

20020473

厚生労働科学研究費補助金

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大河内 仁志

平成15（2003）年 4月

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. 角化細胞 side population の解析	-----	21
橋本 公二		
2. ヒト表皮角化細胞におけるシグナル伝達に関する研究	-----	26
藤本 学		
3. 皮膚由来多能性幹細胞におけるその表面マーカーの 同定とその由来の探索に関する研究	-----	29
藤本 学		
4. 霊長類ES細胞への遺伝子導入法の開発	-----	32
花園 豊		
5. Stem cellの培養方法の検討	-----	36
古江 美保		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	38
----------------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	46
------------------------	-------	----

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

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

マウスの胎生期の細胞を用いて発毛を誘導で
きることを示した。細胞移植に必要な足場と
してコラーゲンスポンジの検討を行い、ポリ
グリコール酸含有コラーゲンスポンジの有
用性を示した。角化細胞の新しい幹細胞マ
ーカーを見つけるために ES 細胞から角化細
胞を誘導することに成功した。また角化細
胞の *in vivo* に近い増殖形式であるシート状
の増殖を *in vitro* で再現する培養法を考案し、
増殖機序を解析した。マウスの皮膚から浮遊
培養系である *sphere* 法を用いて神経細胞や
平滑筋細胞などに分化する多能性幹細胞を取
得し、増殖・分化機序の解析を行った。TGF- β
添加により、*sphere* の形成率が上昇し、ま
た分化過程においては α SMC 陽性細胞が著
明に増加した。

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
まだ不明な点が多く、付属器への誘導に関
する多能性についても知見は少ない。
In vitro での付属器の誘導にむけて、まず
器官形成期の細胞は多能性をもつことから

マウス胎生期の細胞を用いて付属器である
毛の誘導が可能かを検討する。これまでの
研究でインテグリンなどの既知のマーカー
では幹細胞の単離が難しいことが判明した
ので、新しい幹細胞マーカーを見つけるた
めに ES 細胞から角化細胞を分化誘導する

方法を確立すること目的とする。また抗体を用いなくて、色素排出能をもとに未分化な細胞といわれている SP 細胞が皮膚に存在するかを検討する。従来の角化細胞の培養法は細胞をばらばらにして増殖させていたが、より *in vivo* に近いシート状の増殖を再現することにより創傷治癒の新しいモデルになりうるかを検討する。あわせて細胞間相互作用により、slow cycling cell が出現するか否かの検討を行う。また皮膚の細胞の可塑性を利用して神経細胞などを増殖・分化させる方法を開発することを目的とする。汗腺の発生に関する遺伝子発現と遺伝子治療としての経皮的遺伝子導入の可能性を検討する。

B 研究方法

1) 発毛誘導

マウス胎児 (E17.5 前後) の皮膚を表皮と真皮に分離した後、トリプシンにより表皮細胞と間葉系細胞をばらばらにした状態で採取する。ヌードマウスの背部に内径 10mm の帽子型のシリコンチェンバーを植え込み、その中に表皮細胞と間葉系細胞を混合して約 1×10^7 個移植し、発毛させる条件を検討した。移植した細胞の漏出を防ぐために細胞移植の足場として種々のコラーゲンスポンジを用いて比較した。特にコラーゲンを補強するためにポリグリコール酸を含有させたスポンジを京都大学再生医科学研究所田畑泰彦教授より提供されて使用した。ヒトの正常培養細胞を用いても発毛を誘導できるか実験した。

2) ES 細胞から角化細胞の誘導

LIF (leukemia inhibitory factor) 存在下で未分化な状態を保ったマウス ES 細胞をマイトマイシン処理した PA6 という feeder layer 上で培養し、BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4)などのサイトカインを加えた。形態学的観察とケラチン 14 の発現を免疫染色並びに RT-PCR にて経時的に追い、角化細胞に分化する条件を検討した。DMEM(Dulbecco Modified Eagle medium)に ITS (Insulin, Transferin, Serenate)を加えたものを基本培地として用い、BMP4 を 0.01-100ng/ml で至適濃度を検討した。

3) 角化細胞の新しい培養法の検討

培養皿の中央においたクローニングリング内に培養ヒト角化細胞を confluent に播き、リングを除去して遠心性に拡大増殖する系を新たに考案した。カルシウム濃度、血清の有無で増殖形態を検討し、シートの直径を計測することによって定量化した。アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D などの各種阻害剤の添加による検討も行った。BrdU の取り込み実験により、slow cycling cell の存在と増殖パターンの解析を行った。

4) 皮膚における SP 細胞の検討

ヘキスト 33342 と UV レーザーを用いて色素排出能の高い SP 細胞が皮膚に存在するか否かを検討した。マウスの皮膚の毛を脱毛させたあと、トリプシンでバラバラにし、ヘキスト 33342 を 5ug/ml 加えて、37度、60-90 分培養した。FACS により UV

レーザーを照射して SP 細胞を検出した。ベラパミルを加えることにより、SP 細胞分画が消失することを確認した。

5) 皮膚から多能性幹細胞の分離・培養

マウス(CD57BL/6J)の耳介より皮膚を取得し、1-3 平方ミリの大きさに細切し、Hanks Balanced Solution(HBSS)で洗い、0.1%トリプシン溶液にて 37°C60 分静置した。その後、皮膚組織はピペッティング操作にて機械的に細切し、trypsin neutralizing solution (TNS)でトリプシンを中和した。さらに細切した細胞は 40mm のフィルターで濾過し、4°C、on ice で 30 分静置後、遠心にて細胞を回収した。培養には 2% B27 supplement を含む DMEM/F12 培地を使用し、表皮細胞増殖因子(epidermal growth factor:EGF)を最終濃度 20ng/ml、塩基性繊維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor:bFGF)を 10ng/ml となるように添加し CO₂ インキュベーターで 37 度 5%CO₂ の条件下で浮遊系培養皿で 2 週間培養し、スフェアの形成数およびスフェア 1 個当たりの大きさを検討した。さらに以下の増殖因子を添加して control 群と比較検討した。

細胞播種濃度 : 10 cells/ml

増殖因子および最終濃度 :

transforming growth factor-a(TGF-a) 50ng/ml

ciliary neurotrophic factor(CNTF) 50ng/ml

neurotrophin-3(NT-3) 50ng/ml

brain-derived neurotrophic factor(BDNF) 50ng/ml

transforming growth factor-b(TGF-b) 1.0ng/ml

bone morphogenic protein 4(BMP4) 10ng/ml

TGF-bの最終濃度 : 0.001ng/ml, 0.01ng/ml, 0.1ng/ml, 1.0ng/ml, 10ng/ml

分化条件

取得したスフェアを、EGF、bFGF を除いた 1%ウシ血清を含む DMEM/F12 培地で 1 週間培養して分化誘導し、ニューロンのマーカーのbIII Tubulin、アストロサイトのマーカーの GFAP、平滑筋のマーカーのaSMA、脂肪滴を染色する Oil red O を用いて免疫染色を行い各種抗体の陽性細胞の割合を検討した。

表面マーカーの検索

スフェア形成前の取得直後の皮膚の細胞と TGF-bを添加したスフェア、非添加スフェアで各種表面マーカーの発現に違いがあるかを Flow cytometryを用いて検討した。表面マーカーにE-cadherin、Thy-1、aSMA、b1integrin、a6integrinを用いた。

6) 汗腺の発生に関する遺伝子発現の検討

外胚葉の発生に重要な役割を果たしていると考えられる分子 EDA と EDA 受容体の遺伝子発現を胎生期のマウス皮膚にて in situ hybridization 法にて検討した。

7) 経皮的遺伝子導入法の検討

naked DNA 投与法によりサイトカイン遺伝子 (IL-4, IL-6, TGF-b1, TNF-a, IFN-r, GM-CSF, MCAH) の cDNA をラットの皮膚に導入し、導入部と血中のサイトカインの濃度を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は施設の動物実験委員会に計画書を提出し、動物愛護上の配慮等の審査を受けてから行った。

今回用いた、マウス ES 細胞ならびにヒト培養角化細胞は市販のものを使用したもので、特別な倫理上の配慮は要しないものと考えた。

C 研究結果

1) 発毛誘導

マウス胎児期 (E17.5 前後) の表皮細胞と間葉系細胞 (毛乳頭細胞) を混合して移植することにより、2-3 週間で発毛がみられた (図 1)。細胞移植において混合液をシリコンチェンバーに注入する際、液の漏出が起り、発毛状況が安定しないため、足場材料の検討を行った。通常のコラーゲンスポンジを足場として用いると表皮嚢腫の形成が増加し、正常な発毛が阻害されたが、ポリグリコール酸を加えたコラーゲンスポンジでは液の漏出が抑制され、正常な発毛がみられた (図 2)。ヒトの培養表皮細胞と毛乳頭細胞の組み合わせでは発毛がみられず、表皮細胞の分化能力が毛乳頭細胞の毛髪誘導能力が問題と考えられた。

2) ES 細胞から角化細胞の誘導

マウス ES 細胞を PA6 の feeder layer 上で培養し、ケラチン 14 の発現を検討した。BMP4 の濃度は 1-10ng/ml でケラチン 14 陽性細胞が 12-14 日間の培養で出現した (図 3)。また RT-PCR による検討では

より早期から発現していることを確認した。ケラチン 14 のプロモーターに GFP をレポーターとするプラスミドを作成し、ES 細胞に導入して蛍光色素による選別法を開発中である。

3) 角化細胞の新しい培養法の検討

最初に角化細胞のシートを培養皿の中央に作成し、遠心性に拡大増殖する系においてはカルシウム濃度によって細胞動態が全く異なることが判明した。すなわち低カルシウム濃度では辺縁部の細胞は個々に遊走し、中央部の細胞は角化してしまうのに対し、高カルシウム濃度では細胞同士が緊密に連絡しあい、シート状に遠心性に拡大するとともに、中央部の角化が抑制された。アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D により、増殖と遊走が完全に阻害されたが (図 4)、薬剤の除去により再び増殖を開始した。EGF receptor tyrosine kinase の阻害剤である AG1478 の添加によっても、濃度依存的に増殖と遊走が抑制された。血清の添加により、分化が抑制され、シートの形状がより保たれることも判明した。BrdU の取り込み実験により、時間が経過するにつれて外側の細胞が活発に増殖するようになった (図 5)。slow cycling cell の存在は 2 週間の観察でははっきり認められなかった。

4) 皮膚における SP 細胞の検討

マウスの皮膚では 0.04-5% に SP 細胞が存在した。この細胞群はベラパミル添加に

より消失した。骨髄中よりも割合が高いため、他の表面マーカー(β 1 インテグリンや CD71 など)と組み合わせてさらに検討中である。

5) 皮膚から多能性幹細胞の分離・培養

マウス皮膚より浮遊培養系を用いて、sphere を形成させ、半年以上の長期継代に成功した。

スフェアの形成数およびスフェア1個あたりの大きさはTGF- β を添加した場合のみ control 群 (EGF+bFGF) と比較して有意な差が得られた (図6)。TGF- β の濃度依存性について検討したところスフェアの形成数においては、control 群と比較して 0.01ng/ml から有意な差が観察され、1.0ng/ml で顕著な増加が認められた。スフェア1個あたりの大きさは control 群と比較して 0.001ng/ml から有意な差が観察され、1.0ng/ml で顕著な増加が認められた (図7)。スフェア形成時に TGF- β を添加し、分化させた場合には β III Tubulin、GFAP、 α SMA、Oil red O 陽性細胞の割合に変化は認められなかった。しかし、分化誘導時に TGF- β を添加した場合には β III Tubulin、GFAP、Oil red O 陽性細胞の割合に変化が認められなかったものの、 α SMA 陽性細胞は約6~7倍の増加が認められた (図8、9)。

スフェア形成前の取得直後の皮膚細胞に発現している E-cadherin、Thy-1、 α SMA はスフェアにおいては発現していなかった。これらの表面マーカーは TGF- β 添加時においても不変であった (図10)。現在 sphere

をラットに投与して特異的な表面マーカーに対するモノクローナル抗体を作製中である。

6) 汗腺の発生に関する遺伝子発現の検討

EDA と EDA 受容体の遺伝子発現を胎生期の皮膚にて検討したが、マウスの体幹にはほとんど汗腺が存在しないため手掌や足底の皮膚を用いた。まだはっきりした局在を証明できていない。

7) 経皮的遺伝子導入法の検討

naked DNA 投与法によりサイトカイン遺伝子 (IL-4, IL-6, TGF- β 1, TNF- α , IFN- γ , GM-CSF, MCAH) の cDNA をラットの皮膚に導入し、導入部と血中のサイトカインの濃度を測定した。いずれも導入部では高濃度の遺伝子産物が検出されたが、血中レベルの上昇したものとしめないものが存在した。またビタミン D3 水酸化酵素のプロモーターの下流にレポーター遺伝子を組み込み、生体表皮細胞に導入し、その部にビタミン D3 誘導体を外用した所、外用剤の濃度依存性にレポーター遺伝子の発現が誘導された。

D 考察

今回胎生期の未分化な細胞を移植すればヌードマウスに発毛を誘導することができた。組織学的には脂腺も確認できた。しかし汗腺の形成は確認できなかった。マウスの体幹部にはもともと汗腺はほとんどないことを反映していると思われる。手掌や足

底部の皮膚から選択的に細胞を採取すれば、汗腺の誘導も可能であると考えられるので、今後検討していく予定である。また細胞移植の際に細胞を培養液に浮遊させた状態でシリコンチェンバー内に注入したが、液体であるためどうしても漏出してしまふ。そこで足場となるコラーゲンスポンジの検討を行った。通常のものでは毛ではなく囊腫の形成が顕著であった。通常のコラーゲンスポンジは培養液を吸収するとスポンジ自体が縮んでしまうことが原因として考えられた。縮んだスポンジのせいで細胞は自由な動きが阻害されてしまい、毛の構築が十分にできなくなったのではないかと考えた。そこでポリグリコール酸を添加することによりコラーゲンスポンジの強度を高めると、正常な発毛がみられたことから細胞の接着や運動の重要性が示唆された。以上の結果から発毛誘導におけるポリグリコール酸含有コラーゲンスポンジの有用性が示されたので、材料の提供者である京都大学再生医科学研究所田畑泰彦教授と共同で特許を出願した。同様な実験系でヒト培養細胞を用いて発毛するか試みたがまだ成功していない。その原因として培養細胞では表皮細胞の毛に分化する能力の低下ないし毛乳頭細胞の毛髪誘導能の低下が考えられた。ヒトに臨床応用するためにはこの問題を解決しなければならない。

今までに ES 細胞から角化細胞を誘導する方法は胚様体(Embryoid body)を介して4週間程度かかるものが報告されている。ま

た ES 細胞から PA6 という feeder layer を用いて神経細胞を誘導する際に BMP4 を加えると表皮細胞に分化するという報告がなされた。今回の我々の系は後者をモデルにして、胚様体を用いずに2週間でケラチン14陽性の角化細胞が出現している。培養液は検討を加えて報告とは違うものを使用している。胚様体は既にいろいろな細胞に分化するスイッチがはいっているので角化細胞だけに分化誘導することは難しいと思われる。マウスの胎生期において10日前後でケラチン14の発現がみられることから、我々の確立した培養系は時間的に *in vivo* の発生過程に近づいたといえる。ただ PA6 という feeder layer を用いているので、分化に必要な因子は BMP4 以外にも供給されている可能性が高い。まだ角化細胞への分化が100%ではないので、分化効率を高める必要がある。また誘導された角化細胞を大量に増やすためには培養液をさらに改良する必要がある。同様に feeder layer を用いない系で、かつ無血清培地で角化細胞に誘導する実験系も検討中である。今後 differential display 法などにより角化細胞の新しい幹細胞マーカーを検討していきたいと考えている。

角化細胞はばらばらに播種された状態から増殖する場合とシート状に増殖する場合とでは培養液に対する反応が異なることが判明した。また角化細胞の協調した増殖と遊走のためには 0.5mM 以上のカルシウム濃度が必要であった。今回確立した系は皮

膚切片を培養皿に静置した時と同じ現象を再現できたと考えられ、各種阻害剤の影響をシートの直径を計測することにより、定量化できた。今後、創傷治癒モデルとして薬剤のスクリーニングにも使用できる可能性が示唆された。角化細胞はコンフルエントな状態でカルシウム濃度を上げると分化すると言われていたが、周囲に自由空間が存在すれば分化が抑制されることが示され、細胞間の協調運動には張力の関与も重要であると思われた。角化細胞は張力によって増殖をコントロールしていると考えたが、シート状の増殖パターンにおいて2週間では *slow cycling cell* の存在は証明できなかった。さらに幹細胞の維持機構について検討していきたい。

ヘキストという色素を排出する能力の高い細胞が骨髄中に存在し、SP細胞とよばれて幹細胞の候補とされている。有害な物質を排出能力が高いことは幹細胞にとって重要な性質と思われる。今回皮膚においてもSP細胞の存在が確認された。抗体を用いないで幹細胞を取得できる可能性が示唆された。一方表皮にも真皮にもSP細胞が存在している可能性があり、今後表面マーカーの検討により、同じ細胞か否かをはっきりさせる必要がある。ただ表皮と真皮を分離している間にSP細胞の性質が失われる可能性もあると思われる。また取得したSP細胞を未分化な状態で増殖させる方法の開発が重要となる。SP細胞の膜に存在すると言われている *bcrp* タンパクに対す

る抗体を用いて、培養ヒト角化細胞を検討したが、検出できなかった。

皮膚から神経細胞やグリア細胞に分化する細胞を培養することができた。当初浮遊培養により *sphere* を形成させていたが、*wild type* マウスと GFP マウスの細胞を混合したところ、両者のキメラの *sphere* が出現した。すなわち1次 *sphere* の形成には細胞の凝集が生じている可能性が示唆されたので、*clonal* 増殖を証明するために、培養液にメチルセルロースを加えて細胞凝集を抑制した。それでも *sphere* の形成が見られたので多能性をもつ幹細胞が存在することを証明できたと考えている。また TGF- β により *sphere* の形成率と細胞数の増加が見られたが、これは *neurosphere* においては報告されていない現象である。線維芽細胞は TGF- β により形質転換することが知られているので、皮膚の細胞が TGF- β により *transdifferentiation* をおこした可能性がある。また本来接着細胞を浮遊状態にして培養しているため、脱分化しやすくなっている可能性も否定できない。またアポトーシスが抑制された可能性もある。このメカニズムの解明は細胞の可塑性を考える上で非常に重要である。さらに効率よくこの幹細胞を取得するためにモノクローナル抗体を作製中である。

経皮的遺伝子導入法の検討は北海道大学皮膚科の澤村大輔先生に委託したものである。投与方法として *naked DNA* を直接皮膚に塗布する方法や遺伝子を組み込んだウ

イルスベクターを用いる方法もあるが、今回は naked DNA 法を検討した。サイトカインを産生させることに成功したが、発現は一過性であり、今後どのように発現量を調節していくかと発現期間を調節していくかが課題である。本法が免疫を誘導する DNA ワクチンに適していると考えている。一方皮膚のビタミン D3 の濃度が高まると誘導されるビタミン D3 水酸化酵素のプロモーターに注目した。そこでビタミン D3 水酸化酵素のプロモーターの下流にレポーター遺伝子を組み込み、生体表皮細胞に導入し、その部にビタミン D3 誘導体を外用した所、外用剤の濃度依存性にレポーター遺伝子の発現が誘導された。将来、表皮細胞に導入した遺伝子の発現を外用剤を用いて、調節できる可能性が示された。

E 結論

未分化な胎生期の細胞を使えば毛が誘導できることを示した。ES 細胞から角化細胞を誘導する系を新たに構築するとともに、角化細胞のシート状増殖を定量的に検討できる系も確立した。皮膚に未分化な細胞や多能性幹細胞が存在することを証明した。これらの細胞を利用して付属器を誘導できる可能性と、皮膚以外の細胞に分化させて細胞療法に応用できる可能性が示された。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1 論文発表

Yano, S., Komine M, Fujimoto M, Okochi, H., Tamaki, K: Interleukin 15 induces the Signals of Epidermal proliferation through ERK and PI3-kinase in human epidermal keratinocyte cell line, HaCaT Biochem. Biophys. Res. Commun. 301:841-847, 2003

Mitsui H, Komine M, Shirai A, Kanda N, Asahina A, Okochi H, Hitomi S, Kimura S, Tamaki K.: Chronic active EB virus infection complicated with IgG3 subclass deficiency: an adult case treated with intravenous immunoglobulin and IFN-alpha Acta Derm Venereol 83(1):31-5., 2003

Tsunemi Y, Ihn H, Idezuki T, Okochi H, Tamaki K Psoriasis guttata in association with hepatocellular carcinoma Acta Derm Venereol 83(1):70-1., 2003

Mitsui H, Komine M, Watanabe T, Kikuchi K, Okochi H, Tamaki K : Does Hermansky-Pudlak syndrome predispose to systemic l upus erythematosus? Br J Dermatol 146 (5):908-11, 2002

Yano S, Nakamura K, 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 2002;82:82-85

大河内仁志 毛髪の再生医療 遺伝子医学
印刷中

大河内仁志 天疱瘡・類天疱瘡 薬学部学生のための臨床医学テキスト 文光堂 印刷中

大河内仁志 糖尿病性潰瘍 難治性皮膚疾患をなおすスキル 文光堂 印刷中

大河内仁志 皮膚の幹細胞と再生医療 最新医学 58:789-796, 2003

大河内仁志 皮膚と再生医療 日皮会誌 113:247-251, 2003

大河内仁志 毛髪の再生にむけて 臨床現場での再生医療の最前線 羊土社 p84-88 2003年3月

大河内仁志 皮膚にある幹細胞と再生医療への応用 BIO Clinica 18:76-80, 2003

大河内仁志 皮膚を幹細胞ソースに Doctor's magazine 38:38-39, 2002

大河内仁志 皮膚に存在する多能性幹細胞 Medical Practice 19:1220-1221, 2002

大河内仁志 皮膚の幹細胞について 日本臨床皮膚科医学会雑誌 72: 92-96, 2002

大河内仁志 若年性類天疱瘡 最新皮膚科学体系6 水疱症 膿疱症 中山書店 p 117-120 2002年5月31日

大河内仁志 薬物による粘膜障害、物理化学的粘膜障害 今日の皮膚疾患治療指針 第3版 医学書院 p 669-672 2002年6月1日

2学会発表

Yano S, Komine M, Okochi H, Tamaki K : Cellular growth regulation and signal transduction by mechanical stretch in human epidermal keratinocytes 63rd Society of

Investigative Dermatokogy Washington D.C. 2002年5月15日

Okochi H: A keratinocyte outgrowth system useful as a new tool for analyzing proliferation, migration and differentiation

Timberline Symposium 2003 2003年2月3日ポートランド(米国)

大河内仁志、藤本学、白方裕司、橋本公二 皮膚の幹細胞と遺伝子治療について 第1回日本再生医療学会 京都 2002年4月18日

大河内仁志、矢野正一郎、藤本学：表皮角化細胞は feeder layer なしで1個から増殖できるか。 第27回日本研究皮膚科学会 学術大会 京都 2002年8月2日

大河内仁志：再生医学と皮膚科 第66回日本皮膚科学会東部支部学術大会 筑波 2002年10月27日

河瀬陽子、柳靖雄、藤本学、大河内仁志 皮膚由来多能性幹細胞の増殖と分化に対する TGF- β の作用 第2回日本再生医療学会 神戸 2003年3月11日

伊藤宗成、柳靖雄、藤本学、平岡陽介、片岡健、許南浩、田畑泰彦、大河内仁志 毛髪再構築におけるポリグリコール酸含有コーゲンスポンジの有用性 第2回日本再生医療学会 神戸 2003年3月11日

矢野正一郎、大河内仁志 Adult mouse keratinocyte の初代・長期継代培養法の確立 第780回日本皮膚科学会東京地方会 2003年3月15日

矢野正一郎、大河内仁志、小宮根真弓、玉置邦彦 Paget 病における表皮細胞の増殖促進機構 第780回日本皮膚科学会東京地方会 2003年3月15日

G 知的所有権の取得状況

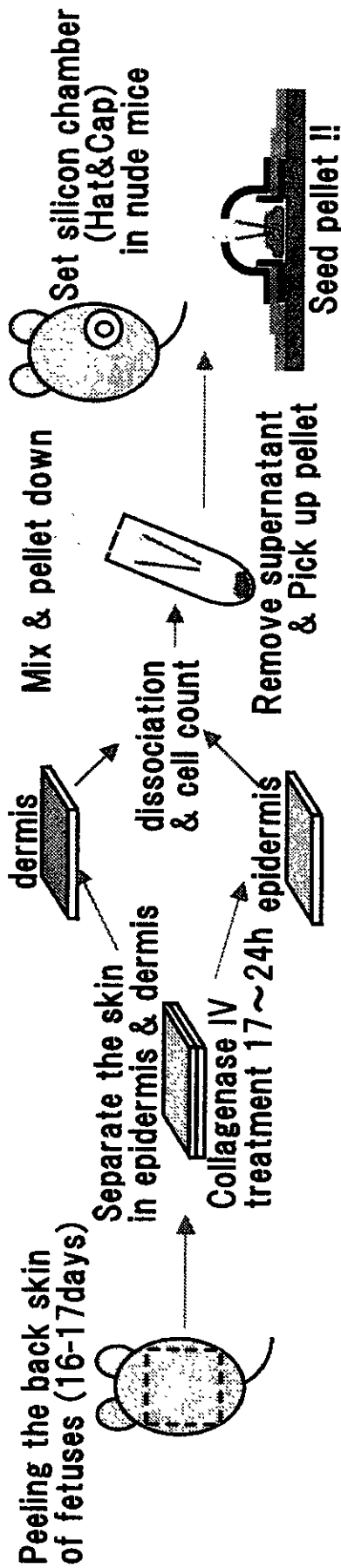
特許出願済 1 件

発毛促進用複合材料（大河内仁志、田畑泰彦共同出願）特許出願予定 1 件

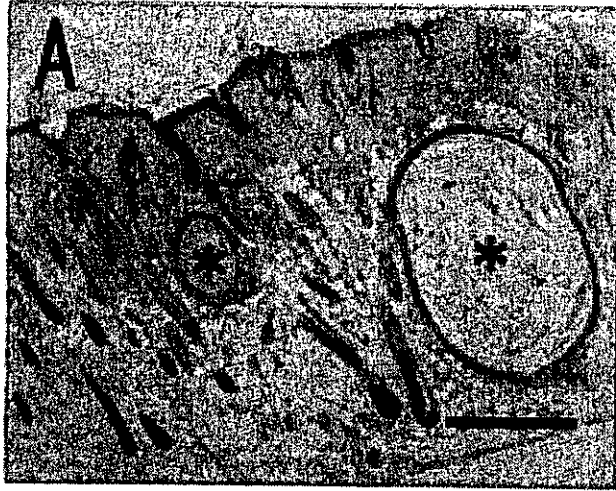
ES 細胞からの表皮細胞誘導法（大河内仁志、古江美保共同出願予定）

Skin & skin appendage

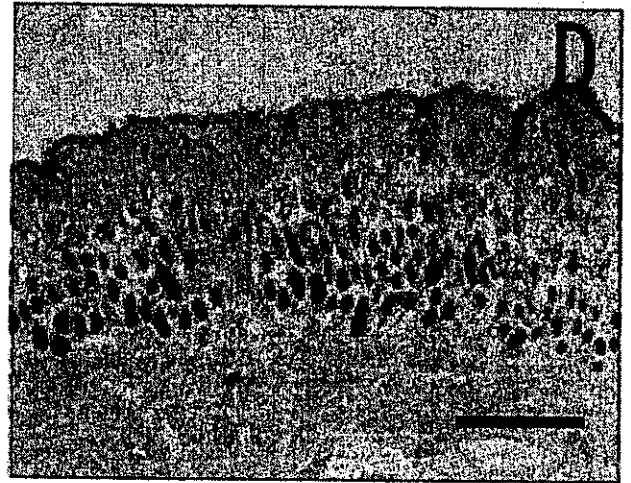
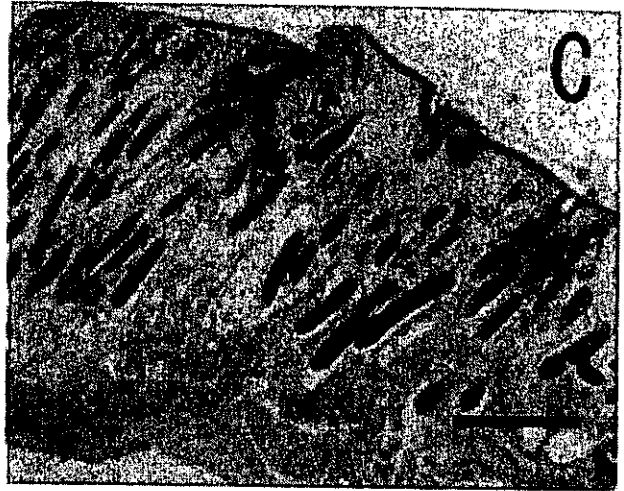
reconstitution assay



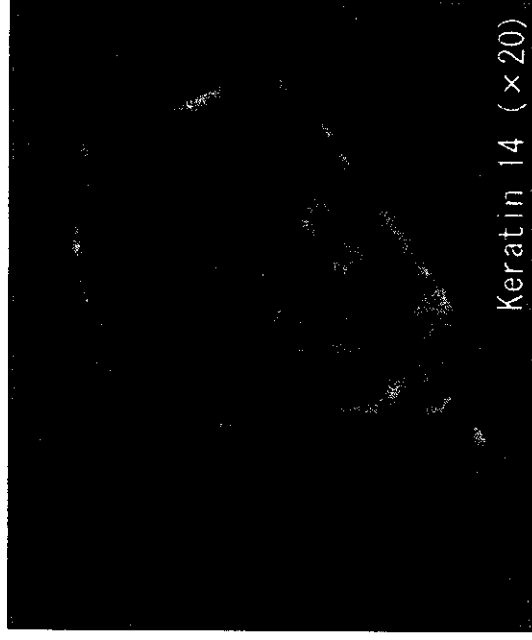
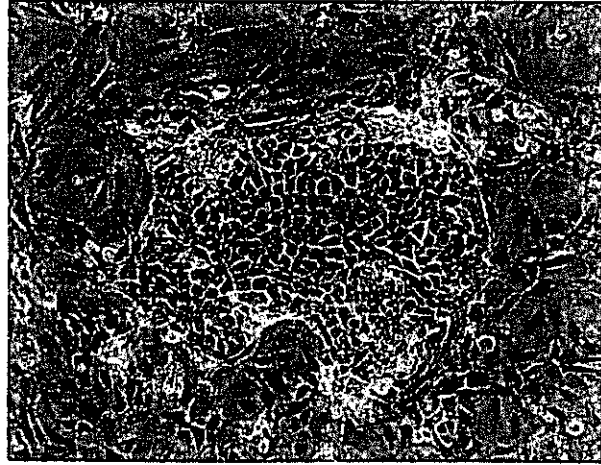
PGA (-)



PGA (+)

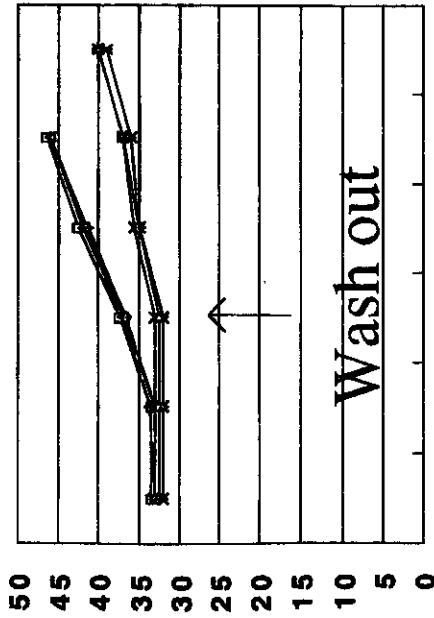


Differentiation from ES cells to Keratinocytes (SDIA methods)



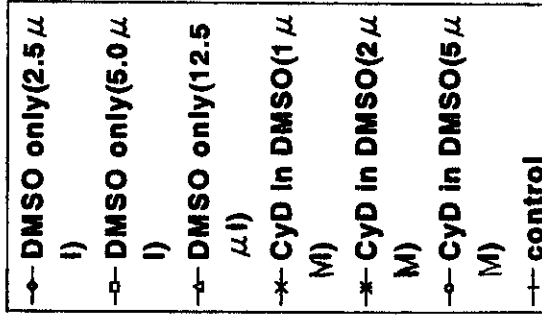
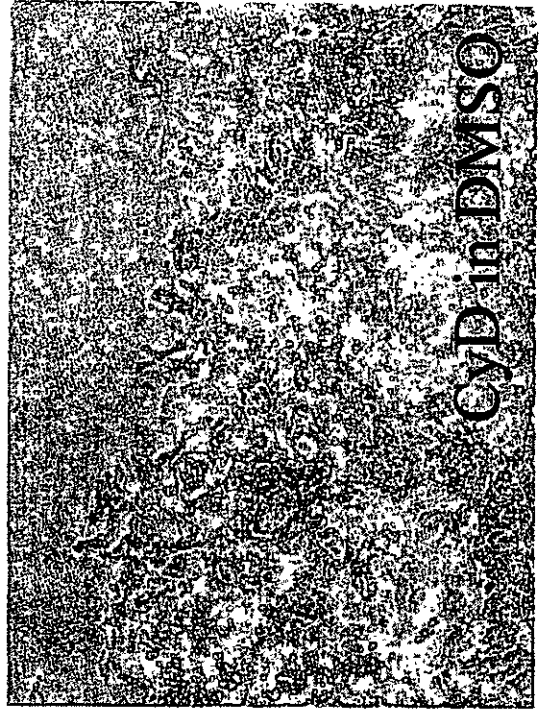
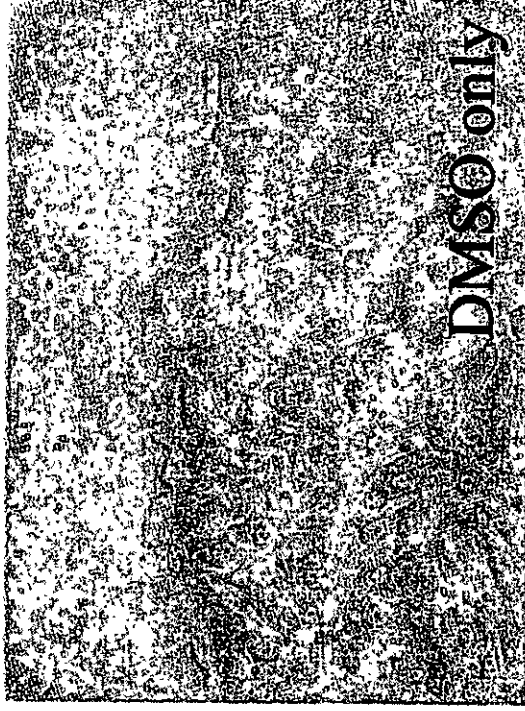
Inhibition by Cytochalasin D

Diameter(mm)

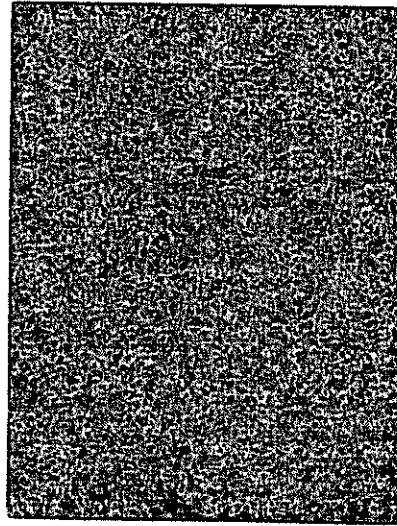


3hr 5hr 23hr 48hr 72hr 96hr

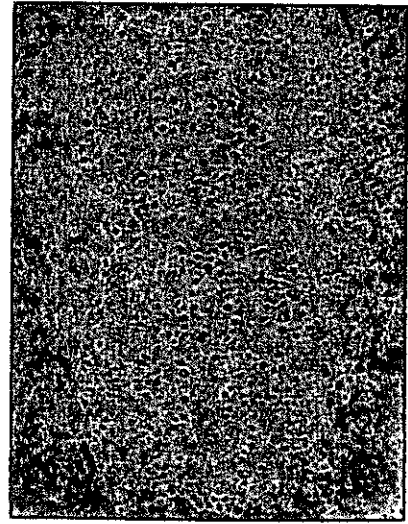
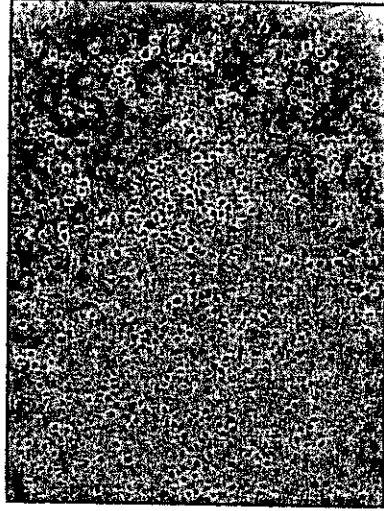
Time



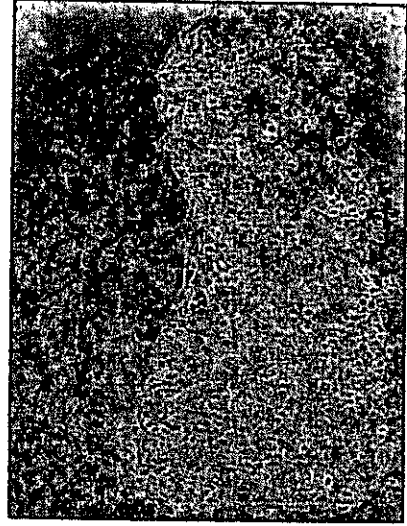
BrdU positive cells



center



periphery



1 day

4 day

Fig.1

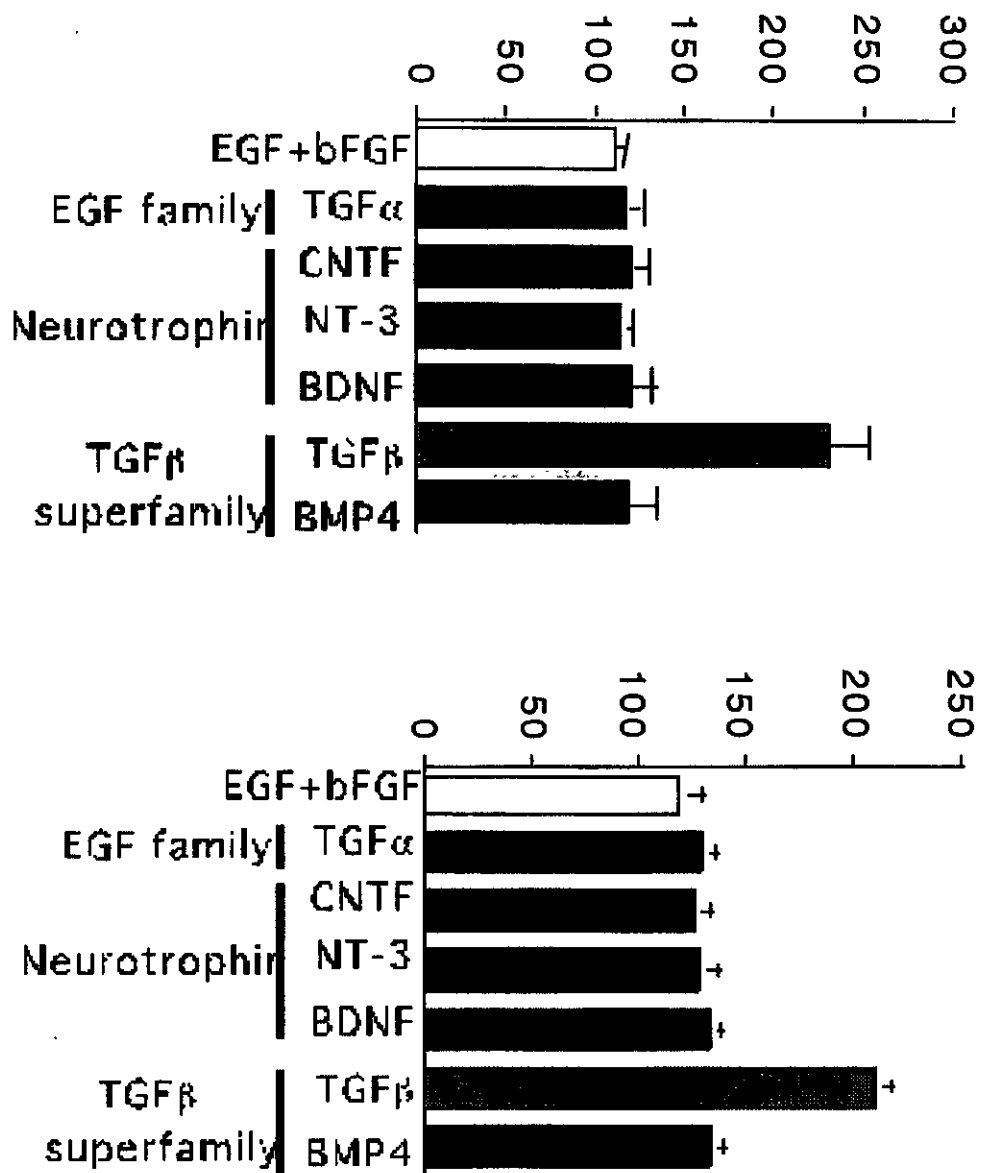
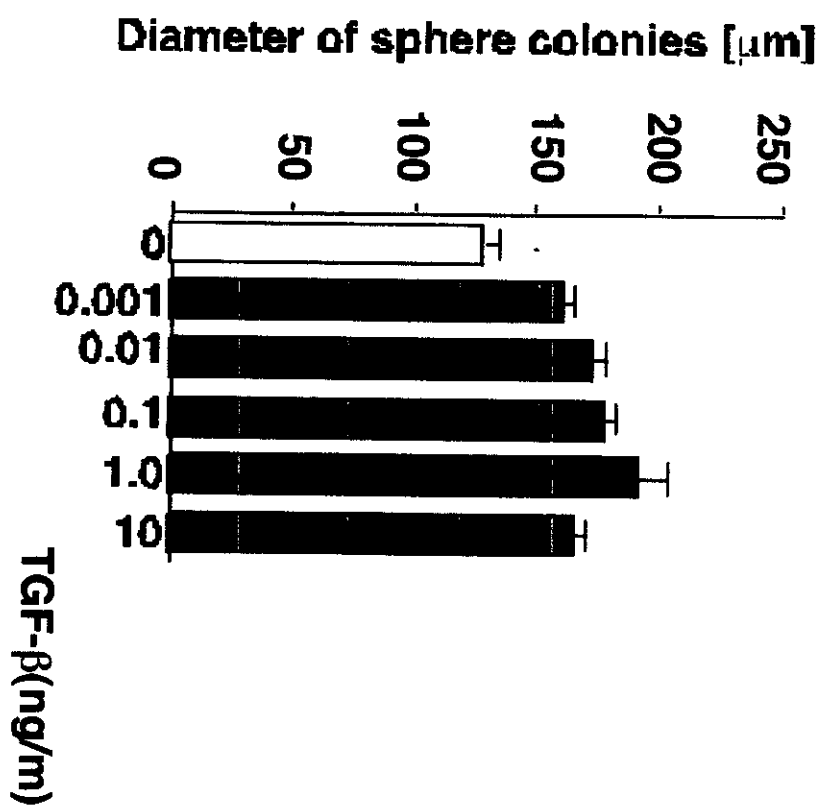
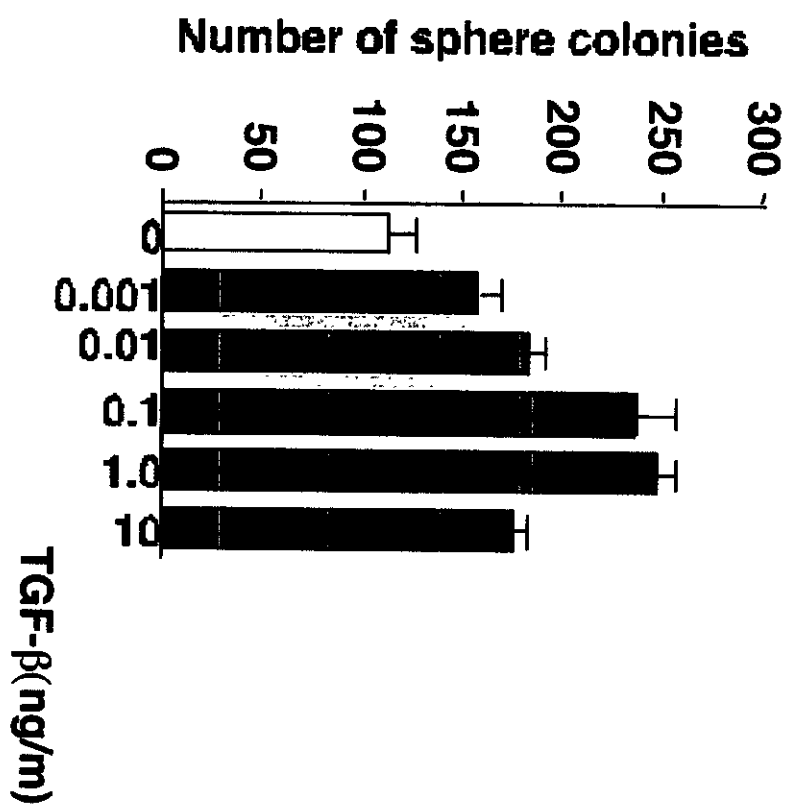
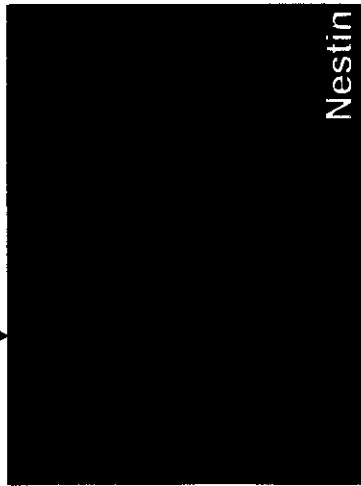
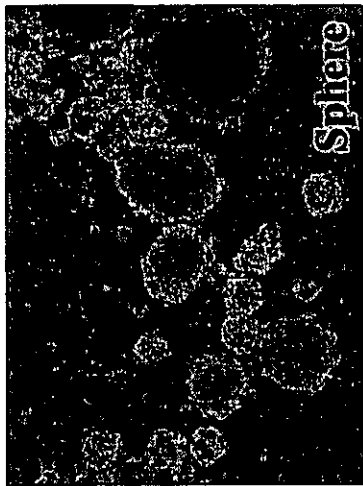


Fig.2



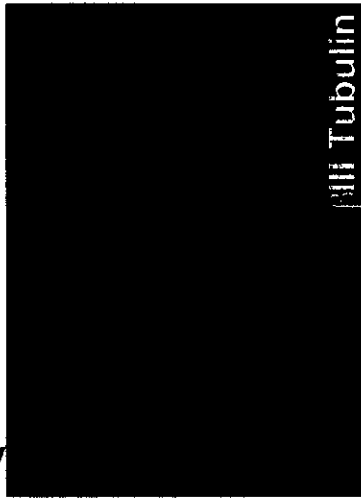
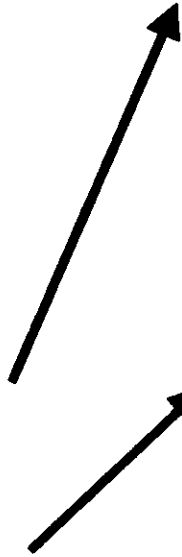
Multipotency of Skin derived precursors



Nestin



GFAP



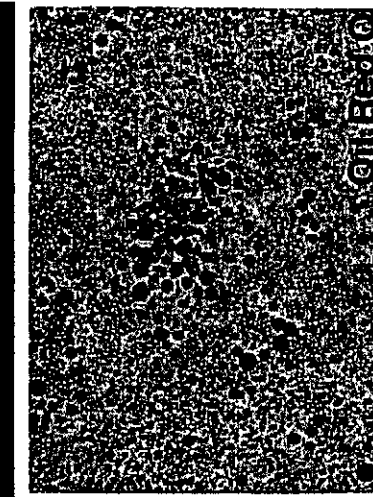
β III Tubulin



αSMA



NF-M



Oil red O

Nestin; selective : undifferentiated cells β III Tubulin, NF-M (Neurofilament-M); neurons
 GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein); astrocytes
 αSMA (α Smooth Muscle Actin); smooth muscle cells Oil red O; lipid droplets