

真皮幹細胞を利用した皮膚の若返り治療

京都大学大学院医学研究科形成外科

内藤 素子

Intrinsic aging and photodamage of the face result in dull and lax skin with clear and deep wrinkles at rest. The “aged face” is characterized by poorly organized dermal extracellular matrix, including collagens and elastic fibers. Many young peoples also have skin troubles, such as acne scar. Although ablative and nonablative therapies of skin resurfacing and rejuvenation are performed against these skin damages, these methods do not achieve complete remission. Recently, dermal multipotent cells (DMCs) were isolated from the mammalian dermis. These cells are able to differentiate into many cell types including osteocytes, chondrocytes, adipocytes and neuros, and are thus suggested to play important roles in wound healing process as an origin of reproduced dermal tissues. This research project aims to determine whether DMCs have a potency to contribute to skin resurfacing and rejuvenation by differentiating into dermal fibroblastic cells that synthesize de novo matrix. As a first step of the project, we determine the most effective method to obtain DMCs from adult aged human dermis and check their proliferation and abilities to produce matrix proteins. Next, we examine whether DMCs grafted with keratinocytes can differentiate into dermal fibroblast at skin wound in nude-mice and stimulate wound healing process by reproduction of extracellular matrix. These experiments will contribute to the establishment of new complete therapy of damaged skin.

1. 緒言

近年、皮膚の老化に伴うたるみやしわをとり、皮膚を若返らせる、という治療は国民の関心を集めている。また、ニキビ痕などの顔面皮膚表面の凹凸に対する種々のレーザー照射による治療も改良が重ねられ、注目を集めている。しわ、たるみに対するコラーゲンやヒアルロン酸の注入、神経毒素の注入などの局所注入療法や、ピーリング、レーザー療法、Face-Lifting手術などが行われている。これらの治療を行う施設は、ここ数年急激に増加しており、女性誌を開けば、必ずといってよいほどこのような治療に関する広告が掲載されており、女性の関心をいかに集めているかがわかる。しかし、いずれも、効果の程度や持続期間が必ずしも一定ではなく、持続的効果を期待するためには、定期的に処置を受けることが必要である場合が多い。ピーリングは、しわやたるみ、瘢痕による凹凸をとる、ということに関して少ない施術回数で確実な効果を期待するのは難しい。手術療法は、侵襲が大きく、術後の管理も必要となり、患者の負担も大きい。最近、自己血液より採取した血小板分画を濃縮し、注入することにより、皮膚の若返りを図る試みがなされているが、効果の確実性や持続性などが一定しない点があり、個体差もある。あるいは、自己皮

膚より採取した線維芽細胞を皮膚のたるみやしわの部分、にきび痕陥凹部に注入することが一部の施設で行われている。しかし、たとえ注入細胞が生着しても、時間とともにその数は減り、またマトリックスの産生も減少してしまうことが予想される。申請者らが形成外科診療において行う「真皮移植」術においてさえ、移植片は時間の経過とともに吸収されてしまう。このことは、「真皮移植」という極めて新鮮な状態で、自己の真皮線維芽細胞と細胞外マトリックスを移植しても、そのみでは術直後の状態を維持することが困難なことを意味する。そこで我々は、移植された場所で、自己複製し、マトリックスを産生し続ける能力のある細胞を用いることが肝要であると考え、その候補として真皮幹細胞は最適であると予想した。

真皮幹細胞は、2001年にToma¹⁾らによって初めて報告されて (Toma. et al., *Nat. Cell. Biol.* 3: 778-784, 2001) 以降、数報の発表^{2), 3), 4)}がある。マウス真皮幹細胞を分化させ、神経系の細胞を誘導して臨床治療に役立てる方向で研究がなされている。我々は、この真皮幹細胞を皮膚の若返り、あるいは皮膚再生に用いるとことを目的に、研究を開始した。

2. 実験

2・1 成人ヒト皮膚由来真皮幹細胞の効率的採取方法の検討：

成人ヒト真皮幹細胞は数が少なく、従来の sphere 法では効率的に採取することが困難である。Joannides ら⁴⁾ (*Lancet*, 364, 172-178, 2004) の報告をもとに、さらに効率よく真皮幹細胞を採取、培養する方法について検討し、得られた細胞の性質も解析した。



Skin rejuvenation and resurfacing with dermal multipotent cells

Motoko Naitoh

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University

2・2 真皮幹細胞が創傷治癒、真皮性状、癬痕化に与える影響の調査：

真皮幹細胞を血清入り培地にて増殖させて得た細胞 (SDM cell とよぶ) が、創傷治癒、癬痕化にどのような影響を与えるかを調べた。ヌードマウス背部に直径 1 cm の皮膚全層欠損層を作製し、同部に SDM cell を表皮角化細胞とともに移植して経過を観察した。比較対象として、成人ヒト皮膚由来線維芽細胞と表皮角化細胞を移植した。創が縮むことにより治癒する影響を防ぐため、創周囲にシリコンリングをおき、6-0 ナイロン糸で筋層まで糸を通して縫合固定した。

3. 結果および考察

3・1

ヒト成人皮膚を細切後、デイスパーゼ処理により表皮を除去した後、得られた真皮を 2 mm 角程度に細切し、コラーゲナーゼ処理、ストレーナーを通して、non-coated dish に播種した。培養液は、Toma らの方法に順じ、DMEM/F12(1:1) に B27、bFGF、EGF を含有した培地を用いた。約 1 週間後に、図 1-A に示すごとく真皮幹細胞 = sphere が形成されてくる。この sphere を取り出し、細胞培養用 coated dish に入れ、血清添加間葉系細胞用培地で培養すると、約 2～3 日で sphere は dish 底面にはり付き、そこから細胞が増殖し始める (図 1-B)。これを我々は SDM cell と呼んでいる。sphere と異なり、SDM cell は容易に継代が可能である。Joannides ら⁴⁾ の報告では添加血清は 20% となっているが、我々の系では 10% で十分であると考えられる。また、培地中に試薬 A を添加した場合は、少なくとも 14 週間までは増殖率が衰えることなく継代が可能である。次に、この培養液から、血清をふくまない sphere 用培地へ交換すると、dish 底面にはり付いていた細胞は浮遊し始め、1 週間程度でもとの球状の sphere に戻り (図 1-C)、分化能でも可塑性を示す。また、SDM cell のマトリックス産生能をみるため、マイクロアレイにてエラスチン、フィブリリン 1、I 型コラーゲン、の mRNA 発現量を同一人物の同部位から培養した線維芽細胞と比較したところ、それぞれ 2.2 倍、1.35 倍、1.7 倍、SDM cell のほうが産生量が

多いことが判明した (図 2)。

3・2

ヌードマウス背部に作製した直径 1 cm の皮膚全層欠損層に、各細胞を移植して 6 日目で移植部を含むマウス背部皮膚を採取した。図 3-B に示すように線維芽細胞を移植した創は、上皮化していない範囲が広いのに対して、SDM cell を移植したほう (図 3-A) は、すでに上皮化が完了している。皮膚質感も周囲皮膚とかわらずしなやかで拘縮は認められない。SDM cell は表皮角化細胞によるすみやかな上皮化を促し、癬痕化を伴わない真皮再生に影響を与える可能性が示唆された。さらに、長期経過観察を行い、7 ヶ月後の組織所見を比較したところ、SDM cell 移植部位では、真皮内には周囲マウス真皮層よりも太く密なコラーゲン線維束が観察され、十分な厚さの真皮様組織が形成されていた (図 3-C)。一方、線維芽細胞移植部 (図 3-D) ではコラーゲン線維も細く、成熟癬痕様組織であり、厚みも SDM cell 移植部と比較して半分以下であった。以上のことから、ヒト真皮由来幹細胞は良好な増殖能とマトリックス産生能を持ち、皮膚再生や皮膚若返りに有用である可能性が示唆された。

(参考文献)

- 1) Toma JG, Akhavan M, Fernades KJL, et al.: Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat. Cell. Biol.*, 3, 778-784, 2001.
- 2) Kawazoe Y, Yanagi Y, Takato T, et al.: Characterization of multipotent adult stem cells from the skin: transforming growth factor- β (TGF- β) facilitates cell growth. *Exp. Cell. Res.*, 295, 194-203, 2004
- 3) Fernandes KJL, McKenney IA, Mill P, et al.: A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat. Cell. Biol.*, 6, 1082-1093, 2004.
- 4) Joannides A, Gaughwin P, Schwiening C, et al.: Efficient generation of neural precursors from adult human skin: astrocytes promote neurogenesis from skin-derived stem cells. *Lancet*, 364, 172-178, 2004.

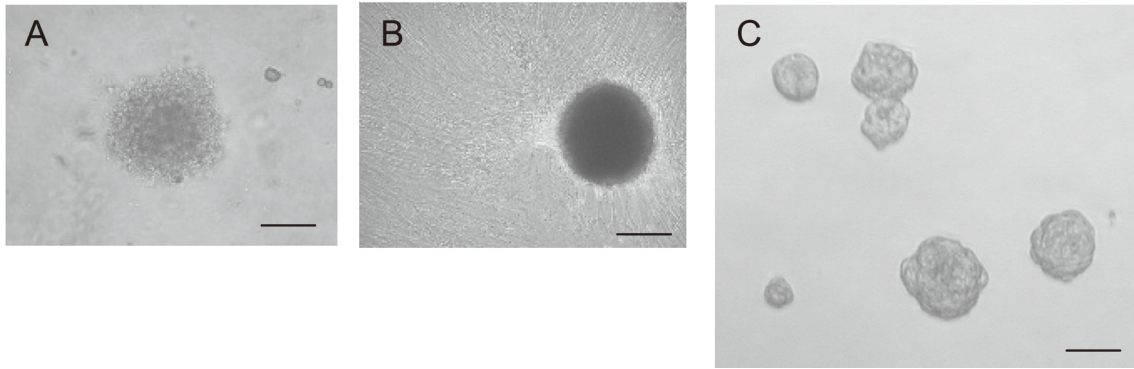


図1 A. sphere 法を用いて 74 歳女性の皮膚より得られた真皮幹細胞。B. sphere を細胞培養用 coated dish で 10% 血清入り培地を用いて培養すると、底面にはりつき増殖する。C. 培地を初代 sphere 用培地に転換すると、はりついていた細胞は浮遊し始め sphere に戻る。Bar=100 μ m

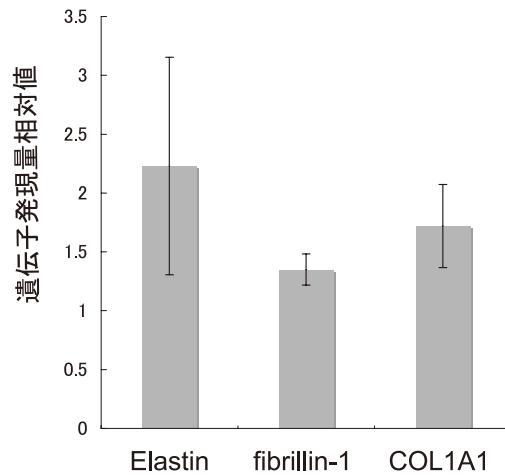


図2 Elastin, fibrillin-1, コラーゲン α 1(1) 遺伝子の発現量の相対値。線維芽細胞における各遺伝子の発現量を 1 としたときの、SDM cell における発現量を数値化した。n=3

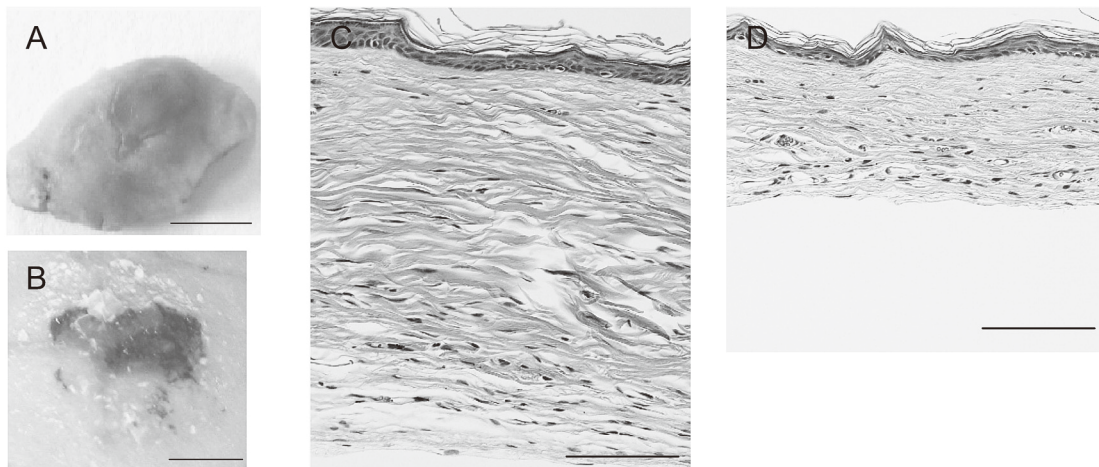


図3 A. ノードマウス背部に作製した皮膚全層欠損層に SDM cell と表皮角化細胞を移植して 6 日後の状態。創は上皮化が完了し、質感も周囲皮膚と大差なく良好な状態である。B. 線維芽細胞と表皮角化細胞を移植したものでは、まだ上皮化が完了していない。Bar=5 mm C. SDM cell と表皮角化細胞移植後 7 ヶ月後、HE 染色像。D. 線維芽細胞と表皮角化移植後 7 ヶ月の結果 HE 染色像。Bar=C,D, とも 100 μ m。