

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592713

研究課題名(和文) 新しい自己集合性ペプチドゲルを用いた3次元全層皮膚ストレッチ培養に関する研究

研究課題名(英文) Mechanical stretch on Human skin equivalents with a new peptide scaffold

研究代表者

徳山 英二郎 (Tokuyama, Eijiro)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：90379785

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)：我々は、本研究において新しい自己集合性ペプチドゲルを用いて3次元全層培養皮膚の作成を試みたが、強度的に伸展培養が困難であった。そこで、1型コラーゲンゲルを用いる方法に変更することで強度が安定し、世界初の3次元全層培養皮膚ストレッチシステムを構築することに成功した。これを用いて、伸展刺激を加えた皮膚を解析したところ、伸展刺激を加えなかった皮膚に比べ、表皮層の肥厚、基底膜タンパクの増加が認められ、電子顕微鏡による観察では基底層におけるヘミデスモソーム及びlamina densaが増加する所見が得られた。このシステムを用いることにより、より生体に近い条件での実験が可能になったと考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to make human skin equivalents (HSEs) with a new peptide scaffold. But it is very difficult to stretch the ones due to the low mechanical strength. Thus we changed the scaffold to collagen Type-I gel, and have established a system that allows application of stretch stimuli to HSEs. After 5-day stimulation with stretching, HSEs were analyzed histologically and immunohistologically. Stretch-stimulated HSEs had a thicker epidermal layer and expressed significantly greater levels of laminin 5 and collagen IV/VII compared with HSEs not subjected to stretch stimulation. Transmission electron microscopy revealed that the structure of the basement membrane was more developed in HSEs subjected to stretching. The system developed in this study enabled us to analyze the effect of a stretch on the skin in a state similar to an in vivo system.

研究分野：形成外科

キーワード：メカノメディスン 3次元全層培養皮膚 自己集合性ペプチドゲル

1. 研究開始当初の背景

形成外科領域では、以前から再生医療として培養皮膚を移植する試みが行われてきた。しかし、現在臨床で実際に用いられている培養皮膚は表皮細胞のみで構成され、真皮成分を含まない。そのため非常に薄く脆弱で取り扱いには細心の注意が必要である。また移植部は整容的に優れているとは言い難いため、その適応は重症熱傷患者の救命の用途に限られているのが現状である。そこで、まず皮膚線維芽細胞をスキャフォールドと混合、培養し、その上に表皮細胞を播種することで真皮成分を含む3次元的全層培養皮膚を作成する試みも行われている。ただ、この際線維芽細胞のスキャフォールドには一般的に動物由来のコラーゲンが用いられ、未知の感染症のリスクが否定できないため実際のヒトへの応用には問題がある。さらに、生体の皮膚には細かい皺(皮溝)があり、これが微妙な肌の質感につながっているが、従来の培養皮膚は表面が平滑で質感に乏しいという欠点がある。このため、臨床現場で頻繁に行われる整容的な皮膚移植には培養皮膚を用い難い。一般的に生体では皮膚の伸展方向に直交するように皺が形成され、その伸展の度合いが大きいほど深い皺になる傾向がある。そこで、3次元培養全層皮膚に適切なストレッチ刺激を加えることで、より強靱で生体に近い質感の皮膚組織の作成が可能ではないかと考えるに至った

2. 研究の目的

形成外科領域における再生医療として、以前から培養皮膚の研究が行われてきたが、現在実際に臨床で用いられている培養皮膚は薄い表皮成分のみで構成され、その質感、強度などは実際の皮膚には遠く及ばない。一方、近年培養細胞に機械的刺激を加えることで、より生体に近い細胞形態・組織としての強度を得られることが判明してきた¹⁾。本研究では、我々が新規開発した自己集合性ペプチドゲルをスキャフォールドとして、表皮および真皮成分からなる3次元培養全層皮膚のストレッチシステムを開発し、より生体に近い皮膚組織へと成長させることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

Normal human dermal fibroblast (NB1RGB) を Riken Cell Bank (Tsukuba, Japan) から、Normal human epidermal keratinocyte (NHEK) を KURABO Industries (Osaka, Japan) から購入した。NB1RGB は 10%FBS 含有 MEM- 培地 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) で継代培養し、3-8 継代目のものを用いた。NHEK は無血清の keratinocyte growth medium である HuMedia-KG2 (KURABO Industries) で継代培養し、2-4 継代目のものを用いた。

(2) ストレッチチャンバーの作成 (図1)

この実験では、3次元全層培養皮膚を作成すると同時に伸展刺激を加えるためのストレッチチャンバーを作成した。既存のシリコン製チャンバー (Menicon, Aichi, Japan) の内側に、有孔性のシリコンシート (穴の直径 1 mm) を 3 枚用いて “雨樋” のような形に貼り合わせた。接着剤としてシリコンレジン (TSE3032; GE Toshiba Silicones, Tokyo, Japan) を使用した。“雨樋” の底面がチャンバーの底面から 4 mm の高さに来るように配置した。使用前に、chamber を真空プラズマ装置 (YHS-R; SAKIGAKE-Semiconductor, Kyoto, Japan) にて 90 秒プラズマ処理し、シリコンシートの表面を親水性に表面改質を行った。

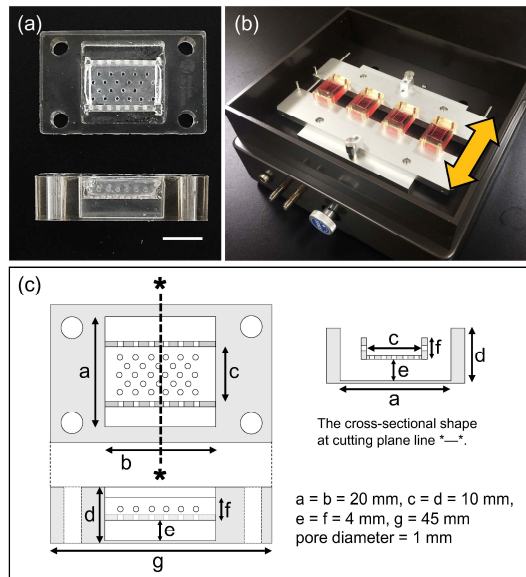


図1) Stretching chamber and stretch device
(Above, left) Over and side view of the chamber. (Above, right) Overhead view of the stretch device. Yellow arrow shows the stretching direction. (Below) Schema of the chamber.

(3) 3次元全層培養皮膚の作成

まず自己集合性ペプチドゲルを用いた全層培養皮膚の作成を試みた。皮膚線維芽細胞をゲルと混合し作成した専用のシリコン製培養器内で3次元培養を行ったが、1週間ほど培養するとゲルが脆くなり伸展刺激を加えるのが困難となってしまいう問題が発生した。細胞やゲルの濃度を変えながら培養を繰り返したが、この問題が解決できなかったため、scaffold として 型コラーゲゲルを用いる方法に変更した。コラーゲゲルを用いることで強度が安定し、ここにヒト表皮角化細胞を播種、角化させることで、3次元全層培養皮膚にストレッチ刺激を加えることがシステムを完成させた。詳細な作成方法は以下の通りである。

“雨樋” の内部に NB1RGB (1.0 × 105

cells/ml)を含む 0.2%Type-1 collagen 溶液 (Cellmatrix®; Nitta Gelatin, Osaka, Japan) を 600 μ l 注入した。これを CO2 インキュベーター内で 37 °C 30 分静置してゲル化させた後、chamber 内を 10%FBS 含有 MEM-培地で満たし、37 °C、5%CO2 で 3 日間培養した。次に、chamber 内の MEM- を吸引し、HuMedia-KG2 を注入後 3 時間静置し、ゲル内の培地を置換した。コラーゲンゲルの上に NHEK (1.0 \times 10⁶ cells/ml) を懸濁した HuMedia-KG2 を 100 μ l 注ぎ、5 時間静置し、NHEK がコラーゲンゲルに接着した後に HuMedia-KG2 を chamber 上縁まで注入した。この状態で 24 時間培養後、chamber 内の培地を MEM- 培地と HuMedia-KG2 を 1:1 の割合で混合し、5%の FBS、1.8 mM の Ca²⁺、50 μ g/ml の ascorbic acid を加えた培地 (3-D culture medium) に変更した。48 時間培養後、3-D culture medium を交換する際に、液量を皮膚モデル表面が空気に暴露される位置まで下げ、表面を角化させた。これを更に 24 時間培養後、伸展刺激負荷を開始した。

(4) 3次元全層培養皮膚へのストレッチ刺激負荷

3次元全層培養皮膚を作成後、chamber を伸展装置 (STB-140; STREX, Osaka, Japan) に装着した。これに uniaxial な伸展刺激を周期的 (Stretch rate 10%, Stretch and return speed: 10%/sec, Hold time: 30 sec, Waiting time before next stretch: 30 sec) に 5 日間負荷した (Stretched sample: ST)。並行して同じ chamber で作成し、伸展刺激を加えなかった 3次元全層培養皮膚を control として用いた (Non-stretch sample: NST)。また、これらの培養の過程で、時折 3次元全層培養皮膚がシリコンシートから剥離し収縮してしまう事があったが、これらは破棄し解析に用いないようにした。

(5) 組織学的、蛍光免疫染色

3次元全層培養皮膚は 4% paraphormaldehyde で固定し、パラフィン包埋後、4.5 μ m で切片を作成、hematoxylin and eosin で染色した。

Immunofluorescence (IF) staining では、3次元全層培養皮膚を包埋剤 (Tissue-Tek® O.C.T. Compound; Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan) に入れた後、液体窒素で凍結させ、クライオスタットで 7 μ m の切片とした。切片は primary antibodies: anti-type IV collagen (ab6586; Abcam, Cambridge, UK)、anti-laminin 5 (ab102539; Abcam)、anti-type VII collagen (NU-01-C07; COSMO BIO, Tokyo, Japan) で incubate した。Secondary antibody は Alexa Fluor® 555 conjugated anti-rabbit IgG (A-21428; Abcam)、Alexa Fluor® 555 conjugated anti-mouse IgG (A-21427; Abcam) を用いた。Primary antibody を用いず、Secondary

antibody のみで incubate したものを negative control とした。蛍光は box type fluorescence microscopy (FSX-100; Olympus, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。

(6) 透過型電子顕微鏡 (TEM)

3次元全層培養皮膚を 4 °C overnight 2% paraphormaldehyde containing 2% glutaraldehyde で前固定し、さらに 4 °C 1 時間 1% osmium tetroxide で後固定を行った。Graded concentrations of ethanol (50 - 100%) を用いて脱水した後、標本を Epon 812 (Oken Shoji, Tokyo, Japan) に包埋し、ultramicrotome (EM UC6; Leica, Vienna, Austria) で超薄切片 (60-90 nm) を作成した。切片を 5% aqueous uranyl acetate and lead citrate で染色し、透過型電子顕微鏡 (H-7650; Hitachi, Tokyo, Japan) にて 80 kV で観察した。

(7) 統計解析

3次元全層培養皮膚の組織学的、蛍光免疫染色、電子顕微鏡所見のデータは mean values \pm SD で表示した。NST 群と ST 群の mean value の相違は Student's t test を行い、p < 0.05 をもって有意差有りとした。

4. 研究成果

(1) ストレッチ刺激は表皮細胞の層化と角化を促進する。

肉眼的所見では、ST 群のほうが NST 群に比べ角質が厚く、透明性が低下していた (図 2)。

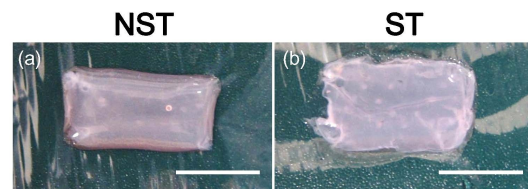


図 2) Macroscopic view of the harvested HSEs. (Left) Non-stretch sample. (Right) Stretched sample. Stretched sample had a thicker cuticle and reduced transparency compared with the non-stretch sample.

H.E. 染色切片で、dermal-epidermal junction 100 μ m あたりの基底細胞の数をランダム 5 箇所計測し平均値を比較したところ、NST 群では 8.50 \pm 1.83 cells (mean \pm SD, n = 6)、ST 群では 12.40 \pm 1.03 cells (mean \pm SD, n = 8) と有意に増加していた (p < 0.001)。さらに、ランダム 10 箇所での表皮角化層の厚さを計測し平均値を比較したところ、NST 群では 27.2 \pm 5.94 μ m (mean \pm SD, n = 6) であったのに対し、ST 群では 46.8 \pm 12.4 μ m (mean \pm SD, n = 8) と有意に増加していた (p < 0.05)。これより、伸展刺激を加える事で HSEs の表皮基底細胞の層化、角化が促進されていることが示唆された。(図 3)

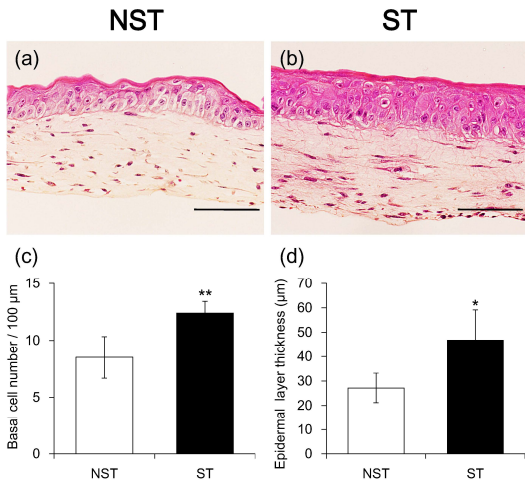


図3) Histologic analysis of HSEs. (a) Hematoxylin and eosin staining of the non-stretch sample (b) and of the stretched sample. Scale bar = 100 μm. (c and d) The number of basal cells per 100 μm of a dermal-epidermal junction and the thickness of the epidermal keratinized layer showing a significant increase in the ST group. **p < 0.01 and *p < 0.05.

(2) ストレッチ刺激は基底膜タンパクの合成、沈着を促進する

laminin 5, collagen IV/ VII に対する免疫蛍光染色を行った切片の基底膜における蛍光強度をランダム 5 箇所計測し、その平均値を比較した。その結果、laminin 5 では ST 群で control basal value (NST: 1.00 ± 0.30, mean ± SD, n = 8) に比べ 1.45 ± 0.09 times (mean ± SD, n = 10) (p < 0.01), Collagen IV では ST 群で control basal value (NST: 1.00 ± 0.33, mean ± SD, n = 10) に比べ 1.56 ± 0.38 times (mean ± SD, n = 11) (p < 0.01)、Collagen VII では ST 群で control basal value (NST: 1.00 ± 0.11, mean ± SD, n = 6) に比べ 1.41 ± 0.24 times (mean ± SD, n = 17) (p < 0.01) と、いずれも有意に蛍光強度が増加していた(図4)。これらの結果から、伸展刺激が HSEs の皮膚細胞に作用し、基底膜構成タンパクの合成および、基底層への沈着が促進されていると考えられた。

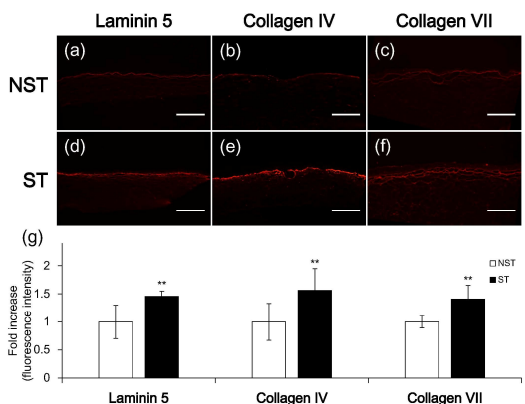


図4) Laminin 5 and collagen IV/VII expression analysis of HSEs by immunofluorescence staining. (a, b and c) Non-stretch sample. (d, e and f) Stretched sample. Scale bar = 500 μm. (g) Fluorescence intensity of NST group was taken as control and adjusted to the 1 value. Each histogram bar represents the mean value of the normalized and adjusted fluorescence intensity. All three proteins of ST group were significantly greater compared with NST group. **p < 0.01.

(3) ストレッチ刺激は基底膜構造を発達させる

TEM で観察したところ、ST 群では NST 群に比べ優位に lamina densa や、ヘミデスモーム様の構造が増加している所見が認められた(図5)。これにより、伸展刺激を加えることで、より発達した基底膜構造となることが示唆された。

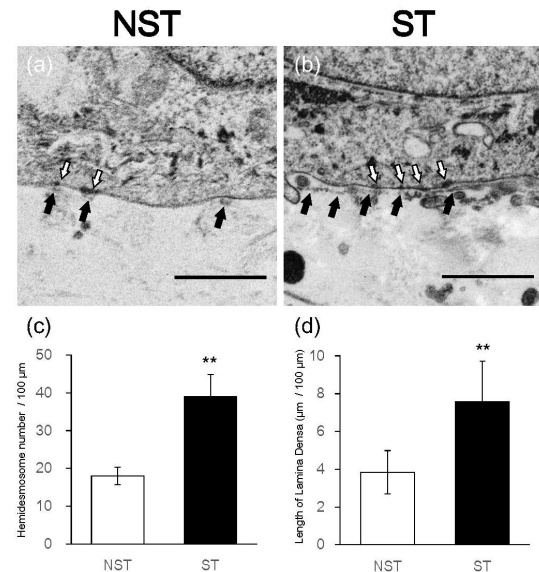


図5) TEM images of HSEs. (a) Non-stretch sample. (b) Stretched sample. White arrow: hemidesmosome. Black arrow: lamina densa. Scale bar = 1 μm. (c, d) In the ST group, the length of lamina densa and the number of hemidesmosomes per 100 μm of a dermal-epidermal junction were significantly greater than in the NST group. **p < 0.01

引用文献

1) Gauvin R. et al., (2011) Acta Biomater, 7(9), 3294-3301

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

第12回日本再生医療学会総会(2013年3月21日、横浜) 「伸展刺激が3次元前走培養皮膚に及ぼす影響」徳山英二郎、永井祐介、高橋 賢、成瀬 恵治

第22回形成外科基礎学術集会(2013年11月7日、新潟) 「ストレッチ刺激が3次元全層培養皮膚に及ぼす影響の解析」徳山英二郎、永井 祐介、高橋 賢、成瀬 恵治

6. 研究組織

(1)研究代表者

徳山 英二郎 (TOKUYAMA, Eijiro)

岡山大学病院 形成外科・助教

研究者番号：90379785

(2)研究分担者

成瀬 恵治 (NARUSE, Keiji)

岡山大学医歯薬学総合研究科 システム

生理学・教授

研究者番号：40252233

高橋 賢 (TAKAHASHI, Ken)

岡山大学医歯薬学総合研究科 システム

生理学・助教

研究者番号：50432258

(3)研究協力者

株式会社 メニコン

永井 祐介