの皮膚とほぼ同様の部位に観察されたことから、オポッサムの皮膚構築および各種タンパク質の局在は真獣類と大きく変わらないものと考えられる(図5)。

レクチンを用いた組織染色では、表皮の各細胞層、基底膜、真皮に対する反応性の異なるレクチンが判明し、これらを組み合わせることで皮膚組織の発達過程を追いかけることができた(表1)。また、特に生後1日から2日に掛けての表皮構造に大きな違いがあることが、SBAとPNA、ECAに対する反応性の変化から明らかになった。すなわち、生後1日目の表皮(図6中のカギ部分)はSBA陽性であるがPNAやECAに対して陰性であり、2日目以降は陽性となった。1日目の表皮が2日目以降の表皮を構成するセラチノサイトではなく、マウス等では胎児期に子宮内で剥離するペリダー姆細胞で構成されることが示唆された(図6)。

表1 オポッサム新生仔皮膚各組織のレクチン反応性

Tissue/Lectin	ABA	ECA	PHA-L4	PHA-E4	PNA	SBA	Con-A	LCA
Cornified		++			++	+		+
Suprabasal	++	+	++		+++	++		+
Basal			+++		+	+		
BM	++	+				++	++	++
Dermis	++	+	+	- or +		+ or -	++	+++
Immune cells			++		++	++		

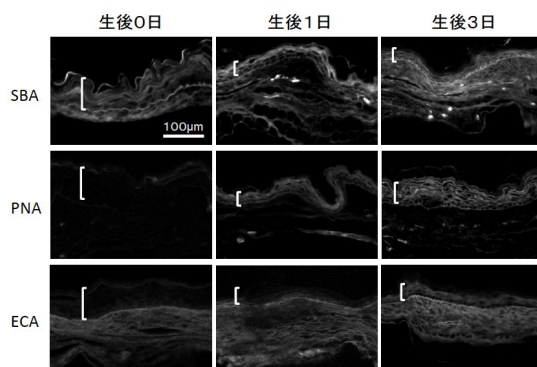


図6 オポッサム新生仔皮膚におけるレクチン反応性の変化

### (3) 皮膚細胞の培養

オポッサム皮膚への遺伝子導入の足がかりとして、まず、皮膚から各種細胞を単離培養して遺伝子導入効率を調べることを試みた。オポッサムの表皮細胞は非常に脆弱で生存率が低く、表皮細胞培養用の各種培養液・条件を試したが、増殖が極めて悪かった。一方真皮からは、形態の異なる種々

の細胞を得ることができた。しかしその多くはやはり増殖速度が極めて遅かった。このうち最も増殖速度の高かった線維芽細胞様の細胞にトランスフェクション試薬を用いて赤色蛍光タンパク質tdTomatoの遺伝子導入を試みたところ、最大約2割の細胞に導入された。この結果から、導入効率は高くないものの、真獣類に通常用いられる方法で、有袋類のオポッサム皮膚細胞にも遺伝子を導入できることがわかった。

### 4) オポッサム皮膚への遺伝子導入

オポッサム個体皮膚に直接遺伝子を導入する方法を検討した。皮膚の表面は表皮細胞の緻密な細胞接着により、外部からの異物の侵入を阻んでいる。また真皮組織にも多量の細胞外基質が存在するため、導入したい遺伝子ベクターが細胞まで届きにくい。そこで、微細な針を付けたシリンジでコラゲナーゼ/ディスペラーゼ溶液を予め皮膚に注入して、細胞外基質を部分分解しておき、トランスフェクション試薬と混ぜたベクターを注入してみた。また、表皮細胞への浸透を良くするため、剣山状に12本の針を装着したDermaPenで連続的に穴を開けた。その結果、コラゲナーゼ/ディスペラーゼ処理した群は対象群に比べ、表皮における遺伝子導入細胞が占める面積が中央値で約3倍増加した(図7)。遺伝子が導入された細胞の割合は最大でも約1%であり、実用的なレベルには達しなかったものの、これらの結果は、対象となる細胞にいかにして遺伝子を接触させるかが導入効率を上げるカギとなっていることを示しており、今後の改良に向けた指針を示すものとなると考えられる。

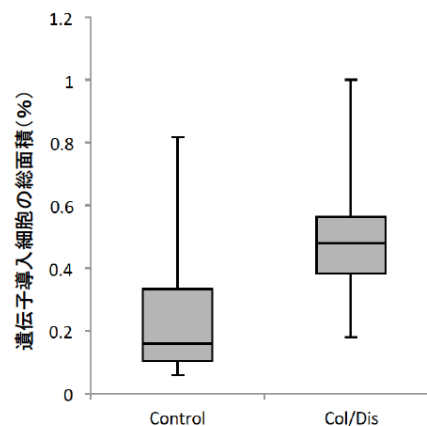


図7 オポッサム新生仔皮膚への遺伝子導入効率

### 5) 皮膚器官培養

オポッサム皮膚へ直接遺伝子を導入する方法は

効率が悪いことから、薄切皮膚片を作成して培養し、これに遺伝子を導入したのち、個体に移植する方法を確立しようと考えた。そこで、まずマウス皮膚を用いて薄切皮膚片の作成と期間培養の至適条件を探った。その結果、WE 培地にハイドロコルチゾン 50ng/ml, インスリン 10ng/ml, 1% ウシ胎児血清を添加した場合、および表皮細胞用無血清培地である KGM-Gold を用いた場合に毛の伸長が6日間観察されたことから、これが現状で最も良い状態で皮膚を維持培養する条件であることがわかった。そこで、この培地を用いてオポッサム皮膚の細説切片の器官培養を試みた。オポッサム皮膚はマウス等の皮膚に比べ皮下脂肪組織が厚く、脂肪細胞も大きい。そのためか、表皮細胞や真皮細胞は6日以上生残するものの、培養開始後数日で脂肪組織が崩壊し始め、毛の伸長も表皮や真皮の肥厚も観察できなかつた。これらの結果は、細胞や組織の増殖・維持に関わる因子が有袋類と真獣類とで大きく異なっている可能性を示唆しているものと考えられる。

#### 6) 皮膚透明化

表皮の細胞間隙構造の発達具合を三次元解析するために、皮膚の透明化を試みた。オポッサムのサンプルが貴重であることから、パイロット実験として4%パラホルムアルデヒド固定したマウス皮膚細胞を Scale 法、CLARITY 法、SeeDB 法、CUBIC 法を用いて透明化処理し、比較してみた。その結果、脳と違い皮膚は透明化が難しいことが分かったが、4者の中ではCUBIC法での透明化度が最も結果が良かった。そこでCUBIC法で用いる1液と2液の組成を変えるとともに、処理温度を変えて効果を検討した。その結果、脂溶性の高いTKEDの濃度を10%上げることと、メラニン色素の除去

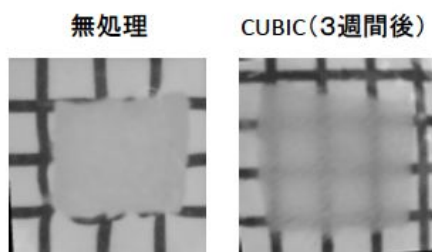


図8 マウス皮膚の透明化

効果があるNTEを5%増やすこと、及びそれぞれの処理温度を37に上げて、処理時間も延長することで皮膚の透明度が増すことがわかった(図8)。この技術は、皮膚に蛍光タンパク質遺伝子等を導

入したのちに三次元で局在解析等を行う際に有効であると考えられる。

#### <引用文献>

- Cook JS, Regan JD. *Nature* 6:223:1066-7 (1969)  
 Mikkelsen TS et al. *Nature* 447:167-77 (2007)  
 Samoilow PB. *Genome Res.* 18:1199-215 (2008)  
 Davis D, Stokoe D. *BMC Med.* 8:42 (2010)  
 Hama H, et al. *Nat Neurosci.* 14:1481-8 (2011)  
 Armstrong JR, Ferguson MW. *Dev. Biol.* 169:242-260 (1995)  
 Susaki EA, et al. *Cell* 157:726-39 (2014)

#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文] (計4件)

1. Arai M., Matsuzaki T., and Ihara S. *Wound Closure on the Neonatal Rat Skin II. The Potential Ability of Epidermis to Close Small-Sized Wounds Independently of the Underlying Dermis.* *CellBio* 2013, 2: 257-266

##### [学会発表] (計9件)

1. 新規マウス背部皮膚器官培養法の開発, 新部 一太郎, 宇佐美 文子, 松崎 貴, 第22回毛髪科学研究会 大手町サンプラザ(東京) (2014年11月29日)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松崎 貴 (MATSUZAKI Takashi)  
 島根大学・生物資源科学部・教授  
 研究者番号 90241249

##### (2) 研究分担者

猪原 節之介 (IHARA Setsunosuke)  
 島根大学・その他部局等・名誉教授  
 研究者番号 90101295

##### (3) 研究協力者

新部 一太郎 (NIIBE Ichitaro)  
 松野 景 (MATSUNO Kei)  
 阿嶋 友紀 (AJIMA Yumki)  
 小野 紗世子 (ONO Sayoko)