

厚生科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

Stem cellを用いた人工皮膚の再構築に関する研究

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大河内 仁志

平成 13 (2001) 年 4 月

厚生科学研究費補助金研究報告書目次

目 次

| | |
|---------------------------------------|---|
| I. 総括研究報告 | |
| Stem cellを用いた人工皮膚の再構築に関する研究 | 1 |
| 大河内仁志 | |
| II. 分担研究報告 | |
| 1. ケラチノサイトのStem cellと真皮のコラーゲン産生に関する研究 | 3 |
| 橋本公二 | |
| 2. 真皮のStem cellに関する研究 | 6 |
| 玉木毅 | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 8 |

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
（総括・分担）研究報告書

Stem cellを用いた人工皮膚の再構築に関する研究

主任 研究者 大河内 仁志 国立国際医療センター研究所細胞組織再生研究部長

研究要旨 培養ケラチノサイトにおける $\beta 1$ インテグリン、 $\alpha 6$ インテグリンの発現を検討した。ケラチノサイトの単細胞培養のための培養液の検討を行った。ヒト毛乳頭細胞を培養し、ケラチノサイトとの相互作用を検討するための実験系を試作した。マウスES細胞から皮膚への分化・誘導におけるシグナル解析のための至適条件の検討を行った。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設における職名

橋本公二 愛媛大学 皮膚科教授
玉木毅 国立国際医療センター皮膚科医長

A. 研究目的

皮膚の再生医学研究の中心となるものはStem cellの同定とその性質を明らかにすることである。本研究では表皮、毛嚢、汗腺と真皮のStem cellの単離法や培養法、保存法を検討して皮膚を人工的に再構築することを目的とする。また皮膚の発生過程をES細胞から再現することが可能か否かを検討する。

B. 研究方法

まず培養ヒト正常ケラチノサイトにおいて今までStem cellのマーカースとして候補に挙げられている $\beta 1$ インテグリン、 $\alpha 6$ インテグリンの発現をフローサイトメトリーを用いて検討した。次に 培養ヒト正常ケラチノサイトにおいて96穴プレート上で限界希釈法を用いて単細胞培養に適した培養液の検討を行った。用いた培養液はKGM2, keratinocyte-SFM, defined keratinocyte-SFM, Epilife mediumなどである。培養皿のコ

ーティングにはコラーゲンタイプ1、コラーゲンタイプ4、フィブロネクチンなどを用いた。BrdUの取り込みとWST-1による細胞増殖のアッセイを施行した。発生段階でのケラチノサイトのシグナル伝達を検討するためにまずヒト正常ケラチノサイトにおいて表皮細胞因子(EGF)によるERK1/2のリン酸化の検討を免疫プロット法を用いて検討した。また マウスES細胞から皮膚への分化・誘導を研究するためにマウスES細胞を培養した。

(倫理面への配慮)

今回は市販されているヒト正常ケラチノサイトを購入したので、特に倫理面での配慮はしなかった。

C. 研究結果

培養ヒト正常ケラチノサイトにおいてほとんどの細胞(90%以上)が $\beta 1$ インテグリン、 $\alpha 6$ インテグリンを強く発現をしていた。培養ヒト正常ケラチノサイトにおいて限界希釈法を用いて単細胞培養に適した培養液の検討を行ったところ、短期間では培養液による細胞増殖の違いは顕著ではなかったが、1ヶ月以上長期培養においてはkeratinocyte-SFM, Epilife mediumが適していた。培養皿のコーティングには関してコラーゲンタイプ1、コラーゲンタイプ4が適していた。

ヒト正常ケラチノサイトにおいて表皮細胞因子(EGF)によるERK1/2のリン酸化

の検討を免疫プロット法を用いて検討したところ、濃度依存性にリン酸化がみられた。

マウスES細胞を培養し、embryoid bodyを経て、単層培養に移した。まだ何日目の培養でケラチノサイトに特異的なケラチンの発現が見られるかを検討中である。

D. 考察

培養ヒト正常ケラチノサイトから $\beta 1$ インテグリン、 $\alpha 6$ インテグリンをマーカーとしてStem cellを単離するのは難しい、ただStem cellが非常に多い可能性も残されているので、新しいマーカーの検討をしていきたいと考えている。ケラチノサイトの単細胞培養の至適条件を検討したが、カルシウム濃度やトリプシンの影響などを含めて本当にStem cellの培養に最適か否かをさらに検討する必要がある。今後セルソーターを使ったStem cellを単離・培養法を確立したい。マウスES細胞から皮膚への分化・誘導におけるシグナル解析のためのアッセイ系の確立のためにはさらなる至適条件の検討が必要である。

E. 結論

ケラチノサイトのStem cellの単離・培養には $\beta 1$ インテグリン、 $\alpha 6$ インテグリン以外の新しいマーカーを見つける必要がある。

F. 健康危険情報
特になし、

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 大河内仁志 再生医学と幹細胞について じっきょう 理科資料 49:1-5, 2001
- 2 Wakugawa M, Okochi H. et al: Elevated levels of eotaxin and IL-5 in blister fluid of bullous pemphigoid. Br J Dermatol 143:112-116, 2000

2. 学会発表

- 1 第26回日本熱傷学会総会・学術大会
2000年6月1-2日
帆足俊彦、大河内仁志ほか 中性子線・ γ 線による皮膚障害部位別・経時的変化について

- 2 International symposium on the criticality accident in Tokaimura
December 15, 2000
Hoashi T, Okochi H et al: Acute radiation syndrome caused by neutron and gamma irradiation from dermatological aspect

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
（分担）研究報告書

Stem cellを用いた人工皮膚の再構築に関する研究

分担 研究者 橋本公二 愛媛大学皮膚科 教授

研究要旨 正常皮膚と正常ヒトケラチノサイトの単層培養、重層培養、3次元培養において β 1インテグリン、 α 6インテグリン、CD71の発現をFACSを用いて検討した。またwhole mount labeling法を用いて正常皮膚における β 1インテグリン、 α 6インテグリン、CD71の発現を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

A. 研究目的

皮膚の再生医学研究の中心となるものはStem cellの同定とその性質を明らかにすることである。本研究では表皮、毛嚢のStem cellのマーカーの検索とStem cellの局在部位の検討を目的とする。

B. 研究方法

まず正常皮膚、培養ヒト正常ケラチノサイトの単層培養、重層培養、3次元培養において今までStem cellのマーカーとして候補に挙げられている β 1インテグリン、 α 6インテグリン、CD71の発現をFACSを用いて比較・検討した。次に正常皮膚をdispaseで表皮と真皮に分離したのち、whole mount labeling法を用いて β 1インテグリン、 α 6インテグリン、CD71の発現を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

（倫理面への配慮）

患者からinformed consentを得た上で手術時に採取した正常皮膚を使用した。

C. 研究結果

培養ヒト正常ケラチノサイトにおいて単層培養、重層培養のいずれにおいてもほとんどの細胞が β 1インテグリン、 α 6インテグリンを強く発現をしていた。一方正常皮膚と3次元培養皮膚においては2峰性の発現がみられ、 β 1インテグリンでは10-20%、 α 6インテグリンでは20-40%が強陽性であった。CD71に関しては染色が十分でなく、解析に至らなかった。

共焦点レーザー顕微鏡による観察結果は正常皮膚における β 1インテグリンの発現は角化細胞全体に陽性ではなく、クラスターを形成していた。3次元構築画像で解析した結果、クラスターは真皮乳頭層に一致していた。

D 考察

正常皮膚と形態的に似ている3次元培養皮膚においては β 1インテグリン、 α 6インテグリンが2峰性の分布を示し、Stem cellのマーカーとして使えるが、培養ケラチノサイトにおいてはほとんどの細胞が発現しているためStem cellの単離に使用するのは難しい。

真皮乳頭層には以前よりslow cyclingの細胞の存在が指摘されていたが、 β 1インテグリンのクラスター部位と一致しておりStem cellの局在部位と考えられる。さらに毛嚢バルジ領域の詳細な解析も必要と思われた。

E. 結論

ケラチノサイトのStem cellの単離・培養には新しいマーカーを見つける必要があるが、正常皮膚においては β 1インテグリンのクラスター部位にStem cellが存在する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Shirakata Y, Komurasaki T, Toyoda H, Hanakawa Y, Yamasaki K, Tokumaru S, Sayama K, Hashimoto K. Epiregulin, a novel member of epidermal growth factor family, is an autocrine growth factor in normal human keratinocytes. **J Biol Chem** 275:5748-5753, 2000

Hanakawa Y, Amagai M, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K. Different effects of dominant negative mutants of desmocollin and desmoglein on the cell-cell adhesion of keratinocytes. **J Cell Sci**. 113:1803-11, 2000

Tokumaru S, Higashiyama S, Endo T, Nakagawa T, Miyagawa J, Yamamori K, Hanakawa Y.

Ohmoto H, Yoshino K, Shirakata Y, Matsuzawa Y, Hashimoto K, Taniguchi N. Ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands is required for keratinocyte migration in cutaneous wound healing. **J Cell Biol**. 151:209-219, 2000

Sayama K, Hanakawa Y, Shirakata Y, Yamasaki K, Sawada Y, Sun L, Yamanishi K, Ichijo H.

Hashimoto K. Apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) is an intracellular inducer of

keratinocyte differentiation. **J Biol Chem** 276:999-1004, 2001

白方裕司、橋本公二

培養表皮移植による皮膚疾患の治療
形成外科 43:563-569, 2000

2. 学会発表

K Yamasaki, Y Hanakawa, S Tokumaru, N Toriu, M Tohyama, Y Shirakata,

K Sayama and K Hashimoto: SOCS1/JAB and SOCS3/CIS3 are major negative regulators in the STAT-signaling pathway of normal human keratinocytes.

May 10, 2000 61st Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology, Chicago, USA

M Tohyama, Y Shirakata, K Yamasaki, Y Hanakawa, K Sayama and K Hashimoto: Keratinocyte-derived MIP-3 α is an essential chemokine for recruiting immature dendritic cells.

May 10, 2000 61st Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology, Chicago, USA

K Sayama, Y Hanakawa, Y Shirakata, K Yamasaki, K Yamanishi, Y Sawada,

H Ichijo and K Hashimoto: Apoptosis signal-regulating kinase 1, a MAP kinase kinase kinase, is an intracellular inducer of keratinocyte differentiation.

May 10, 2000 61st Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology, Chicago, USA

S Tokumaru, Y Hanakawa, K Yamasaki, Y Shirakata, K Sayama and K Hashimoto: EGFR ligand/EGFR-induced keratinocyte migration requires activation of Stat3, but not Stat1.

May 10, 2000 61st Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology, Chicago, USA

Y Shirakata, K Yamasaki, S Tokumaru, Y Hanakawa and K Hashimoto: Differential expression of Smad6 and Smad7 induced by TGF- β , activin and BMP in human keratinocytes.

May 10, 2000 61st Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology, Chicago, USA

N Toriu, Y Shirakata, S Tokumaru, K Yamasaki, Y Hanakawa and K Hashimoto: HB-EGF and epiregulin are over

expressed in psoriatic epidermis.
May 10, 2000 61st Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology, Chicago, USA

山崎研志、花川 靖、徳丸 晶、鳥生信子、白方裕司、橋本公二：SOCS/CISは、ヒト表皮角化細胞内のサイトカイン-STAT シグナル伝達を調節する。日本研究皮膚科学会第 25 回年次学術大会、2000 年 9 月 1 日、岐阜市

徳丸 晶、花川 靖、山崎研志、白方裕司、佐山浩二、橋本公二：HB-EGF によるヒト表皮ケラチノサイトの遊走には Stat3 活性化が関与している。日本研究皮膚科学会第 25 回年次学術大会、2000 年 9 月 1 日、岐阜市

佐山浩二、花川 靖、白方裕司、山崎研志、橋本公二：SAK1 によるケラチノサイトの分化誘導シグナルは p38 MAP kinase を介するが、protein kinase C と NF- κ B は関与しない。日本研究皮膚科学会第 25 回年次学術大会、2000 年 9 月 1 日、岐阜市

八幡陽子、村上信司、橋本公二：共焦点レーザー顕微鏡と培養ヒト皮膚微小血管内皮細胞(HDMEC)を用いた新たな微量ヒスタミン測定システムの開発。日本研究皮膚科学会第 25 回年次学術大会、2000 年 9 月 1 日、岐阜市

藤山幹子、白方裕司、山崎研志、鳥生信子、佐山浩二、橋本公二：重層化したヒト表皮角化細胞が TNF- α 刺激により産生する MIP-3 α によりランゲルハンス細胞は表皮内へ遊走する。日本研究皮膚科学会第 25 回年次学術大会、2000 年 9 月 1 日、岐阜市

花川 靖、天谷雅行、白方裕司、橋本公二：Desmoglein1 と desmoglein3 の dominant negative mutant の細胞接着への影響の違い。日本研究皮膚科学会第 25 回年次学術大会、2000 年 9 月 1 日、岐阜市

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
（分担）研究報告書

Stem cellを用いた人工皮膚の再構築に関する研究

分担 研究者 玉木 毅 国立国際医療センター皮膚科 医長

研究要旨 末梢血から繊維芽細胞に分化する細胞の単離を試みた。ヒト毛乳頭細胞を培養し、ケラチノサイトとの相互作用を検討するための実験系を試作した。

A. 研究目的

皮膚の再生を考えると表皮のみが注目されやすいが、表皮は外胚葉由来であり、真皮は中胚葉由来である。真皮の中心的役割は繊維芽細胞が担っている。末梢血から繊維芽細胞に分化する細胞の単離を試みるとともに、ヒト毛乳頭細胞を培養し、ケラチノサイトとの相互作用を検討するための実験系を作成することを目的とする。

B. 研究方法

正常人よりヘパリン採血（20ml）し、Ficoll法にてPBMCを採取し、CD13, CD34, CD45などに対する抗体を用いて繊維芽細胞のStem cellの同定を試みた。

通常皮膚の3次元培養に使われる方法を応用する。タイプ1コラーゲンで作成したゲルの中央に3mmの穴をあけ、あらかじめヒト毛乳頭細胞を別のタイプ1コラーゲンゲル内に播種しておいたものを注入する。その上にヒト正常ケラチノサイトを播種し、培養して毛の分化が生じるか否かを検討する。

（倫理面への配慮）

正常人より同意を得た上で採血した。
ヒト毛乳頭細胞とヒト正常ケラチノサイ

トは市販されているものを使用したもので特に倫理面の配慮はしなかった。

C. 研究結果

末梢血からCD13, CD34, CD45 すべて陽性の細胞をえることはできなかった。

毛乳頭細胞と表皮ケラチノサイトの相互作用をみるための実験系を試作したが、毛の分化はみられなかった。

D. 考察

末梢血からCD13, CD34, CD45 すべて陽性の細胞をえることはできなかった理由としてpopulationが非常に少ないためにもっと多量の血液からでないとは分離できない可能性が考えられる。もしそうだとすれば、結局末梢血幹細胞移植と同じ設備が必要となるので、繊維芽細胞だけの単離のためには実用性の点から難がある。骨髄間葉系細胞からの繊維芽細胞分化の可能性を探る方が現実的であると考えられた。

ヒト毛乳頭細胞とケラチノサイトを用いて毛が誘導されるか否かを検討したが、単なる共培養では成功しなかった。ケラチノサイトの分化を脱メチル化剤などを用いてリセットする必要があると考えられる。あるいは毛嚢バルジ領域の幹細胞を単離できれば毛の誘導が可能となるかもしれない。さらに毛乳頭細胞を球状に培養するテクニックを使ってより生体に近い条件を作っていくことが重要と思われる。そのためには血管系の関与も必要と思われ、今回の実験系はまだ改善の余地が残されていると考えられる。

E. 結論

真皮の重要な成分である繊維芽細胞の誘導には至らず、ケラチノサイトと毛乳頭細胞から毛を誘導する試みは更なる改善が必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yazawa N, Tamaki T et al :Serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 in patients with systemic sclerosis. J Am Acad Dermatol 42:70-75, 2000

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---------------------------------|---|-------------------|-----|---------|------|
| 大河内仁志 | 再生医学と幹細胞について | じっきょう 理科資料 | 49 | 1-5 | 2001 |
| Wakugawa M, Okochi H. et al. | Elevated levels of e otaxin and IL-5 in b lister fluid of bull ous pemphigoid. | Br J Dermat ol | 143 | 112-116 | 2000 |

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|---|---------------------|-----|-----------|------|
| Shirakata Y. <u>Hashimoto K</u> et al | Epiregulin, a novel member of epidermal growth factor family, is an autocrine growth factor in normal human keratinocytes. | J Biol Chem | 275 | 5748-5753 | 2000 |
| Hanakawa Y. Amagai M. Shirakata Y. Sayama K. <u>Hashimoto K</u> | Different effects of dominant negative mutants of desmocollin and desmoglein on the cell-cell adhesion of keratinocytes. | J Cell Sci. | 113 | 1803-11 | 2000 |
| Tokumaru S. Higashiya S. Endo T. Nalagawa T. Miyagawa J. Yamamori K. Hanakawa Y. Ohmoto H. <u>Hashimoto K.</u> Taniguchi N | Extracellular domain shedding of epidermal growth factor receptor ligands is required for keratinocyte migration in cutaneous wound healing | J Cell Biol. | 151 | 209-219 | 2000 |
| Sayama K. Hanakawa Y. Shirakata Y. Yamasaki K. Sawada Y. Sun L. Yamanishi K. Ichijo H. <u>Hashimoto K</u> | Apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) is an intracellular inducer of keratinocyte differentiation | J Biol Chem | 276 | 999-1004 | 2001 |
| 白方裕司、 <u>橋本公三</u> | 培養表皮移植による皮膚疾患の治療 | 形成外科 | 43 | 563-569 | 2000 |

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---------------------------|---|--------------------|----|-------|------|
| Yazawa N, Tamaki T, et al | Serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 in patients with systemic sclerosis. | J Am Acad Dermatol | 42 | 70-75 | 2000 |