

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19390455

研究課題名（和文）皮膚を完全に再生しうるヒト体性細胞の分離

研究課題名（英文）Sorting of cells that have the ability to regenerate complete skin

研究代表者

貴志 和生（KISHI KAZUO）

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：40224919

研究成果の概要（和文）：様々な発生段階のマウス皮膚から真皮細胞と筋膜細胞を採取し表皮細胞と混合移植を行い、その際の再生細胞の局在、全細胞に対する割合を免疫染色で確認し、scid mouse 背部皮膚全層欠損創への表皮真皮混合移植モデルを用いて皮膚再生能の相関性を調べた。その結果、胎仔の真皮細胞に相当する細胞は減少したが、成獣においても存在した。週令数が増加するとともに scid mouse 皮膚全層欠損創への混合移植による皮膚付属器の再生率は減少した。ヒトでも同様の細胞は存在した。

研究成果の概要（英文）：Murine fetal dermal cells have the ability to regenerate complete skin when co-transplanted with fetal epidermal cells. This potential of regenerative ability disappear after they grew up. The ability to regenerate skin can be substituted using skin derived precursors (skps). As such, some cells, remain in the adult tissue and may possess the ability to regeneration. In order to identify and sorting cells that have the ability to regenerate skin, we used MACS using various cell surface markers which expressed rich in fetal dermal cells but not fascial cells. By co-transplanting cells of these cells with fetal epidermal cells, partial regeneration of skin including hair could be observed, but the population was low. Some damage to the cells during separation of the low population of the cells were thought to be a cause.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2008年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：皮膚；再生；付属器；細胞

1. 研究開始当初の背景

熱傷や外傷の跡の瘢痕に悩む患者は多い。しかしいかに形成外科的手技を駆使しても、真皮全層に生じた瘢痕を完全に正常な皮膚に戻す方法は現在のところ存在しない。瘢痕を跡形なく治す、または皮膚付属器を含めた完全に正常な皮膚を再生する方法を見つけられれば、これら瘢痕で悩む患者には非常な救いになる。一方で哺乳類でもある発生段階までの胎仔は、皮膚に傷をつけても完全な再生が起こる。この皮膚の再生は、われわれのそれまでの研究から、下記の2点を特徴とした。

1) 皮溝、皮丘のパターンを含めた完全な再生はマウスでは胎生13日と14日の間で切り替わる。

2) 胎仔の真皮の間葉系細胞が、胎仔の皮膚再生の中心的な役割を果たしている、マウス胎仔の真皮細胞は成獣の環境下でも皮膚を再生する能力がある。

これらの結果から成獣で傷を付けても瘢痕を残すことなく、完全に皮膚を再生させる方法として2通りの方向性が考えられた。ひとつは1)を基に皮膚が再生する時期と再生しなくなる時期の創傷治癒を比較して、そこで発現している遺伝子を比較し、遺伝子導入あるいは蛋白投与を行うことで、瘢痕を少なく治癒させる方向性である。もう一方は2)を基に胎仔期の皮膚再生の中心的な役割を果たしている細胞を同定し、これに近い細胞を成獣から分離し移植する方法である。

われわれは、後者に着目し、マウス胎仔から、真皮の細胞と皮膚肉様筋下の筋膜細胞を顕微鏡下に採取し、RNAを抽出し、Genechip^Rを用いて2者の発現遺伝子の網羅的解析を行った。その結果、膜表面タンパクに関しては、132個の遺伝子が2倍以上の違いを持って有意に上昇しているこ

とが判明した。この結果に基づいて、皮膚を再生させうる細胞の検索を行った。

2. 研究の目的

本研究は、われわれの従来のマウス胎仔皮膚再生の研究から得られた皮膚再生のメカニズムの知見に基づいて、成獣の皮膚を瘢痕を残すことなく完全再生させる細胞を分離することを目標とした。

すなわち、これまでの研究でマウスでは胎仔の真皮細胞を用いることで成獣の環境下でも皮膚を再生させることは可能であったので、胎仔真皮組織の中で皮膚を再生させる細胞を、さらに発現している膜表面マーカーを基に絞り込むことと、ヒトで皮膚を再生しうる細胞の分離を行うことを目的とした。

具体的には、この膜表面マーカーをもとに胎仔皮膚よりFACSを用いて細胞のsortingを行い、この細胞群のうちどの膜表面マーカーの組み合わせが皮膚再生能を有するかをin vivoのscid mouse背部皮膚全層欠損創モデルを用いて確認することを目的とした。

さらに皮膚を再生させる細胞の膜表面マーカーを、各時期のマウス皮膚の中の皮膚を再生させる細胞の局在を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

マウス胎仔真皮と筋膜細胞を採取し、Genechipによりその差異を比較した。これらをマーカーとしてScid mouse背部皮膚全層欠損創で皮膚を再生させうる細胞を、皮膚全層から採取した様々な細胞の中からFACSでsortingできることを確認した。

C57bl/6Jマウス胎生17日の深筋膜より浅層の組織を顕微鏡下に採取した。コラゲナーゼ処理により細胞を浮遊させ、FACSを用いて皮膚細胞のsortingを行った。このうち上記細胞マーカーを有する細胞のうち、どの組み

合わせの細胞群が皮膚再生能を有するかを *in vivo* で検討した。組み合わせを検討する際には、まず上記膜表面マーカーをおのおの単独で使用して細胞を分離し、発現している細胞と発現していない細胞の2群で *scid mouse* 背部皮膚全層欠損創で、マウス表皮細胞と混合移植し、皮膚を再生させるか否かを検討した。全層皮膚をコラゲナーゼ処理で細胞を浮遊させた後、CD マーカーとして確立しているフローサイトメトリー用の抗体を中心に、すべて陽性の細胞を分離し、直後に *scid mouse* 皮膚全層欠損創に移植した。

移植後4週で移植組織を採取し、その形態を観察した。

その後、胎生17日以降、新生児、出生後1週、2週、4週、8週のマウス皮膚から同様に真皮細胞と筋膜細胞を採取し表皮細胞と混合移植を行い、その際の再生細胞の局在、全細胞に対する割合を免疫染色で確認するとともに、皮膚再生能の相関性を調べた。

さまざまな部位からヒト皮膚病理検体から、マウスで認められた再生細胞の局在を免疫染色で調べた。また、RIKEN からヒト線維芽細胞を購入し、FACS を用いて細胞分離、免疫不全マウスへの移植を行い、同細胞群が *scid mouse* 背部皮膚全層欠損創で皮膚の再生能を有しているか否かを検討した。

4. 研究成果

これまでのわれわれのマウス胎仔皮膚再生能の研究で判明した、皮膚再生能を有する胎仔真皮間葉細胞で強く発現し、逆に癒痕を形成する筋膜間葉細胞で発現が弱かった遺伝子で、遺伝子産物が膜表面に存在する遺伝子は

CD9, CD29, CD49f, CD103, CD103, CD117, CD138, CD168, Igsf4a, Ephb6, Igsf4a, Ptch2,

Efnb2, Fzd6,

Efna5, Sema5a, Cdn1, Sdc4, Jag2, Sema6a, Axin1

, Vcl であった。

マウスで皮膚再生能を有する胎仔真皮間葉細胞で強く発現し、逆に癒痕を形成する筋膜間葉細胞で発現が弱かった遺伝子で、遺伝子産物が膜表面に存在する遺伝子群を、胎仔真皮に局在していることを、免疫染色を用いて確認した。

これらをマーカーとして *Scid mouse* 背部皮膚全層欠損創で皮膚を再生させうる細胞を、マウス胎仔皮膚全層から採取した様々な細胞の中から sorting できることを確認した。

C57bl/6J マウス胎生17日の深筋膜より浅層の組織を顕微鏡下に採取した。本組織をコラゲナーゼ処理により細胞を浮遊させ、再生能を有すると思われる皮膚細胞の sorting を行い、上記の真皮の細胞マーカーを有する細胞のうち、どの組み合わせの細胞群が皮膚再生能を有するかを *in vivo* で検討を試みた。また、*in vitro* で細胞集塊を形成する細胞 (skin derived precursors) の培養を行い、マウス胎児表皮細胞との混合移植法で、*scid mouse* 背部皮膚全層欠損創で皮膚の再生能を有するか否かを検討した。skin derived precursors は皮膚の再生能を有し、これは胎児真皮由来の細胞マーカーと一致した。しかし、真皮間葉細胞は多くの細胞マーカーが重複して発現していたので、ひとつの膜表面マーカーのみで細胞を sorting するのは困難であった。*In vitro* で細胞集塊を形成する細胞が、皮膚再生能を有する細胞であると考えられた。

胎生17日以降、新生児、出生後1週、2週、4週、8週のマウス皮膚から真皮細胞と筋膜細胞を採取し表皮細胞と混合移植を行い、皮膚再生能の相関性を調べた。その結果、胎仔の真皮細胞に相当する細胞は減少したが、成獣においても一部に再生が認められた。真皮と筋膜ではどの週令数でも、真皮の方が優位

に毛包再生が多く認められた。週令数が増加するとともに scid mouse 皮膚全層欠損創への混合移植による皮膚付属器の再生率は減少した。

成獣皮膚での再生細胞と思われる細胞を確認した後、MACSを用いて再生細胞と思われる細胞の分離を行った。分離後に、同様に scid mouse 背部皮膚で皮膚の再構築試みた。一部で、毛包形成が認められたが、その数は少なく得られる細胞数が少ないこと、MACS 操作中の細胞のダメージ等が考えられた。また、培養皮膚線維芽細胞から同様に MACS を用いて再生細胞と思われる細胞を分離を試みたが、細胞数が少なく効果的に毛包誘導が可能である細胞の確保は困難であった。

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 18 件)

Ohara H, Kishi K, Nakajima T. (査読有)

The unilocular fat cell graft.

J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2010 in press

Kishi K, Imanishi N, Ohara H, Ninomiya R, Okabe K, Hattori N, Kubota Y, Nakajima H, Nakajima T (査読有)

Distribution of adipose derived stem cells in adipose tissues from human cadavers

J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2010 in press

Kishi K, Okabe K, Ninomiya R, Konno E, Hattori N, Katsube K, Imanishi N, Nakajima H, Nakajima T. (査読有)

Early serial Q-switched ruby laser therapy for medium-sized to giant

congenital

melanocytic nevi.

Br J Dermatol. 2009;161(2):345-352.

Kubota Y, Takubo K, Shimizu T, Ohno H, Kishi K, Shibuya M, Saya H, Suda T. (査読有)

M-CSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis.

J Exp Med. 2009;206(5):1089-1102.

Hattori N, Mochizuki S, Kishi K, Nakajima T, Takaishi H, D'Amiento J, Okada Y. (査読有)

MMP-13 plays a role in keratinocyte migration, angiogenesis and contraction in mouse skin wound healing.

Am J Pathol. 2009;175(2):533-546.

服部典子、貴志和生、佐藤博子、高野淳治、中島龍夫 (査読有)

ケロイド発赤部におけるヘルパーT細胞について

癬痕・ケロイド治療ジャーナル 2009

3:32-34

落合博子、貴志和生、中島龍夫、梅澤明弘 (査読有)

幹細胞医学の臨床 創傷治癒

病理と臨床 2009 27(4):364-366

服部典子、中島龍夫、貴志和生

ケロイド (査読有)

治療 2009 91(2):309-313

Tanaka H, Nakagami G, Sanada H, Sari Y, Kobayashi H, Kishi K, Koyama C, Tadaka E. (査読有)

Quantitative evaluation of elderly skin based on digital image analysis. Skin Res Technol. 2008;14(2):192-200.

Matsuda N, Katsube K, Mikami S,

Katsuki Y, Iseki H, Mukai M, Yamaguchi

- A, Takano Y, Nakajima T, Nakajima H, Kishi K. (査読有)
E-cadherin expression in the subepithelial nevus cells of the giant congenital nevocellular nevi (GCNN) correlates with their migration ability in vitro.
J Dermatol Sci. 2008;52(1):21-30.
- Kubota Y, Hirashima M, Kishi K, Stewart CL, Suda T. (査読有)
Leukemia inhibitory factor regulates microvessel density by modulating oxygen-dependent VEGF expression.
J Clin Invest. 2008;118(7):2393-2403.
- Ohara H, Kishi K, Nakajima T. (査読有)
Rat dorsal paired island skin flaps: a precise model for flap survival evaluation.
Keio J Med. 2008;57(4):211-216.
- 貴志和生, 中島龍夫 (査読有)
創傷外科における新しいアプローチ 胎仔創傷治癒と創傷外科への応用
形成外科 2008 51:S285-S289
- 服部典子, 貴志和生, 佐藤博子, 高野淳治, 中島龍夫 (査読有)
ケロイド・肥厚性瘢痕における神経分布の検討
瘢痕・ケロイド治療ジャーナル 2008 2:70-72
- Kishi K, Matsuda N, Kubota Y, Katsube K, Imanishi N, Nakajima T. (査読有)
Rapid, severe repigmentation of congenital melanocytic nevi after curettage and dermabrasion: histological features.
Br J Dermatol. 2007;156(6):1251-1257.
- 中島龍夫, 佐藤博子, 貴志和生, 緒方寿夫, 永竿智久 (査読なし)
臨床応用への道 形成外科領域での再生医療の最近の動向
ティッシュエンジニアリング 2007号
2007:163-168
- 緒方寿夫, 貴志和生, 永竿智久, 中島龍夫 (査読有)
ケロイド・肥厚性瘢痕の掻痒に対する塩酸オロパタジン(アレロック)の効果の検討
診療と新薬 2007 44(8):954-959
- 服部典子, 貴志和生, 高野淳治, 中島龍夫 (査読有)
ケロイド発赤部における炎症細胞の検討
瘢痕・ケロイド治療ジャーナル 2007 1:53-55
- [学会発表](計8件)
貴志和生 「傷のきれいな治し方」港区医師会外科医会講演会 2009 7 16 東京
貴志和生 「付属器を含めた皮膚の再生」第18回日本形成外科学会基礎学術集会モーニングセミナー 2009 10 2 東京
Keisuke Okaabe, Kazuo Kishi, Ruka Ninomiya, Tatsuo Nakajima. The stage-dependent profiles of inflammatory cells recruited to the incisional skin wound of fetal mouse. 5th Joint meeting of European Tissue Repair Society and Wound Healing Society 2009 8 27 Limoges
Ruka Ninomiya, Kazuo Kishi, Keisuke Okabe, Tatsuo Nakajima. Fibroblast aggregates grown in non-adhesive culture obtain hair inductive ability. 5th Joint meeting of European Tissue Repair Society and Wound Healing Society 2009 8 26 Limoges
二宮瑠加, 貴志和生, 岡部圭介, 中島龍

夫 マウス成獣皮膚線維芽細胞による毛包誘導 第 17 回日本形成外科学会基礎学術集会
2008 10 2 東京

二宮瑠加、貴志和生、岡部圭介、中島龍夫
非接着培養皿を用いたマウス胎仔表皮、真皮
共培養

第 17 回日本形成外科学会基礎学術集会
2008 10 2 東京

二宮瑠加、貴志和生、岡部圭介、中島龍夫
非接着培養法によるマウス皮膚線維芽細胞の
毛包誘導能の獲得

第 8 回日本再生医療学会
2008 3 5 東京

貴志和生、二宮瑠加、岡部圭介、中嶋英雄、
中島龍夫 皮膚を再生させるマウス胎生 17 日
の真皮間葉系細胞の膜表面マーカーの解
析 第 8 回日本再生医療学会
2008 3 5 東京

〔図書〕(計 0 件)
〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

貴志 和生 (KISHI KAZUO)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：40224919

(2) 研究分担者

中島 龍夫 (NAKAJIMA TATSUO)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：40095633

久保田 義顕
慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：50348687

勝部 憲一
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究
科・講師
研究者番号：20233760

(3) 連携研究者
なし