

ヒト表皮角化幹細胞の動態制御を目指した低分子化合物の探索

愛媛大学上級研究員センター

難波 大輔

Reconstruction of epidermal sheets from isolated human epidermal keratinocytes has realized autologous transplantation onto patients with extensive burns. Isolated keratinocytes from human skin have heterogeneity in their proliferative capacity and in ability for regeneration of the epidermis. Keratinocyte stem cells have the greatest proliferative capacity and can produce a progeny large enough to entirely reconstitute the epidermis of an adult human for a lifetime. The stem cells are also available for gene therapy against inherited epidermal disorders such as junctional epidermolysis bullosa. Therefore, increasing self-renewal of keratinocyte stem cells in culture facilitate regenerative medicine using autologous keratinocytes. To address these issues, we explored small molecules that can expand keratinocyte stem cells in vitro. We screened a number of compounds and found three molecules that could increase the number and size of keratinocyte colonies. These molecules enhanced attachment speed but not efficiency of keratinocytes after inoculation, suggesting that rapid adhesion of keratinocytes is crucial for maintenance and self-renewal of human epidermal keratinocyte stem cells.

1. 緒言

表皮角化細胞の培養技術の開発によって、重度の広範囲熱傷患者の救命が可能となった¹⁾。表皮は細胞が常に分裂を繰り返して維持されている組織であるが、作製された移植表皮は生涯に渡って維持される^{2,3,4)}。この事実は、生体より単離された表皮角化細胞の中に幹細胞が存在し、体外での培養表皮作製期間中もその能力を失うことなく維持されていることを示している。表皮角化幹細胞は、培養上で高い増殖能を示し⁵⁾、機能的な培養表皮シートの作製に必須である^{6,7)}。またその幹細胞に対する遺伝子導入は、先天性表皮疾患の治療に応用されている⁸⁾。このように表皮角化幹細胞は治療にとって必須であるにも関わらず、培養上で継代を重ねていくごとに失われていく。この現象はクローナル・コンバージョンとして知られており⁹⁾、表皮角化幹細胞培養における最大の問題点である。また培養において幹細胞特性を維持することが、培養上皮シートを用いた移植医療の成否に最も重要であることが角膜上皮細胞の再生医療研究から明らかとなっている¹⁰⁾。再生医療における細胞培養は熟練した技術者に負うところが大きく、それ故、再生医療そのものが熟練者の数に制限される。容易に幹細胞性を維持できる細胞培養技術を開発することによって、幹細胞移植による再生医療が大きく発展するものと考えられる。

我々は培養ヒト表皮角化幹細胞の幹細胞性を維持させる

方法を開発するため、我々が見出したクローナル・コンバージョンに伴うヒト表皮角化幹細胞の変化に着目し(難波ら、論文投稿中)、本研究において、その変化に影響を与える低分子化合物の中から、ヒト表皮角化幹細胞を培養上でより増幅する、またはより長期に渡って維持する活性を持つ分子の探索を行った。

2. 実験

2.1 表皮角化細胞培養

ヒト表皮角化細胞(KURABOより購入)を、フィーダー細胞としてマイトマイシンCで処理したマウス3T3線維芽細胞を用いて培養した。DME培地とF12培地の3:1混合培地に10%ウシ胎仔血清を含む培養液を用い、37℃、10%CO₂の条件で培養を行った。

2.2 コロニー形成能測定

ヒト表皮角化細胞を200個、6cm細胞培養ディッシュ(IWAKI)に播種し、12日間培養後、10%フォルマリン溶液で固定し、1%ローダミンB溶液で染色することでコロニーを可視し、個数の計測を行った。またコロニーの面積は画像解析ソフトVLOCITY(PerkinElmer)を用いて計測した。

2.3 免疫蛍光抗体法

ヒト表皮角化細胞を4%パラフォルムアルデヒド溶液を用いて固定、0.5% Triton x-100溶液処理し、1%ウシ血清アルブミン溶液でブロッキングを行った。その後、1次抗体を室温で1時間、または4℃で約16時間反応させ、対応する2次抗体で室温下1時間処理を行った。また画像はAxiovert 200M(Zeiss)を用いて取得した。



Exploring small molecules that modulate behaviors of human epidermal keratinocyte stem cells

Daisuke Nanba

Senior Research Fellow Center, Ehime University

3. 結果

3.1 低分子化合物のヒト表皮角化細胞コロニー形成能への影響

我々が見出した培養ヒト表皮角化幹細胞のクローナル・コンバージョンにおける細胞生物学的な変化(難波ら、論文投稿中)に影響を与える市販の低分子化合物を10種類選択し検索した結果、3種類の化合物が細胞播種後24時間の処理で、コロニー数(図1a, b)とコロニーの面積の増大をもたらした(図1a, c)。

3.2 ヒト表皮角化細胞クローンへの影響

特にコロニー形成能に対して影響の大きかった化合物Aに関して、角化細胞のクローンに対して実験を行った結果、ほぼ全てのクローンのコロニー形成能を増大させた(図2)。

3.3 低分子化合物の細胞接着能への影響

各低分子化合物の細胞接着能に関する影響を調べるため、細胞播種後0.5、1、3、6、12時間後にそれぞれ細胞を固定し、角化細胞のみを特異的に認識する凡ケラチン抗体で免疫染色を行い、単位面積あたりの接着細胞を測定した。その結果、化合物AおよびBは、細胞播種後1時間で最大の細胞接着をもたらすことが明らかとなった(図3a, b)。また化合物Cも同様に、細胞接着速度を増大させた(図3a, b)。コントロールと化合物を加えたものでは、播種後12

時間後の細胞接着効率に変化がないことから、これら化合物は、播種後の細胞接着速度を増大させる働きがあることが明らかとなった。

3.4 低分子化合物の細胞死への影響

低分子化合物の細胞死に対する影響を明らかとするために、細胞死(アポトーシス)の際に見出される活性型カスペアーゼ3を認識する抗体と、角化細胞のみを特異的に認識する凡ケラチン抗体で二重染色を行い、角化細胞中でアポトーシスを起こしている細胞の割合を計測した。その結果、培養開始後12時間で、コントロールと化合物を加えたものに有意な差は観察されなかった(図3c)。

3.5 低分子化合物の処理時間の検討

見出した低分子化合物は細胞接着を早く起こさせることによって、コロニー形成能を増大させていると考えられる。特に化合物AおよびBは、細胞播種後1時間で接着率を最大化させている。十分効果的な低分子化合物の処理時間を検討するため、細胞播種後に1、3、6、12時間で通常培地交換を行った。その結果、低分子化合物の処理時間は1時間で十分効果的であることが明らかとなった(図4)。またコントロール実験においても播種後1時間の培地交換で大きなコロニー形成能の低下は起きていないことから、コロニーを形成する角化細胞は、播種後約1時間で接着する細胞であることが強く示唆された。

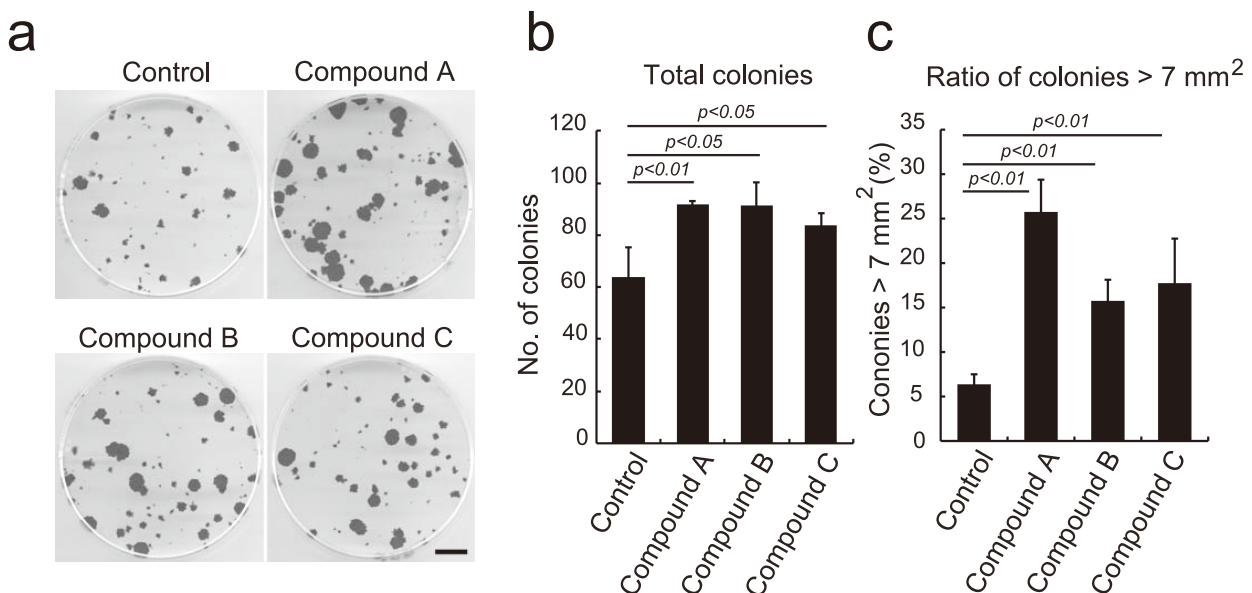


図1 低分子化合物によるコロニー形成能の増大

- 6cmの細胞培養ディッシュに200個のヒト表皮角化細胞を播種し、同時に3種類の低分子化合物を最終濃度10 μ Mで添加した。培養開始から24時間後に培地を交換し、さらに11日間培養を行い(計12日間)、細胞を10%ホルマリンで固定後、1%ローダミンBで染色した。スケールバー: 10 mm。
- 培養12日後のコロニー数。
- 培養12日後の面積が7mm²以上のコロニーの割合。低分子化合物A、B、Cを培養開始後24時間添加することによって、コロニー数と各コロニー面積の増大が観察された。

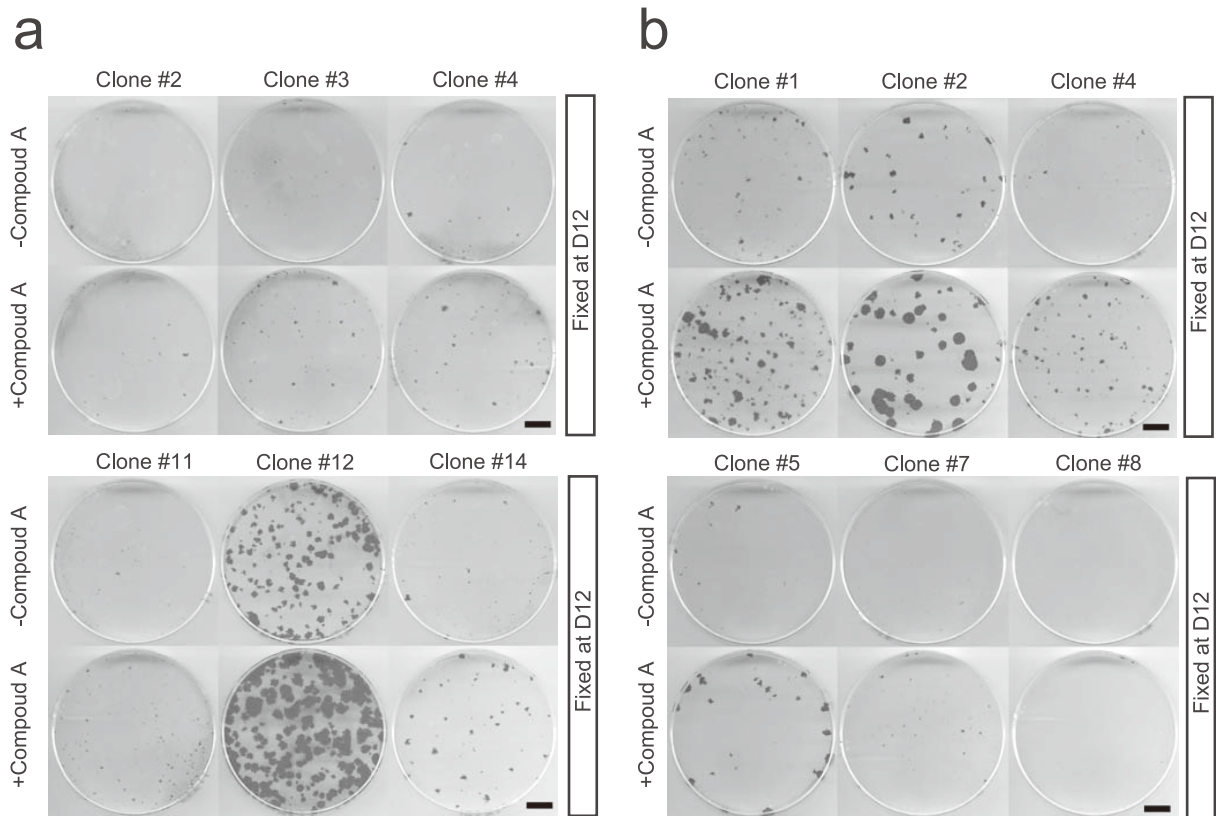


図2 角化細胞クローンに対する化合物Aの効果

角化細胞をクローニングし、各クローンに対する化合物Aの効果をも12日間培養することで評価した。化合物Aを培養開始後すぐ添加し24時間後に培地交換した。(a)と(b)は独立したクローン解析。スケールバー：10 mm。増殖活性の異なる角化細胞クローンに対して、化合物Aはコロニー形成能を増大させた。

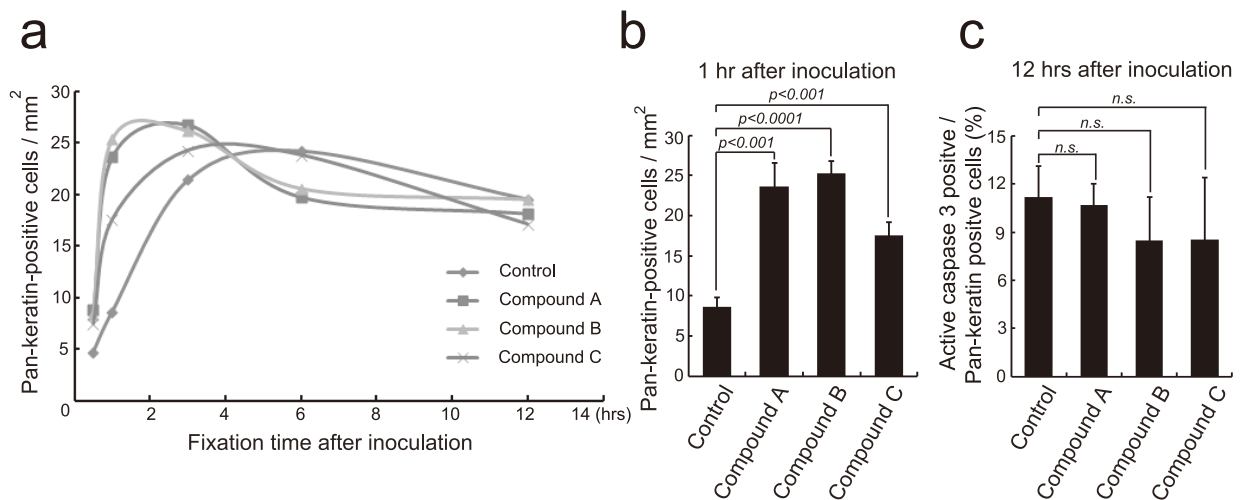


図3 低分子化合物の角化細胞接着および細胞死への影響

- 角化細胞を低分子化合物存在下で播種後、0.5、1、3、6、12時間後に固定し、角化細胞を特異的に認識する凡ケラチン抗体で免疫染色することで、単位面積当たりの接着した角化細胞の数を測定した。
- 培養開始後、1時間後の接着した角化細胞の数。
- 培養開始後12時間で細胞を固定し、角化細胞のうちでアポトーシス細胞で検出される活性型カスパーゼ3を発現している細胞の割合。低分子化合物は細胞接着速度を増大させたが、細胞死を抑制することはなかった。

4. 考 察

ヒト表皮角化細胞のコロニー形成能の測定は、個々の角化細胞の増殖能力を容易に可視化できる評価方法である。表皮角化幹細胞は特にコロニー形成能が高いことが知られている⁵⁾。今回、この実験法を用いて、表皮角化細胞のコロニー形成能を増大させる低分子化合物の検索を行ったところ、三種類の化合物を見出すことができた。これらの化合物はすべて細胞のある基本的特性を阻害する。今回の研究では、この基本特性の阻害が、角化細胞の迅速な接着を促すことが明らかとなった。細胞基質間の接着を担うβ1インテグリンタンパク質の発現量の高い細胞が、コロニー形成能の極めて高いヒト表皮角化幹細胞であるという報告¹¹⁾がある。本研究では、化合物によるインテグリン分子の発現制御に関して実験を行っていないが、化合物処理1時間という非常に短い時間で十分な効果を発揮することから、コロニー形成能の増大には、インテグリン分子の量以外にも重要な要素が存在することが示唆される。

短時間の化合物処理による迅速な接着がコロニー形成能を増大させる事実は、迅速に角化細胞を培養面に接着させることによって、どのような増殖活性を持つ角化細胞も増殖活性が増大することを示唆している。すなわち培養系に

において評価されるヒト表皮角化幹細胞とは、迅速に接着することができる細胞であると考えられる。この特性を明らかにすることで、新しいヒト表皮角化幹細胞像が見えてくると予想される。

本研究で見出された低分子化合物は、非常に短い処理時間で、ヒト表皮角化細胞の培養効率を改善することができた。それは特に幹細胞のような非常に増殖能の高い角化細胞が増大したためであると推測される。このような化合物を用いることで、迅速な培養表皮シートの作製が可能となり、広範囲重度熱傷や先天性表皮疾患などへの治療に対して、培養表皮シートの応用可能性が益々増大するものと期待される。

5. 総 括

ヒト表皮角化細胞のコロニー形成能を増大させる低分子化合物を見いだすことに成功した。その作用機序の一部は、角化細胞の接着速度の促進であると考えられる。これらの化合物が実際に培養表皮シートの作製に用いるため、さらなる条件検討や安全性の検討が求められる。最後に、本研究の遂行にあたり御支援をいただいたコスメトロジー研究振興財団に深く感謝申し上げます。

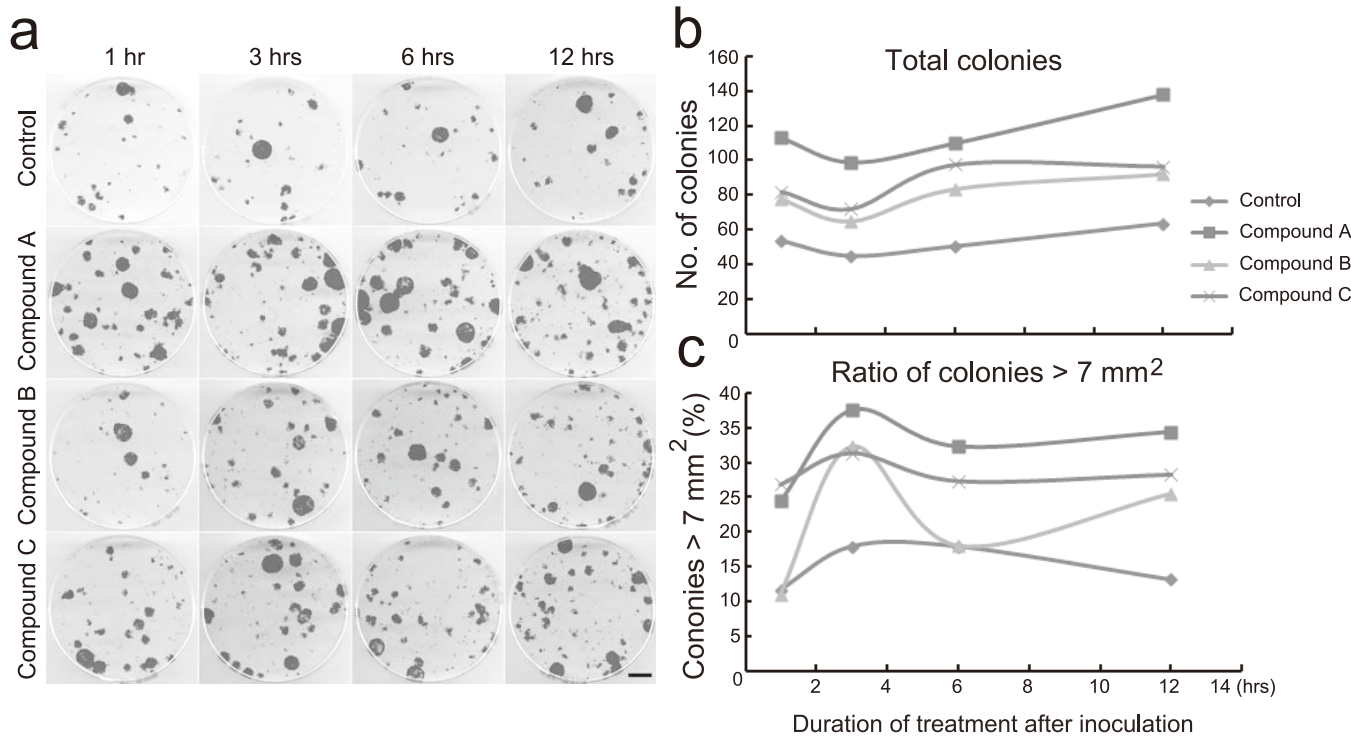


図4 低分子化合物の処理時間の検討

- a) 細胞播種後直ちに低分子化合物を添加し、1、3、6、12時間後に培地交換を行った後、計12日間培養を行い、コロニー形成能を測定した。スケールバー：10mm。
- b) 低分子化合物処理時間と12日後の総コロニー数。
- c) 低分子化合物処理時間と12日後の面積が7mm²以上のコロニーの割合。1時間の低分子化合物処理でコロニー形成能に関して、十分な効果が観察された。

(参考文献)

- 1) Green H, :The birth of therapy with cultured cells, *Bioessays* 30, 897-903, 2008.
- 2) Gallico, GG, O'Connor NE, Compton CC, et al, :Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium, *N. Engl. J. Med.* 311, 448-45, 1984.
- 3) Pellegrini G, Ranno R, Stracuzzi G, et al, :The control of epidermal stem cells (holoclonies) in the treatment of massive full-thickness burns with autologous keratinocytes cultured on fibrin, *Transplantation* 68, 868-879, 1999.
- 4) Ronfard V, Rives JM, Neveux Y, et al, :Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix, *Transplantation* 70, 1588-1598, 2000.
- 5) Barrandon Y, Green H, :Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2302-2306, 1987.
- 6) Rochat A, Kobayashi K, Barrandon Y, :Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell* 76, 1063-1073, 1994.
- 7) Mathor MB, Ferrari G, Dellambra E, et al, :Clonal analysis of stably transduced human epidermal stem cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1031-1036, 1996.
- 8) Mavilio F, Pellegrini G, Ferrari S, et al, :Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat. Med.* 12, 1397-1402, 2006.
- 9) Rochat A, Barrandon Y, :Regeneration of epidermis from adult keratinocyte stem cells. In *Essentials of stem cell biology* 2ed edition. Lanza R, Hogan B, Melton D, et al, editors, Academic press, 551-560, 2009.
- 10) Rama P, Matuska S, Paganoni G, et al, :Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N. Engl. J. Med.* 362, 147-155, 2010.
- 11) Jones PH, Watt FM, :Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell* 73, 713-724, 1993.