

骨髄細胞を用いた皮膚の構築

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生物学分野

許 南 浩

Recently we demonstrated the participation of whole bone marrow cells from adult mice in the reconstitution of skin including the epidermis and hair follicles (Kataoka et al., Am J Pathol 163:1227-1231, 2003). To get an insight into cell populations that give rise to the epithelial components of the reconstituted skin, we fractionated bone marrow cells derived from green fluorescent protein-transgenic mice by density gradient. Unexpectedly, we found that a substantial amount of mononucleated cells (~30%) was recovered in the pellet fraction and that the cells in the pellet fraction preferentially differentiated into epithelial components of skin than the cells in the mononuclear cell fraction. The pellet fraction contained more CD45-negative (thus uncommitted to the hematopoietic cell lineage) cells than the mononuclear cell fraction. These results indicate that the density gradient fractionation results in significant loss of specific progenitor cells into the usually discarded pellet fraction.

1. 緒言

近年、骨髄に由来する細胞が血液細胞以外の様々な組織細胞、例えば骨、軟骨、筋肉、肝臓、肺、心臓、脳、皮膚などの細胞に分化する能力をもつことが明らかにされた。このことに対応して、骨髄から複数の幹細胞・前駆細胞が単離同定されている。血液幹細胞は血液細胞のみでなく、肝臓や皮膚細胞にも分化しうる。間葉系幹細胞は骨、軟骨、脂肪、腱、筋肉の他に、神経細胞まで生み出す能力があることが示された。また、Verfaillie 等が単離した MAPC (multipotent adult progenitor cells) と呼ばれる細胞は、分裂能力も高く、多様な細胞に分化する。さらに、薬剤排出能力が高いことを指標に単離される SP 細胞も、多分化能を示す。このように骨髄は、最も豊かな幹細胞の供給源であると考えられる。

骨髄の他にも、多様な成体組織から多分化能を持つ幹細胞が単離されている。しかし、現在のところ、その生理的意義は十分明らかではない。皮膚は独自の幹細胞を保持しており、傷害を受けるとそれらを動員して組織を修復しうる。それでは何故、他の体組織に皮膚に分化しうる幹細胞が存在しているのであろうか？ また、どのような幹細胞が最も効率よく皮膚構成細胞に分化するのでであろうか？ 皮膚にもともと存在していた幹細胞から分化した表皮細胞と、他の組織幹細胞から分化した表皮細胞では、その性質に違いがあるであろうか？ このような問題を明らかにする

ことは、皮膚の生理、病理、さらにはコスメトロジーの観点からも、大きな意義を持つ。

我々は、ヌードマウスの背部皮膚切除部に特殊なシリコンチャンバーを装着し、その内部に細胞浮遊液を播種することによって比較的短期間に皮膚組織を再構築する実験系を樹立した。本研究はこのシステムを用いて、骨髄細胞の中でどのような細胞集団が効率よく表皮角化細胞をはじめとする皮膚構成細胞に分化するのかを明らかにしようというものである。

2. 実験

2.1 マウス

骨髄細胞は、GFP-トランスジェニックマウス（阪大、岡部勝教授より提供を受けた）から調製した。このマウスは強力なプロモーターの下流に GFP を繋いだベクターが導入されており、全身殆どの細胞が蛍光をあてると緑色に光る。胎児皮膚細胞の調製には、胎生 16.5 日の ICR マウスを用いた。組織構築は、成体 BALB/c ヌードマウスを用いて行った。

2.2 胎児皮膚細胞の調製

胎児皮膚を切り出し、0.05% コラゲナーゼ、4 度で一晩消化した後、実体顕微鏡下で表皮を真皮から剥離した。それぞれをピペッティングによって浮遊し、メッシュを通して細胞浮遊液とした。

2.3 骨髄細胞の調製と解析

大腿骨の両端を切除し、骨髄を生理食塩水で洗い出すことにより骨髄細胞を採取した。この浮遊液を Histopaque 1083 に上層して 400xg 30 分間遠心して、細胞を分画した (Fig. 3)。各分画の細胞を 3 回生理食塩水で洗浄した後、



Reconstitution of skin using bone marrow-derived cells

Nam-ho Huh

Department of Cell Biology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

FACS Calibur (BD Biosciences) を用いた細胞の前方および側方散乱解析と、免疫染色を行った。

2.4 細胞移植

移植した皮膚細胞は、表皮由来細胞と真皮由来細胞を各々 500 万個ずつ混合したものである。実験によってこの浮遊液に 500 ~ 1,000 万個の骨髄細胞を混入した。ネブタール麻酔下のヌードマウスの背部皮膚全層を直径約 1 cm の円形に切除し、下部シリコンチャンバーを装着した (Fig. 1)。細胞浮遊液を遠心して可能な限り少量の液に浮遊した後、チャンバー内に播種し、上部シリコンチャンバーをかぶせた。1 週間後にシリコンチャンバーを取り除き、経過を観察した。

2.5 組織採取、免疫染色

細胞を移植して 3 週間後に移植部位に形成された皮膚組織を切除し、4% パラホルムアルデヒドで固定、Technovit 8100 (Heraeus Kulzer) に包埋した。1 サンプルについて切片を少なくとも 20 枚作製し、GFP-陽性細胞 (すなわち骨髄由来細胞) を検索した。GFP-陽性細胞の計測は、写真上で行った。サイトケラチン (上皮細胞マーカー) と von-Willebrand factor (血管内皮細胞マーカー) に対する抗体を用いて免疫染色を行った。また切片を 60% イソプロピルアルコールで処理した後、0.18% Oil Red O で染色することによって、皮脂腺細胞を同定した。

3. 結果と考察

3.1 骨髄細胞の分画

胎生 16.5 日のマウス胎児皮膚から調製した細胞浮遊液をシリコンチャンバー内に播種すると、3 週間で皮膚組織が構築され、表皮は勿論、毛のうや皮脂腺も形成される (Fig. 1)。この細胞浮遊液に GFP-陽性の骨髄細胞を混入すると、その細胞が周囲の環境の影響を受けて、表皮角化細胞、毛のう細胞、皮脂腺、血管内皮細胞などに分化した (Fig. 2)。この実験では、骨髄細胞を未分画のまま用いたが、どのような細胞集団が皮膚構成細胞に分化するのかを明らかにするために、骨髄細胞をまず分画した。

骨髄細胞浮遊液には大量の赤血球が含まれる。従って、通常、細胞の分画実験を行うには、まず密度勾配遠心によって単核細胞分画を調製し、それをさらに分画するのが一般的である。そこで我々もまず単核細胞を調製し、それをマウス胎児皮膚細胞と混合して移植し、皮膚組織構築への貢献度を検討した。単核細胞分画というのは骨髄中の有核細胞の大部分が回収されると考えられているので、当然未分画の骨髄細胞と同様な結果が得られると期待したが、予想に反して皮膚の上皮成分への貢献は大幅に低下していた。その原因を明らかにするために、以下の検討を行った。

骨髄細胞を密度勾配遠心によって分画すると、上清、単核細胞分画、中間層、沈渣にそれぞれ 0%、62%、7%、31% の細胞が回収された (Fig. 3)。赤血球は部分的に溶血しており、単核細胞分画、沈渣中の有核細胞率は、68% と

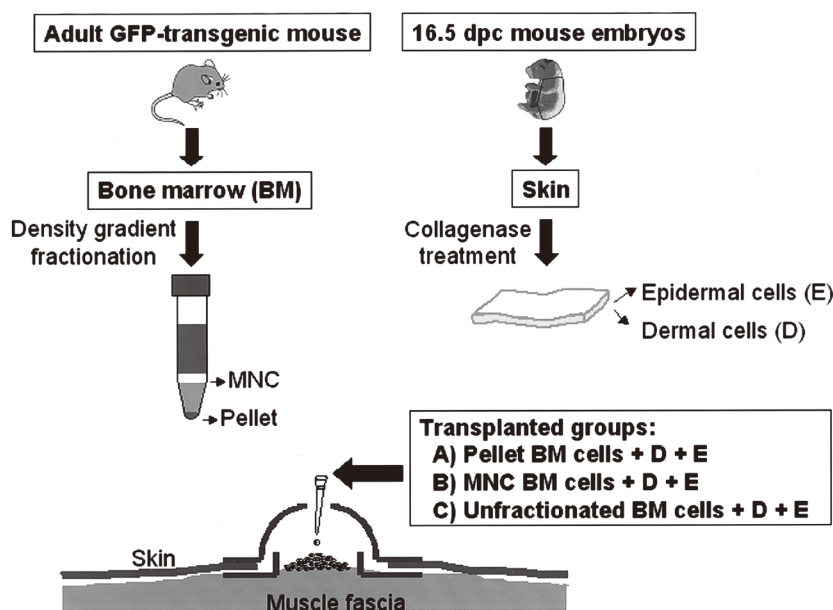


Figure 1 Skin reconstitution assay using a silicon chamber. Bone marrow cells from adult GFP-transgenic mice were fractionated by density gradient centrifugation, mixed with embryonic mouse skin cells, and transplanted into skin defects made on the backs of nude mice. MNC, mononuclear cells.

41%であった。このような分画パターンは、密度勾配遠心の媒体を変えても、大きな変化は見られなかったので、一般的な現象だと考えられる。

3.2 再構築された皮膚組織中の細胞の同定

移植した骨髄細胞によってどのような皮膚構成細胞が形成されたかは、GFP-陽性細胞の形態、局在、脂肪染色、免疫染色によるマーカータンパク質の検出等によって判定した (Fig. 2)。表皮角化細胞と毛のう細胞は、その形態や局在に加えてサイトケラチンを発現することが指標となる。皮脂腺細胞は Oil Red O 染色陽性である。樹状細胞は表皮内に存在し、その特徴的な形態から容易に同定できる。血管内皮細胞は環状構造をなし、von Willebrand factor を発現する。筋肉細胞と脂肪細胞はその形態と局在から同定した。それ以外の細胞は、その形態によって球形細胞と紡

錘形細胞に分類した。

3.3 単核細胞分画と沈渣分画の皮膚細胞への分化

骨髄沈渣分画の細胞は単核細胞分画に比較して、毛のうに分化する頻度が高かった (Table I, Fig. 4)。骨髄沈渣分画を移植した8回の実験ではその全てで毛のうに分化した細胞が検出できたが、単核細胞分画では12回の移植実験中、毛のうに分化した骨髄細胞を検出できたのは2回にとどまっていた。再構築された皮膚に存在するGFP-陽性細胞 (すなわち骨髄由来細胞) のうちの毛のう細胞の比率は、沈渣分画を移植した場合は23.1%、単核細胞分画を移植した場合は4.9%であって、統計的に明確な有意差があった。同様に、沈渣分画細胞は単核細胞分画に比べて皮脂腺細胞にもより高い頻度で分化した。反対に、血管内皮細胞に分化する確率は、単核細胞分画が高かった。

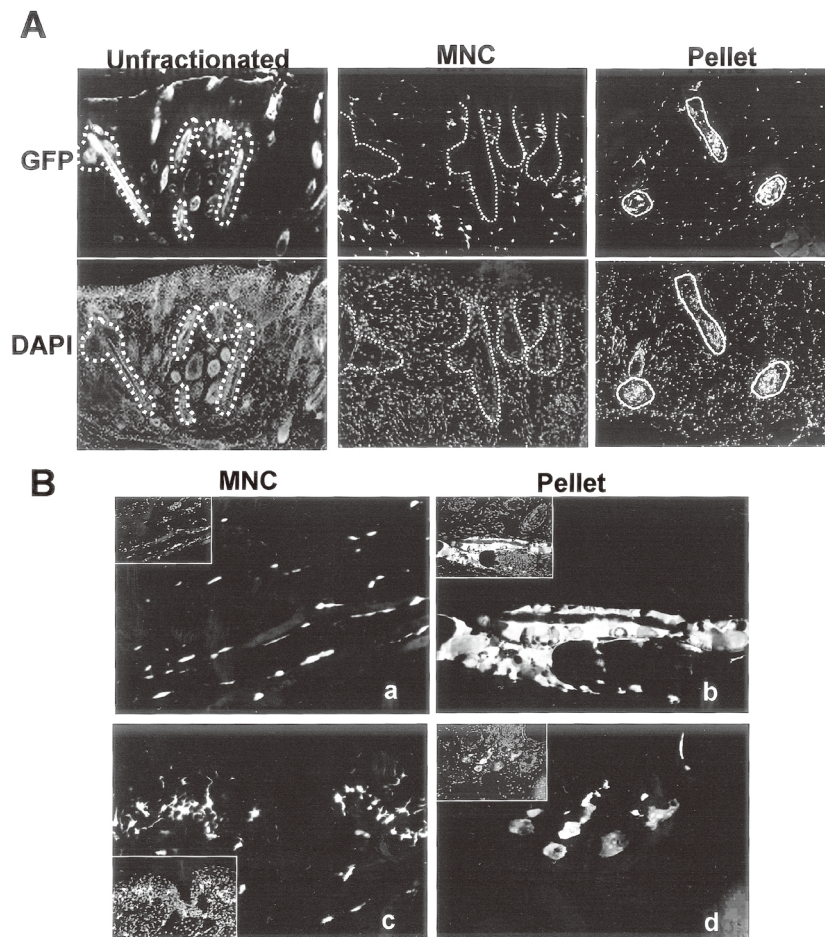


Figure 2 Density gradient fractionation of adult mouse bone marrow cells. (A) Density gradient fractionation divides the bone marrow cells into four fractions. Most of the nucleated cells were recovered in the MNC fraction (low density) and pellet fraction (high density). (B, C) Flow cytometric analysis of the MNC and pellet fractions. The abscissa and ordinate are forward scatter and side scatter, respectively. GFP-positive cells (viable nucleated cells) are indicated in red. GFP-negative large (viable nucleated cells) and small cells (erythrocytes and dead cells) are indicated in blue and black, respectively.

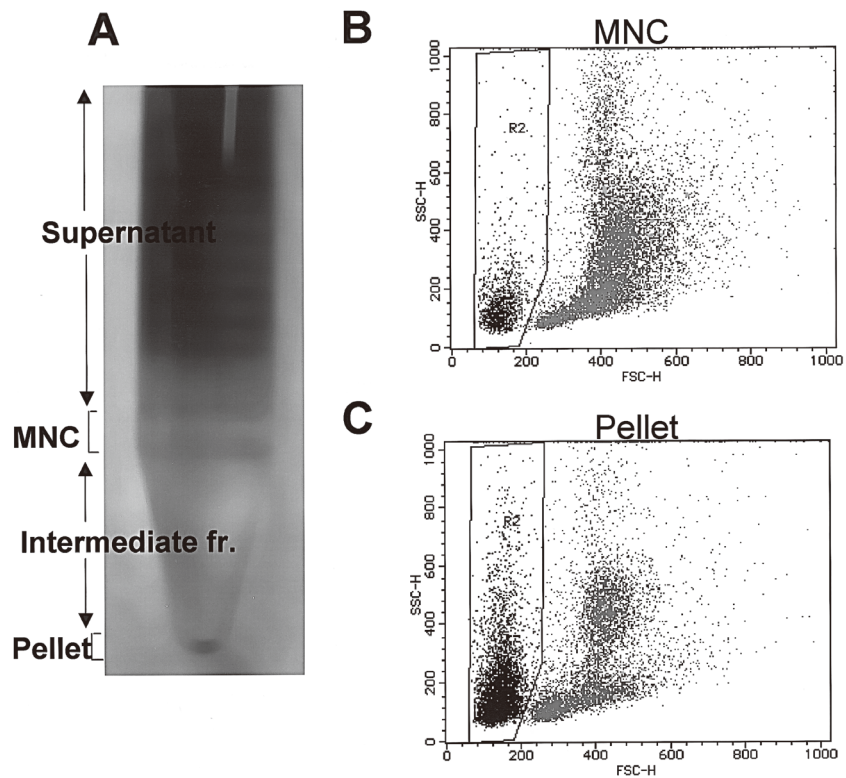


Figure 3 Immunohistochemistry showing multipotent differentiation capacity of bone marrow cells. (A) Cells composing hair follicles formed by transplantation of the pellet fraction. Co-localization of GFP signal (A2) and cytokeratin expression (A3). Nuclei were stained with DAPI (A2). (B) Peri-sebaceous gland cells after transplantation of the pellet fraction. (B1), DAPI staining with dotted lines indicating the sebaceous glands; (B2), GFP signal present in the outer layer of sebaceous glands; (B3), a merged image of GFP and Oil red O staining. (C) Endothelial cells after transplantation of the MNC fraction. GFP signal (C1) was co-localized with von Willebrand factor (C2) as indicated by arrowheads. Erythrocytes were observed in the vessel lumen (*).

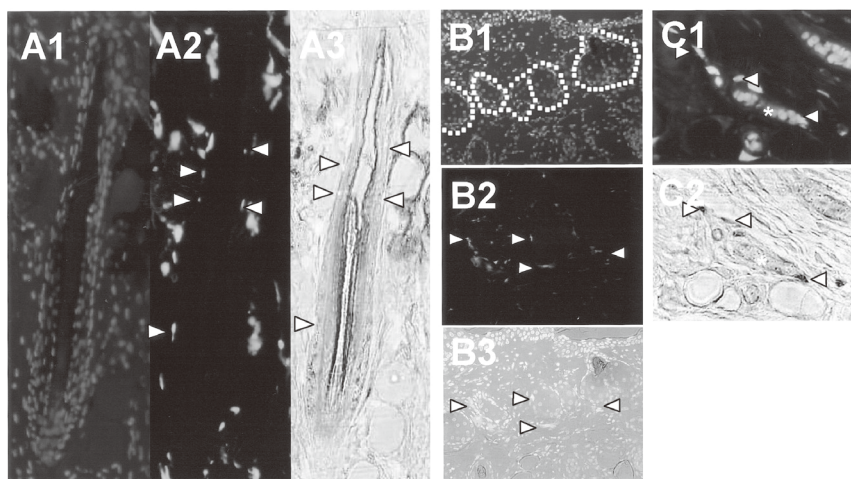


Figure 4 Fluorescent-activated cell sorter analysis of the cells recovered in the MNC and pellet fractions after density gradient fractionation. The antibodies against CD45 was conjugated with fluorescein isothiocyanate (green; detected by FL1 covering 515 to 545 nm) and the antibodies against CD117 (c-kit) and CD200 were conjugated with phycoerythrin (red; detected by FL2 covering 653 to 669 nm).

Table I. Differentiation of bone marrow cells into various cell types in skin

	Incidence of differentiation events			No. of GFP-positive cells		
	Whole	MNC	Pellet	MNC	Pellet	
No. of experiments	7	12	8			
No. of GFP(+) cells counted (Total number of cells counted)				100% (2,455)	100% (1,579)	
Epidermal keratinocytes	2 / 7	1 / 12	2 / 8	0.3%	0.5%	
Hair follicle cells	4 / 7	2 / 12	8 / 8	4.9%	23.1% *	
Sebaceous gland cells	3 / 7	3 / 12	7 / 8	3.3%	8.3% **	
Dendritic gland cells	7 / 7	11 / 12	8 / 8	4.3%	4.1%	
Endothelial cells	4 / 7	12 / 12	3 / 8	2.6%	0.9% ***	
Muscle cells	-	2 / 12	3 / 8	0.3%	0.6%	*) MNC<Pellet p<0.0
Adipocytes	-	2 / 12	0 / 8	0.6%	0.0%	**) MNC<Pellet p<0.0
Spindle cells	7 / 7	12 / 12	8 / 8	58.4%	52.7%	***) MNC>Pellet p<0.0
Round cells	7 / 7	12 / 12	8 / 8	25.9%	9.8%	(Mann-Whitney test)

Table II. Percentage of cells positive for expression of cell surface markers in the MNC and pellet fractions.

	MNC	Pellet	No. of experiments	
CD45	85.7 +/- 2.3	35.5 +/- 4.4	4	*
CD90	4.5 +/- 1.8	2.6 +/- 0.2	4	
γδTCR	12.0 +/- 1.9	7.4 +/- 1.4	3	**
CD34	1.2 +/- 1.3	1.5 +/- 0.7	4	
CD29	95.2 +/- 2.7	94.0 +/- 0.7	4	
CD49f	13.7 +/- 2.3	9.0 +/- 2.2	4	**
CD200	28.4 +/- 0.4	9.3 +/- 0.5	3	*
CD117	14.0 +/- 2.5	4.9 +/- 1.3	9	*

*) MNC>Pellet p<0.001
 **) MNC>Pellet p<0.05
 (ANOVA method)

3.4 単核細胞分画と沈渣分画に含まれる細胞のマーカータンパク質の解析

単核細胞分画と沈渣分画にそれぞれどのような特徴を持つ細胞が含まれているのかを明らかにするため、いろいろなマーカータンパク質に対する抗体で染色した後に、FACSで解析した (Table II)。CD45、CD117、CD200 陽性の細胞の頻度は、沈渣分画が単核細胞分画に比較して低かった。CD49f、gdTCR 陽性細胞の頻度の差はわずかで、CD90、CD34、CD29 の発現は両分画で差が認められなかった。二重染色による解析では、CD117 や CD200 の陽性細胞は CD45 陽性細胞集団中のみ検出され、CD45 陽性細胞集団中の CD117 や CD200 の発現頻度は、両分画で差が認められなかった。以上を総合すると、沈渣分画は血液細胞に分化するよう決定づけられている細胞を含む頻度が低い、言い換えれば血液細胞系以外の幹細胞がより高い頻度で含まれるという可能性が示唆された。

3.5 本研究の意義

骨髄から細胞を採取すると、一般に多数の赤血球が含まれている。そこで、殆ど全ての実験が密度勾配遠心によって赤血球を沈渣として取り除き、その上部に層を形成する単核細胞分画を使用した行われている。本研究は、通常行われている密度勾配遠心の後、赤血球として廃棄されている沈渣分画にも単核細胞分画の四分の一程度の有核細胞が含まれていること、しかも沈渣分画に回収される細胞集団にはより幅広い細胞系列に分化する幹細胞が含まれていることを明らかにしたもので、その意義は大きい。

我々の一連の研究によって、骨髄細胞は適当な環境におかれれば短期間に予想以上の頻度で皮膚細胞に分化しうることが明らかになった。ヒトで同様なことが起こるのか、もし起こるとすれば皮膚内部から再生増殖してきた細胞と、骨髄をはじめ皮膚外組織に由来する細胞とで機能的にどのような違いがあるのか、このような問題は皮膚の生理・病理を明らかにするだけでなく、コスメトロジーの観点からも非常に興味のある課題である。