

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591647

研究課題名(和文) 脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた培養皮膚の作製法の開発

研究課題名(英文) The development of the method of producing cultured skin using adipose tissue-derived mesenchymal stem cells.

研究代表者

亀田 健治 (Kenji, Kameda)

愛媛大学・総合科学研究支援センター・講師

研究者番号：60363264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪由来間葉系幹細胞を培養したが、ケラチン陽性細胞が確認できなかった。型コラーゲン液に脂肪由来間葉系幹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、その後10%FCS/DMEMを適量インサートの内と外に添加し培養した。ゲル上に播種し培養させ空気曝露を行い重層化させた。HE染色を行ったところ皮膚の三次元再構築が確認できた。従ってASC細胞が真皮線維芽細胞の代替細胞として機能しうることが確認できた。

研究成果の概要(英文)：We cultured adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs), but cytokeratin-positive cells could not be detected. Therefore we seeded and gelled ASCs with Type I collagen solutions on the culture inserts, and then added the appropriate amount of 10 % FCS/DMEM inside and outside the inserts. And then were plated onto the gel cultures were stratified perform air exposure. We demonstrated three-dimensional configuration of the skin with HE staining. Three-dimensional reconstruction of the skin was subjected to HE staining was confirmed. It shows that ASCs can function as an alternative to dermal fibroblasts.

研究分野：分子生物学

キーワード：再生医療 三次元培養 脂肪細胞 幹細胞 角化細胞

### 1. 研究開始当初の背景

我々は表皮角化細胞の無血清培養法を確立し、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。角層を有する培養皮膚として三次元培養皮膚を開発し、さらには簡便かつ大量に三次元培養皮膚が作製可能な方法を開発した。

生検皮膚から表皮と真皮を分離し、それぞれ表皮角化細胞と真皮線維芽細胞を分離培養、大量に増殖させたものを用いなければならない。従って細胞の確保、培養に多くの時間と労力を費やす。この点を改良できる可能性として幹細胞が候補と成るであろう。幹細胞には胎性幹細胞 (ES 細胞)、誘導多能性幹細胞 (iPS 細胞)、間葉系幹細胞などがあり、これらの細胞から角化細胞や線維芽細胞を分化誘導することができれば、ひとつの細胞から数種類の細胞を得ることができ、増殖能力を保ったまま細胞数を確保することができると予想される。このような学術的背景から、比較的大量に採取しやすい脂肪組織に着目し、脂肪組織から間葉系幹細胞を分離培養し、分化誘導にて線維芽細胞と角化細胞を作製し、これら分化誘導細胞にて三次元培養皮膚を作製することができないかと思いついた。

### 2. 研究の目的

脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ASC 細胞) が幹細胞としての増殖能力を有しているかについて明らかにし、最適の増殖培養環境について培養液や添加因子、さらには培養条件を検討し、その培養法を確立することを目的とする。継代操作による細胞増殖能の検討、培養上清中に分泌されるサイトカイン、細胞成長因子の測定、サイトカイン、細胞成長因子刺激時の遺伝子発現などを示標に、コラーゲンゲル中での増殖、形態について線維芽細胞と比較し、三次元培養皮膚での表皮角化細胞へ分化できる条件について明らかにすることを目的とする。これらの条件が明らかにし、最終的に脂肪組織から三次元培養皮膚作製が可能かについて明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

脂肪組織からの間葉系幹細胞の分離培養：手術時に得られた脂肪組織を 0.1% コラゲナーゼ 37 にて 60-90 分反応させ細胞を沈殿する。細胞を培養し適宜凍結保存する。

脂肪由来間葉系幹細胞の増殖能の検討：継代数を同じにした線維芽細胞と脂肪由来間葉系幹細胞を培養 4-7 日後に細胞数を測定する。細胞数の測定結果をもって増殖能が高いか低いかを検証する。継代を繰り返し、何回継代可能かについて検討することで長期的な細胞増殖能を推定する。

脂肪由来間葉系幹細胞の性質の検討：同じような形態を示す線維芽細胞とどの程度性質が異なるかについて検討する。培養上清中のサイトカイン・細胞成長因子について ELISA 法を用いて解析する。さらに線維芽細胞に対して増殖促進、抑制する因子を数種類選び

(bFGF, TGF-beta, PDGF など) 培養液に添加し、刺激後のサイトカイン・細胞成長因子についても ELISA 法を用いて解析する。サイトカイン・細胞成長因子刺激後経時的に RNA を回収し、主にサイトカイン・細胞成長因子の遺伝子発現について micro array 解析、real-time PCR 法にて比較検討する。

脂肪由来間葉系幹細胞の他分化能についての検討：脂肪由来間葉系幹細胞と線維芽細胞をそれぞれ培養し、分化誘導培地に変更しその形態的变化を解析する。

脂肪由来間葉系幹細胞の角化細胞への分化誘導：脂肪由来間葉系幹細胞を培養し、FAD 培地に変更、BMP とアスコルビン酸添加によりケラチン陽性細胞がでてくるかについて免疫組織学的に検討する。その際に BMP の添加時期と添加濃度を数種類の組み合わせで試すことにより最適な条件を検討する。この方法以外のものとして供培養系を試す。シャーレ底面に脂肪由来間葉系幹細胞を播種し、インサートに角化細胞を播種し供培養する。脂肪由来間葉系幹細胞の真皮構成成分としての検討：型コラーゲン液に脂肪由来間葉系幹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/DMEM を適量インサートの内と外に添加し培養する。あらかじめ培養しておいたヒト表皮角化細胞を剥離し、ゲル上に播種する。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。正常な表皮が構築されていれば間葉系幹細胞が真皮を構成できることが確認できる。

脂肪由来間葉系幹細胞から分化誘導した角化細胞を用いた三次元培養皮膚の作製：確認できた真皮成分に脂肪由来間葉系幹細胞から分化誘導した角化細胞を播種し 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、細胞間接着因子、細胞骨格、分化マーカーなどの発現を比較する。

### 4. 研究成果

手術時に得られたヒト脂肪組織を生理食塩水にて十分洗浄し、血球成分をできる限り除去した。ハサミを用いて細切し 0.75% コラゲナーゼ溶液にて時々攪拌しながら 37° で 90 分間処理した。1000rpm にて遠心し、ペレットを 10%FCS/DMEM にて懸濁しコラーゲンコートディッシュに播種した。細胞が増殖した段階で適宜保存し継代を行った。脂肪細胞への分化誘導は専用の培地に変更し 7-14 日間培養後 Alizarin Red 染色を行った。サイトカイン産生については培養液を回収し、培養液中のサイトカイン量を ELISA 法にて測定した。培養開始翌日にはシャーレ底面に付着する細胞が数多くみられ、培養継続により線維芽細胞様の形態を呈した。コンフルエントに達

した時点で継代を行ったが、継代した細胞も順調に増殖した。継代を9回行ったが形態の変化はほとんど認めなかった。数回継代した時点で脂肪細胞への分化を誘導する培地に変更し、3日に1回培地を交換したところ、7日目以降に細胞内に脂肪滴を有する細胞が出現した。10日目にAlizarin Red染色をおこなったところ脂肪であることを確認した。コントロールとして用いた線維芽細胞ではこのような脂肪を有する細胞は認めなかった。

細胞の形態と増殖能についても線維芽細胞と比較した。増殖が亢進につれて線維芽細胞は細長くなるがASC細胞は細長くはならず比較的太い形態を示した。シャーレー杯になった時点で細胞数を測定すると線維芽細胞の約1/3であった。継代数を合わせた細胞で増殖アッセイを行ったところ、どの継代の細胞においても増殖能は線維芽細胞の約1/2から1/3であった。このASC細胞のサイトカイン産生について培地中に分泌されるタンパクをELISAにて測定した。細胞100万個あたりのサイトカイン量ではVEGFとKGFはASCのほうが多く、HGFについては線維芽細胞のほうが多量に分泌していた。FGF2は両者間では差はなく、TGF-beta1はASCでは検出限度以下であった。

脂肪由来間葉系幹細胞を培養し、FAD培地に変更、BMPとアスコルビン酸添加にて培養をつづけたがケラチン陽性細胞が確認できなかった。BMPの添加時期と添加濃度を数種類の組み合わせで試したが、我々の行った実験系では角化細胞への分化誘導はできなかった。従って脂肪細胞由来の培養皮膚作成は困難であった。

脂肪由来間葉系幹細胞の真皮構成成分としての検討：型コラーゲン液に脂肪由来間葉系幹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、その後10%FCS/DMEMを適量インサートの内と外に添加し培養した。あらかじめ培養しておいたヒト表皮角化細胞を剥離し、ゲル上に播種し、2日間培養後、空気曝露を行い重層化させた。HE染色を行ったところ皮膚の三次元再構築が確認できた。従ってASC細胞が真皮線維芽細胞の代替細胞として機能しうることが確認できた。

#### 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3件)

Yuki Hosokawa, Hisaaki Takahashi,  
Akihiro Inoue, Yuya Kawabe, Yu  
Funahashi, Kenji Kameda et al. (13人)  
Oct-3/4 modulates the drug-resistant  
phenotype of glioblastoma cells through

expression of ATP binding cassette  
transporter G2. *Biochimica et Biophysica  
Acta* 1850. 査読有 (2015) 1197-1205  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.01.017>

Minoru Tamura, Sachio Kunihiro, Yuki  
Hamashima, Yuki Yoshioka, Shigenobu  
Tone, Kenji Kameda. An improved  
superoxide-generating nanodevice for  
oxidative stress studies in cultured cells.  
*Biotechnology Reports* 6. 査読有 (2015)  
45-50  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2015.02.003>

Pham Thi Dau, Hiroki Sakai, Masashi  
Hirano, Hiroshi Ishibashi, Yuki  
Tanaka, Kenji Kameda et al. (9人)  
Quantitative analysis of the  
interaction of constitutive androstane  
receptor with chemical and steroid  
receptor coactivator 1 using surface  
plasmon resonance biosensor systems:  
A case study of the Baikal seal (*Pusa  
sibirica*) and the mouse. *Toxicological  
Sciences*, 131(1) 査読有 (2013) 116-127  
[doi:10.1093/toxsci/kfs288](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs288)

#### [学会発表](計1件)

M. Murakami, T Kaneko, T, Nakatsuji,  
K, kameda, et al. Vesicular LL-37  
contributes to inflammation of the  
lesional skin of palmoplantar  
pustulosis. 44<sup>th</sup> Annual ESDR meeting.  
10-13 Sep. 2014. Copenhagen, Denmark.

#### [図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔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・准教授  
研究者番号：50226320

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：