

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592719

研究課題名(和文)線維芽細胞凝集塊形成による幹細胞形成機構の解明

研究課題名(英文)Explication of stem cells formation mechanism using fibroblasts spheres

研究代表者

林 瑠加(HAYASHI, RUKA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50445392

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)：C57BL/6Jマウス新生仔の皮膚より間葉系細胞を採取・培養したのち、非接着性培養皿で無血清培地を用いて細胞凝集塊を形成した。凝集塊は比較的長期に生存可能であり、その間いわゆる冬眠状態である可能性が示唆された。また細胞凝集塊の性質について遺伝子学的、免疫組織学的検討を行ったところ、凝集塊形成により毛包誘導や毛周期に関わりの深いWnt関連因子や、細胞の未分化性を示すSox-2、Oct-4、CD133、cxcr4などの遺伝子発現が相対的上昇することが判明したが、これら因子の分布は必ずしも凝集塊内で均一でなく、一部の細胞の性質が変化した結果なのか、もしくは細胞の選択が行われたのかは今後要検討である。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal cells were extracted and cultured from skin of newborn C57BL/6J mice, and each cell spheres were made using serum-free medium on non-adhesive culture dishes. Spheres were viable for the comparative long term of the months unit in spite of the non-adhesive condition, which suggest the possibility that the spheres were in so-called hibernation state. In genetic and immunohistological examination, the Wnt related markers which supposed to concerned with hair follicle regeneration and hair cycle, and also the undifferentiated markers such as Sox-2, Oct-4, CD133, cxcr4 were seen to relatively upregulated after forming the cell spheres. But the distribution of the markers was not equal in cell spheres, it is necessary to examine whether it is the result of character change in some specific cells or the result of the cell choice.

研究分野：形成外科学

キーワード：細胞凝集塊 非接着培養 間葉系細胞 線維芽細胞 毛包誘導

1. 研究開始当初の背景

毛包再生の研究は、形成外科医が携わる外傷・先天性の原因などによる癬痕性禿髪の治療のみならず、男性型脱毛の分野からも期待されている。現在材料となる毛包単位を用いることである程度の治療は可能だが、少なからず採取部の犠牲を伴うため、この材料を比較的簡便に調達できれば治療の可能性は格段に上昇する。また毛包が再生することはすなわち、同時に皮膚付属器を含んだ皮膚の再生を意味し、ヒトではいったん生じると二度と消失しない癬痕に対し、それを消すことができる可能性が生まれる。

毛包形成は、胎生期に上皮・間葉双方のシグナルにより真皮凝集塊が形成されることから始まり、この上皮間葉の相互作用はのちの hair cycle にも大きく関わっている。よって成獣環境下での毛包再生を目指す際は、上皮・間葉いずれの要素も必須であると考えられる。一般的に上皮成分としては皮膚の表皮角化細胞、間葉成分としては毛乳頭細胞が用いられることが多く、これまでもマウスやヒトの表皮細胞と毛乳頭細胞を混合移植することでマウスにおいて毛包誘導が可能であったとの報告は多い。我々は以前の研究で、間葉成分としてはマウス胎生期の真皮線維芽細胞 (non cultured) や、真皮由来の skin derived precursors (以下 Skps) という多分化能を有する細胞 (Toma, J.G. et al./Nat. Cell Biol. 2001, Hunt, Morris, Sterling et al./STEMCELLS. 2008) が毛包誘導能を持つことを発見し、表皮細胞と共に免疫不全マウスの皮膚欠損層に混合移植することで、皮膚付属器を有した皮膚を再生することに成功している (Kishi et al./Cell Transplant. 2005)。しかしこのマウス胎仔の真皮線維芽細胞は、一度でも継代を行うともはや毛包誘導能は消失し、また Skps も初代培養の段階で凝集塊を形成するとその後増殖しないことが判明した。

我々はその後、毛包誘導実験における間葉成分として皮膚真皮由来の線維芽細胞を用い、培養方法の工夫を加えることでこの細胞が毛包誘導を引き起こす能力を獲得する可能性を見出した。すなわち、通常の成獣由来の線維芽細胞は毛包誘導能力を有しない。しかし、数継代の培養を経た線維芽細胞を、非接着培養皿にて無血清培地で培養し細胞凝集塊を形成すると、この細胞凝集塊と表皮細胞を用いることにより毛包が誘導されることが判明した。

2. 研究の目的

一般的に毛包誘導実験における間葉系細胞としてよく用いられる毛乳頭細胞は毛包誘導効率が高い細胞として知られているが、材料採取のための細胞の単離が比較的難しく、また継代数が増えるにつれ毛包誘導能は低下してしまう。一方で近年、毛乳頭細胞に凝集塊を形成させることで毛包誘導効率が維持できるという報告 (Osada A. et al./Tissue Eng. 2007) や、線維芽細胞も凝集塊形成により、炎症性サイトカイン関連の遺伝子発現や、走化性に変化が生じ、接着培養の場合とは異なるプロファイルを示すという報告 (Vaheri A et al./Exp Cell Res. 2009, Enzerink A et al./Mol Immunol. 2009) が散見される。我々は以前より、細胞に凝集塊を形成させるという点に着目し、間葉成分としては二次元培養を行ったのちのマウス皮膚線維芽細胞を使用し、同系マウスの表皮細胞との混合移植を行うことで毛包再生が得られるかどうかの研究を行ってきた。線維芽細胞を選択した根拠としては、皮膚線維芽細胞の方が毛乳頭細胞に比べ採取に技術を要しないこと、体表のあらゆる部位から材料が採取できること、少量の細胞から十分量の細胞が培養・増殖可能なことなどが挙げられる。この研究において、通常の二次元培養を行った線維芽細胞は毛包を誘導することができないが、二次元培養により細胞数を増やした

のち、非接着培養の条件に移し凝集塊を形成することで、毛乳頭細胞ではなく培養を行った線維芽細胞でも毛包誘導が可能であることが判明した (Shimizu R. et al. / Exp Dermatol. 2011 Aug;20(8):679-81)。

本研究では、この線維芽細胞由来の細胞凝集塊に対し、毛包誘導を引き起こすための細胞は未分化性などを始めどのような性質を持ち合わせているのか、またその性質に関しこれまで報告されている種々の幹細胞と比較した際の、類似点、相違点についても検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

C57bl/6J 新生仔マウス背部皮膚より線維芽細胞を採取、通常の二次元接着培養 (10% FBS 添加 DMEM 培地) にて数継代培養した後、いったん酵素処理により細胞を回収した。そしてあらかじめ寒天でコーティングした超親水性の非接着性培養皿上で、無血清培地 (DMEM : F-12 = 3:1 + EGF、bFGF、B27 添加培地) を用いて培養を行い、細胞凝集塊を作成した。

非接着培養皿に移すと、徐々に細胞同士が集まり出し、約 1 週間で安定した凝集塊の形態となる。いったん凝集塊の状態になると肉眼的には増殖をしなくなるが、実際には細胞がどの程度生存しているかを調べ、その後一定期間非接着培養を行った細胞を各 time point で回収し、凝集塊の性質に関して免疫組織学的検討や、遺伝子発現の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞の生存に関する検討

TUNEL 染色では 95%以上の細胞の生存が確認された。その後も細胞が培養皿底面に付着しない状態であっても、数ヶ月単位で長期間生存可能であることを発見した。この間、凝集塊は徐々に小型化し、細胞の中の核の占める割合が増えてくる傾向にあった。これまでも他の凝集塊を作る細胞が、低栄養や低酸素

状態で培養を行うことで長期の生存が可能であるとの報告があり、細胞を取り囲む環境が大きく関与していることが示唆された。この際細胞はいわゆる「冬眠」状態であることが予測され、一般的に幹細胞と呼ばれている細胞にもこのような休止の期間があるのと同様の現象である。例えば造血幹細胞は冬眠状態になると、細胞膜に lipid raft を有し、Notch の発現を認め、活性化 Akt の核への集積が認められなくなる (Yamazaki et. al., Ann N Y Acad Sci. 2007)。われわれの実験系でも、二次元接着培養群と、細胞凝集塊群とでこれらの発現を比較したところ、細胞凝集塊群でこれら冬眠関連因子の変動が認められた。

そして長期間非接着状態で培養した後に、酵素処理により細胞を単一の状態にまで分解し二次元接着状態で培養を行ったところ、細胞は増殖を再開し、最初増殖速度が遅かったにも関わらず、徐々に通常の線維芽細胞と同程度近くまで回復してきた。凝集塊を再び二次元に戻した際にそれまで休止状態であった細胞が再び増殖しだすということは非常に興味深く、「接着」という刺激が trigger になっているのか、または血清成分が関与しているのかは不明であるが、今後はこれら細胞間での発現マーカーなどの違いを調べることを予定している。

(2) 細胞凝集塊の免疫組織学的検討

細胞凝集塊は 50~200 μm の間でサイズは様々であったが、免疫組織学的検討では、100 μm 前後のものを使用した。細胞凝集塊を形成すると毛包誘導能を有することや、いわゆる冬眠状態に移行することなどから、少なくとも通常の線維芽細胞と比べると脱分化な状態となり、幹細胞に近い状態に変化することが考えられた。真皮の幹細胞とされる skin derived precursors などでも発現が確認されている、Sca-1、Nest in、fibronect in に関し、

これらの細胞凝集塊を hole mount で多重免疫染色したところ、いずれも発現していることが確認されたが、confocal microscope で観察した切片画像では、これらの分布が必ずしも一致せずそれぞれ異なる細胞が発現している像が得られた。するとこれらの細胞は一樣な細胞群を形成しているのではなく、培養条件の違いにより、凝集塊を形成する一部の細胞が未分化状態へと移行するのか、もしくは細胞が選択された結果なのか、いずれの可能性も示唆されるが、これを明らかにするには単一の集団からなる細胞を用いて同実験系を再検討する必要があると考え、今後行ってゆく予定としている。

(3) 細胞凝集塊の遺伝子発現の検討：

凝集塊形成後、1W、2W、3W と経時的にサンプル採取ポイントを設定し、各段階での細胞凝集塊より mRNA を抽出した。この際、各群での細胞数の均一化を図るために、非接着培養下の条件では medium change の量を的確に規定し、細胞の loss がないようにした。得られた mRNA は変性を防ぐために直ちに cDNA に変換し、各サンプルが揃った時点で定量的 RT-PCR を行い、サンプル間の相対的变化を観察した。

様々な幹細胞において発現が確認されている未分化性を表す膜表面マーカーや転写因子を、細胞凝集塊でも確認したところ、iPS や MSC、毛乳頭細胞などにおいて確認されている、Sox-2、Oct-4、CD133、cxcr4、などが、細胞凝集塊形成後に二次元培養細胞と比較し、発現が著明に上昇することが観察された。

また毛包再生において重要と考えられているものの一つに、Wnt シグナル関連遺伝子がある。毛乳頭細胞への Wnt、 β -catenin などのシグナルが毛包誘導能の維持に必要であるとの報告 (Kishimoto J. et al./Genes Dev.2000. Enshell Seijffers D. et al./Dev Cell. 2010) や、Wnt シグナルが毛

包再生の first trigger となるとの報告 (Andl T. et al./Developmental Cell. 2002.) など、胎生期の毛包再生および hair cycle の維持に Wnt シグナルの関与が不可欠と考えられている。Wnt シグナル関連遺伝子の中では、Wnt5a、Wnt5b、catenin、Lef-1 の発現が上昇しており、表皮細胞との相互作用を起こしやすい状態になっていることが推測されたが、さらに表皮細胞との混合培養を行ったのちに再び発現変化を調べたところ、Wnt5a、Wnt5b については凝集塊単独の状態よりも発現が上昇することが判明した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

(1) Shimizu R, Kishi K, Okabe K, Uchikawa Y, Sakamoto Y, Hattori N, Imanishi N : Recruited minced skin grafting for improving the skin appearance of the donor site of a split thickness skin graft. Dermatol Surg. 2012 Apr;38(4):654-60 査読あり

(2) Shimizu R, Kishi K : Skin Graft. Plast Surg Int. 2012;2012:563493. 査読あり

(3) Kazuo Kishi, Keisuke Okabe, Ruka Shimizu, Yoshiaki Kubota: Fetal skin possesses the ability to regenerate completely: complete regeneration of skin. Keio J Med. 2012;61(4):101-8. Review. 査読あり

〔学会発表〕(計2件)

(1) 林瑠加、久保田義顕、岡部圭介、服部典子、貴志和生

「マウス線維芽細胞凝集塊を用いた毛包誘導と凝集塊の経時的 profile 変化」(研究奨励賞講演)

第42回日本創傷治癒学会

2012年12月3日 かでる2・7(札幌)

(2) 清水瑠加、貴志和生、岡部圭介、久保田義顕

「線維芽細胞凝集塊形成による非対称性脱分化」

第20回日本形成外科学会基礎学術集会

2011年10月6日

ハイアットリージェンシー東京(東京)

〔図書〕(計2件)

(1) 林瑠加、貴志和生

実践編 15. 癬痕に対する植皮術-リストカット

ト癬痕に対する植皮による治療-

癬痕・ケロイドはここまで治せる

Less-scar Wound Healing のための形成外科

科: 110-116, 2015年, 克誠堂出版

(2) 荒牧典子、磯貝善蔵、岡部圭介、林瑠加、貴志和生

ケロイド組織における細胞外マトリックスの産生・分解

癬痕・ケロイド治療ジャーナル(7):5-7, 2013

年, 全日本病院出版会

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 瑠加 (HAYASHI RUKA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究員番号: 50445392

(2) 研究分担者

鳥海 正博 (TORIUMI MASAHIRO)

帝京大学・医学部・助教

研究員番号: 20528210

貴志 和生 (KISHI KAZUO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究員番号: 40224919