

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11545

研究課題名(和文) 癬痕環境下における表皮角化幹細胞動態解析と創傷発生メカニズムの検討

研究課題名(英文) Behavior of keratinocyte stem cells on the dermal scar and epidermal regeneration

研究代表者

松崎 恭一 (MATSUZAKI, KYOICHI)

国際医療福祉大学・医学部・主任教授

研究者番号：20278013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：1) 癬痕組織とヒト正常表皮角化細胞、2) コントロールとして健常皮膚の真皮とヒト正常表皮角化細胞をそれぞれ組みわせて作製した3次元皮膚モデルを用いて、表皮恒常性維持にかかわる表皮角化幹細胞に癬痕組織がどのような影響を与えるかを解析した。癬痕組織においても健常真皮と同様に多層構造を持つ表皮が再生されたことから、癬痕組織が表皮角化幹細胞へ及ぼす影響は明らかにできなかった。しかし本研究で用いた真皮は、冷凍保存操作によって細胞成分の活性が消失していることから、報告されている癬痕組織へ移植した培養表皮シートの分化遅延に関して、癬痕組織中の細胞成分が表皮角化幹細胞に影響を与えている可能性は否定できない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

表皮と真皮のinteractionは皮膚の恒常性維持において重要であることが知られている。しかし表皮細胞と癬痕のinteractionに関する知見は十分に得られていない。多くの人的資源や医療費を投入して難治性創傷が治癒しても、皮膚の恒常性に障害があると創傷を再発する危険性は高くなる。表皮角化幹細胞の動態解析は、創傷再発の危険度を察知して予防につなげる効果だけでなく、癬痕やケロイド治療への応用、表皮細胞に適した人工真皮開発のためのブレークスルーに成り得ることも大きな意義と考える

研究成果の概要(英文)：Transplantation of cultured epidermal autografts (CEAs) has been applied to the treatment of burned patients. It has been reported that the expression of epidermal differentiation markers delays if the CEAs are transplanted onto the dermis in the scar. As the epidermis is maintained by epidermal keratinocyte stem cells, we examined whether the scar dermal tissue affects the behavior of keratinocyte stem cells. We have established the 3D-skin model by the combination of frozen dermal tissues and cultured epidermal keratinocytes, and could not find any structural difference in that regenerated epidermis on the scar dermal tissue compared with that on the normal dermal tissue. This study suggests that cells within the scar tissue affect keratinocyte stem cells and epidermal regeneration when CEAs are transplanted onto the scar tissue.

研究分野：創傷治癒

キーワード：糖尿病 表皮角化細胞 幹細胞 培養表皮 創傷

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

これまで行われてきたケロイド研究の多くは、表皮角化細胞の病態に焦点があてられており、増殖能のマーカであるKi67、keratins 6/16/17、分化のマーカであるkeratin 10、involucrin、loricrin、filaggrin、SPRR2、SKALPを用いた研究では、表皮の肥厚や分化の異常が指摘されている1)。研究代表者らは、熱傷瘢痕の表層を剥削した創面に移植した培養表皮角化細胞のfilaggrin、transglutaminase、cytokeratin 6、involucrinの発現を経時的に検討した。その結果、瘢痕組織に培養表皮細胞を移植すると、正常真皮への移植に比べて表皮細胞の分化マーカの発現が遅れることを明らかにした2)。

表皮の基底層に存在する表皮角化幹細胞は、分裂の際に角化細胞を供給することで、表皮の恒常性を維持する。ホロクロンと呼ばれる表皮角化幹細胞は、分化能を維持したうえで高い増殖活性を示す。ホロクロンを培養して継代するとクロナル・コンバージョンが生じ、増殖活性は低下してパラクロンと呼ばれるTransient amplifying細胞になる。細胞培養によるクロナル・コンバージョンは継代操作だけでなく不適当な培養条件に伴うストレスや細胞を取り巻く微小環境(niche)の変化によっても生じる3)。それ故、瘢痕組織の表皮角化幹細胞は、正常組織での環境と異なることが予想されるにもかかわらず、これまでクロナル・コンバージョンの視点で検討された報告はない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、創傷再発の危険性を幹細胞動態の視点で解析することである。創傷の再発には外因性障害と細胞・分子レベルの内因性障害が複雑に関与する。創傷再発危険度の解明には組織単位での変化を追及する研究は重要だが、細胞レベルでの変化を丁寧に解明し、関連細胞における研究成果を積み上げることも不可欠である。表皮と真皮のinteractionは皮膚の恒常性維持において重要である。しかし、表皮細胞と瘢痕のinteractionは、十分に解明されていない。多くの人的資源や医療費を投入して難治性創傷が治癒しても、皮膚の恒常性に障害があると創傷を再発する危険性が高くなる。表皮角化幹細胞の動態解析は創傷再発の危険度を察知して予防につなげる効果だけでなく、瘢痕やケロイドの治療への応用、表皮細胞に適した人工真皮開発のためのブレークスルーとして期待できる。

## 3. 研究の方法

### (1) 瘢痕組織および健常組織の取得

倫理委員会承認のもと研究を遂行した。瘢痕を切除後そのまま縫合すると、縫合部両端に“皮膚のより”が生じる。そのため瘢痕だけでなく、“より”の部位の健常皮膚も含めて紡錘形に切除する。研究の対象は、このような瘢痕切除手術で採取された組織である。

## (2) 冷凍組織を利用した3次元皮膚モデルの構築

患者から採取した癒痕および健常皮膚を、-80 のディープフリーザーで保存し、細胞活性を消失させた。その後、解凍し、ディスペーゼによって表皮を剥離した後、真皮組織をコラーゲンゲルで固定した。さらにコラーゲンゲルに固定された癒痕または健常真皮の表皮側表面にヒト新生児由来の表皮角化細胞を播種し培養した後、気相・液相界面で培養することによって角層を持った3次元皮膚モデルを作製した。

## (3) 組織化学的解析

患者から得られた組織および培養組織をホルマリンで固定した後、パラフィンに包埋、薄切後、ヘマトキシリン・エオシン染色を行った。

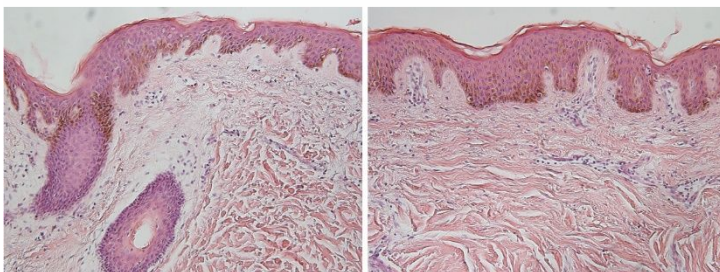
## 4. 研究成果

### (1) 癒痕組織の構造

癒痕組織を5例、健常皮膚を4例で採取した。表皮においては、基底層、有棘層、顆粒層、角層の構造に大きな相違は見られなかった。一方、癒痕部の真皮組織では、太く発達した膠原線維が観察された。また、真皮線維芽細胞の密度が低下していた(下図)。

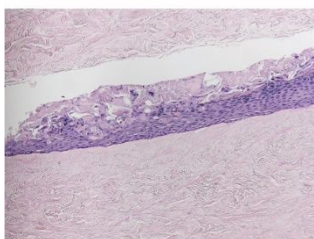
健常部

癒痕部

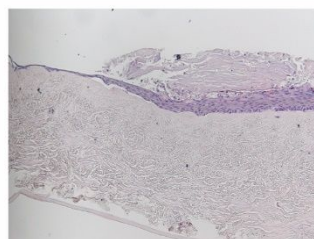


### (2) 冷凍組織を用いた3次元皮膚モデルによる癒痕組織の表皮再生への影響

冷凍保存した組織を解凍後、ディスペーゼで表皮を剥離した部位に新生児由来表皮角化細胞を播種して、3次元皮膚モデルを作製した。まず、健常部真皮を用いて実験を行ったところ、角化細胞は真皮組織に接着し、その後、角層を持った表皮が再生されることを確認した(下図左)。次いで癒痕組織を用いて実験を行ったところ、同様に角化細胞は癒痕に接着し、表皮を再生することが認められた(下図右)。



新生児由来  
培養表皮角化細胞  
+  
健常部由来  
真皮組織



新生児由来  
培養表皮角化細胞  
+  
癒痕部由来  
真皮組織

今回の検討では、3次元皮膚モデルの部位によって再生表皮の重層化にバラつきが見られたこと、実験に使用した例数が少ないことから、明確な結論を得ることは難しいが、瘢痕組織が表皮角化幹細胞に大きな影響を及ぼす結果は得られなかった。一方臨床的には、培養表皮シートを瘢痕組織に移植すると、正常真皮への移植とは異なる分化の動態がみられる 2)。本研究で用いた組織の細胞成分は、冷凍操作によって活性が消失している。それ故、瘢痕部の細胞成分が表皮角化幹細胞に何らかの影響を与えている可能性は否定できない。今後の更なる研究が必要である。

#### <引用文献>

- 1) Limandjaja GC et al. Increased epidermal thickness and abnormal epidermal differentiation in keloid scars. *Br J Dermatol.* 176:116-126, 2017.
- 2) Kadoya et al. Changes in the expression of epidermal differentiation markers at sites where cultured epithelial autografts were transplanted onto wounds from burn scar excision. *Int Wound J.* 13: 412-17, 2016.
- 3) Barrandon et al. Capturing epidermal stemness for regenerative medicine. *Semin Cell Dev Biol.* 23: 937-44, 2012.

5. 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〕

-

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	難波 大輔  (Nanba Daisuke)  (10380255)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授    (12602)	

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