

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：16301
研究種目：奨励研究
研究期間：2020～2020
課題番号：20H01102
研究課題名 表皮幹細胞オルガノイドの長期培養への試み

研究代表者

津田 照子 (TSUDA, Teruko)

愛媛大学・医学部・技術専門職員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 480,000円

研究成果の概要：初代表皮角化細胞から単離した表皮幹細胞を用いて長期間培養可能なスフェロイド三次元組織を構築することを目指した。1)凍結保存細胞と未凍結保存細胞内に表皮幹細胞マーカーならびにCD34陽性細胞の存在を確認後、単離することに成功した。2)既報の低接着細胞plateを用いて、スフェロイド形成の至適条件を検証し、小型のスフェロイドの形成がみられた。3)スフェロイド形成後、病理標本作製を行い、免疫組織学的に細胞の分化、機能マーカーの発現を検討したが、十分に発現が観察されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本法は既報報告に代わる新規三次元表皮細胞培養法として期待されるが、現時点では、単離及びスフェロイド形成までに成功したものの、スフェロイド形成はやや未熟であり、期待される機能性が十分に担保されたモデル形成までには至らなかった。スフェロイド形成環境などの再検討・追加検討に重点を置いて、分化・機能を有するスフェロイド形成を目指した研究を継続する予定である。

研究分野：再生医療

キーワード：三次元培養

1. 研究の目的

従来、表皮の再生において、表皮基底細胞が前駆細胞としてその主たる役割を担うと目されてきたが、近年、少なくとも毛包上皮内には多能性幹細胞が分布することが明らかにされてきた。これら幹細胞は、生理的環境下においては各々の分布部位での再生を担っているが、皮膚創傷治癒過程におけるこれらの細胞の機能分化が注目される。本研究では、ヒト表皮幹細胞の長期培養可能なスフェロイド三次元組織を構築し、これらの幹細胞の多機能分化の形態定量的評価モデルを確立することを目的とした。

2. 研究成果

多指症患者などの手術後に廃棄される皮膚組織から採取した初代表皮細胞を用いて以下の実験を行なった。

(1) 表皮幹細胞の解析と分離方法の検討：凍結保存細胞と未凍結保存細胞における表皮幹細胞の解析と単離を行った。

単層培養法での幹細胞マーカータンパクの発現：

ヒト皮膚の免疫染色でその存在が確認されている幹細胞マーカー中、初代表皮細胞のタンパクを用いたウエスタンブロットにて、nestin、GPNMB、Nanog、Oct3/4、Sox2 の存在を認めた。

CD34、GPNMB の存在：

正常皮膚と従来の平板三次元培養皮膚、ケラチノサイトの培養細胞を免疫染色し、その存在を認めた。

SCA-1 陽性細胞の有無：

ケラチノサイトの培養細胞の免疫染色では、SCA-1 陽性細胞は検出されなかった。

PluriBead を用いた表皮幹細胞の単離：

CD34 陽性細胞を PluriBead (pluriSelect Life Science UG & Co.KG) で単離、単層培養とマトリゲル培養を行い、細胞形態変化を観察した。さらに、従来の平板三次元培養皮膚のゲルの上に播いて気液界面培養し、7 日目のパラフィンブロックを作成して HE 染色した。より少ない細胞数でも同等の表皮層を形成できる可能性があることがわかった。

(2) マトリゲル培養方法の検討：既報の低接着細胞plate (Greiner) を用いて、培地にマウス表皮幹細胞の長期培養に有効であった成長因子¹を添加し、スフェロイド形成の至適条件を検証した。

スフェロイド三次元培養方法の検討：

マウス表皮幹細胞を長期間スフェロイド培養した報告²を参考に作成した DMEM/F12 培地と従来の MCDB 培地を用いて、ヒトケラチノサイトをそれぞれ単層培養用 Type collagen coating dish と低接着細胞 plate (Greiner) に播いて、培地による細胞形態変化を観察した。単層培養においても低接着細胞 plate においても DMEM/F12 培地の方がスフェロイド形成しやすいことが判明した。

継代方法の検討：

報告²を参考に上記スフェロイドを 3、4 日おきに培地交換し、7 日おきに 1:4 の比率で継代した。継代時にはトリプシンに代えて、Accutase を用い、37 恒温槽で震盪しながらスフェロイド細胞を 10 分間分散させ、上清を回収後、再び播いたが、細胞数が大幅に減少した。10 分間という酵素反応により細胞が障害される可能性から、より少ない時間でも確実にスフェロイドを分散させられるよう、37 恒温槽での震盪方法の改良、他の細胞剥離液での分散等、今後再度検討を行う。

(3) スフェロイドにおける分化細胞の解析：スフェロイド形成後の増殖を確認後、標本作製し、多断面における細胞の分化、機能マーカー(各種ケラチン(K5, K14, K1, K10, K15), ABCG2, involucrin, loricrin, TGase1)を免疫染色し、細胞の分化度を定量したが、スフェロイドの継代の再現性が乏しく、今後、継代方法を改良し、引き続きスフェロイドにおける分化細胞の解析を行う予定である。

¹ Noggin (5%), R-spondin 1 (5%), Forskolin (10 ng/mL), acidic FGF1 (100 µg/mL)

² Kim E. Boonekamp, et al. PNAS, 2019

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
----	--------