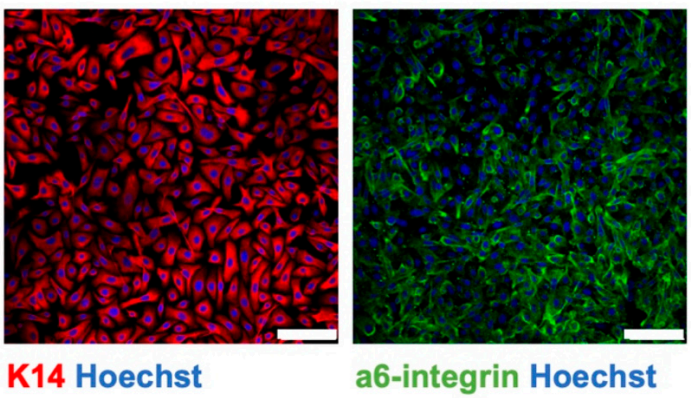
144　凹凸構造を保持した三次元皮膚再生に向けての基盤研究	佐田　亜衣子

【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、切片またはホー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



144. 凹凸構造を保持した三次元皮膚再生に向けての基盤研究

佐田　亜衣子

熊本大学 国際先端医学研究機構

Key words：表皮幹細胞，皮膚再生，細胞外マトリクス，三次元培養，力学的環境

緒　言

1980 年代、ヒト表皮幹細胞の体外培養と自家移植による熱傷治療が世界で初めて成功して以来、皮膚に関する再生医療は大きく発展してきた。2017 年には、遺伝性難病である表皮水疱症患者に対し、遺伝子導入幹細胞を含む表皮シートを移植することで、全身の約 8 割以上の皮膚再生に成功したことが報告された［1］。しかし、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技術的に困難である。現在、真皮に及ぶ皮膚欠損に対しては、培養真皮を移植後に表皮を移植する方法や、真皮と表皮を結合させた培養皮膚の移植等が試みられているが、安定した成果が得られていない。

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、新たに同定した分子マーカー（Dlx1、Slc1a3）と、分裂頻度の違いによって細胞を可視化する H2B-GFP tet-off システムを用い、マウス表皮では、分裂頻度の低い細胞と高い細胞が 2 種類の独立した幹細胞として働くことを見出した［2］。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、*in vivo* において組織構造、幹細胞局在・挙動を解析したところ、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、規則的かつ領域化した局在パターンを示すことを発見した（未発表）。近年、F Watt らの研究グループにより、シリコーンの一種である PDMS 上にヒト表皮幹細胞を播種すると、凹凸構造に対応し幹細胞のパターニングが起こることが報告され、幹細胞制御における力学的環境の重要性が示唆されている［3］。しかし、PDMS はヒト皮膚や口腔において移植目的での利用は難しく、不均一な上皮幹細胞を制御する環境因子についての基盤情報も不足しているため、立体構造を保持した上皮組織の構築には至っていない。

細胞外マトリクスは、臓器や組織の構築に不可欠な非細胞成分である。Fibulin-5（遺伝子名：*Fbln5*）は、弾性繊維の形成に不可欠な fibulin ファミリーの細胞外マトリクスタンパク質である［4］。弾性繊維形成の機能に加え、インテグリン結合を介した細胞接着、増殖や移動の制御や活性酸素の産生の抑制等に働く［5］。*Fibulin-5* 欠損マウスは、全身の弾性線維形成不全により皮膚に弛みが生じ、老化様の表現型を示すが、fibulin-5 を介した微小環境の制御が、表皮幹細胞の不均一性に及ぼす影響は分かっていない。

本研究では、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（図右）。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。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、*in vitro* で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。

方　法

1. *Fibulin-5* 欠損マウスの表現型解析

全ての動物実験は、熊本大学の動物実験委員会のガイドラインに従って実施した。実験には、以前に樹立した *Fbln5* 欠損マウス [6] を使用した。増殖性の違いを調べるため、0.8 mg/ml の濃度の BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridine、Sigma-Aldrich、B5002) を飲料水で 2 日間投与した。*Fbln5* 欠損マウスとコントロールである *Fbln5* 野生型マウスから、生後 2、6 ヶ月齢で尾部および背部皮膚、口腔組織を採取後、OCT コンパウンドに包埋し、急速凍結した。10 μm の厚みで皮膚切片を作製し、4% PFA で固定後、免疫染色を行った。ホールマウント染色は、尾部皮膚または口腔組織から EDTA 処理によって上皮シートを採取したものを用いた。上皮シートを、4% PFA で固定後、免疫染色を行った。一次抗体は以下の希釈率で用いた : ウサギ抗 K14 (1 : 1,000、BioLegend、905304)、ラット抗 BrdU (1 : 300、Abcam、ab6326)、マウス抗 K10 (1 : 500、Abcam、ab9026)、モルモット抗 K31 (1 : 100、PROGEN Biotechnik、GP-hHa1)。抗 BrdU 抗体で染色するために、組織切片はブロッキング後、1N HCl で 37℃、1 時間インキュベートし、洗浄後、染色を行った。全ての二次抗体 (Alexa 488 または Alexa 546、Invitrogen) は 1 : 300 希釈で使用した。マウス一次抗体は MOM キット (Vector Laboratories) でブロッキングした。全てのサンプルは Hoechst (Sigma、B2261) で核染色し、蛍光褪色防止剤入りの封入剤で封入した。染色後のスライドは、共焦点蛍光顕微鏡 (Zeiss、Axio Imager.Z2、NIKON A1 HD25) を用いて観察・画像化した。画像の明るさとコントラストは、Adobe Photoshop を使用して、異なるマウスグループ間で等しい強度に調整した。

2. 皮膚・口腔ケラチノサイトを用いた三次元培養

マウスからの皮膚ケラチノサイトの単離は、既報の方法に従った [7]。新生児皮膚から酵素 (Accutase) を用い、表皮を真皮から剥離した。インキュベート後、細胞を単離し、洗浄・フィルター後、培地に懸濁し、フィーダー細胞の上に播種した。成体マウスからの口腔ケラチノサイトの単離・培養方法については、確立された方法がなかったため、自らプロトコルを確立し、論文発表した [8]。マウス口蓋組織を採取し、0.04% Trypsin (Gibco R001100) で室温 16 時間インキュベートした。トリプシン阻害剤 (DTI、Gibco、R007160) で反応を止め、細胞を組織から掻き出し、フィルター・遠心後、Epilife (Gibco、MEPI 500CA) に懸濁した。コラーゲンコートした 24 穴プレートに播種し、カルシウムを除いたウシ胎児血清を 20%含む Epilife 培地中で培養を行った。

ヒト皮膚のケラチノサイトは、株式会社ケー・エー・シーより購入したものを使用した。ヒト組織由来製品の倫理・安全性委員会に、ヒト組織由来研究用試薬提供についての同意書を提出し、承認を受けた。三次元培養の足場として、アロダーム (無細胞ヒト真皮) または共同研究者の泉健次 (新潟大学) らが開発したマイクロパターンゲル (魚うろこ由来コラーゲンゲルにマイクロパターンを転写した足場) [9] を使用した。EpiLife 培地中で培養後、気相液相培養を行い、ケラチノサイトの分化と重層化を誘導した。三次元培養皮膚の免疫染色は、1 と同様の方法で行った。ケラチノサイトの免疫染色は、細胞をカバーガラスの上に播種し、4% PFA で固定後、1 と同様の方法で行った。幹細胞マーカーとして p63 抗体 (1 : 500、Abcam、ab124762)、K14 抗体 (1 : 1,000、BioLegend、905304)、a6 インテグリン抗体 (1 : 100、BD Biosciences、553745)、口腔分化マーカーとして K13 抗体 (1 : 100、Abcam、ab92551)、線維芽細胞のマーカーPDGFR α 抗体 (1 : 100、R&D Systems、AF1062) を使用し、ケラチノサイトの性質を評価した。ケラチノサイトの分化は、培地中のカルシウム濃度を、0.06 mM から 1.2 mM に上げることで誘導した。

結　果

1. 研究計画 1．組織の凹凸構造や幹細胞亜集団の制御因子 Fibulin-5 の機能解析

上皮幹細胞を制御する環境因子として、柳沢裕美 (筑波大学) との共同研究により細胞外マトリクス fibulin-5 に着目し、欠損マウスの表現型解析を行った。*Fbln5* 欠損マウスでは、以前の報告 [4] と一致して、皮膚に老化様の弛緩が認められたが、脱毛や白髪は観察されなかった。2、6 ヶ月齢のマウスにおいて、BrdU 染色により増殖の変化を調べたところ、*Fbln5* 野生型と欠損マウスの皮膚および口腔で、顕著な差は見られなかった。一方、分化マーカーである K10、

K31 を染色したところ、*Fbln5* 欠損マウスでは K31 陽性の領域が狭くなり、K10 陽性の領域が広がる傾向が見られた。K31 陽性の分化細胞は高分裂の表皮幹細胞に、K10 陽性の分化細胞は低分裂の表皮幹細胞に由来することから［2］、*Fbln5* 欠損マウスは、分裂頻度の異なる 2 種類の幹細胞集団のバランスが乱れている可能性が示唆された。

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。皮膚と口腔では、上皮組織の下に位置する組織の硬さや細胞種に違いがあり、組織特異的な機能を果たす可能性が考えられる。

2. 研究計画２．アロダームとマイクロパターンゲルを用いた *in vitro* 上皮脚モデルの確立

泉健次（新潟大学）との共同研究により、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（凹凸構造の間隔、大きさ、深さ、傾斜、ゲルの硬さ等）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。

ヒト皮膚ケラチノサイトを用いた培養では、アロダームの足場上で、重層化が誘導でき、培養日数や、培地成分が適切であることが確認できた。一方、マイクロパターンゲルを用いた培養では、ゲルに細胞が生着しない、培養途中でゲルから上皮シートが剥離してしまう、凍結切片が上手く作製できないなどの複数の課題が見つかり、現在までに培養条件の確立に至っていない。また、マウス皮膚ケラチノサイトは、マイクロパターンゲルへの生着が特に悪く、培養条件を変えても改善が見られなかった。マウス皮膚ケラチノサイトに比べ、増殖が早く、幹細胞性が高いとされるマウス口腔ケラチノサイトを代わりに使用しようと考えたが、マウス口腔ケラチノサイトは細胞の単離・培養法が確立されていなかったため、培養プロトコルの検討を行った。その結果、Epilife にケレックス処理をしたウシ胎児血清を 20%加えることで、大幅に細胞の増殖・生存を改善することができ、マウス口腔ケラチノサイトの単離・培養に成功した。この方法はビデオプロトコルとして論文発表した［8］。成体マウスの口蓋組織（図 1a）から単離したケラチノサイトは、ケラチノサイトに特徴的な多角形の形態を示し、単離後 1～2 週間程度でクラスターを作って増殖する様子が認められた（図 1b）。さらに、口腔ケラチノサイトの免疫染色を行ったところ、p63 陽性、K14 陽性、a6 インテグリン陽性、K13 陰性、PDGFRα陰性であることから、未分化状態を維持していることが確認された（図 1c）。確立されたマウス口腔ケラチノサイトを用い、マイクロパターンゲル培養を行ったところ、マウス皮膚ケラチノサイトと比べ、顕著な細胞接着の改善が見られた。一方、高カルシウム濃度および気相液相培養により、ケラチノサイトの分化・重層化を誘導したが、分化マーカーの発現上昇は見られるものの、ヒト皮膚ケラチノサイトで誘導されるような重層化は見られず、細胞は 1 層のままゲル上にとどまっていた。

以上のことから、マイクロパターンを用いた三次元培養系の確立には、さらなる培養条件の検討が必要と結論づけた。

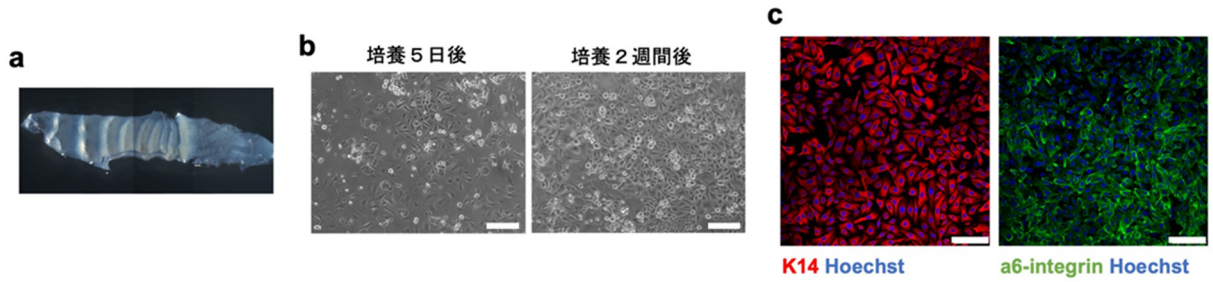


図 1. 単離したマウス口腔ケラチノサイトの性質の解析

a) 成体マウス口蓋組織の実体顕微鏡写真。

b) 成体マウス口蓋組織からケラチノサイトを単離し、培養 5 日、2 週間培養した細胞の形態。スケールバー：400μm。

c) マウス口腔ケラチノサイトを培養後、免疫染色により基底細胞マーカー（K14、a6 インテグリン）の発現を確認したもの。核染色には Hoechst を用いた。スケールバー：100μm。

考　察

筆者はこれまでに、マウス表皮では分裂頻度の低い細胞だけでなく、活発に分裂する細胞も幹細胞として働くことを見出し、さらにこれらの表皮幹細胞が皮膚組織の中で高度に領域化しているという現象を発見した［2］。本研究は、マウスにおける知見をもとに、立体組織としての皮膚再生に向け、不均一な表皮幹細胞集団とそれを支える環境因子の理解を目指して実施した（図 2）。本研究では、細胞外マトリクス *fibulin-5* の欠損により 2 種類の表皮幹細胞のバランスが崩れる可能性を見出し、新たな環境因子としての役割を示した。今後は、fibulin-5 がどのようにして、表皮幹細胞の制御に働くのか分子機構の解明をさらに進めていきたい。皮膚・口腔ケラチノサイトを用いた三次元培養では、実験条件のさらなる検討が必要ではあるものの、凹凸構造が表皮幹細胞に及ぼす影響を直接検証する上で重要な新たな培養モデルの構築が期待される。組織幹細胞を制御する機構として、力学的環境や細胞外マトリクスの重要性が示唆されているが、それらを *in vitro*、*in vivo* で解析する実験系が不足しており、本研究で得られた成果は幹細胞制御の基礎的理解へつながる重要な一歩であると考えられる。

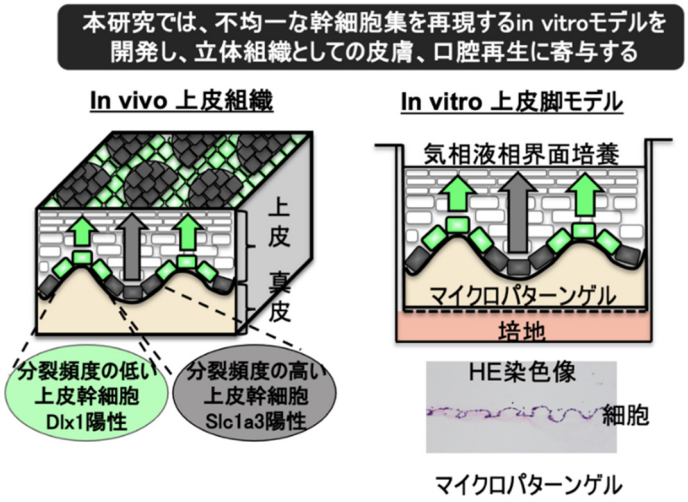


図 2.　本研究の全体構想

皮膚、口腔の上皮組織において分裂頻度の異なる上皮幹細胞は凹凸構造と相関して局在する。このような上皮幹細胞の分裂不均一性を再現した *in vitro* モデルを開発することで、将来的に再生医療や創薬プラットフォームとしての利用が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、筑波大学生存ダイナミクス研究センターの柳沢裕美、新潟大学大学院医歯学総合研究科の泉健次、早稲田大学ナノ・ライフ創新研究機構の水野潤である。本研究を遂行するにあたり、多大なご支援をいただきました上原記念生命科学財団に心より感謝申し上げます。

文　献

1）　Hirsch T, Rothoeft T, Teig N, Bauer JW, Pellegrini G, De Rosa L, Scaglione D, Reichelt J, Klausegger A, Kneisz D, Romano O, Secone Seconetti A, Contin R, Enzo E, Jurman I, Carulli S, Jacobsen F, Luecke T, Lehnhardt M, Fischer M, Kueckelhaus M, Quaglino D, Morgante M, Bicciato S, Bondanza S, De Luca M. Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. Nature. 2017 Nov 16;551(7680):327-332. Epub 2017 Nov 8. PMID: 29144448. doi: 10.1038/nature24487.

2) Sada A, Jacob F, Leung E, Wang S, White BS, Shalloway D, Tumbar T. Defining the cellular lineage hierarchy in the interfollicular epidermis of adult skin. Nat Cell Biol. 2016 Jun;18(6):619-31. Epub 2016 May 16. PMID: 27183471. doi: 10.1038/ncb3359.
3) Mobasseri SA, Zijl S, Salameti V, Walko G, Stannard A, Garcia-Manyes S, Watt FM. Patterning of human epidermal stem cells on undulating elastomer substrates reflects differences in cell stiffness. Acta Biomater2019 Mar 15;87:256-264. Epub 2019 Jan 30. PMID: 30710711. doi: 10.1016/j.actbio.2019.01.063.
4) Yanagisawa H, Davis EC, Starcher BC, Ouchi T, Yanagisawa M, Richardson JA, Olson EN. Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. Nature 2002 Jan 10;415(6868):168-71. PMID: 11805834. doi: 10.1038/415168a.
5) Papke CL, Yanagisawa H. Fibulin-4 and fibulin-5 in elastogenesis and beyond: Insights from mouse and human studies. Matrix Biol. 2014 Jul;37:142-9. Epub 2014 Mar 6. PMID: 24613575. doi: 10.1016/j.matbio.2014.02.004.
6) Budatha M, Roshanravan S, Zheng Q, Weislander C, Chapman SL, Davis EC, Starcher B, Word RA, Yanagisawa H. Extracellular matrix proteases contribute to progression of pelvic organ prolapse in mice and humans. J Clin Invest 2011 May;121(5):2048-59. doi: 10.1172/JCI45636. Epub 2011 Apr 25. PMID: 21519142
7) Lichti U, Anders J, Yuspa SH. Isolation and short-term culture of primary keratinocytes, hair follicle populations and dermal cells from newborn mice and keratinocytes from adult mice for in vitro analysis and for grafting to immunodeficient mice. Nat Protoc 2008;3(5):799-810. PMID: 18451788. doi: 10.1038/nprot.2008.50.
8) Xuan Ngo Y, Haga K, Suzuki A, Kato H, Yanagisawa H, Izumi K, Sada A. Isolation and Culture of Primary Oral Keratinocytes from the Adult Mouse Palate. J Vis Exp. 2021 Sep 24;(175). PMID: 34633387. doi: 10.3791/62820.