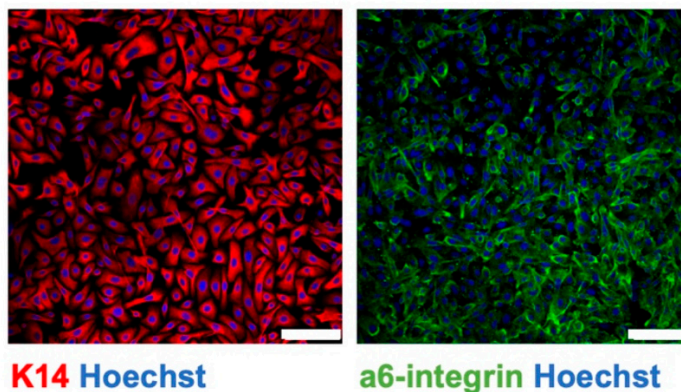


【目的】 ヒト表皮幹細胞を用いた皮膚再生医療は大きく発展してきたものの、臨床的な有用性が示されているのは、組織の最も表層にある「表皮」の再建にとどまり、結合組織も含めた複雑な皮膚の構造を完全に再生することは困難である。ヒト皮膚において、表皮と真皮の境目は平坦ではなく、上皮脚と呼ばれる表皮が真皮に入り込んだ凹凸構造をとることが知られている。組織学的・病理学的観察により、上皮脚は、①表皮幹細胞の局在と関係すること、②皮膚の加齢や病変により形状が変化すること、が示唆されている。しかし、マウス皮膚には上皮脚が存在しないこと、表皮幹細胞マーカーが長年未同定であったことから、幹細胞制御や皮膚の機能に対する上皮脚構造の役割を実証するのは困難であった。筆者はこれまでに、マウス皮膚において分裂頻度の異なる 2 種類の表皮幹細胞集団を同定している (*Nat. Cell Biol.* 2016)。さらに、マウスで唯一上皮脚を持つ組織である口腔粘膜上皮に着目し、分裂頻度の異なる 2 種類の上皮幹細胞が、組織の凹凸構造と対応した局在パターンを示すことを見出した。本研究では、このような自身の先行研究をもとに、組織の凹凸構造と上皮幹細胞局在を三次元的に捉え、表皮幹細胞のパターニングや増殖・分化に最適な環境因子を同定することで、より生体に近い臓器再生に向けた基盤をつくることを目的として実施した。

【方法】 *Fbln5* 欠損マウスの皮膚、口腔組織を 2、6 ヶ月齢で採取し、切片またはホルマウント免疫染色により上皮幹細胞の増殖と分化の変化について検証した。培養実験では、凹凸構造を模倣したマイクロパターンゲルとアロダーム（無細胞ヒト真皮）を用い、上皮幹細胞のパターニングを誘導する最適な力学的環境と培養条件について検証を行った。ゲル上に、マウス皮膚、マウス口腔から単離したケラチノサイト、またはヒト皮膚ケラチノサイトを播種し、高カルシウムおよび気相液相界面培養により分化・重層化を誘導した。

【結果】 研究計画 1 では、柳沢裕美（筑波大学）との共同研究により、2 種類の表皮幹細胞の不均一性を制御する環境因子として *fibulin-5* に着目し、ノックアウトマウスの表現型解析を行った。*Fbln5* 欠損マウスの皮膚においては、分裂頻度の異なる 2 種類の表皮幹細胞由来の分化マーカーの発現が変化していることを見出した。一方、口腔組織においても、2、6 ヶ月齢のマウスにおいて同様な表現型解析を行ったが、*Fbln5* 野生型と欠損マウスで明らかな差は認められなかった。研究計画 2 では、泉健次（新潟大学）との共同研究により、凹凸構造を保持した足場であるアロダームおよびマイクロパターンゲル培養を用い、上皮組織を構築する条件の検討と、表皮幹細胞不均一誘導の評価を行った。本研究では始めにヒト皮膚ケラチノサイトをアロダーム上で三次元培養する条件を確立した。またマウス口腔ケラチノサイトの単離・培養条件を確立し、責任著者として論文発表した (*J Vis Exp.* 2021、図)。一方、マイクロパターンゲルを用いた三次元培養は、ヒト皮膚ケラチノサイト、マウス皮膚ケラチノサイト、マウス口腔ケラチノサイトのいずれにおいても上手くいかず、さらなる条件検討が必要である。

マウス口腔ケラチノサイトの単離・培養系の確立



K14 Hoechst

a6-integrin Hoechst