

機関番号：16301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591347

研究課題名 (和文) 表皮幹細胞と羊膜を利用した三次元培養皮膚の簡便大量作製法の開発

研究課題名 (英文) Development of an easy method for constructing three dimensional cultured skin using epidermal stem cell and amnion membrane

研究代表者

亀田 健治 (KAMEDA KENJI)

愛媛大学・総合科学研究支援センター・講師

研究者番号：60363264

研究成果の概要 (和文)：

簡便な三次元培養皮膚作製法を開発する目的で表皮幹細胞と羊膜に注目した。角化細胞の幹細胞としては SP 細胞について解析した。至適条件を検討したところ、ヘキスト 33342 の濃度は $10 \mu\text{g/ml}$ で 37 度、60 分の染色がもっともよいことが明らかとなった。そこで継代数の異なる細胞を同時に培養し、SP 細胞の比率について検討したところ、継代をかさねると SP 細胞の比率が低下することが明らかとなった。すなわち幹細胞を用いた培養皮膚作製については継代の少ない細胞集団から SP 細胞を分離する必要があることが明らかとなった。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が可能であるかどうか検討した。正常ヒト線維芽細胞をコラーゲンゲル中で培養し、羊膜をゲルの上に密着させ、角化細胞を播種した。2 日後に空気に曝露することにより重層化させた。病理組織所見では、基底細胞がコンパクトであり、その配列は正常皮膚により近いものであった。免疫組織学的検索では、羊膜付き三次元皮膚では基底膜成分は良好に発現しており、正常皮膚に非常に近いものであった。羊膜を用いることで良好な培養皮膚の作製が可能であった。

研究成果の概要 (英文)：

In order to develop an easy method for constructing a three-dimensional cultured skin, we focused on epidermal stem cells and amnion membrane. We analyzed the condition for side population cells as stem cells, and clarified that ten microgram per ml of Hoechst dye, 60 min treatment at 37 degree are best for side population staining. Then we examined side population cell rate among different passaged cells, and demonstrated that side population cell ratio decreased along with passaging. Next we analyzed about amnion membrane. Amnion membrane was overlaid on type I collagen gel embedded with fibroblasts; then, normal human keratinocytes were seeded on the epithelial side of the amnion membrane. When the keratinocytes reached confluence, the three-dimensional cultured skin was lifted to the air-liquid interface and cultured for up to 3 weeks. Samples were harvested at different times and manipulated for morphological, immunohistochemical, and ultrastructural investigation. In the three-dimensional cultured skin with amnion, the epidermis was better stratified, with more compact, polarized, columnar basal cells, and the expression of differentiation and proliferation markers was more similar to that of normal human skin than was that of the three-dimensional cultured skin without amnion membrane. A more continuous basement membrane and better-developed hemidesmosomes were found in the three-dimensional cultured skin with amnion. It is possible to construct a better cultured skin using amnion membrane.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚炎症・再生学

1. 研究開始当初の背景

我々は過去10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、さらにこの培養法を用いた培養表皮シートを作製し臨床応用を行い良好な成績を示してきた。これらの研究において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判明した。組織学的検索にて、培養表皮シートは角層を有しないこと、基底膜の構成成分をほとんど有していないことが明らかとなった。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。この原因としてはその作製方法が複雑であること、大量作製が困難であることなどによる。この点を改良することにより、多くの患者への還元が期待できる。

2. 研究の目的

本研究の具体的な目的は、表皮幹細胞と羊膜を応用することにより、簡便かつ大量作製可能な三次元培養皮膚作製法を確立することである。簡便な方法を確立することができれば、当然大量作製法につながると予想される。三次元培養皮膚では真皮に相当する部分に

コラーゲンをを用いることが多いが、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えない。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が可能であるかどうかについて研究を行うことを目的とした。さらに表皮幹細胞を分離培養し、大量に表皮細胞を増殖させることにより、容易かつ大量に三次元皮膚を作製できるかについて検討を行う。表皮の幹細胞として side population 細胞が候補としてあげられており、この細胞と従来の分離法であるマーカーを用いた分離法で比較検討する。

3. 研究の方法

三次元培養皮膚作製時での羊膜併用の効果：ブタ臍由来I型コラーゲン液に線維芽細胞を加えてカルチャーインサートに添加し、ゲル化させる。その後10%FCS MEMを適量インサートの内と外に添加し、5日間5%CO₂, 37℃で培養する。5日後にはゲルは収縮している。ゲルの表面に羊膜を密着させ、数時間静置する。あらかじめ培養しておいたヒト表皮角化細胞を剥離し、羊膜の上に播種する。2日間培養後、空気曝露を行い重層化させる。経時的にサンプルを回収し、HE染色、免疫染色、電子顕微鏡にて検索する。具体的にはHE

染色にて形態学的な特徴を解析し、免疫染色にて基底膜構成成分（ラミニン5、IV型コラーゲン、VII型コラーゲン、 $\alpha 6 \beta 4$ インテグリン）、細胞間接着因子（Eカドヘリン、デスモグレイン1、3、 $\alpha 2$ インテグリン）、細胞骨格（ケラチン5, 14, 1, 10）、分化マーカー（インボルクリン、ロリクリン、トランスグルタミナーゼ）などの発現を比較する。電子顕微鏡では特に基底膜の構成について詳細に検討を加える。

SP細胞を利用したヒト表皮幹細胞の分離：手術時の余剰ヒト皮膚をディスパーゼにて剥離し、トリプシン処理にて細胞を分離・分散する。ヘキスト33342を用いて細胞を染色し、セルソーターにてヘキストブルー陰性・ヘキストレッド陰性の分画を採取する。ヘキスト33342の濃度、反応時間、染色法についてはすでにマウスで確立しており、若干の検討が必要である。同時にベラパミル処理した細胞で、この分画が消失することを確認する。その分画の細胞を無血清培養法にて培養し、その増殖能力を従来の培養法と比較検討する。SP細胞における幹細胞マーカーの発現の検討：SP細胞が幹細胞として有用であるかについて、従来報告されているマーカーの発現を検討する。従来は $\beta 1$ インテグリン、 $\alpha 6$ インテグリンの強発現細胞が幹細胞としてのマーカーであるとされているが、SP細胞がこのマーカーをどの程度発現しているかについて、二重染色を行い、セルソーターを用いて解析し比較検討する。さらには、これらのマーカーを組み合わせ、細胞を分離し、増殖能を検討することにより、さらに効率のよい幹細胞の分離法を確立する。

4. 研究成果

正常ヒト線維芽細胞をコラーゲングル中で培養し、5日間静置培養した。5日目に足場となる羊膜をゲルの上に密着させさらに1

日間静置培養した。翌日、正常ヒト角化細胞を羊膜の上に播種した。2日後に空気に曝露することにより重層化させた。経時的にサンプルを採取し、組織学的に検討した。すなわち、HE染色にて形態を観察し、免疫染色にて基底膜、表皮細胞間蛋白、ケラチンの発現を検討した。さらに基底膜部を電子顕微鏡にて観察した。HE染色所見では、従来の三次元培養皮膚は基底細胞が不揃いで、角化細胞の形態が分化しやすい傾向が見られた。新しい三次元培養皮膚は基底細胞がコンパクトであり、その配列は正常皮膚により近いものであった。また、この形態は空気曝露後21日まで維持されていた。免疫組織学的検索では、羊膜付き三次元皮膚はケラチン10の発現は弱く、ケラチン6はほぼ全層に発現していた。E-カドヘリン、デスモグレイン1、デスモグレイン3は良好に発現しており、正常皮膚と比較すると遜色なく発現していた。4型コラーゲン、7型コラーゲン、ラミニン5、インテグリン $\alpha 6$ 、インテグリン $\beta 4$ は羊膜付き三次元皮膚では基底膜部に線状に発現し、その発現は正常皮膚に非常に近いものであった。電子顕微鏡所見では羊膜付き三次元皮膚は線状に lamina densa が観察されたが、従来の三次元皮膚では線状の lamina densa はほとんど認めなかった。

凍結保存していた2継代目の角化細胞を播種し、無血清培養にて培養した。継代繰り返し、6代目までで適宜保存した。2-6代の細胞を同じ濃度で播種し、培養5日目にトリプシンを用いて細胞を回収し、ヘキスト33342にて染色した。至適条件を検討したところ、濃度は $10 \mu\text{g/ml}$ 、37度60分の染色が細胞へのダメージが少なく、染色も良好であった。角化細胞におけるSP細胞の比率は5%前後であった。3代目以降の細胞ではSPの比率は徐々に低下し、6代目では1%以下であった。数

種類の角化細胞を用いて同様の検討をおこなったところ、継代がすすむにつれて SP の比率は低下した。

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11件)

1. Sayama K, Yamamoto M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Hirakawa S, Dai X, Tohyama M, Tokumaru S, Shin MS, Sakurai H, Akira S, Hashimoto K.: E2 Polyubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in keratinocytes is essential for epidermal integrity. J Biol Chem. 査読有、285(39)、2010、30042-9,
2. Sayama K, Kajiya K, Sugawara K, Sato S, Hirakawa S, Shirakata Y, Hanakawa Y, Dai X, Ishimatsu-Tsuji Y, Metzger D, Chambon P, Akira S, Paus R, Kishimoto J, Hashimoto K.: Inflammatory mediator TAK1 regulates hair follicle morphogenesis and anagen induction shown by using keratinocyte-specific TAK1-deficient mice. PLoS One. 査読有、23;5(6) 2010、e11275,
3. Shirakata Y. : Regulation of epidermal keratinocytes by growth factors. J Dermatol Sci. 査読有、59(2)、2010、73-80,
4. Shirakata Y, Tokumaru S, Sayama K, Hashimoto K.: Auto- and cross-induction by betacellulin in epidermal keratinocytes. J Dermatol Sci. 査読有、58(2)、2010、162-4,
5. Shibata S, Tada Y, Kanda N, Nashiro K, Kamata M, Karakawa M, Miyagaki T, Kai H, Saeki H, Shirakata Y, Watanabe S, Tamaki K, Sato S.: Possible Roles of IL-27 in the Pathogenesis of Psoriasis. J Invest Dermatol. 査読有、2010 130(4)、1034-9,
6. Yang L, Shirakata Y, Tokumaru S, Xiuju D, Tohyama M, Hanakawa Y, Hirakawa S, Sayama K, Hashimoto K: Living Skin Equivalents Constructed Using Human Amnions as a Matrix. J Dermatol Sci. 査読有、56、2009、188-95,
7. Tohyama M, Hanakawa Y, Shirakata Y, Dai X, Yang L, Hirakawa S, Tokumaru S, Okazaki H, Sayama K, Hashimoto K.: IL-17 and IL-22 mediate IL-20 subfamily cytokine production in cultured keratinocytes via increased IL-22 receptor expression. Eur J Immunol. 査読有、39、2009、2279-88,
8. Torii K, Maeda A, Saito C, Furuhashi T, Shintani Y, Shirakata Y, Morita A.: UVB wavelength dependency of antimicrobial peptide induction for innate immunity in normal human keratinocytes. J Dermatol Sci. 査読有、56、2009、217-9,
9. Hara Y, Shiraishi A, Kobayashi T, Kadota Y, Shirakata Y, Hashimoto K, Ohashi Y.: Alteration of TLR3 pathways by glucocorticoids may be responsible for immunosusceptibility of human corneal epithelial cells to viral infections. Mol Vis. 査読有、15、2009、937-48,
10. Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Yang L, Hirakawa S, Tokumaru S, Hashimoto K.: The NF-kB, p38 MAPK and STAT1 pathways differentially regulate the dsRNA-mediated innate

immune responses of epidermal keratinocytes. **Int Immunol.** 査読有、20、2008、901-9、

11. Dai X, Sayama K, Shirakata Y, Tokumaru S, Yang L, Tohyama M, Hirakawa S, Hanakawa Y, Hashimoto K. : PPARgamma is an important transcription factor in 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced involucrin expression. **J Dermatol Sci.** 査読有、50、2008、53-60、

[学会発表] (計5件)

1. Shirakata Y, Yang L, Tsuda T, Tohyama M, Miyawaki S, Kameda K, Sayama K, Yoshimura A, Hashimoto K. : Deletion of SOCS3 in the epidermis causes impaired skin wound healing in vivo. The 40th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Helsinki, Finland, 9/8-11, 2010,
2. Tohyama M, Yang L, Tsuda T, Miyawaki S, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K. : Interferon alpha enhances IL-22 receptor expression on epidermal keratinocytes. The 40th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Helsinki, Finland, 9/8-11, 2010,
3. Shirakata Y and Hashimoto K. : Development of a new skin equivalent using de-epithelialized amnion membrane. The 4th Joint Meeting of Japanese Dermatological Association and Australasian College of Dermatologists, Sapporo, 7/10-12, 2009,
4. Shirakata Y, Yang L, Sayama K, and

Hashimoto K. : Simple method of constructing living skin equivalent using human amnion as dermal matrix. The 39th Annual Meeting of European Society for Dermatological Research, Budapest, Hungary, 9/10-12, 2009,

5. Sayama K, Shirakata Y, Ishimatsu-Tsuji Y, Kajiya K, Hirakawa S, Sugawara K, Chambon P, Akira S, Paus R, Kishimoto J, and Hashimoto K. : Inflammatory mediator TAK1 regulates hair follicle cycling. The 69th Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology, Montreal, Canada, 5/6-9, 2009,

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀田 健治 (KAMEDA KENJI)

愛媛大学・総合科学研究支援センター・
講師

研究者番号 : 60363264

(2) 研究分担者

白方 裕司 (SHIRAKATA YUJI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号 : 50226320