

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791902

研究課題名(和文) ヒト真皮由来多能性細胞の効率的採取法の検討と創傷治癒への応用

研究課題名(英文) Investigation of human dermal multipotent progenitor cells to utilize for wound treatment

研究代表者

吉川 勝宇 (YOSHIKAWA, KATSUHIRO)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10583156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：成人ヒト真皮より多能性細胞(SKPs)を採取すること成功した。これらの細胞は、Wnt5a, Sca-1, Dermo-1, Snail1, SHOX2, Slug, Sox9などの多能性マーカー遺伝子を発現し、神経、脂肪、骨への分能性を有することを示した。また、年齢、採取部位による採取効率において検討したところ、顔面皮膚から採取すれば、高齢者(70歳以降)でも、小児と遜色ない程度にSKPsを採取できることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Skin-derived precursor (SKP) cells are a valuable resource for wound therapy and regenerative medicine, because they represent multipotent stem cells that differentiate into neural and mesodermal progenies. Previous studies suggest that the stem cell pool decreases with age. We found that human multipotent SKP cells can be efficiently collected from adult cheek/chin skin, even in aged individuals of 70–78 years. The number of spheres obtained from adult facial skin was significantly higher than that of trunk or extremity skin. SKP cells derived from cheek/chin skin exhibited a high ability to differentiate into neural and mesodermal cells relative to those derived from eyelid, trunk, or extremity skin. These results indicate that cheek/chin skin is useful for the recovery of multipotent stem cells for wound therapy and regenerative therapy.

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：多能性細胞 真皮由来幹細胞 創傷治癒 再生医療

1. 研究開始当初の背景

近年、ES 細胞や iPS 細胞のようないわゆる「万能細胞」だけでなく、各臓器・組織中にも多能性の細胞が存在することが報告されている。ヒト皮膚(真皮)においても、Toma らにより、多能性の幹細胞が報告された (Toma JG, et al. *Stem Cells* 2005; 23: 727-37.)。自家組織から比較的容易に採取できる組織幹細胞は、臨床応用が実現する可能性が高い。さらに、皮膚という臓器は、体表に存在するため、そこからの細胞採取は非常に容易であり、より臨床応用に適している。そこで、臨床応用を念頭においた場合、検討すべき項目は、組織中にわずかにしか存在しない幹細胞の効率的な採取方法の検討である。

我々はこれまで、患者のインフォームド・コンセントを得たうえで、形成外科手術時に生じる余剰の皮膚より、真皮由来幹細胞 (以下 SKPs = Skin derived precursor cells) の抽出、培養に成功した。再生医療のソースとして SKPs を使用する場合、皮膚の採取はどの部位から行うのが最適か、また、各部位から採取した SKPs は、それぞれ同じような性質をもつのか、あるいは分化能に違いあるかの検討は必須である。

さらには、年齢に関係なく高齢者からも SKPs の採取が可能であるかを調査することも重要である。皮膚は体全体で一様ではなく、顔面の真皮は神経堤由来 (Couly G, et al. *Development* 1992; 114: 1-15.) であるのに対し、体幹の皮膚はそうではない (Santagati F, et al. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 806-18.) ことから、採取部位により、その幹細胞の採取効率、性質等が異なることは十分に考えられるからである。

以上の点から、本プロジェクトではまず、SKPs の採取部位や年齢により、採取効率や増殖能、分化能等の性質にどのような差異があるのか、詳細に検討することを計画した。また、このような未分化な細胞は、分化の最終段階にある成人皮膚線維芽細胞よりも、いわば胎児皮膚における細胞により近い細胞であるため、SKPs を用いれば、より創傷治癒を促進し、瘢痕を少なく治癒させる可能性がある。申請者らは、研究期間の後半で、SKPs が創傷治癒や瘢痕形成への影響についても検討することを計画した。

2. 研究の目的

SKPs の採取部位、年齢により、その採取効率、性質に差異がないかどうかを明らかにする。各部位から得られた SKPs が創傷治癒の促進、瘢痕形成の抑制に関与するかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

① ヒト SKPs の分離・培養：インフォームドコンセントを得たうえで、形成外科手術により生じた余剰皮膚検体から脂肪組織を除去し、鉗子等で細切後、ディスペーゼ (1000U/ml)

にて処理。表皮組織を除去し、真皮組織を 1~2mm 角に細切後、0.5% コラゲナーゼ溶液で振盪しながら 37°C で 90 分間反応させる。2 度の遠沈操作で洗浄後、40um セルストレイナーにて濾過し、得られた細胞を sphere 形成培地 (DMEM/F12 に抗生剤、抗真菌剤、EGF、bFGF、B27 を添加) を用いて 6 穴非接着性プレートに播種し浮遊培養を行い、SKPs 細胞を得た。幼児、成人、高齢者ごとにそれぞれ 5 例以上、部位としては、顔、体幹、四肢それぞれ、5 例を得た。

② メチルセルロース培地によるコロニーアッセイ：また、上記の処理にて得られた細胞の個数をセルカウンターを用いてカウントし、 4.8×10^4 個の細胞を、sphere 形成培地 (組成は上記と同じ) に 1.5% の濃度でメチルセルロースを加えた培地にて再懸濁し、48well プレート (非接着性) に播種し、培養後 1 週間と 2 週間に、顕微鏡を用いて、well 内の sphere の個数をカウントし、年齢別、部位別に比較した。

③ ヒト SKPs の RT-PCR, real time PCR：浮遊培養により得られた SKPs から mRNA を採取し、Wnt-5a、Sca-1、Dermo-1、Snail、SHOX2、Slug、Sox9 などの多能性細胞のマーカー遺伝子について、その発現の有無や発現量の差異を PCR, real time PCR で確認した。

④ Sphere (SKPs) の免疫蛍光染色：浮遊培養により得られた SKPs を、PLL コートされたカバーガラス上に移動して培養することにより、カバーガラスに接着させる。2~3 時間経って接着が確認された後、4% パラホルムアルデヒドにて 1 時間固定し、Anti-NGF Receptor p75、Vimentin、Versican、Fibronectin、Nestin など、SKPs で特徴的に発現しているとされている遺伝子について、免疫蛍光染色を行い、発現の確認、比較を行った。

⑤ SKPs の骨、脂肪、神経分化：神経分化には NeuroCult NS-A Differentiation Medium (StemCell Technologies)、脂肪分化には、Differentiation Media BulletKits-Adipogenic (Cambrex)、骨分化には、Differentiation Media BulletKits-Osteogenic (Cambrex) を用いた。神経分化させた細胞は β III tubulin と、Nestin の免疫蛍光染色を行い分化を確認した。骨分化させた細胞は、アルカリフォスファターゼ染色を行い、脂肪分化させた細胞は Oil red O 染色を行い、それぞれ分化を確認した。

⑥ 骨、脂肪分化度の定量：年齢別、部位別に分化能に差異があるかを、骨分化と脂肪分化で検討した。骨分化は Sensolyte pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit (ANA SPE) で、脂肪分化には Serum Triglyceride Determination Kit (SIGMA 社) でトリグリセリドの定量を行い、年齢別、部位別に比較した。

⑦ 動物への移植による創傷治癒実験：ヌードマウスの背部に全層皮膚欠損創を作成し、周囲にシリコンリングを縫合固定、その中心

にヒトの顔から得られた SKPs の細胞懸濁液を移植し、テガダームで密閉。3 週間後に同部を切除し、組織学的検討を行った。

4. 研究成果

高齢者の皮膚からも SKPs が採取でき、脂肪、骨、神経に分化する能力を持っていた (図 1)。また、顔の皮膚からは、四肢や体幹と比較して効率よく SKPs を採取できた。高齢者においても、顔面の皮膚を用いれば、若年者と同等の効率で、SKPs を採取することができた。(図 2A, B)

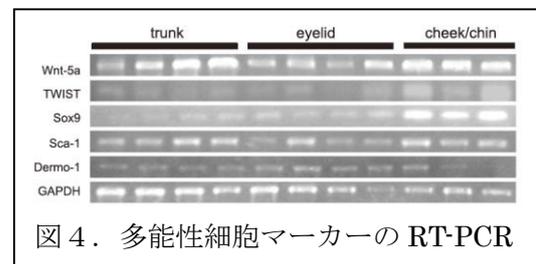
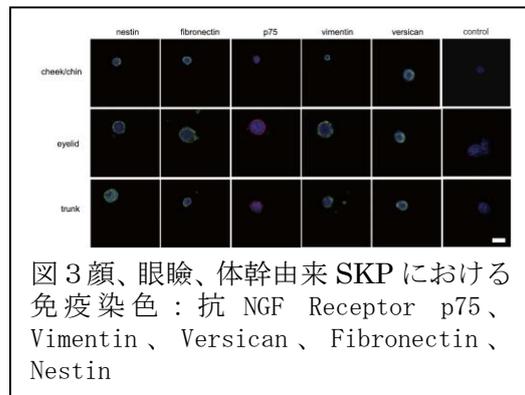
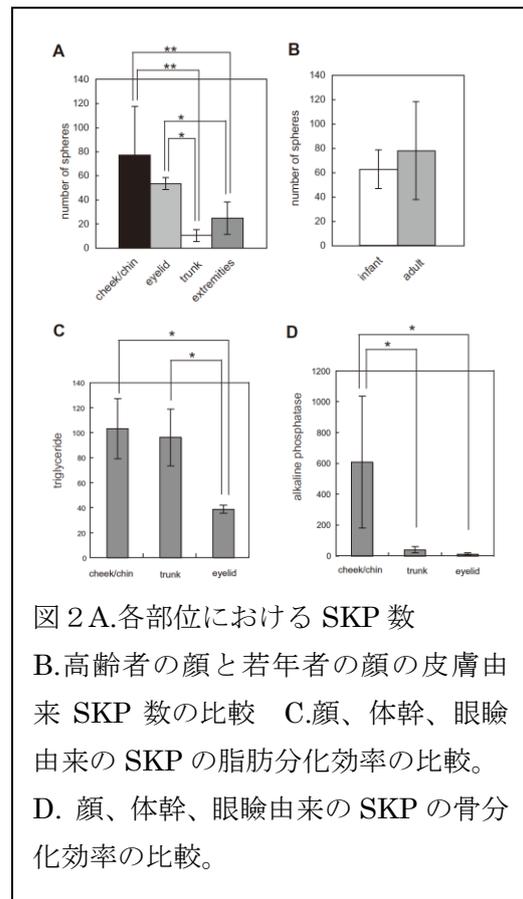
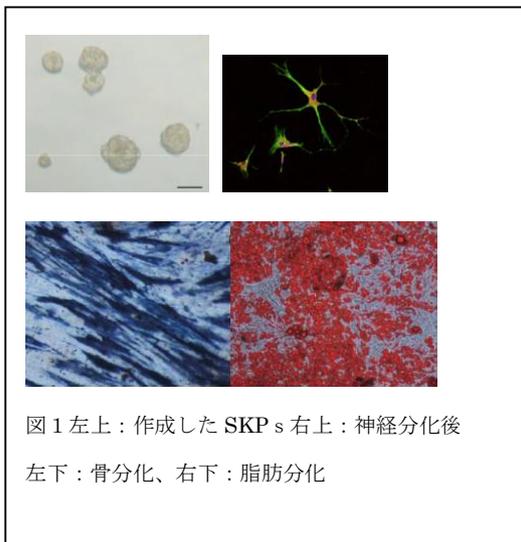
また、顔面の皮膚由来の SKPs は多部位由来の SKPs よりも、骨分化、脂肪分化能に優れることが判明した (図 2B, C)

免疫染色においては、NGF Receptor p75、Vimentin、Versican、Fibronectin、Nestin をいずれの部位由来の SKPs も発現し、採取部位間で違いは認められなかった。(図 3)

多能性細胞マーカーである Wnt-5a、Sca-1、Dermo-1、Snail、SHOX2、Slug、Sox9 はいずれの部位から採取した SKPs にも発現していたが、顔由来の SKPs では、sox9 が他の部位と比較して高く発現していた。(図 4)

この SKPs をヌードマウス創に移植すると、通常の線維芽細胞を移植した場合と比較し、早く創が閉鎖し、厚みのある真皮様組織が構築されることがわかった(図 4)

以上より、SKPs を採取する場合は、顔面皮膚が適しており、良好な創傷治癒を促進する可能性が示唆された。



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 1 件)

Yoshikawa K, Naitoh M, Kubota H, Ihisiko T, Aya R, Yamawaki S, and Suzuki S. Multipotent stem cells are effectively

collected from adult human cheek skin.
Biochemical and Biophysical Research
Communications. 2013, 431:104-110

〔学会発表〕（計 1 件）

吉川勝宇、内藤素子、石河利広、山脇聖子、綾
梨乃、久保田広志、鈴木茂彦
ヒト皮膚における Skin-derived Precursor
Cells の採取部位による相違
第 11 回日本再生医療学会総会 2012 年 6 月
12 日-14 日 横浜

〔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：
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

吉川 勝宇（医学研究科 助教 ）

研究者番号：10583156

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：