

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861498

研究課題名(和文) ヒト真皮由来多能性細胞の創傷治癒への応用

研究課題名(英文) Application to the wound healing of the human skin derived precursor cells

研究代表者

吉川 勝宇 (Yoshikawa, Katsuhiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10583156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト皮膚検体より、浮遊培養にて真皮由来多能性幹細胞(sphere)を採取した。増殖培地を用いて接着培養にて継代増殖させ、ふたたび浮遊培養にて再sphere化し、すべての細胞で神経、骨、脂肪への多分化能が確認され、mRNAで幹細胞マーカーの発現が確認された。液体窒素保存により、真皮由来多能性幹細胞のバンクを作成した。コラーゲンスポンジ上で培養した同細胞のヌードマウスへの移植実験では、皮膚付属器官である脂腺組織への分化傾向がみられ、通常の線維芽細胞と比較すると、より厚い真皮様組織が形成された。

研究成果の概要(英文)：Skin derived precursor cells (sphere) were collected from human skin samples in suspension culture. The cells were passaged and proliferated using growth medium in adherent culture, then turned into re-sphere in suspension culture. The pluripotency of the cells were confirmed by neural, adipogenic and osteogenic differentiation assay. Expression of stem cell markers was confirmed in the mRNA. In the transplantation experiment of the cells that were cultured on collagen sponge to nude mice, the trend of differentiation to the sebaceous gland that are appendages of the skin was observed. When compared to the fibroblasts, thicker dermis-like tissue was formed.

研究分野：皮膚再生

キーワード：真皮幹細胞 SKP 皮膚再生 高齢者

1. 研究開始当初の背景

ヒト皮膚(真皮)には真皮由来幹細胞(以下SKPs = Skin derived precursor cells)という多能性の幹細胞が存在する。皮膚という比較的容易に採取できる組織から採取できるため、より臨床応用に適している。しかし、一般的にそのような前駆細胞は組織中にわずかしか存在せず、また採取後も培養・増殖させることが困難な場合も多い。移植治療実現のためには、治療に必要な細胞数をどのように確保するかという問題がある。そのため、効率的な採取方法、培養増殖方法の検討が必須である。

われわれはこれまでの研究で、ヒト顔面の真皮から他部位の真皮よりも「良質」な多能性細胞をより効率よく採取できることを見出した(Yoshikawa et al. Biochem Biophys Res Commun. 2013;431(1):104-110)。

SKPsは分化の最終段階にある線維芽細胞よりも未分化な細胞であるので、細胞治療に用いることができれば、線維芽細胞よりも、より創傷治癒を促進し、瘢痕を少なく治癒させる可能性がある。現在、表皮細胞や真皮細胞の培養や移植は可能となっているが、皮膚付属器を含めた完全に正常な皮膚を再生することは未だ実現していない。すなわち、毛が生えず、汗や脂の分泌が無く、乾燥しがちで弾力性の乏しい皮膚しか再生できない。毛根や脂腺、汗腺などの皮膚付属器は表皮(外胚葉)と真皮(中胚葉)の相互作用により形成されるとされている。真皮から分離培養されるSKPsは、神経という外胚葉系と、脂肪や骨という中胚葉系の両系統に分化する多能性を持つ。

以上の点から、本プロジェクトでは、SKPsが創傷治癒におよぼす影響、また付属器再生の可能性を探ることを背景に、実際の細胞治療、臨床応用を念頭に、SKPsの分離・培養、細胞の分化能の検討、細胞の効率的増幅方法について検討を行う。

2. 研究の目的

SKPsの効率的増幅方法の検討およびSKPsの創傷治癒への影響、皮膚再生の可能性を探る。

3. 研究の方法

ヒトSKPsの分離・培養

インフォームドコンセントを得た患者を対象とし、手術の際に生じる余剰皮膚を検体として用いた。得られた皮膚検体から脂肪組織を除去し、鋏刀等で細切後、ディスパーゼ(1000U/ml)にて処理し、表皮組織を除去し、真皮組織を1~2mm角に細切後、0.5%コラゲナーゼ溶液で振盪しながら37℃で90分間反応させた。2度の遠沈操作で洗浄後、40µmセルストレイナーにて濾過し、得られた細胞を

sphere形成培地(DMEM/F12に抗生物質、抗真菌剤、EGF、bFGF、B27を添加)を用いて、非接着プレートで浮遊培養を行った。

細胞の増幅

非接着プレートを用いた浮遊培養にて得られたSKPsの細胞塊(sphere)を、接着プレートに移し、増殖培地(DMEM/F12, 10%または20%FBS, 40ng/ml FGF, 20ng/ml EGF)で接着培養を行った。継代増殖させた後に、トリプシン処理、遠心分離にて細胞を回収し、再び非接着プレート、sphere形成培地に戻して、再sphere化した。

増殖細胞の多分化能の確認、PCR

再sphere化により得られたsphereを、間葉系幹細胞用脂肪分化培地(Differentiation Media BulletKits-Adipogenic, CAMBREX)に移し、約3週間、37℃、5%CO₂下で培養して脂肪分化を誘導した。Oil Red O染色にて分化を確認した。またsphereを間葉系幹細胞用骨分化培地(Differentiation Media BulletKits-Osteogenic, CAMBREX)に移し、約3週間、37℃、5%CO₂下で培養して骨分化を誘導し、アルカリフォスファターゼ染色にて分化を確認した。また神経分化培地(NeuroCult NS-A Differentiation Medium, StemCell Technologies)に移し、神経分化を誘導し、tubulin、Nestinの免疫蛍光染色にて分化を確認した。増殖、再sphere化により得られたsphereよりmRNAを採取し、多能性細胞のマーカー遺伝子について、その発現の有無や発現量の差異をPCR, real time PCRで確認した。

脂肪、骨への分化度の定量

脂肪への分化度を測るために中性脂肪の定量を行った。中性脂肪の定量には、Serum Triglyceride Determination Kit (SIGMA)とGlycerol Standard Solution (SIGMA)、Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo)を用いた。骨への分化度を測るためにアルカリフォスファターゼ(ALP)の定量を行った。ALPの定量には、SensoLyte pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit (ANA SPEC)を用いた。上記の方法で増殖、分化させた細胞を用いて、計測した。

動物への移植

SKPsおよび通常の線維芽細胞をコラーゲンスポンジ上で培養し、ヌードマウスの背部への移植実験を行った。経時的に観察し、顕微鏡を用いた組織観察により組織の性状を検討した。

4. 研究成果

ヒト皮膚検体より、浮遊培養にて真皮由来多能性幹細胞(sphere)を採取した(図1)。増殖培地を用いて接着培養にて継代増殖させた(図2)、ふたたび浮遊培養にて再sphere化した(図3)、すべての細胞で神経、骨、脂肪へ

の多分化能が確認され、mRNA で幹細胞マーカーの発現が確認された。液体窒素保存により、真皮由来多能性幹細胞のバンクを作成した。老人性眼瞼下垂手術時に切除した眼瞼皮膚組織より sphere を作成した。増殖培地にて接着培養を行い増殖させた。10%FBS, 20%FBS のいずれの条件下でもすみやかに増殖し、20%FBS 添加培地の方がより効率よく増殖した。増殖した細胞を再 sphere 化し、細胞を回収し PCR 実験を行ったところ、真皮幹細胞マーカーの発現は確認できた。再 sphere 化した細胞を脂肪分化培地、骨分化培地に移し分化を誘導したところ、oil red O 染色、ALP 染色にてそれぞれの分化が確認できた。しかし、中性脂肪と ALP の定量実験においては、脂肪分化、骨分化ともに分化効率が悪かった (図 4、5)。

SKPs をコラーゲンスポンジ上で培養し (B27 添加 DMEM/F12, 10%FBS, 20ng/ml EGF, 40ng/ml FGF) ノードマウスの背部への移植を行うと、SKPs は皮膚付属器官である脂腺組織への分化傾向がみられ、通常の線維芽細胞と比較すると、より厚い真皮様組織が形成された。

SKPs は増殖させても多能性を保っており、臨床応用に必要な細胞数の確保は可能である。また皮膚付属器官の 1 つである脂腺組織への分化傾向を示しており、付属器をとまなう皮膚の再生の可能性が示唆された。

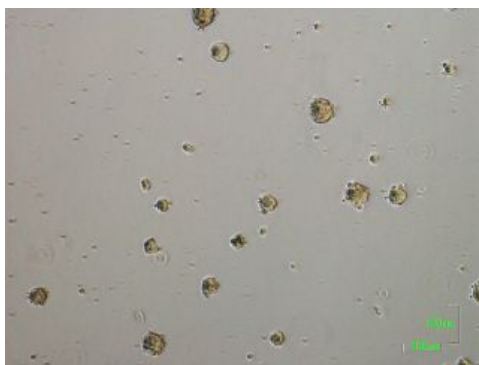


図 1
浮遊培養にて分離培養したヒト真皮由来多能性細胞



図 2
増殖培地により接着培養中の SKPs

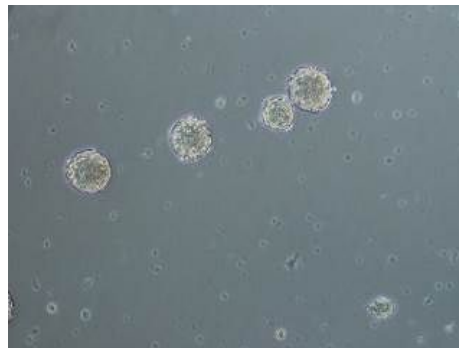


図 3
増殖後に再 sphere 化した SKPs

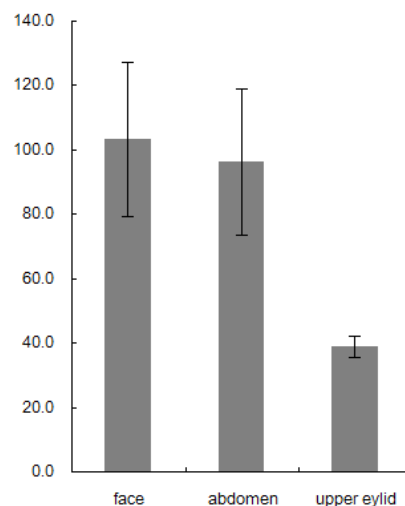


図 4
トリグリセリド測定結果

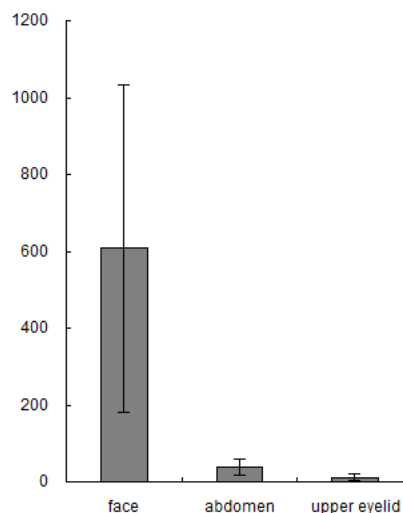


図 5
アルカリフォスファターゼ測定結果

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)

[雑誌論文](計 1件)
M murata, K Yoshikawa, M Hiratsuka, S Suzuki
A case of extensive sacral decubitus ulcer complicated by an epidural abscess
PRS global open 2016/4/20 accepted

[学会発表](計 4件)
吉川勝宇、上田真帆、中村陽子、齊藤晋、益岡弘、山脇聖子、内藤素子、河合勝也、鈴木茂彦
当科における胸腔胸壁再建術について
第57回日本形成外科学会総会・学術集会
2014/4/9~4/11 長崎

吉川勝宇
オンコプラスティックサージャリーについて(招待講演)
第20回日本乳癌コンセンサス会議
2014/6/28 京都

吉川勝宇、江野尻竜樹、山脇聖子、鈴木茂彦
当院でのDIEP-flapによる乳房再建の実際
第41回日本マイクロサージャリー学会学術集会
2014/12/4~12/5 京都

吉川勝宇、江野尻竜樹、坂本道治、齊藤晋、河合勝也、鈴木茂彦
術前にNPWTを併用する褥瘡手術
第21回日本形成外科手術手技学会
2016/2/13 大宮

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
吉川勝宇(YOSHIKAWA, Katsuhiro)
京都大学・大学院・医学研究科・助教
研究者番号： 10583156

(2)研究分担者

(3)連携研究者