

機関番号：32610

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2010

課題番号：21689046

研究課題名(和文) 伸展刺激がヒト間葉系幹細胞に及ぼす影響

研究課題名(英文) Influences of extension on human mesenchymal stem cells

研究代表者

栗田 昌和 (KURITA MASAKAZU)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：20424111

研究成果の概要(和文)：脂肪由来間葉系細胞の伸展培養を行い、細胞数、脂肪、骨、筋への分化誘導による各系統への分化を調べたが、臨床的な細胞治療において、有意義と考えられる傾向を得ることができなかった。機械的刺激が培養条件下の間葉系細胞に直接的に及ぼす影響は大きくないと考えられたため、隣接する組織を介して間接的に影響を及ぼしている可能性を考え、伸展培養下でケラチノサイトにおきる変化を調べた結果、伸展刺激によってケラチノサイト由来エンドセリン1が上昇することを明らかにした (Kurita et al. BBRC 2011)。

研究成果の概要(英文)：We investigated the influences of cyclic stretch on the differentiation capacity of adipose-derived adult stem cells, however, no positive data are obtained for the clinical use. We consider the possibilities that mechanical stress influences mesenchymal tissues through adjacent tissue such as epidermis, therefore we investigated the influences of cyclic stretch on keratinocyte, focusing on expression levels of cytokines which are known to work on mesenchymal tissue with paracrine fashion. As a result, we found keratinocyte-derived endothelin-1 was upregulated with mechanical stretch (Kurita et al. BBRC 2011).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2010年度	2,700,000	810,000	3,510,000
総計	9,700,000	2,910,000	12,610,000

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：間葉系幹細胞、脂肪由来細胞、皮膚線維芽細胞、伸展培養、創傷治療、再生治療

1. 研究開始当初の背景

創傷治療や組織再建の分野を中心に、骨髄間葉系幹細胞や、脂肪由来間葉系細胞、など成人組織中に存在する多能性を有する間葉系細胞を用いた細胞治療の研究が盛んに行われている。本研究では、当初、培養条件下でこれら間葉系細胞に対して機械的刺激を加え、細胞の応答およびその分子生物学的メカニズムを調べることにより、再生医療のため

の細胞操作のあたらしい方法を開発することを目的とした。しかし、脂肪由来間葉系細胞・皮膚線維芽細胞など間葉系細胞の伸展培養を行い、細胞数、脂肪、骨、筋への分化誘導による各系統への分化を調べたが、臨床的な細胞治療において、有意義と考えられる傾向を得ることができなかったため、間葉系細胞に隣接する組織からのパラクライン作用を介して間葉系細胞に起きる変化を調べる方向へと研究を転換した。

2. 研究の目的

脂肪由来間葉系細胞、線維芽細胞を用いて、伸展培養下での細胞外器質や癒痕形成関連サイトカインの発現を調べたが、伸展培養による変化は認められなかったことから、機械的刺激が培養条件下の間葉系細胞に直接的に及ぼす影響は大きくないと考えられたため、隣接する組織を介して間接的に影響を及ぼしている可能性を考え、伸展培養下でケラチノサイトにおける変化を調べた。また研究の基盤情報として、線維芽細胞の部位特異性について、特に癒痕形成にかかわる因子の発現を中心に調べた。

3. 研究の方法

初代培養細胞の確立

形成外科手術中に余剰として廃棄される皮膚検体を、患者の同意のもと、施設の倫理委員会の審議、許可を受けたプロトコルにのっとり採取した。線維芽細胞は、10% Fetal calf serum (FCS) を添加した DMEM 培地を基本培地 (Fibroblast growth medium: FGM) として、細胞遊走法にて初代培養を行った。ケラチノサイトは、Bovine pituitary extract (BPE), Epidermal growth factor を含む無血清ケラチノサイト培地による無血清培養法にて、初代培養を確立した。それぞれ passage 3-6 の細胞を用いて、解析を行った。

伸展培養

0.05% ブタ由来コラーゲン 1 でコーティングした伸展培養用シリコンチャンバーに、20,000 cells/cm² の密度で細胞を播種した。24 時間後に、培地交換を行った後、伸展培養を開始した。伸展刺激には専用の機器 (STREX ST140, STREX) を用いた。

増殖特性の評価

特に、線維芽細胞の癒痕形成にかかわる因子として in vitro での増殖特性の評価を行った。12 well plate に 10,000 cells/well で細胞を播種 (FGM) し、4 日ごと 32 日目まで、培地交換と同時に、細胞数をカウントした。

培養上清中の細胞外器質、サイトカイン濃度の測定

各実験目的に応じた濃度、培養条件下で細胞を播種、培地を収集した後、培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA を用いて測定した。

細胞外器質、サイトカイン、マーカーの mRNA 発現解析

各実験目的に応じた濃度、培養条件下で細胞を播種、規程の条件で細胞を収集した後、カラムを用いる市販のキットを用いて mRNA を抽出し、逆転写を行った。メーカー作成のプライマーもしくは、サイバーグリーンを用いたリアルタイム PCR 用に、代表的な因子についてプライマーの最適化を行い、GAPDH、ACTB を内部標準として mRNA 発現レベルの比較を行った。

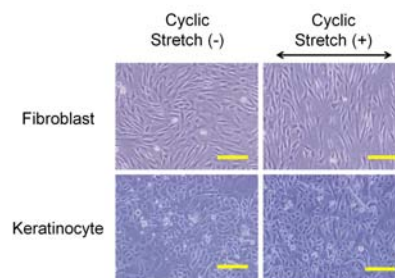
コラーゲンゲル収縮アッセイ

タイプ 1 コラーゲン酸性溶液を用いて、終濃度 100,000 cells/ml, 3.0 mg/ml となるように線維芽細胞、コラーゲン溶液を調整し、12 (もしくは 24) well plate に 1 (もしくは 0.5) ml ずつ播種した。ゲル化を確認した後、実験目的によっては、サンプル培地を 1cc 追加した。4 日目にコラーゲンゲルをプレートの側壁から剥離し、1 時間後にゲルの写真撮影を行い、画像処理によって面積を算出した。

3. 研究の結果

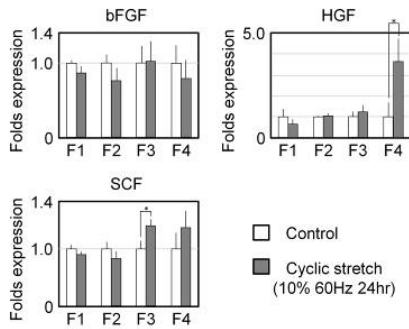
データは論文発表目的にまとめた形で示す

伸展刺激が線維芽細胞、ケラチノサイトに対して及ぼす影響



線維芽細胞、ケラチノサイト (図にはないが脂肪由来細胞も含め)、in vitro 条件下での周期的伸展刺激によって、細胞は伸展方向に対して垂直方向に伸びた形をとるように変化した。

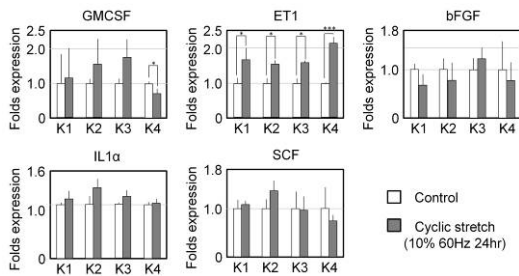
周期的伸展刺激が線維芽細胞由来のメラニン原性サイトカイン、癒痕形成関連因子発現に対して及ぼす影響



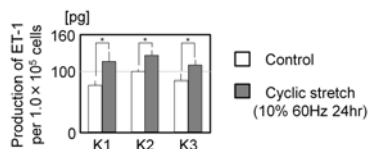
周期的伸展刺激によって線維芽細胞、脂肪由来細胞由来のメラニン原性サイトカイン、癒痕形成関連因子に対して起きる変化を網羅的に調べた。

図は4初代培養線維芽細胞ラインに対して周期的伸展刺激を加えた際のメラニン原性サイトカインの変化を示すが、これらを含めて、周期的伸展刺激によって線維芽細胞や脂肪由来細胞に対して、恒常的な変化は認められなかった。

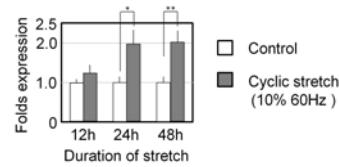
周期的伸展刺激がケラチノサイト由来のメラニン原性サイトカイン発現に対して及ぼす影響



周期的伸展刺激によってケラチノサイト由来のパラクライン作用をもつ代表的なサイトカインに対して起きる変化を網羅的に調べた。図は4初代培養ケラチノサイトラインに対して周期的伸展刺激を加えた際のメラニン原性サイトカインの変化を示す。エンドセリン1のみ、細胞ラインによらず、恒常的に発現上昇を認める。



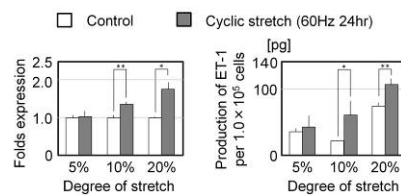
同時に採取した培養上清内のエンドセリン1濃度をELISAにて測定した。伸展刺激によって、タンパク質レベルでもエンドセリン1産生が上昇していることが示された。



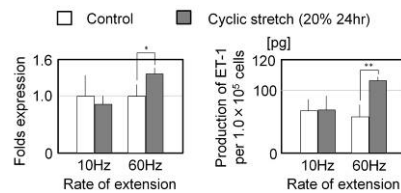
mRNA レベルについて、経時的な変化を確認した。周期的伸展開始後、12、24、48時間のエンドセリン1発現について示す。24時間の時点で、発現量がピークに達していることがわかる。

周期的伸展刺激の刺激強度エンドセリン1発現の関係

伸展距離とエンドセリン1発現の関係



伸展頻度とエンドセリン1発現の関係

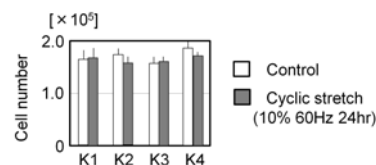


周期的伸展刺激の強度(伸展距離、伸展頻度)とエンドセリン1の発現をmRNA、タンパク質レベルでそれぞれ調べた結果、ケラチノサイト由来のエンドセリン1発現、産生は、刺激強度に依存して上昇することがわかった。

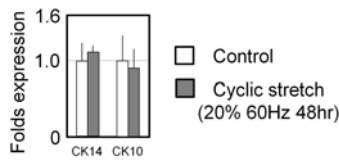
周期的伸展刺激とケラチノサイトの増殖、分化との関連

in vitro 条件下において、一般の細胞と異なり、ケラチノサイトは容易に分化し、全く異なった形質を示すことが知られているため、周期的伸展刺激による増殖と、分化について、細胞数およびマーカーのmRNA発現の変化についてそれぞれ調べた。

周期的伸展刺激と細胞数との関係



周期的伸展刺激と分化マーカー発現の関係



結果として、図に示すように、周期的伸展刺激は、本研究条件下においては、細胞数、分化マーカーの発現に対して有意な影響を与えていなかった。

以上の検討結果より、周期的伸展刺激はケラチノサイトの増殖、分化には影響を与えることなく、エンドセリン1の機能的な発現上昇を来すということが明らかにされた。その他の代表的なメラニン原性サイトカイン発現に対する影響が認められなかったことと併せて、物理的刺激を誘因とする色素沈着との病態生理におけるケラチノサイト由来エンドセリン1の役割を示唆する知見として、論文報告した (Kurita et al. BBRC 2011)。

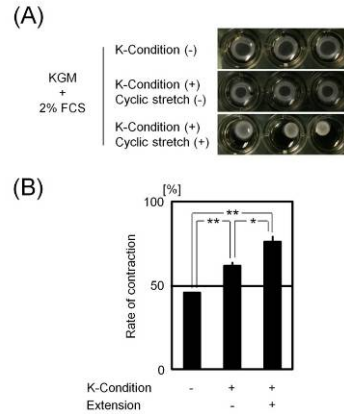
一方、エンドセリン1は肺高血圧症や、強皮症など、組織の線維化を主たる特徴とするいくつかの病態において、病態生理の中心的役割を果たすことが知られている。また、臨床的には、物理的な刺激が創傷治癒過程における癒痕形成に大きな影響を与えることは明らかであるにもかかわらず、物理刺激と、過剰癒痕形成との直接的な関連を示す分子生物学的な知見は明瞭に理解されていない。そこで、間葉系細胞自体に対する直接的な伸展刺激が、癒痕形成関連因子の発現に影響を与えなかったという事実と考えあわせて、物理刺激が、癒痕形成を促進過程においては、隣接する上皮成分、ケラチノサイトを介する経路が主要な役割を果たしているのではないかと考えるにいたった。

周期的伸展刺激とケラチノサイト、線維芽細胞および癒痕形成との関連を総合的に検討するために、周期的伸展刺激負荷を行ったケラチノサイト、線維芽細胞の培養上清が、線維芽細胞含有コラーゲングルの収縮に対して及ぼす影響を調べた。

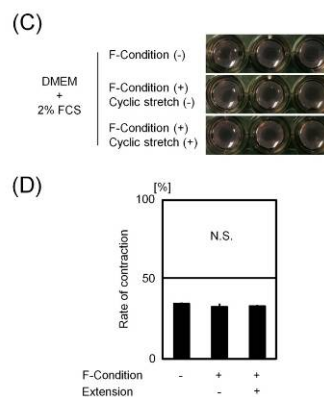
なお、コラーゲングル収縮アッセイに関しては、基礎的情報としてこれを調べ、線維芽細胞の部位特異性との関連性について報告を行っている (Kaminishi-Tanikawa A, Kurita M (correspondence), et al. JPSHS, in press)。

周期的伸展刺激負荷の有無による、ケラチノサイト、皮膚線維芽細胞培養上清の線維芽細胞含有コラーゲングルの収縮に対する影響

コラーゲングルに対する伸展刺激あり、なしでのケラチノサイト培養上清負荷の影響



コラーゲングルに対する伸展刺激あり、なしでの線維芽細胞培養上清負荷の影響



結果的に、線維芽細胞含有コラーゲングルに対して、ケラチノサイトの培養上清は収縮を促す作用を有しており、伸展刺激の負荷は、その作用に対して促進的に働くこと、線維芽細胞の培養上清はコラーゲングルの収縮に対して有意な作用をもたず、伸展刺激の負荷もこれに影響を及ぼさないことが明らかになった。

すなわち、物理的刺激と、皮膚組織との関連で見た場合、ケラチノサイトは物理的刺激に対して、癒痕形成傾向の活性化につながる反応を示すのに対して、線維芽細胞は、そういった傾向を示さないということがわかった。

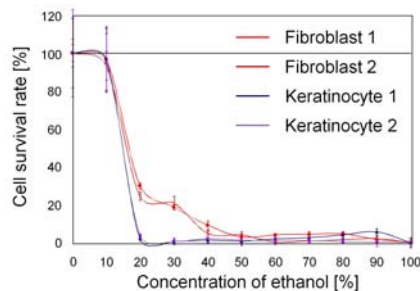
エンドセリン1の受容体拮抗薬を用いた阻害実験によると、伸展刺激負荷の有無によるコラーゲングル収縮能の変化の多くの部分はケラチノサイト由来エンドセリン1によっていることがわかった。

今後、エンドセリン1を介した上皮間葉相互作用をターゲットとして、ケロイド、肥厚性癬痕の有用な治療方法の開発が見込まれると考えている。

***補遺**

生理食塩水による希釈が線維芽細胞、ケラチノサイトに対するエタノールの細胞毒性に与える影響の検討

上記主研究と平行して、細胞増殖アッセイであるMTTアッセイの最適化と並行して線維芽細胞、ケラチノサイトに対するエタノールの毒性についても実験的検討を行った。



結果として、MTTアッセイの最適化を行ったとともに、エタノールによる線維芽細胞、ケラチノサイトに対する細胞毒性は、希釈による影響を強く受けており、細胞種類によらず10%程度まで希釈することができれば細胞毒性が失われるという知見を得たため、これを関連研究の部分的データとして論文報告した (Ihara A, Kurita M (correspondence), Dermatologic Surgery, in press)。

[雑誌論文] (計3件)

① Kurita M, Okazaki M, Fujino T, Takushima A, and Harii K. Cyclic Stretch Induces Upregulation of Endothelin-1 with Keratinocytes In Vitro: Possible Role in Mechanical Stress-induced Hyperpigmentation. Biochemical and Biophysical Research Communications, 409 2011:409:103-107. (査読有)

② Kaminishi-Tanikawa A, Kurita M (correspondence), Okazaki M, Kawaguchi R, Ihara A, Niikura M, Takushima A, Harii K. Fibroblast obtained from superficial and deep dermis showed different features for wound healing. J Plast Surg Hand Surg, in press. (査読有)

③ Ihara A, Kurita M (correspondence),

Ozaki M, Fujiki M, Kaji N, Takushima A, and Harii K. Subcutaneous injection of normal saline prevents cutaneous complications of ethanol sclerotherapy for superficial vascular lesions: an experimental study. Dermatol Surg, in press. (査読有)

[学会発表] (計6件)

① 川口留奈, 栗田昌和, 岡崎睦, 上西昭子, 多久嶋亮彦, 波利井清紀 耳垂ケロイドおよび健常皮膚の線維芽細胞の増殖特性の比較 第28回日本頭蓋顎顔面外科学会学術集会 2010年10月28,29日 京都大学百周年時計台記念館、京都

② 栗田昌和, 岡崎睦, 上西昭子, 川口留奈, 多久嶋亮彦, 波利井清紀 顔面および体幹由来線維芽細胞の癬痕形成・色素沈着関連遺伝子発現の違い 日本形成外科学会基礎学会 2010年9月16,17日 パシフィコ横浜、横浜、神奈川県

③ 上西昭子, 栗田昌和, 岡崎睦, 川口留奈, 多久嶋亮彦, 波利井清紀 創傷治癒における真皮浅層と深層由来の線維芽細胞の部位特異性 第2回創傷外科学会総会・学術集会 2010年7月30,31日 ANAクラウンプラザホテル神戸、神戸、兵庫県

④ Kurita M, Okazaki M, Kaminishi A, Kawaguchi R, Takushima A, Harii K. Cultured facial and trunk dermal fibroblasts show different property for scarring and pigmentation. The 10th Korea-Japan Congress of Plastic and Reconstructive Surgery, 16-18, June, 2010, Paradise hotel Busan, Busan, Korea

⑤ 上西昭子, 栗田昌和, 岡崎睦, 川口留奈, 大浦紀彦, 多久嶋亮彦, 波利井清紀 線維芽細胞の部位特異性 東京大学医学部形成外科学教室第21回同門学術集会、2010年1月16日、東京大学医学部附属病院 入院棟A15階 大会議室、文京区、東京

⑥ 栗田昌和, 岡崎睦, 上西昭子, 大浦紀彦, 多久嶋亮彦, 波利井清紀 皮膚、皮下組織および筋組織由来の細胞群の増殖特性 第18回日本形成外科基礎学術集会 2009年10月1-2日 都市センタービル 千代田区 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗田 昌和 (KURITA MASAKAZU)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号: 20424111

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者
なし