

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11542

研究課題名（和文）三次元培養皮膚におけるエクリン汗腺の再現

研究課題名（英文）Reproduction of eccrine sweat glands in three-dimensional cultured skin

研究代表者

亀田 健治（KAMEDA, Kenji）

愛媛大学・医学系研究科・研究員

研究者番号：60363264

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：正常ヒト組織より採取された皮膚組織から、エクリン汗腺由来細胞をそれぞれ回収することに成功した。これらエクリン汗腺由来細胞により、マトリジェル内での真皮内導管へ分化誘導を試みた。細胞はやや増殖傾向を呈し、一部で未熟な管腔構造を形成したかとも思われたが、最終的には期待されたような分化増殖誘導には至らなかった。しかし、分離したエクリン汗腺の一部は、せん断された真皮内汗管組織が延長することが確認された。既報の三次元培養において、組織の回収に至ることができないことが明らかになった。

エクリン汗由来細胞に単離する以前に、細切された真皮内汗管が再生する仕組みを明らかにすることが急務であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚再生医療を推進する目的のために三次元培養皮膚の作製法を改良した。今後マウスに代わる代替え実験モデルとして、より正常皮膚に近いモデルの確立を目指すことは非常に重要な課題である。今回我々は、エクリン汗腺の構造を有する三次元培養皮膚の新規作成方法の開発を目指すため、この研究を立案した。既存の培養法を使用して三次元培養皮膚を作製するのみならず、将来の基礎研究及び臨床応用に十分に貢献できる品質の三次元培養皮膚モデルの作製を目指すものである。この研究成果を広く国内国外へ発信することにより、基礎研究のみならず臨床現場で幅広く多数の皮膚疾患患者への臨床応用へ発展されていくことを切望する。

研究成果の概要（英文）： We succeeded in recovering eccrine sweat gland-derived cells from skin tissue collected from normal human tissue. Using these eccrine sweat gland-derived cells, we attempted to induce differentiation into intradermal ducts in Matrigel. The cells showed a tendency to proliferate slightly, and some of them seemed form immature luminal structures. However, some of the isolated eccrine sweat glands were confirmed to have elongated sheared intradermal sweat duct tissues. It became clear that it was not possible to recover the tissue in the previously reported three-dimensional culture.

Prior to isolating eccrine sweat-derived cells, it turned out that there is an urgent need to clarify the mechanism of regeneration of the cut intradermal sweat ducts.

研究分野：分子生物学

キーワード：再生医療 エクリン汗腺 三次元培養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は過去 15 年以上にわたり表皮角化細胞の生物学、培養方法などについて研究を行ってきた。その結果、表皮角化細胞の無血清培養法を確立し、動物由来材料を用いない培養法を開発することに成功した。さらにこの培養法を用いた培養表皮シートを作製、実際に臨床応用を行い良好な成績を示すことに成功している。しかしながら、培養表皮シートは組織学的検索の結果、(1) 角層を有しない、(2) 基底膜の構成成分をほとんど有しない、(3) 付属器の形成を認めないことが明らかとなり、培養表皮シートは創傷治癒促進の効果は優れているが、生着性に問題があることが明らかとなった。表皮の主たる機能は角化であり、正常角層を作ることが皮膚角化細胞の最終目的である。角層を有する培養皮膚として三次元培養皮膚が開発されているが、臨床応用は予想外に遅れている。この原因としては、(1) その作製方法が複雑であること、(2) 大量作製が困難であることなどが挙げられる。我々は、この点を改良すべく表皮細胞と羊膜を応用することにより、簡便かつ大量に三次元培養皮膚が作製可能な方法を開発した (*J Dermatol Sci* 2009)。三次元培養皮膚では真皮に相当する部分にコラーゲンを多用することが多いが、コラーゲンを使用しなければならないために、作製過程が複雑にならざるを得ない。そこで、我々は真皮成分に相当する材料として羊膜に着目し、簡便な三次元培養皮膚の作製方法を考案し、報告した。しかしながらこの手法では当然ながら付属器を再現することは不可能である。

今や三次元培養皮膚の製作手技はある程度の確立を認め、すでに商業ベースからの入手も可能となった。しかしながら現時点で、付属器を含有する正常皮膚を模倣するような三次元培養皮膚を確立した施設は見受けられない。今後マウスに代わる代替実験モデルとして、より正常皮膚に近いモデルの確立を目指すことは非常に重要な課題である。今回我々は、エクリン汗腺の構造を有する三次元培養皮膚の新規作成方法の開発を目指すため、この研究を立案した。

2. 研究の目的

エクリン汗腺培養細胞 (NCL-SG3, Lee, CM: *J Cell Sci.* 1989) は共同研究者の Prof B. Harvey, RCSI, IRELAND より供与を受けており、この細胞の継代及び維持を行うことはすでに可能となっている。さらに臨床検体からのエクリン汗腺細胞 (真皮内導管細胞・腺房細胞) の分離・培養についても、すでに既報の分離・培養方法が報告されている。(Biedermann T et al., *J Invest Dermatol* 2010)。最終的な目標は真皮内腺房から表皮・角層内汗管まで一連の組織構築ではあるが、今回の研究期間内での主たる目標は表皮内での表皮内汗管の構築を試みることにする。二次元培養系において NCL-SG3 細胞による汗管 (導管) 構造への分化誘導を試みる。最適の増殖培養環境について培養液や添加因子、さらには培養条件を検討し、その培養法を確立する。具体的には継代操作による細胞増殖能の検討、培養上清中に分泌されるサイトカイン、細胞成長因子の測定、サイトカイン、細胞成長因子刺激時の遺伝子発現などを指標とする。この結果を踏まえて臨床検体より得られたエクリン汗腺細胞を用いた同様の検討を行い、二次元培養系における汗管構造の構築を試みる。

二次元培養系での汗管構造の構築に成功したのち、LSE 内 (表皮内) での汗管構造構築を試みる。この時に NCL-SG3 細胞及びエクリン汗腺細胞 (真皮内導管細胞・腺房細胞) を用いて、I 型コラーゲン内包埋培養を行い、これを LSE 内に挿入し腺管形成の誘導を試みる。

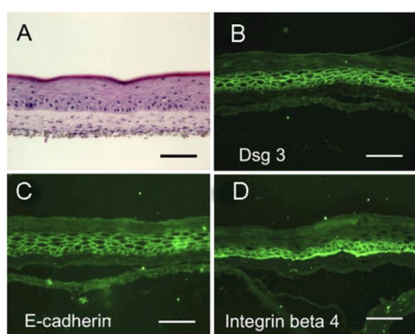
3. 研究の方法

エクリン汗腺由来細胞（NCL-SG3 細胞、臨床材料より分離した真皮内汗管細胞・腺房細胞）が幹細胞としての増殖能力を有しているかについて明らかにする。また、角化細胞、脂肪細胞、骨分化誘導培地などに変更し、多分化能を有するかについて検討する。分離培養された真皮内汗管細胞・腺房細胞を長期間培養し、その培養条件を適切な時期に変更し、さらに細胞成長因子などを添加する方法や、conditioned medium を用いる方法、さらには角化細胞あるいは線維芽細胞との共培養の系を用いることで表皮内汗管、真皮内汗管へ分化誘導する系を確立する。これら汗腺細胞と I 型コラーゲンをを用いて真皮成分の再構築を行い、真皮内で汗管・腺房への分化を誘導できるか検討する。作成された培養皮膚が正常皮膚とどの程度近似しているかについては形態学的、免疫組織学的に確認する。

4. 研究成果

正常ヒト組織より採取された皮膚組織から、エクリン汗腺由来細胞をそれぞれ回収することに成功した。

その後、これらエクリン汗腺由来細胞により、マトリジェル内での真皮内導管へ分化誘導を試みた。細胞は集塊を形成してやや増殖傾向を呈し、一部で未熟な管腔構造を形成したかとも思われたが、最終的には期待されたような分化増殖誘導には至らなかった。これと並行して行ったエ



作製されたLSE:

A: HE染色、羊膜上に形成された基底細胞層、有棘細胞、顆粒層、角層を認める。

B-D: 蛍光染色、細胞間橋の形成はE-cadherin(C)及び

Desmoglein 3(B)により、hemidesmosomeの形成は

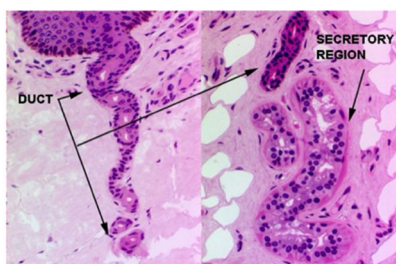
integrin β4 (D)により示された。

Bars: 50 μm

クリン汗腺由来組織の包埋培養 Base gel と upper gel の間に汗腺コロニーを挟み込み、その上から overlay medium を注ぎ、37 °C・5%CO₂ incubator 内で培養を行う)においても

ほぼ同様の結果となった。分離したエクリン汗腺の一部はそのまま organ culture を行い、せん断された真皮内汗管組織が延長することが確認された。これらを得られた構造は顕微鏡下で観察し、免疫染色にて免疫染色にて基底膜構成成分のマーカー (laminin 5, type IV collagen, type VII collagen, integrin)、細胞間接着因子のマーカー (E-cadherin, desmoglein 1, 3)、細胞骨格のマーカー (keratin 5, 14, 10)、分化マーカー (involucrin, loricrin, transglutaminase)、汗腺マーカー (CEA, GDCFP-15) などの発現検討を行ったが、特異的な発現結果を得られなかった。

既報のマトリジェルなどを用いた三次元培養において、報告されたような汗腺構造を呈する組織の回収に至ることができないことが明らかとなり、改めて分化誘導に関する手法の検討が必要となった。Organ culture にて組織が維持ならびに軽度増殖することが明らかとなったので、エクリン汗由来細胞に単離する以前に、細切された真皮内汗管が再生する仕組みを明らかにすることが急務であることが判明した。



エクリン汗腺組織図: 表皮内、真皮内汗管 (導管) 及び真皮内の腺房より構成される

今後、エクリン汗由来細胞を再現性良く単離できる、培養条件、分化誘導条件等を再検討し、また、将来の基礎研究及び臨床応用に十分に貢献できる品質の三次元培養皮膚モデルの作製を目指したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Muto Jun, Fukuda Shinji, Watanabe Kenji, Dai Xiuju, Tsuda Teruko, Kiyoi Takeshi, Kameda Kenji, Kawakami Ryosuke, Mori Hideki, Shiraishi Ken, Murakami Masamoto, Imamura Takeshi, Higashiyama Shigeki, Fujisawa Yasuhiro, Mizukami Yoichi, Sayama Koji	4. 巻 6
2. 論文標題 Highly concentrated trehalose induces prohealing senescence-like state in fibroblasts via CDKN1A/p21	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-04408-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hieda Miki, Matsumoto Taizo, Isobe Mari, Kurono Sadamu, Yuka Kaneko, Kametaka Satoshi, Wang Jing-Ya, Chi Ya-Hui, Kameda Kenji, Kimura Hiroshi, Matsuura Nariaki, Matsuura Shuji	4. 巻 11
2. 論文標題 The SUN2-nesprin-2 LINC complex and KIF20A function in the Golgi dispersal	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5358-5370
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-84750-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taguchi S, Choudhury ME, Miyanishi K, Nakanishi Y, Kameda K, Abe N, Yano H, Yorozuya T, Tanaka J.	4. 巻 22;7
2. 論文標題 Aggravating effects of treadmill exercises during the early-onset period in a rat traumatic brain injury model: When should rehabilitation exercises be initiated?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IBRO Rep.	6. 最初と最後の頁 82-89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ibror.2019.10.002. eCollection 2019 Dec.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masamoto Murakami, Jun Muto, Kenji Kameda, Hideki Mori, Ryo Utsunomiya, Ken Shiraishi, and Koji Sayama
2. 発表標題 The histological pustulovesicle-like feature of pomphlyx: The specific component different from palmoplantar pustulosis.
3. 学会等名 ESDR2019 Bordeaux, France 18-21 September (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	村上 正基 (Murakami Masamoto) (20278302)	愛媛大学・医学系研究科・特任教授 (16301)	
研究 分担者	森 秀樹 (Mori Hideki) (60325389)	愛媛大学・医学系研究科・講師 (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------