

200/0484

厚生科学研究研究費補助金

ヒゲム・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 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大河内 仁志

平成 14 (2002) 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 |
| ケチサバと毛嚢のStem cellの単離・培養 | |
| 大河内 仁志 | |

II. 分担研究報告

| | |
|--------------------------|---|
| 1. ケチサバと汗腺のStem cellの研究と | |
| 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
ケラチノサイトと毛囊のStem cellの単離培養

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医学研究部長

研究要旨 正常ヒトケラチノサイトの低密度培養にはケラチノサイトの培養上清の添加が必要なことを明らかにした。 $\alpha 6$ インテグリンないし $\beta 1$ インテグリンを強発現している細胞をセルソーターを用いて、単離・培養することに成功し、feeder layer なしで1個から2～3万個にまで増殖させることができた。

A 研究目的

ケラチノサイトの幹細胞については生物学的にまだ不明な点が多い。幹細胞マーカーによるセルソーティングにてケラチノサイトの幹細胞をfeeder layer なしで単離・培養することと牛由来材料を用いない培養液の検討を目的とする。またマウスES細胞から表皮細胞への分化過程を検討する。さらに付属器の誘導を試みる。

B. 研究方法

1 正常ヒトケラチノサイトの低密度培養

新生児包皮由来ケラチノサイトの培養には無血清培地（KGM-2）を用いた。まず低密度培養を可能にするために、培養液の検討を行い、ケラチノサイトの培養上清を新鮮な培養液に25%, 50%, 75%加えて96穴プレート上で限界希釈法により細胞増殖を比較検討した。

2 ケラチノサイトの単細胞培養

ベックマン・コールター社のセルソーター（EPICS ALTRA）を用い、シース液として氷冷した滅菌PBSを使用し、コラーゲンIVでコートした96穴プレートに $\alpha 6$ インテグリンないし $\beta 1$ インテグリンに対する蛍光抗体を用いて強発現している細胞を1個ずつ播種した。その後の培養経過を倒立顕微鏡で経時的に観察した。

3 マウスES細胞から表皮細胞へ分化過程の検討

連続的な分化過程においてある段階を蛍光発色にて検出するために分化特異的ケラチンに注目した。ケラチン19プロモーターをEGFP発現ベクターに組み込んだものとケラチン14プロモーターをDs-Red発現ベクターに組み込んだものをマウスES細胞にトランスフェクトし、発色した細胞をセルソーターで分取する。

4 インテグリンによるシグナル伝達と幹細胞の維持機構

HaCat細胞を用いて幹細胞マーカーの候補である $\beta 1$ インテグリン強発現ラインを樹立した。ERK, PI3K, Gab1について検討した。

（倫理面への配慮）

今回は市販されている正常ヒトケラチノサイトや細胞株を使用したため、倫理面が問題となることはなかった。

C. 研究結果

ケラチノサイトの培養上清を25%, 50%, 75%加えたものの方が新鮮な培養液のみの場合よりも低密度で増殖できることが示された。通常の培養条件では96穴1wellに100個以下の場合、増殖しないのに対して、特に50%, 75%加えたものでは1wellに5～10個程度の細胞からコンフルエントになるまで増殖できた。培養上清中の細胞成長

因子等を ELISA 法を用いて検討したが、新鮮な培養液と有意差のあるものは見いだせなかった。
以後のセルソーターの実験には 50% 培養上清を加えたものを使用した。
 $\alpha 6$ インテグリンないし $\beta 1$ インテグリンを強発現（上位 10%）している細胞は 1 個からコンフルエントになるまで（約 2-3 万個）増殖することが可能であった。1 日に 1 回細胞分裂し、2-3 週間でコンフルエントになった。1 週間目ころから角化した細胞が出現し、10 日以降には樹状突起をもった神経細胞様のものも出現した。
ケラチン 19, 14 の蛍光発現ベクターを作成し、エレクトロポレーション法やマイクロインジェクション法を試みているが、マウス ES 細胞への導入効率が悪くまだ満足のいく結果は得られていない。
 $\beta 1$ インテグリン強発現ラインにおいては ERK および PI3K の活性の上昇が認められ、Gab1 によって調節されていることが明らかになった。

D. 考察

ケラチノサイトの単細胞からの培養法は feeder layer を用いてコロニーを形成させたものが報告されているが、feeder layer なしで成功したのは今回が初めてと思われる。ケラチノサイトの幹細胞マーカーとして $\alpha 6$ インテグリンないし $\beta 1$ インテグリンが知られているが、セルソーターによる単離は細胞ダメージをうけてしまうために難しいとされていた。我々は培養上清を添加することにより、低密度培養を可能にし、細胞ダメージを最小限にするソーティング法により、増殖能力の強い細胞を 1 個ずつ分離・培養することができたと考えた。
培養上清中に存在するケラチノサイトの生存と増殖に関与する因子はケラチノサイト自身が産生しているものであり、それが何であるかを追求することは意義あることと思われる。今後 differential display 法などにより検討していきたいと考えている。また 1 個から 2-3 万個に増殖する過程で分化した細

胞が出現しており、一部樹状突起をもつ神経細胞様の細胞が出現したのも興味深い。対称分裂と非対称分裂のメカニズムを考える上で重要な点と思われると同時に、ケラチノサイトの未分化状態維持機構の解明につながる可能性を秘めていると思われる。インテグリンによるシグナル伝達をさらに検討することで未分化維持に必要なシグナルの解明も進むものと期待される。

E. 結論

feeder layer なしで正常ヒトケラチノサイトを 1 個からコンフルエント（2-3 万個）になるまで増殖させることに成功し、自己の培養上清の中に生存と増殖に重要な因子が含まれていることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1 論文発表

Yano, S., Okochi, H., Tamaki, K.: Analysis of the Expression of Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen on the Peripheral Blood and Cutaneous Lymphocytes of Alopecia Areata Patients. *Acta Derm Venereol* in press

2 学会発表

Okochi H: keratinocyte stem cell culture without using feeder layer after single cell sorting by $\alpha 6$ integrin. Timberline Symposium 2002 2002 年 2 月 3 日ポートランド（米国）

H 知的所有権の出願・取得状況

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

ケラチノサイトと汗腺のStem cellの研究と真皮のコラーゲン産性に関する研究

分担研究者 橋本 公二 愛媛大学医学部皮膚科教授

研究要旨 培養皮膚移植の安全性を向上させる目的で、牛由来材料を用いない完全無血清角化細胞培養法を確立した。さらにこの培養法で分離した角化細胞を用いて三次元培養皮膚を作製し、組織学的に検討し良好な結果を得た。この三次元培養皮膚をマウスへ移植し、*in vivo*においても良好に構築されていることを確認した。

A 研究目的

培養皮膚移植は患者自身の細胞を用いる自己移植と他人の細胞を用いる同種移植に分類され、自己移植は主として **stem cell** 移植を、同種移植は **biological dressing** 効果を目的として使用される。難治性皮膚潰瘍に対しては **stem cell** の生着が重視される自己培養皮膚移植が適している。しかし、培養皮膚移植は必ずしも、臨床的に普及しているとは言えない。その理由として、1) 現在表皮細胞培養法として普及している Green らの方法は牛胎児血清を使用し、プリオン感染の危険性が懸念されること、2) 毛嚢、汗腺などの皮膚付属器あるいは血管を備えた人工培養皮膚が開発されていないこと、3) 広く臨床応用を可能にするために必須である低コストかつ簡便な培養皮膚の保存法および輸送法の開発が不十分であることなどが挙げられる。そこで、これらの研究、開発の基礎となる皮膚構成細胞の **stem cell** の基礎的研究として、牛由来材料を使用しない培養法の確立、ならびに **Stem cell** に適した培養液の開発を目的とする。

B. 研究方法

1 牛由来材料を用いない培養法の確立
現在の培養表皮の作製法は牛胎児血清を使用する Green らの方法が主に用いられており、クロイツフェルト・ヤコブ病の原因がプリオンであると同定された状況では、牛由来材料を用いない培養法の確

立が急務である。MCDB153 type II 無血清培地のアミノ酸、微量分子の配合量を検討し、さらに添加因子を種々組み合わせることで完全無血清培養法を確立する。培地の可否についてはすでに保存している角化細胞を用いる系と初代培養の系の両方で検討した。

2 完全無血清にて培養した角化細胞を用いた三次元培養皮膚の作製

三次元培養皮膚は真皮成分に相当するコラーゲンゲルと表皮を組み合わせた機能的に最もヒト皮膚に近い培養皮膚である。この三次元培養皮膚が完全無血清で作製できるかについて上記方法を用いて検討した。

3 皮膚構成細胞のstem cellの研究

皮膚構成細胞の **stem cell** の研究が培養皮膚開発に必須であることは当然であるが、まず表皮の幹細胞を同定し、その特徴を明らかにするとともに、幹細胞を効率よく培養する方法を確立する。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮として、本研究は生検ヒト皮膚を用いるが、試料等の保存及び使用方法について十分な説明を行った上で、自由意志に基づく文書による同意（インフォームド・コンセント）を得た上で行った。

C. 研究結果

MCDB153 type II 培地のアミノ酸含有を変更した培地を作製した。添加因子として EGF, PGE2, transferrin, IGF-1 を用い、それぞれ最適の濃度を決定し、カルシウム濃度を変更した。保存培養角化細胞を用いて細胞の増殖能を検討したところ、従来の培地と同等ないしはそれ以上の増殖が認められた。正常ヒト皮膚から初代培養を行ったところ、同程度の細胞増殖が認められ、さらに継代を繰り返して細胞増殖能を検討したところ、7-10代の継代が可能であった。

新規無血清培養法で培養した角化細胞を用いて三次元皮膚を作製し、組織学的に完成度を比較検討した。従来の方法とくらべ何ら遜色のない三次元培養皮膚が完成した。

幹細胞の同定については抗体を用いる方法、ヘキスト 33343 染色を用いる方法が他の臓器の幹細胞研究において用いられている。角化細胞においては b1 インテグリン、a6 インテグリンが細胞膜上のマーカーとして候補に挙げられている。我々は抗体以外の方法、すなわちヘキスト 33342 染色で陰性の細胞、いわゆる *side population* に幹細胞が含まれているかについて検討した。マウス表皮をトリプシン処理し、ヘキスト 33342 で 90 分染色し自動細胞分取装置を用いて検討したところ、角化細胞においても *side population* の存在が示唆された。この細胞を分取し細胞培養を試みたが、*viability* の問題が生じ、以後の検討は不可能であった。

D. 考察

従来の無血清培養法を改良し、完全無血清培養法を確立した。この培養法は培養液の見直しと添加因子の調製を繰り返すことで達成できたと考えられる。また、この培養法を用いて培養した角化細胞は従来の方法で分離した角化細胞と同様に、良好な三次元皮膚を形成しうることが示された。今回の培養法では角化細胞の増殖は比較的早く、臨床応用に関して有利であると思われる。細胞の増殖が早い分、分化の形態を呈する細胞の比率も多少多い印象を得ており、今後さらなる培養液の改良が望まれる。今回の研究では、角化細胞全体でその増殖能を比較

検討したが、今後は幹細胞を特異的に増殖させる培養液の開発、すなわち、目的とする細胞に応じた培養液の使用等を考慮し、培養液の開発を進めてゆくべきと考えられる。

E. 結論

角化細胞の完全無血清培養法を確立することに成功した。この成果は、今後の培養皮膚の臨床応用に関しては多大な功績であると思われる。すなわち、感染症の問題が培養皮膚の作製時にはつねにつきまといっているが、完全無血清培養法による培養皮膚を使用する限りにおいては、安全であることが証明されると思われる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1 論文発表

1. Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, Komiya S, Kosai K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Nagata K, Yoshimura A. Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 2001 108(12):1781-8

2. Li G, Schaidler H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Herlyn M. Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene* 2001 6;20(56):8125-35

3. Hamada K, Shinomiya H, Asano Y, Kihana T, Iwamoto M, Hanakawa Y, Hashimoto K, Hirose S, Kyo S, Ito M. Molecular cloning of human squamous cell carcinoma antigen 1 gene and characterization of its promoter. *Biochim Biophys Acta* 2001 19:1518(1-2):124-31

4. Hamada K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Iwamoto M, Kihana T, Hirose S, Nakamura M, Ito M. Gene expression of human squamous cell carcinoma antigens 1 and 2 in human cell lines. *Oncol Rep* 2001 ;8 (2):347-54

5. Tohyama M, Shirakara Y, Yamasaki K, Sayama K, Hashimoto K. Differentiated keratinocytes are responsible for TNF- α regulated production of macrophage inflammatory protein 3 α /CCL20, a potent chemokine for Langerhans cells. *J Dermatol Sci* 2001;27(2):130-9

6. Sayama K, Hanakawa Y, Shirakata Y, Yamasaki K, Sawada Y, Sun L, Yamaniishi 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

7. 白方裕司、鳥生信子、橋本公二：表皮における β 1インテグリンの発現 *Excerpta Medica* 4:4, 2001

8. 白方裕司、橋本公二：培養表皮シート自家移植による劣性栄養障害型表皮水疱症の治療 *Excerpta Medica* 4:4, 2001
2学会発表

1. Y Shirakata, H Oura, K Yano, P Velasco, L Riccardi, M Streit, K. Hashimoto, and M Detmar: Inverse regulation of the angiogenesis factor VEGF and the angiogenesis inhibitors thrombospondin-1 and TSP-2 in human epidermal keratinocytes. 62nd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology May 13, 2001 at Washington DC, USA

2. Y. Yahata, S. Tokumaru, Y. Hanakawa, K. Yamasaki, Y. Shirakata, K. Hashimoto: Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 is essential for endothelial cell migration induced by basic FGF: STAT3 phosphorylation is involved in tube formation. 62nd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology May 13, 2001 at Washington DC, USA

3. K. Sayama, K. Yamasaki, Y. Hanakawa, Y. Shirakata, N. Toriu, S. Tokumaru, K. Hashimoto: Phosphatidylinositol 3-kinase regulates early phase keratinocyte differentiation. 62nd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology May 13, 2001 at Washington DC, USA

4. K. Yamasaki, N. Toriu, Y. Hanakawa, Y. Shirakata, S. Tokumaru, Y. Yahata, M. Tohyama, K. Sayama, K. Hashimoto: Keratinocyte growth inhibition by high doses of epidermal growth factor is mediated through autoinduction of transforming growth factor beta: Negative feedback mechanism of keratinocyte growth. 62nd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology May 13, 2001 at Washington DC, USA

5. N. Toriu, Y. Hanakawa, Y. Shirakata, K. Hashimoto: Exogenous gene expression in skin-equivalent keratinocytes using a Cre/loxP adenovirus system. 62nd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology May 13, 2001 at Washington DC, USA

6. Y. Shirakata, S. Tokumaru, K. Yamasaki, K. Sayama, K. Hashimoto: BIOLOGICAL DRESSING EFFECT OF CULTURED EPIDERMAL SHEETS IS MEDIATED BY THE PRODUCTION OF VEGF AND TGF- β . 26th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology Sep 7, 2001 at Ehime, Japan

7. K. Midorikawa, Y. Hanakawa, Y. Shirakata, K. Sayama, S. Tokumaru, K. Yamasaki, K. Hashimoto: CRE-LOXP ADENOVIRUS-MEDIATED FOREIGN GENE EXPRESSION IN SKIN EQUIVALENT KERATINOCYTES. 26th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology Sep 7, 2001 at Ehime, Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況
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

真皮のStem cell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 マウス皮膚から神経細胞や脂肪細胞、筋細胞に分化する能力を持った多能性幹細胞を分離・培養することに成功した。体幹部の皮膚より耳介部からの方が培養しやすいが、抜毛により体幹部からも培養できるようになった。

A. 研究目的

皮膚に存在する多能性幹細胞が部位によって異なるか否かを検討する。皮膚由来幹細胞の分化・増殖を制御する因子について検討する。

B. 研究方法

マウスの背腹部と耳介とにおいて皮膚幹細胞のin vitroでの増殖能の違いを浮遊した細胞集団の形成をみるスフェア法で検討した。次に皮膚細胞由来スフェアを分化条件下で培養した。皮膚由来幹細胞のin vitroでの増殖に対する各種成長因子の作用をスフェア法により検討した。TGFβ存在下、非存在下で形成された1次スフェア由来細胞に含有される幹細胞の割合を明らかにするために2次スフェア形成率について検討した。神経成長促進剤であるB27 supplementとN2 supplementの培地添加による皮膚由来幹細胞のスフェア形成の違いを検討した。

(倫理面への配慮)

今回はマウスを用いた実験であり、実験動物の取り扱いには研究所の規定に従って行ったので、特に倫理面での配慮は問題にならないと思われた。

C. 研究結果

当初耳介皮膚の方が体幹部の皮膚よりスフェア形成能および増殖能が高いことが示されたが、抜毛により差異はなくなったため、毛の存在が影響することが明らかになった。

血清添加による分化条件では形態学的に明らかな脂肪細胞や平滑筋細胞は認められなかったが、Oil red O染色にて脂肪滴の存在が証明され、平滑筋マーカーであるSMA染色陽性の細胞が検出できた。また神経細胞様の突起を伸ばす細胞が認められ、免疫染色を行ったところ神経上皮細胞マーカーのNestinや分化した神経細胞マーカーのNeuro filament 160の発現が確認された。

各種成長因子の検討においてはbFGF+TGFβ共存下では、今までに報告があるbFGF+EGF共存下と比較して1次スフェアの形成・増殖が促進されることが明らかになった。1次スフェアをTGFβ共存下で形成させた場合、2次スフェアの形成率はbFGF単独で1次スフェアを形成させた場合と比較して約6.4倍であり、TGFβ共存下では幹細胞の対称分裂が促進されたと考えられた。

N2 supplement添加ではスフェアは形成されなかったのに対しB27 supplementではスフェアの形成が促進された。

D. 考察

皮膚由来の多能性幹細胞はマウス皮膚においては特に部位による違いはなさそうである。培養時に毛の存在が悪影響を及ぼしていることが判明した。また分化条件にて神経細胞のみならず、脂肪細胞や平滑筋細胞への分化が証明されたが、全体が同一の細胞になっているわけではないので、今後特定の細胞だけに分化できる条件の検討が必要である。TGFβが1次スフェアの形成・増殖を促進し、1次スフェアに幹細胞が多く含まれていることが明らかになった。このことはTGFβが幹細胞の対称分裂を促進する結果だと考えられる。またこれまでのTGFβのアポトーシス抑制作用の報告も考え合わせると、アポトーシスが抑制されたためスフェアの形成・増殖が促進した可能性も考えられる。

N2 supplement 添加ではスフェアが形成されなかったのに対し、B27 supplement添加ではスフェアの形成が促進された。すなわちB27 supplementの構成成分にスフェア形成に必須の因子が含有されている可能性が考えられる。B27 supplementの各種成分をスフェア法にて、消去法で必須の因子を検出していきたいと考えている。

E. 結論

皮膚由来の多能性幹細胞の分離・培養をし、TGFβが1次スフェアの形成・増殖を促進し、B27 supplement添加ではスフェアの形成が促進された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

なし

G 知的所有権の取得状況

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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 |
|---|---|-----------------------------|--------------|---------|------|
| Yano, S., Okochi, H., Tamaki, K | Analysis of the Expression of Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen on the Peripheral Blood and Cutaneous Lymphocytes of Alopecia Areata Patients. | Acta Derm Venereol | in press | | |
| .Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, Komiya S, Kosai K, Hanakawa Y, <u>Hashimoto K</u> , Nagata K, Yoshimura A. | Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. | J Clin Invest | 108(12) | 1781-8 | 2001 |
| .Li G, Schaidler H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, <u>Hashimoto K</u> , Herlyn M. | Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development | Oncogene | 6:20(56) | 8125-35 | 2001 |
| Hamada K, Shinomiya H, Asano Y, Kihana T, Iwamoto M, Hanakawa Y, <u>Hashimoto K</u> , Hirose S, Kyo S, Ito M. | Molecular cloning of human squamous cell carcinoma antigen 1 gene and characterization of its promoter. | Biochim Biophys Acta | 19:1518(1-2) | 124-31 | 2001 |
| Hamada K, Hanakawa Y, <u>Hashimoto K</u> , Iwamoto M, Kihana T, Hirose S, Nakamura M, Ito M. | Gene expression of human squamous cell carcinoma antigens 1 and 2 in human cell lines. | Oncol Rep | 8(2) | 347-54 | 2001 |
| Tohyama M, Shirakara Y, Yamasaki K, Sayama K, <u>Hashimoto K</u> | Differentiated keratinocytes are responsible for TNF-alpha regulated production of macrophage inflammatory protein 3alpha/CCL20, a potent chemokine for Langerhans cells. | J Dermatol Sci | 27(2) | 130-9 | 2001 |

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 |
|--|--|------------------------|-----|----------|------|
| 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、鳥生信子、橋本公二 | 表皮におけるβ1インテグリンの発現 | Excerpta Medica | 4 | 4 | 2001 |