

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462732

研究課題名(和文) ストレッチ刺激が培養皮膚に及ぼす影響の解析～オーダーメイド皮膚の作成を目指して～

研究課題名(英文) The effect of stretch stimuli on human skin equivalents

研究代表者

長谷川 健二郎 (Hasegawa, Kenjiro)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：90197674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、世界初の3次元全層培養皮膚の伸展培養が可能なシステムを開発しており、今回このシステムを用いて伸展刺激が3次元全層培養皮膚に及ぼす影響の解析を行った。伸展刺激を加えた群で表皮層の厚みが増し、表皮分化マーカーであるinvolucrinの発現が増加しており、伸展刺激が表皮細胞の分化・増殖を促進することが示唆された。さらに基底膜構成タンパクであるLaminin 5, Collagen IV/ VIIの合成および基底層への沈着が増加し、基底膜におけるLamina densaの長さおよびヘミデスモソームの数も有意に増加しており、伸展刺激により、より発達した基底膜を形成することが分かった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed systems that enable application of stretch stimuli to HSEs during formation. Consequently, we found that in the ST group, the epidermal layer is thicker than NST group. Furthermore, synthesis of basement membrane proteins and deposition in the basal layer are increased; therefore, a more developed basement membrane is formed. Further research using this system may elucidate effects of stretching on skin properties and wound healing. In addition, application to an in vitro model of a hypertrophic scar is also expected.

研究分野：形成外科学

キーワード：メカノメディスン human skin equivalent 伸展培養 基底膜

1. 研究開始当初の背景

一般的に、関節の伸側などの伸展刺激が強く加わる部位では、皮膚の厚みが厚く、創治癒が遅延しやすく、肥厚性瘢痕やケロイドの発生率が高いことが知られている。しかし、現在、これらの原因はよく分かっていない。皮膚だけでなく我々の体を構成する細胞は常に何らかの機械刺激にさらされており、例えば、血管内皮細胞は血流による shear stress や、心拍に伴う血管壁の伸展刺激などを受けている。培養細胞に伸展刺激を加え、それに対する細胞の応答を解析する実験は1970年代から報告されはじめ、現在までに筋芽細胞、血管内皮細胞、軟骨細胞、気管支線維芽細胞など様々な細胞での実験が報告されている。細胞に伸展刺激を加えると、細胞内で生化学的なシグナル伝達が発生し、その結果、様々なタンパク発現の増加、遺伝子発現の変化や細胞の分化・増殖などの反応が起こることが分かっている。また、近年2次元培養だけでなく、3次元培養と組み合わせた例も報告されるようになってきている。

培養皮膚細胞に伸展刺激を加える実験も、数多く報告されている。しかし、我々が涉猟し得た限りではその全てが表皮角化細胞単独もしくは皮膚線維芽細胞単独での実験であった。線維芽細胞に関しては3次元培養での実験も認められたが、表皮細胞に関してはすべて培地内で単層培養された状態での実験であり、重層化、角化させた状態での実験はなかった。表皮角化細胞と皮膚線維芽細胞の間には複雑な interaction が存在することや、in-vivo では表皮細胞は重層化、角化した状態であることを考慮すると、これらの実験方法では、生体内での現象を再現するには不十分であると考えられた。そこで我々は、より in-vivo に近い条件で実験を行うために、これら2つの細胞を共培養して作成した human skin equivalents (HSEs) に伸展刺激を加える事を考案した。HSEs は Bell らによりラットの皮膚細胞を用いて開発された3次元培養皮膚モデルをベースにしており、現在では in vitro での薬剤安全性 37、経皮吸収試験など様々な解析に用いられるようになっている。今回の実験において我々は、HSEs を作成すると同時に伸展刺激を加える事ができるシステムを開発し、従来の方では観察できなかった伸展刺激が表皮の重層化、角化に及ぼす影響や、表皮層と真皮層の間に存在する基底膜へ及ぼす影響の解析を行った。

2. 研究の目的

近年、機械的刺激が培養皮膚細胞に及ぼす影響に関して数多くの報告がなされているが、これらはすべて単一細胞における研究である。実際の生体の皮膚においては多くの細胞が混在した状態で成育しており、我々は単一細胞での研究では不十分であると考えた。本研究の目的は、我々が開発した表皮角化細胞及び皮膚線維芽細胞からなる3次元培養

全層皮膚のストレッチシステムを用いて、単一細胞の培養では観察不能な基底膜の形成や、表皮細胞の重層化にストレッチ刺激が及ぼす影響を詳細に解析することである。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

Normal human dermal fibroblast (NB1RGB) を Riken Cell Bank (Tsukuba, Japan) から、Normal human epidermal keratinocyte (NHEK) を KURABO Industries (Osaka, Japan) から購入した。NB1RGB は 10% FBS 含有 MEM-培地 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) で継代培養し、3-8 継代目のものを用いた。NHEK は無血清の keratinocyte growth medium である HuMedia-KG2 (KURABO Industries) で継代培養し、2-4 継代目のものを用いた。

(2) Stretching chamber (Fig.1) 作成

この実験では、HSE を作成すると同時に伸展刺激を加えるためのストレッチチャンバーを作成した。既存のシリコン製チャンバー (Menicon, Aichi, Japan) の内側に、有孔性のシリコンシート (穴の直径 1 mm) を 3 枚用いて“雨樋 (gutter)” のような形に貼り合わせた。シリコンシートのサイズは底面用の 1 枚が 20 mm × 10 mm (length × width)、側面用の 2 枚が 20 mm × 4 mm (length × width) で、接着剤としてシリコンレジン (TSE3032; GE Toshiba Silicones, Tokyo, Japan) を使用した。“雨樋”の底面が、チャンバーの底面から 4 mm の高さに来るように配置した。シリコンシートの表面は疎水性であるため、使用前に真空プラズマ装置 (YHS-R; SAKIGAKE-Semiconductor, Kyoto, Japan) にて 90 秒プラズマ処理し、親水性に表面改質を行った。

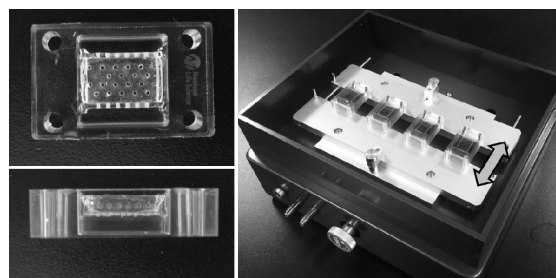


Fig. 1) Stretching chamber and stretch device
(left) Over and side view of the chamber.
(right) Overhead view of the stretch device. Arrow shows the stretching direction.

(3) Human skin equivalents (HSEs) 作成

Chamber に NB1RGB (1.0×10^5 cells/ml) を含む 0.2% Type-1 collagen 溶液 (Cellmatrix®; Nitta Gelatin, Osaka, Japan) を 600 μ l 注入した。これを CO₂ インキュベーター内で 37 °C 30 分静置してゲル化

させた後、chamber 内を 10%FBS 含有 MEM-培地で満たし、37 °C、5%CO₂ で 3 日間培養した。次に、chamber 内の MEM-培地を吸引し、HuMedia-KG2 を注入後 3 時間静置し、ゲル内の培地を置換した。置換後、chamber 内の HuMedia-KG2 を“雨樋”上縁のレベルまで吸引し、コラーゲンゲルの上に NHEK (1.0 × 10⁶ cells/ml)を懸濁した HuMedia-KG2 を 100 μl 注ぎ、5 時間静置した。NHEK がコラーゲンゲルに接着した後に HuMedia-KG2 を chamber 上縁まで注入した。この状態で 24 時間培養後、chamber 内の培地を MEM-培地と HuMedia-KG2 を 1:1 の割合で混合し、5%の FBS、1.8 mM の Ca²⁺、50 μg / ml の ascorbic acid を加えた培地(3-D culture medium)に変更した。48 時間培養後、3-D culture medium を交換する際に、液量を皮膚モデル表面が空気に暴露される位置まで下げ、表面を角化させた。これを更に 24 時間培養後、伸展刺激負荷を開始した。

(4) HSEs の伸展培養

Chamber 内部で HSEs を作成後、chamber を伸展装置 (STB-140; STREX, Osaka, Japan) に装着した。これに uniaxial な伸展刺激を周期的 (Stretch rate 10%, Stretch and return speed: 10%/sec, Hold time: 30 sec, Waiting time before next stretch: 30 sec) に 5 日間負荷した (Stretched sample: ST)。培地は伸展開始後 1 日目と 3 日目に交換した。並行して同じ chamber で作成し、伸展刺激を加えなかった HSEs を control として用いた (Non-stretch sample: NST)。

(5) 組織学的観察、蛍光免疫染色

5 日間の伸展刺激負荷後、chamber より HSEs を採取し、4%paraphormaldehyde で固定した。これをパラフィンに包埋し、4.5 μm の切片を作成、hematoxylin and eosin で染色した。

Immunofluorescence (IF) staining では、HSEs を包埋剤 (Tissue-Tek® O. C. T. Compound; Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan) 内に入れた後、液体窒素で凍結させ、クライオスタットで 7 μm の切片とした。切片は primary antibodies: anti-type IV collagen (ab6586; Abcam, Cambridge, UK)、anti-laminin 5 (ab102539; Abcam)、anti-type VII collagen (NU-01-C07; COSMO BIO, Tokyo, Japan) で incubate した。Secondary antibody は Alexa Fluor® 555 conjugated anti-rabbit IgG (A-21428; Abcam)、Alexa Fluor® 555 conjugated anti-mouse IgG (A-21427; Abcam) を用いた。Primary antibody を用いず、Secondary antibody のみで incubate したものを negative control とした。蛍光は box type fluorescence microscopy (FSX-100; Olympus, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。

(6) Immunoblotting

HSEs を 1 ml の 1% protease inhibitor cocktail (P2714; SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA)入り ice-cold TBS を入れた 1.5 ml tube に移した。余剰の培地を除去するためにこれを 4 °C、6,000 × g (8,500 rpm)で 5 分間遠心分離し、上清を破棄、1% protease inhibitor 入り lysis buffer (Pierce® RIPA Buffer; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) を各チューブ 300 μl 注入した。この cell lysate を sonicator (UX-050; MITSUI ELECTRIC, Chiba, Japan) で合計 35 秒間 sonicate し、4 °C、18,500 × g (15,000 rpm)で 30 分間遠心分離した。遠心分離後、上清を新しい tube に移し、protein assay kit (Pierce® BCA Protein Assay Kit; Thermo Fisher Scientific)及び microplate spectrophotometer (Multiskan™ GO; Thermo Fisher Scientific)を用いてタンパク定量を行った。およそ 10 μg/lane のタンパクを 7.5% Tris-HCl SDS polyacrylamide gel (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels; BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA)で電気泳動し、PVDF membrane (Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer Packs; BIO-RAD) に transfer した。この membrane を 5% skimmed milk in TBS containing 0.05% Tween20 (TBS-T) でブロッキングした後、primary antibodies: anti-type IV collagen (ab6586; Abcam)、anti-laminin 5 (ab102539; Abcam)、anti-type VII collagen (ab6312; Abcam) で incubate した。Secondary antibody は、HRP-conjugated anti-rabbit IgG (sc-2004; Santa Cruz Biotechnology, Monterey Bay, CA, USA)、HRP-conjugated anti-mouse IgG (sc-2005; Santa Cruz Biotechnology) を用いた。シグナルは chemiluminescence substrate (Luminata™ Forte Western HRP Substrate; Millipore, Bedford, MA, USA) を用いて、western blotting imager (C-DiGit™ Blot Scanner; LI-COR, Lincoln, NE, USA) で検出した。

(7) 透過型電子顕微鏡 (TEM)

HSEs を 2% paraphormaldehyde containing 2% glutaraldehyde で前固定し、さらに 4 °C、1 時間 1% osmium tetroxide で後固定を行った。Graded concentrations of ethanol (50 - 100%) を用いて脱水した後、標本を Epon 812 (Oken Shoji, Tokyo, Japan) に包埋し、ultramicrotome (EM UC6; Leica, Vienna, Austria) で超薄切片 (60-90 nm) を作成した。切片を 5% aqueous uranyl acetate and lead citrate で染色し、transmission electron microscopy (H-7650; Hitachi, Tokyo, Japan) にて 80 kV で観察した。

(8) Static analysis

HSEs の microscopical analysis と Immunoblotting assay のデータは mean values ± SD で表示した。NST 群と ST 群の

mean value の相違は Mann Whitney U test を行い、 $p < 0.05$ をもって有意差有りとした。

4. 研究成果

(1) ストレッチ刺激は表皮細胞の層化と角化を促進する。

肉眼的所見では、ST 群のほうが NST 群に比べ角質が厚く、透明性が低下していた。H.E. 染色切片で、dermal-epidermal junction 100 μm あたりの基底細胞の数をランダム 5 箇所計測し平均値を比較したところ、NST 群では 8.50 ± 1.83 cells (mean \pm SD, $n = 6$)、ST 群では 12.40 ± 1.03 cells (mean \pm SD, $n = 8$) と有意に増加していた ($p < 0.001$)。さらに、ランダム 10 箇所での表皮角化層の厚さを計測し平均値を比較したところ、NST 群では 27.2 ± 5.94 μm (mean \pm SD, $n = 6$) であったのに対し、ST 群では 46.8 ± 12.4 μm (mean \pm SD, $n = 8$) と有意に増加していた ($p < 0.05$)。また、表皮角化マーカーである involucrin の表皮層における発現が増加している所見が得られた。これより、伸展刺激を加える事で HSEs の表皮基底細胞の重層化、角化が促進されていることが示唆された。(Fig. 2)

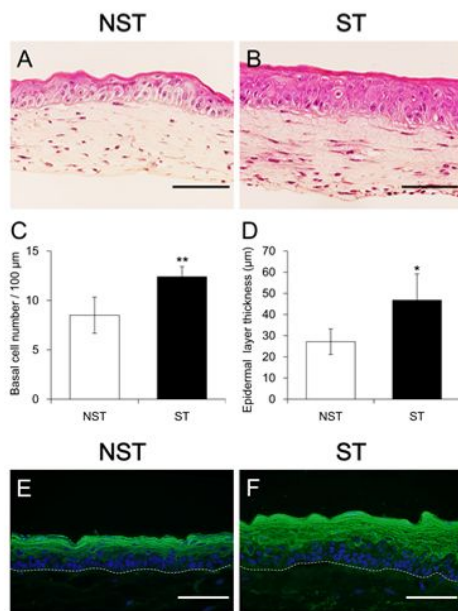


Fig. 2) Histologic analysis of HSEs. (A) Hematoxylin and eosin staining of the non-stretch sample (B) and of the stretched sample. Scale bar = 100 μm . (C and D) The number of basal cells per 100 μm of a dermal-epidermal junction and the thickness of the epidermal keratinized layer showing a significant increase in the ST group. ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$. (E and F) The expression of involucrin was significantly increased in the ST group. Dotted lines indicate basement membrane. Scale bar = 100 μm .

(2) ストレッチ刺激は基底膜タンパクの合成、沈着を促進する

laminin 5, collagen IV/ VII に対する免疫蛍光染色を行った切片の基底膜における蛍光強度をランダム 5 箇所計測し、その平均値を比較した。その結果、laminin 5 では ST 群で control basal value (NST: 1.00 ± 0.30 , mean \pm SD, $n = 8$) に比べ 1.45 ± 0.09 times (mean \pm SD, $n = 10$) ($p < 0.01$)、Collagen IV では ST 群で control basal value (NST: 1.00 ± 0.33 , mean \pm SD, $n = 10$) に比べ 1.56 ± 0.38 times (mean \pm SD, $n = 11$) ($p < 0.01$)、Collagen VII では ST 群で control basal value (NST: 1.00 ± 0.11 , mean \pm SD, $n = 6$) に比べ 1.41 ± 0.24 times (mean \pm SD, $n = 17$) ($p < 0.01$) と、いずれも有意に蛍光強度が増加していた (Fig. 3)。

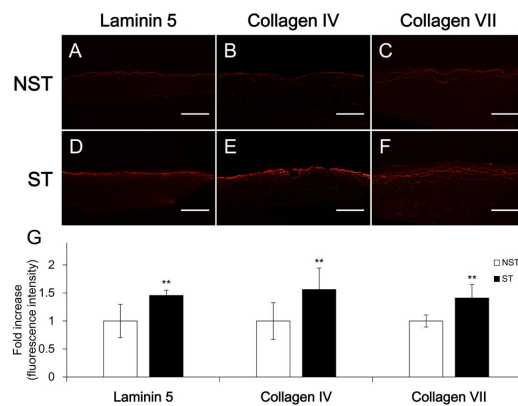


Fig. 3) Laminin 5 and collagen IV/VII expression analysis of HSEs by immunofluorescence staining. (A, B and C) Non-stretch sample. (D, E and F) Stretched sample. Scale bar = 500 μm . (G) Fluorescence intensity of NST group was taken as control and adjusted to the 1 value. Each histogram bar represents the mean value of the normalized and adjusted fluorescence intensity. All three proteins of ST group were significantly greater compared with NST group. ** $p < 0.01$.

また、immunoblotting で HSEs 1 枚あたりに含まれるこれらのタンパク量を計測し比較したところ、laminin 5 に関しては ST 群で control basal value (NST: 1.00 ± 0.10 , mean \pm SD, $n = 11$) に比べ 1.22 ± 0.12 times (mean \pm SD, $n = 11$) ($p < 0.0001$)、Collagen IV に関しては ST 群で control basal value (NST: 1.00 ± 0.07 , mean \pm SD, $n = 11$) に比べ 1.78 ± 0.48 times (mean \pm SD, $n = 11$) ($p < 0.0001$)、Collagen VII に関しては ST 群で control basal value (NST: 1.00 ± 0.24 , mean \pm SD, $n = 11$) に比べ 2.00 ± 0.67 times (mean \pm SD, $n = 11$) ($p < 0.0001$) と、いずれも有意に増加していた (Fig. 4)。

これらの結果から、伸展刺激が HSEs の皮膚細胞に作用し、基底膜構成タンパクの合成および、基底層への沈着が促進されていると考えられた。

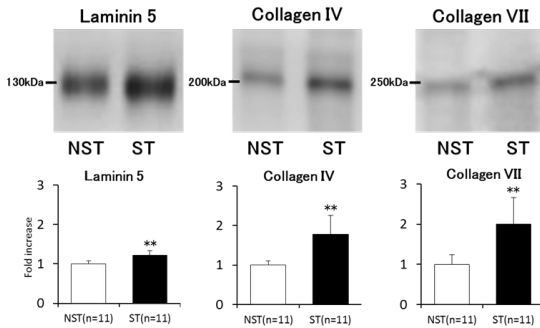


Fig.4) Semiquantitative analysis of Laminin 5 and collagen IV/VII by immunoblotting. The amounts of these proteins in a sheet of HSEs significantly increased in the ST group compared with NST group. Error bars = SD, **p < 0.01.

(3) ストレッチ刺激は基底膜構造を発達させる

TEMで観察したところ、ST群ではNST群に比べ優位に lamina densa 及び、ヘミデスモゾーム様の構造が増加している所見が認められた (Fig. 5)。これにより、伸展刺激を加えることで、より発達した基底膜構造となることが示唆された。

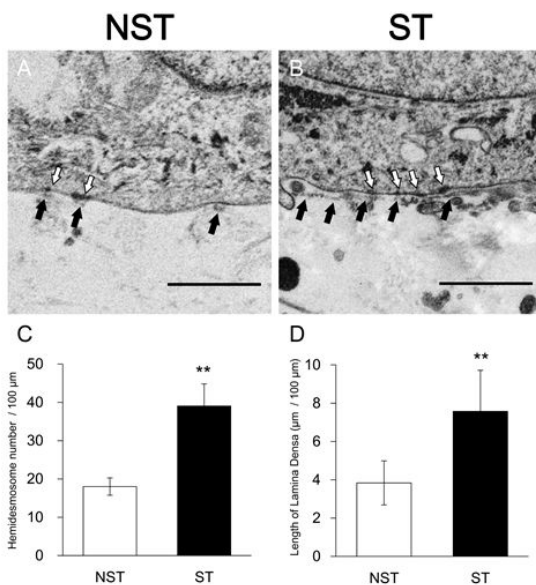


Fig. 5) TEM images of HSEs. (A) Non-stretch sample. (B) Stretched sample. White arrow: hemidesmosome. Black arrow: lamina densa. Scale bar = 1 μm. (C, D) In the ST group, the length of lamina densa and the number of hemidesmosomes per 100 μm of a dermal-epidermal junction were significantly greater than in the NST group. **p < 0.01

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)

Tokuyama E, Nagai Y, Takahashi K, Kimata Y1, Naruse K. : Mechanical Stretch on Human Skin Equivalents Increases the Epidermal Thickness and Develops the Basement Membrane. [PLoS One](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141989). 2015 Nov 3;10(11): e0141989.doi:10.1371/journal.pone.0141989.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 健二郎 (HASEGAWA, Kenjiro)
川崎医科大学 整形外科・教授
研究者番号: 90197674

(2) 研究分担者

成瀬 恵治 (NARUSE, Keiji)
岡山大学医歯薬学総合研究科
システム生理学・教授
研究者番号: 40252233

徳山 英二郎 (TOKUYAMA, Eijiro)
岡山大学病院 形成外科・助教
研究者番号: 90379785

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

高橋 賢 (TAKAHASHI, Ken)
岡山大学医歯薬学総合研究科 システム
生理学・助教
研究者番号: 50432258