

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861680

研究課題名(和文) ヒト爪組織の細胞学的特性の研究～ヒト爪再生を目指して～

研究課題名(英文) Research on cytological characteristics of human nail tissue for regenerating nail matrix

研究代表者

宇佐美 聡 (Usami, Satoshi)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10635577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：多指(趾)症患者から得た爪組織を用いたヒト爪・皮膚ケラチノサイトの分離、初代培養、継代培養を行った。各種刺激因子の作用効果および爪ケラチノサイトが産生する硬ケラチンへの影響を調べた。爪と皮膚のケラチノサイトはほぼ同様の細胞特性を示したが、爪ケラチノサイトの方が分化・角化が早く、早期に分裂能が消失した。bFGFおよびEGFは低用量(0.1～5ng/ml)で細胞増殖効果が強く、高濃度で増殖の抑制と分化を誘導した。逆にVitamin Dは濃度依存性に細胞増殖を抑制した。爪ケラチノサイトの単層培養での硬ケラチン産生量はVitamin D添加群が多く、bFGFとEGFは濃度依存性に産生量を増加させた。

研究成果の概要(英文)：We established cell separation, primary and passage culture methods of nail and skin keratinocytes harvested from polydactyly patients. Next, we examined the effects of various stimulating factors on the functions of these keratinocytes and hard keratins. Nail and skin keratinocytes showed similar cell characteristics, however, the nail keratinocytes differentiated and cornified earlier losing their ability to undergo cell division. Basal FGF and EGF proliferated keratinocytes at a low concentration (0.1-5ng/ml), and inhibited their growth at a high concentration. On the one hand, Vitamin D showed concentration-dependent inhibition. With regard to the production of hard keratin in a nail keratinocyte monolayer culture, Vitamin D group showed higher production; bFGF and EGF increased the production in a concentration-dependent manner.

研究分野：形成外科学

キーワード：爪ケラチノサイト 硬ケラチン サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

手指足趾の爪は機能及び整容的に重要な組織である。手指については、爪甲は指尖部の保護だけでなく、物をつまむ際の支えとして重要であり、更に整容的な美しさを求める女性が多い。現在、外傷後や先天性の手指爪欠損に対し足趾からの爪移植術が一般的に行われるが、足趾の犠牲による歩行障害や移植部の新たな傷を考えると理想的な再建とは言い難い。近年再生医療として表皮や毛髪の研究や臨床での実用化が進んでいるが、同じ外胚葉由来の体表組織である爪に関しては、現在のところ解剖学的構造以外にはほとんど基礎的研究がなされていなかった。実際に、ヒト爪の組織学的構造や爪甲の構成成分は古くより研究されているが、爪組織を構成する細胞の生理学的特性や爪甲が整った形で生えるメカニズムについては、これまでほとんど研究がなかった。臨床例で指尖部の組織欠損後に爪床や爪甲の再生が認められた報告が存在する程度であるが、これらに基礎的な裏付けや検討はなされていなかった。過去にヒト爪細胞の単離や培養の報告はわずかに存在するが、ケラチノサイトの細胞学的特性や各種刺激因子との関連の研究も十分でなく、3次元培養の研究も成長の方向性を持たせる足場の開発にはほど遠い段階であった。

2. 研究の目的

ヒト爪組織の研究が積極的になされない原因の一つが、実際のヒト爪組織が入手しにくいという現状がある。しかし我々は幸いにも多指症患者の手術にて実際の月齢の若いヒト爪組織を入手する機会に恵まれており、その「細胞源」の獲得が可能である。近年爪組織と毛包組織の類似性が着目されており、両組織の主成分は硬ケラチンである。これまでの研究により爪の硬ケラチンは爪母ケラチノサイト単体もしくは爪母部位より単離された線維芽細胞と他部位のケラチノサイトの共培養で産生されることが判明している。今回、爪の構造、整った形で生えるメカニズム、細胞生理学的特性を研究し、わずかな組織から得られた細胞を用いて硬ケラチンを有効に産生し、爪を再生することができれば、手足の外科領域で大きな発展ができると考え研究目的に設定した。再生技術を支える要素として、サイトカインなどの「増殖分化因子」および産生に整った方向性を持たせる「足場」の研究が未だ不十分であり、これらの研究を進めることが今後臨床での爪再生に寄与すると思料し、研究を行うことにした。

3. 研究の方法

(1) 爪組織標本からの爪・皮膚ケラチノサイトの分離、培養

研究倫理委員会の承認および家族の同意の下、多指(趾)症患者の初回形成術(月齢0~14ヶ月)の術中に得た余剰指より組織を採取する。爪組織試料より爪甲を除去後に爪母および爪床表面より12/1000inchほどに薄くスライスした分層組織を採取し、その後0.25%Trypsinを用いて37℃で30~60min処置を行う。Trypsin処置後の試料をケラチノサイト専用培養液(KGM)中に浸し、爪母・爪床表面層に存在するケラチノサイトを物理的に擦って培養液中に単離する(爪母由来と爪床由来の混合細胞となる)。濾液を遠心後に細胞を回収し、Ⅰ型コラーゲンでコーティングしたディッシュに播種する(dispersed cell culture)。播種後にKGMを加えて37℃のインキュベーターで培養を行う。以後2日おきに培養液を交換する。継代培養は増殖した細胞がコンフルエントに達する前に行うこととする。

皮膚ケラチノサイトについては同一検体の指腹より採取した皮膚組織を用いて同様の過程を経る。Trypsin処置後は自然剥奪した表皮層を除去後に真皮浅層に存在するケラチノサイトを擦って培養液中に単離する。以下爪と同様の工程を行うこととする。

(2) 細胞培養曲線および各種刺激因子の作用

同一個体から得られたヒト爪ケラチノサイトおよびヒト皮膚ケラチノサイトの4~6継代目を用いて培養曲線を作成する。35mmシャーレを使用し、初期濃度 0.2×10^4 cell/cm²で細胞を播種する。又、専用培養液中に各種刺激因子を以下の濃度で加える。bFGF(1, 10, 100ng/ml)、EGF(1, 10, 100ng/ml)、Vitamin D(5, 50, 500ng/ml)について両ケラチノサイトの増殖の様子を比較する。これらの刺激因子を加えていない培養液をcontrol群とする。

(3) 各種刺激因子が硬ケラチン産生に与える影響およびケラチノサイトの産生因子との関連

前述量の刺激因子を加えた専用培地で爪ケラチノサイトの単層培養を10日間行い、産生される硬ケラチンの量を比較する。硬ケラチンはCK31を用いて免疫染色を行い、その染色写真を画像処置アプリケーションImage Jを用いて硬ケラチンが占有する面積比を算出する。また、爪ケラチノサイトが産生する細胞間基質であるフィブロネクチンおよびラミニンの量をELISA法を用いて測定し、硬ケラチン産生量との関連を調べる。このELISAはDay7~8に使用した培養液を用い

て測定を行う。回収した培養液を遠心にかけて細胞成分を排除し、上澄み液を用いて ELISA を施行する。

4. 研究成果

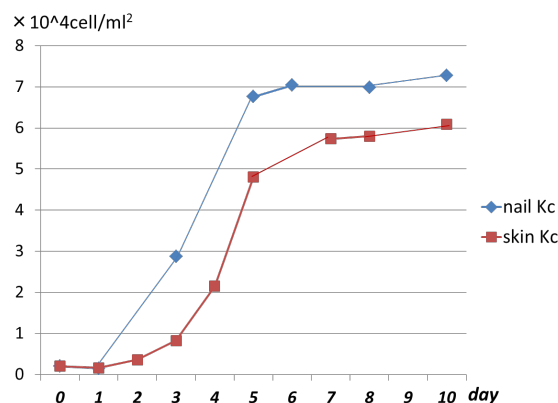
(1)

本研究期間中に患者家族の同意を得て試料の提供を頂いた数は多指症 8 例、多趾症（および多合趾症）8 例の計 16 例であった。

初年度の初期はケラチノサイトの単離に失敗し、有効なケラチノサイトを培養することができなかったが、初年度後半には前述した分離、培養法にて爪ケラチノサイト、皮膚ケラチノサイトの単離を行うことができた。細胞保存液（セルバンカー、バンバンカー）を使用した冷凍保存後も、解凍された細胞は増殖能を維持していた。各ケラチノサイトは継代を進める毎に primary cell から角化傾向を示す細胞の割合が増え始め、6~8 継代ほどで増殖能を失っていった。また、標本からの組織薄切の厚さおよび Trypsin の作用時間により、細胞の増殖能に差が見られ、2~3 継代で増殖能を失う primary cell も多かった。継代に当たっては、confluent になると増殖に抑制がかかるため、60% confluent 程度の継代が望ましい。

(2)

爪ケラチノサイトおよび皮膚ケラチノサイト両細胞は類似した増殖傾向を示し、分裂の活発な細胞においては共に $2 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2$ の細胞濃度範囲で対数増殖期が認められた。以下に同一個体からの 5 継代目の爪ケラチノサイト (nail Kc) 及び皮膚ケラチノサイト (skin Kc) の増殖曲線を示す。

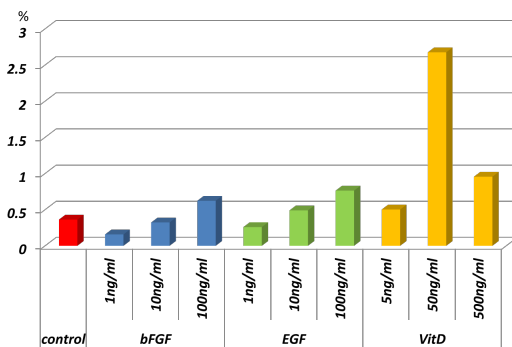


各種刺激因子の作用については、bFGF は 1, 10ng/ml で細胞増殖効果を認めたが、100ng/ml の高濃度では強い増殖効果は認めなかった。一方、EGF はすべての濃度 (1, 10, 100ng/ml) で増殖効果を認めた。しかしながら、bFGF、EGF とともに 100ng/ml の高濃度では

細胞自体を分化・変性させる効果が強く（核と細胞の巨大化、扁平化などを認めた）、正常のケラチノサイトの特性が維持できているのか懸念が残った。Vitamin D は濃度依存性に細胞増殖を抑制した。ケラチノサイトの分化を促さずに増殖のみを促進させるには、1ng/ml より低濃度の bFGF および EGF が適していると考えられた。これら各刺激因子の特徴は、爪ケラチノサイト及び皮膚ケラチノサイトに同様に観察されるものであった。

(3)

各種刺激因子と硬ケラチンの産生量の関係を以下に図に示す（縦軸は画面に対する硬ケラチンの占有率）。



硬ケラチンは分化・角化した細胞での産生を多く認めたため、10 日間といった短い培養期間では、角化が進んだ細胞ほど硬ケラチン産生量が増加する結果となった。よって上記図からは、低濃度の bFGF および EGF は角化を促さずに細胞増殖を純粋に促進することが示され、細胞増殖因子として有効であることが示された。しかしながら高濃度の bFGF、EGF および濃度に関わらず Vitamin D は細胞の角化・分化を促進するため、細胞増殖には適さないと判断された。

フィブロネクチン産生量は EGF 添加培地で著明に増加したが、その他の因子 (bFGF, Vitamin D) では顕著な増加は認めなかった。また、単層培養でのフィブロネクチン産生量と硬ケラチン産生量との間に有意な相関性は認めなかった。又、ラミニンは各因子で特に control 群と比較して産生量に差はなく、こちらも同様に硬ケラチン産生量との相関はないものと判断された。

~ 結語・総評 ~

本研究によりヒト爪ケラチノサイトの特徴と問題点について検討する機会を得ることができた。ヒト爪ケラチノサイトは希少な組織であり、単離培養に成功しても線維芽細胞などと異なり継代数が限られる。細胞曲線や様々な研究を行うには一定数の細胞が必要となるが、それに足り得る細胞数に増やすことがまず難しい。ケラチノサイトは

confluent に達すると細胞増殖に抑制がかかるため、60~70% confluent 程度で継代を行う必要があることも線維芽細胞と異なり細胞の増殖・継代を難しくさせる要因であった。特に多指症ではそれなりの大きさの爪組織が確保できるが、多趾症ではその爪組織は極めて小さい(切除側は多くの場合低形成である)。実験に有用な数の爪ケラチノサイトを増やすまでには継代数を重ねる必要性があり、途中である程度の分化・角化が進んでしまい実験には適さない状態になってしまった。今後、各種刺激因子について更に研究を進め、角化を抑制しつつ増殖を促進する培養法を確立する必要がある。本研究では低用量(5ng/ml 以下)の EGF と bFGF が純粋に細胞増殖を促進させる刺激因子として確認されたが、他の因子についても検討が望まれる。

細胞間基質については EGF の添加によりフィブロネクチン産生が促進された。単層培養では硬ケラチン産生量との関連性を認めなかったが、EGF 添加により 3 次元培養では細胞の重層化を促進し、正常に近い皮膚や爪甲を形成する可能性があると思料された。更に今後爪ケラチノサイトを用いた爪再生を行うには細胞特性の他に 3 次元的に培養の方向性を決める足場の存在が必要であり、今後これらの研究が望まれる。

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)

[学会発表](計 1 件)

宇佐美聡他、ヒト爪ケラチノサイトの細胞学的特性および各種刺激因子の検討～第 1 報～. 第 7 回創傷外科学会, 2015 年 7 月 24 日, 文京区, 東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

宇佐美 聡 (USAMI, Satoshi)
東京医科歯科大学 医学部附属病院
医員
研究者番号: 10635577

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: