

表1. 抗体の組み合わせの検討

		検出抗体 (ビオチン化 Fab')							
		39-2	72-5	110-2	43C5	44B1	44B2	31C6	B-103
Capture 抗体	39-2		±	±	±	±	±	±	-
	72-5	+		NS	±	NS	-	-	++
	110-2	-	++		-	+	+	+	NS
	43C5	±	-	+		+	-	++	±
	44B1	±	++	NS	-		++	++	++
	44B2	±	-	-	-	++		-	+
	31C6	+	±	++	±	++	+		+
	B-103	±	+	NS	-	++	+	+	

++:高度, +:中程度 ±:低度, -:反応せず, NS:非特異反応

B-103:抗 PrP ペプチド ウサギ抗体

表2. 免疫磁性ビーズELISA

使用 mAb		試料	OD450nm
Capture 用	検出用		
44B1	31C6	感染脳	0.758
"	"	非感染脳	0.182
陰性抗体	"	感染脳	0.191

角化細胞無血清培養法の開発に関する研究

分担研究者 白方 裕司 愛媛大学 助手

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いがたい。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が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した。

B. 研究方法

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。

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。

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は示された。今回の培養法では角化細胞の増殖は比較的早く、臨床応用に関しても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常につきまわっているが、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

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Tohyama M, Shirakara Y,

- Yamasaki K, Sayama K, Hashimoto K. 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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* 4:5, 2001
- 5) 白方裕司、中岡博喜、橋本公二。血管新生 (FGF) を利用した難治性皮膚潰瘍治療 最新医学 56: 1786-1791, 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. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, Komiya S, Kosai K, Hanakawa Y, <b>Hashimoto K</b> , Nagata K, Yoshimura A.	Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis.	<b>J Clin Invest</b>	108(12):	1781-8	2001
Li G, Schaider H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, <b>Hashimoto K</b> , Herlyn M	Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development	<b>Oncogene</b>	20(56):	8125-35	2001
Hamada K, Shinomiya H, Asano Y, Kihana T, Iwamoto M, Hanakawa Y, <b>Hashimoto K</b> , Hirose S, Kyo S, Ito M	Molecular cloning of human squamous cell carcinoma antigen 1 gene and characterization of its promoter	<b>Biochem Biophys Acta</b>	1518(1-2):	124-31	2001
Hamada K, Hanakawa Y, <b>Hashimoto K</b> , 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	<b>Oncol Rep</b>	8(2):	347-54	2001
Tohyama M, Shirakara Y, Yamasaki K, Sayama K, <b>Hashimoto K</b>	Differentiated keratinocytes are responsible for TNF-alpha regulated production of macrophage inflammatory protein 3alpha/CCL20, a potent chemokine for Langerhans cells	<b>J Dermatol Sci</b>	27(2):	130-9	2001
Sayama K, Hanakawa Y, Shirakata Y, Yamasaki K, Sawada Y, Sun L, Yamanishi K, Ichijo H, <b>Hashimoto K</b>	Apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) is an intracellular inducer of keratinocyte differentiation	<b>J Biol Chem</b>	276	999-1004	2001
橋本公二	皮膚工学	<b>Excerpta Medica</b>	4	1-3	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	<b>Excerpta Medica</b>	4	4	2001
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	<b>Excerpta Medica</b>	4	5	2001
橋本公二	ビタミンDの皮膚作用	腎と骨代謝	14 (2)	115-121	2001
橋本公二	スキンバンク -up-to-date-	臨床皮膚科	55	145-148	2001

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
品川森一、堀内基広、松井高峯	プリオンの免疫学的検出法	生活衛生	45	259-269	2001
池田徹也、堀内基広、古岡秀文、石黒直隆、品川森一	牛海綿状脳症に関する検査概要と今後の対応	食品衛生研究	52	33-42	2002
Yamamoto, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Matsuo, T., and Kaneko, K	Glycidol degrades scrapie mouse prion protein	J. Vet. Med. Sci	63	983-990	2001
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		2002
白方裕司、中岡博喜、橋本公二	血管新生 (FGF) を利用した難治性皮膚潰瘍治療	最新医学	56 (8)	1786-91	2001
H Nakamura, M Aoki, K Tamai, M Oishi, T Ogihara, Y Kaneda R Morishita	Prevention and regression of atopic dermatitis by ointment containing NFkB decoy oligodeoxynucleotides in NC/Nga atopic mouse model	Gene Therapy	In press		

20010868

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。