

## 発生再生の分子メカニズムを応用した人工皮膚作製

杉山俊博、亀田隆  
秋田大学 医学部生化学第一講座

### 【目的・背景】

培養表皮は再生医工学技術による最も初期の産物である。1970年代に Green 博士らは Swiss-3T3 細胞をフィーダー細胞として利用することでヒト表皮角質化細胞の増殖をコントロールし、培養人工表皮を作製することに成功した。この技術は火傷や母斑の治療に広く応用され成功を収めている。現在ではベンチャービジネス企業群により同種移植用の培養表皮が凍結品として供給されているが、恒久的な生着を可能とする自家移植用培養表皮を迅速に供給する為には培養表皮作製に要する期間をより短縮することが重要である。

*hedgehog* 遺伝子産物はショウジョウバエに発生異常を引き起こす変異遺伝子として同定されたが、哺乳類では *sonic hedgehog*・*indian hedgehog*・*desert hedgehog* の3種が相同遺伝子として報告されている。このうち *sonic hedgehog* 遺伝子産物 (Shh) は哺乳類の発生において肢芽の前後軸決定など形態形成のシグナル因子として重要な役割を担っていることが知られている。ヒトの表皮基底細胞がんや毛包腫等の極未熟なケラチノサイトが癌化したと考えられる腫瘍の解析から Hedgehog タンパク質を介したシグナル伝達が表皮幹細胞の増殖制御において重要な役割を担っていることが示唆されている。本研究では、Hedgehog シグナル生理作用の培養表皮作製系への応用を目指した。

### 【結果・考察】

Shh 遺伝子産物のケラチノサイト増殖促進効果は再生医工学分野においても利用可能であると考えられるが、現在までのところ生理活性を持った Shh 精製タンパク質を入手することは一般的に困難である。またヒト表皮ケラチノサイトへの直接的な Shh 発現ベクターの導入は細胞のがん化を誘発する可能性が高く安全面での不安が大きい。これらの問題を解決するために我々は上皮系細胞の培養や培養表皮作製にフィーダー細胞として広く用いられている Swiss-3T3 細胞へ Shh 発現遺伝子を導入した。リポフェクション法により Shh 発現プラスミドを導入後、G418 による選択を行い Shh 発現フィーダー細胞株を樹立した。放射線照射によりフィーダー化した本細胞株を用いることで顕著なケラチノサイトコロニーの増殖促進が観察された。Shh 発現フィーダー細胞との共培養では通常は観察されない極小サイズのケラチノサイトの活発な増殖が認められた。これらの効果は Hedgehog シグナル阻害剤サイクロパミンにより顕著に抑制された。Shh 発現フィーダー細胞を用いて作製した培養表皮は基底細胞層上に重層した細胞層を形成しており再生医工学に十分利用可能であると予測される。我々の開発した手法は表皮再生医工学技術の開発ならびに幹細胞研究のためのツールとして有用であると期待される。