

玉井克人，先天性表皮水疱症，今日の小児  
疾患治療指針，印刷中  
玉井克人，先天性表皮水疱症，皮膚疾患最  
新の治療，印刷中

Ⅱ. 的**所有権の出願・登録状況**（予定を含む）  
なし。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

角化細胞の stem cell の単離・培養

分担研究者 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

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系を確立した。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 で再現することに成功した。角化細胞は個別に増殖する場合とシート状に増殖する場合とでは、細胞の動態が異なることを明らかにした。

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い。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。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ことを目的とする。

B. 研究方法

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、BMP4 などのサイトカインを加えて、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 に ITS 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。  
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、サイトカラシン D などの各種阻害剤による検討も行った。

(倫理面への配慮)

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

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 日の培養で出現した。またケラチン 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。

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、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。

#### D. 考察および結論

従来のES細胞から角化細胞を誘導する系は胚様体 (Embryoid body) を介して4週間程度かかるものが報告されているが、今回の我々の系は2週間で角化細胞が出現したことが特筆される点である。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in vivoの発生過程に近づいたといえる。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。さらに誘導された角化細胞を大量に増やすためには培養液を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。

#### E 結論

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。

#### 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

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 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 印刷中

大河内仁志 毛髪再生医療 遺伝子医学 印刷中

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 6  
69-672 2002年6月1日

#### 学会発表

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)

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（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

角化細胞 side population の解析

分担研究者 岡野栄之 慶応義塾大学医学部生理学 教授

**研究要旨**

マウス角化細胞の幹細胞を同定する目的で、side population 細胞の分離法について検討した。Side population 細胞は骨髄で明らかにされたもので、ヘキスト 33342 色素を強く排出する能力を有し、幹細胞としての要素を持つものとして注目されている。表皮幹細胞を利用した再生医療を推進する上で、表皮幹細胞を効率よく分離する方法の確立が望まれる。そこで、表皮において side population が存在するかについて検討した。マウス表皮細胞を用いた FACS 解析により side population の存在が確かめられた。

**A. 研究目的**

表皮角化細胞を用いた再生医療を推進するうえで、効率のよい細胞の分離と培養が必要である。このためには、表皮角化細胞の幹細胞を分離・培養することが最も適していると思われる。表皮角化細胞の幹細胞は過去の報告によると b1 integrin を強発現していることが明かとなっており、これらに対する抗体を用いた細胞の分離法が利用されてきた。しかし、抗体を用いる方法は少なからず細胞に対するダメージがあるため、臨床応用については疑問が持たれる。そこで、抗体を用いない幹細胞の分離法として骨髄細胞で行われているヘキスト 33342 を用いた分離法が角化細胞においても有用であるかについて検討を行った。

**B. 研究方法**

新生児マウス皮膚を外科的に採取し、エタノール処理後、PBS にて洗浄し、ディスペルゼ処理を 4℃、18 時間行った。表皮と真皮を剥離し、表皮部分をトリプシン処理し細胞を分離した。ヘキスト 33342 を 5, 10, 20 ug/ml の濃度で添加し、37℃ 60 分間染色を行った。遠心操作後細胞を  $3 \times 10^6$ /ml の濃度で再懸濁し、FACS により解析を行った。同時にレセルピンで処理した細胞をヘキスト 33342 で染色し、同様に解析を行った。

**C. 研究結果**

マウス表皮角化細胞においても side population 細胞が存在していることが明かとなった。ヘキストの濃度は 5, 10, 20 ug/ml の濃度すべてで良好に染色された。Side population であることの確信は、この細胞集団がレセルピンないしはベラパミルにより消失することにより確かめられるが、今回用いたレセルピン処理でこの細胞集団は消失した。以上のことにより、この集団は side population であることが確かめられた。全細胞集団に対する side population 細胞の割合は 0.5-5%の間であった（図）。

**D. 考察**

表皮角化細胞の幹細胞の分離法として表面マーカーを用いた分離法が従来おこなわれていたが、この方法では少なからず細胞に対するダメージが危惧されている。また、決定的な表面マーカーは見いだされておらず、抗体による染色に時間がかかることもあり、最適の分離法とはいえない。Side population 細胞 (SP) は骨髄において当初検討された細胞であり、骨髄 SP 細胞は幹細胞である可能性が高いと報告されている。その他の組織における SP の存在は精力的に検討されているが、表皮角化細胞におけ

る SP の存在はなされていなかった。今回の検討においてマウス表皮角化細胞には SP が含まれていることが明らかとなった。この細胞が表皮幹細胞としての性質を有するか否かについては次年度の検討課題である。この分離法がヒト角化細胞において確立されれば今後の表皮角化細胞を用いた再生医療に大きな貢献をもたらすことであろう。

#### E. 結論

マウス表皮角化細胞においても side population 細胞の存在が確かめられた。この side population 細胞が従来いわれている幹細胞のマーカーである b1 integrin, a6 integrin を強発現しているかどうか、さらには増殖能力が高いかについては cell sorter を用いて生きたまま細胞を回収し、検討を行うことが必要である。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表 (平成 14 年度)

論文発表

英語論文

1. Sakakibara S, Nakamura Y, Koike M, Takano H, Uchiyama Y, Noda T, **Okano H**: RNA-Binding Protein Musashi Family, Roles for CNS Stem Cells and a Subpopulation of Ependymal Cells Revealed by Targeted Disruption and Antisense Ablation. **Proc Natl Acad Sci USA** 99: 15194-15199, 2002
2. Matsuno K, Ito M, Hori K, Miyashita F, Suzuki S, Kishi N,

Artavanis-Tsakonis S, **Okano H**: Involvement of a proline-rich motif and RING-H<sup>2</sup> finger of Deltex in the regulation of Notch signaling. **Development** 129:1049-1059, 2002

3. Potten CS, Booth C, Tudor GL, Booth D, Brady G, Hurley P, Ashton G, Clarke G, Sakakibara S, **Okano H**: Identification of a putative intestinal stem cell marker and early lineage marker; Musashi. **Differentiation** 71: 28-41, 2003
4. Kayahara T, Sawada M, Takaishi S, Fukui H, Seno H, Fukuzawa H, Suzuki K, Hiai H, Kageyama R, **Okano H**, Chiba T: Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. **FEBS Lett** 535: 131-135, 2003
5. **Okano H**, Imai T, Okabe M. Musashi: a translational regulator of cell fates. **J Cell Sci** 115: 1355-1359, 2002

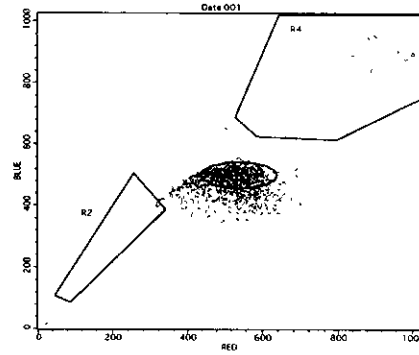
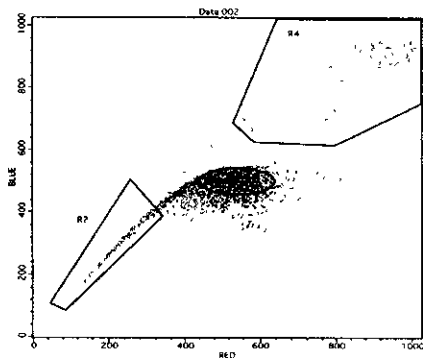
#### G. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

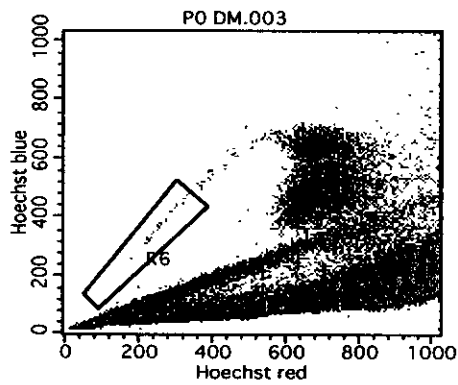
図 マウス角化細胞における SP の FACS パターン。ヘキスト 33342 を用いて染色し、UVlaser を用いて FACS 解析を行った。

左：SP fraction, 右：SP fraction はレセルピン処理にて消失

### 実験 1

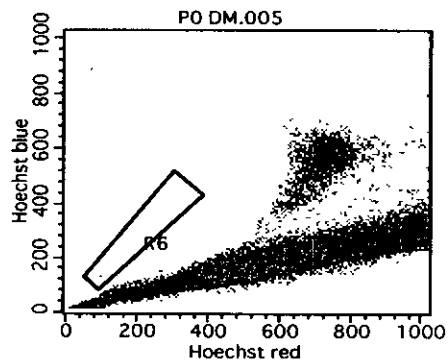


### 実験 2



Sample ID: HO X2  
Gate: G2  
Gated Events: 104654  
Total Events: 107400

Events	% Gated	% Total
104654	100.00	97.44
38	0.04	0.04



Sample ID: HO x4  
Gate: G2  
Gated Events: 101640  
Total Events: 102000

Events	% Gated	% Total
101640	100.00	99.65
2	0.00	0.00

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hanakawa Y, Amagai M, Shirakata Y, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K	Differentiatl effects of desmoglein 1 and desmoglein 3 on desmosome formation	J Invest Dermatol	119	1231-1236	2002
Sayama K, Yamasaki K, Hanakawa Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Ijuin T, Takenawa T, Hashimoto K	Phosphatidyl inositol 3 kinase is a key regulator of early phase differentiation in keratinocytes	J Biol Chem	277	40390-40396	2002
Iwamoto R, Yamazaki S, Asakura M, Takashima S, Hasuwa H, Miyado K, Adachi S, Kitakaze M, Hashimoto K, Raab G, Klagsbrun M, Nanba D, Higashiyama S, Hori M, Mekada E	HB-EGF and ErbB signaling is essential for heart function	Proc Natl Acad Sci			2003 in press
Yanai F, Ishii E, Kojima K, Hasegawa A, Azuma T, Hirose S, Suga N, Mitsudome A, Zaitzu M, Ishida Y, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K, Yasukawa M	Essential roles of perforin in antigen-specific cytotoxicity mediated by human CD4+ T lymphocytes: analysis using the combination of hereditary perforin-deficient effector cells and Fas-deficient target cells	J Immunol	170	2205-13	2003
Shirakata Y, Tamai K, Nakaoka H, Tokumaru S, Sayama K, Murakami S, Hashimoto K	Severe Palmo-plantar Hyperkeratosis in Koebner Epidermolysis Bullosa Simplex	J Dermatol	30	135-140	2003
Wada T, Shirakata Y, Takahashi H, Murakami S, Iizuka H, Suzuki H, Hashimoto K	A Japanese Case of Segmental Darier's Disease Caused by Mosaicism for the ATP2A2 Mutation	Br J Dermatol			2003 in press
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
Tsuda T, Thoyama M, Yamasaki K, Shirakata Y, Yahata Y, Tokumaru S, Sayama K, Hashimoto K	Lack of evidence for TARC/CCL17 production by normal human keratinocytes in vitro	J Dermatol Sci	31	37-42	2003



Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, Nishikawa T	BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid	J Dermatol Sci	30	224-232	2002
Hattori N, Komine M, Yano S, Kaneko T, Hanakawa Y, Hashimoto K, Tamaki K	Interferon-gamma, a strong suppressor of cell proliferation, induces upregulation of keratin K6, one of the inflammatory- and proliferation-associated keratins	J Invest Dermatol	119	403-410	2002
Sakakibara S, Nakamura Y, Koike M, Takano H, Uchiyama Y, Noda T, Okano H	RNA-Binding Protein Musashi Family, Roles for CNS Stem Cells and a Subpopulation of Ependymal Cells Revealed by Targeted Disruption and Antisense Ablation	Proc Natl Acad Sci	1049-1059	15194-15199	2002
Matsuno K, Ito M, Hori K, Miyashita F, Suzuki S, Kishi N, Artavanis-Tsakonis S, Okano H	Involvement of a proline-rich motif and RING-H <sup>2</sup> finger of Deltex in the regulation of Notch signaling	Development	129	135-140	2003
Potten CS, Booth C, Tudor GL, Booth D, Brady G, Hurley P, Ashton G, Clarke G, Sakakibara S, Okano H	Identification of a putative intestinal stem cell marker and early lineage marker; Musashi1	Differentiation	71	28-41	2003
Kayahara T, Sawada M, Takaishi S, Fukui H, Seno H, Fukuzawa H, Suzuki K, Hiai H, Kageyama R, Okano H, Chiba T	Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine	FEBS Lett	535	131-135	2003
Okano H, Imai T, Okabe M	Musashi: a translational regulator of cell fates	J Cell Sci	115	1355-1359	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	82	82-85	2002
Nakamura H, Aoki M, Tamai K, Oishi M, Ogiwara T, Kaneda Y and Morishita R	Prevention and regression of atopic dermatitis by ointment containing NFkB decoy oligonucleotides in NC/Nga atopic mouse model	Gene Therapy	9	1221-1229	2002

Meng X, Sawamura D, Ina S, Tamai K, Hanada K, Hashimoto I	Keratinocyte gene therapy: cytokine gene expression in local keratinocytes and in circulation by introducing cytokine genes into skin	Exp Dermatol	11	456-451	2002
Matsuzaki Y, Tamai K, Kon A, Sawamura D, Uitto J and Hashimoto M	Keratinocyte responsive element 3 (KRE3): Analysis of a keratinocyte-specific regulatory sequence in the 230-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG1) gene promoter	J Invest Dermatol	120	308-12	2003

20020744

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、  
P.26- P.28の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。