

人工皮膚を用いた皮膚の形成機構に関する研究

広島大学理学部

吉 里 勝 利

The mechanism of formation of skin was studied using a reconstituted skin model. The dermal model was made by culturing fibroblasts in three dimensional lattices of collagen (collagen gel culture). It was found in this model that cells recognize and bind collagen fibrils utilizing their cell surface protein, cellular fibronectin (cFN). Collagen fibrils induced the synthesis and phosphorylation of specific proteins in cells. To develop a technique to grow hair follicles in the skin model, dermal papilla cells were successfully immortalized by transfecting them with SV40 viruses. These cell lines should be useful for identifying a hair-inducing factor.

1. 緒 言

動物の器官や組織は細胞と細胞外基質 (Extracellular Matrix, 以下ECM) を構成要素としてこれらが複雑な様式で結合し、有機的複合体として特異的形態をとり種々の機能を果たしている。最近の細胞生物学や生化学の進歩により、これらの構成要素を純粋な形で分離することが可能となった。本研究では、皮膚の構造と機能をより深く理解するために、皮膚から構成要素を分離した後、これらを用いて、皮膚を再構築して人工皮膚を作ることを試みた。皮膚の主要構成要素の分離およびそれらの性質に関しては、これまでに多くの研究がなされてきた。しかしながら、これら構成要素を用いて生体皮膚に類似の構造と機能を持つ人工皮膚を再構築することに成功した研究例はない。

本研究は次の目的をもって行われた。① 生体皮膚に近似の構造と機能をもつ人工皮膚を表皮細

胞、真皮線維芽細胞およびECM (主としてコラーゲンとフィブロネクチン) を用いて人工的に再構築する。この再構築体を用いて表皮細胞と真皮線維芽細胞の相互作用に関する研究を行う。② 皮膚付属器官としての毛をも有する人工皮膚を構築することを目指す。③ 人工皮膚を用いて皮膚の形成機構を、特に細胞とECMの結合様式を中心に解析する。④ 皮膚細胞に対するECMの作用を生化学的に調べる。

2. 実験材料および方法

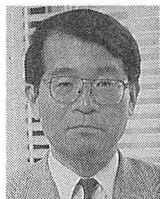
細胞は正常ヒトまたはラット (Fisher系) の皮膚から得られた真皮線維芽細胞または表皮細胞を用いた。これらの細胞の分離と培養は既に公表した方法に従った^{1, 2)}。人工真皮 (線維芽細胞のコラーゲンゲル培養) は既報の方法に従って作製した³⁾。

3. 結 果

3.1 人工真皮における線維芽細胞とコラーゲンの結合様式

線維芽細胞をコラーゲンゲルの中で三次元的に培養するとゲルが収縮し、生体真皮に類似した形態を示す⁴⁾。ゲルの収縮は線維芽細胞とコラー

The study on the mechanism of formation of the skin utilizing a reconstituted skin model



Katsutoshi Yoshizato

Faculty of Science
Hiroshima University

ゲンが結合すること、およびその後の細胞の運動などによって引き起こされる。従ってゲルの収縮過程を調べることによって真皮形成過程における線維芽細胞とコラーゲンの結合・認識機構を明らかにすることが出来るものと思われる。

私達は既にこのゲル収縮を特異的に阻害するモノクローナル抗体 A3A5 を得ることに成功した⁵⁾。A3A5 が認識する抗原は細胞性フィブロネクチン (cFN) である。cFN が確かにゲル収縮過程で重要な働きをしているかどうか検討した。細胞を充分量の cFN で処理した後コラーゲンゲル培養を行ったところ収縮の促進がみられた。逆にコラーゲンを cFN であらかじめ処理した後ゲル培養を行うと収縮は抑制された。これらの事実はゲル収縮過程で cFN が重要な働きをしていることを示唆している。

cFN 分子上の A3A5 に対するエピトープを決定することは、cFN とコラーゲンの結合様式を知る上で重要である。FN を V8 プロテアーゼやトリプシンで消化して断片化した。得られた断片のうちで A3A5 と反応する最小分子量を持つもののアミノ酸シーケンスを決定することでこの問題を解決しようとしている。現在の段階ではまだ結論が得られていない。

3.2 線維芽細胞に対するコラーゲンの作用

皮膚形成の過程で ECM は細胞と結合し、種々の影響を細胞に与えているものと考えられる。ヒト真皮由来の線維芽細胞をコラーゲンを基質としてこの上で培養し、細胞にどのような変化が表れるか検討した。コントロール基質としてプラスチック上およびゼラチン上で細胞を培養して、コラーゲン上のもものと比較した。細胞を ³⁵S-メチオニンで標識し、二次元電気泳動を O' Farrell の方法に従って行った。360 から 420 個のタンパク質スポットを得ることができた。ゼラチンとプラスチック上の細胞の二次元パターンはよく似ていた。ところがコラーゲン上で培養された細胞のタンパク質パターンはそれらと比べるとかなり異

なっていた。コラーゲン上では 364 個のスポットを確認できたが、そのうち 26% はコラーゲン上でのみ合成されており、前二者では合成されていなかった。残りのスポットはプラスチック上の細胞でも合成されているものであったが、このうち 26% はコラーゲンによってその合成が up-regulation されており、23% は逆に down-regulation されていた。残りはプラスチック上のものと同じ合成率であった。以上の結果は細胞によるタンパク質の合成パターンは基質依存的であり、コラーゲンは細胞のタンパク質合成の質と量のいずれにおいても多大な影響を及ぼすことを示している⁷⁾。

コラーゲンと細胞の接触が刺激となって細胞のタンパク質合成の量的および質的变化を引き起こしているものと考えられる。この刺激の細胞内伝達の仕組みの一端を知る目的で細胞内タンパク質のリン酸化のパターンを調べた。この時以下の理由で EGF の刺激伝達に対するコラーゲンの影響を見るという方法でこの問題にアプローチすることとした。コラーゲンの細胞に対する効果のうちで顕著なものの一つは分裂抑制である⁸⁾。コラーゲンの濃度依存的に細胞の DNA 合成は顕著に抑制される^{3, 9)}。一方 EGF は線維芽細胞の mitogen の一つである。そこで EGF による DNA 合成の活性化の過程にコラーゲンはどのような影響を示すか調べることによってコラーゲンによって引き起こされる変化を追跡することにした。

低血清濃度 (3%) 培養液で線維芽細胞を培養して EGF を 3ng/ml の濃度で添加すると DNA 合成が高まる。この時、タンパク質のリン酸化のパターンを調べた。細胞を ³²P の無機リン酸で標識してタンパク質を可溶化して既述の方法で二次元電気泳動を行った。この時細胞はプラスチックあるいはコラーゲン上で培養した。リン酸化タンパク質の二次元電気泳動パターンを両者で比較した。パターンはほとんど同じであったが、分子量 27,000 のタンパク質の挙動に興味を持たれた¹⁰⁾。

このタンパク質には等電点の異なる2つのスポットが存在していた。一つは等電点 (pI) が5.3で pp27a、他は pI5.5で pp27b とそれぞれ名付けた。後者はコラーゲン上、プラスチック上あるいはEGFの有無に関係なくリン酸化タンパク質として出現するが pp27a は特異的な挙動を示した。EGF添加後、直線的にリン酸化され15分で最高値になり、その後リン酸化の程度は減衰した。pp27aのリン酸化をプラスチック上とコラーゲン上で比較するとコラーゲン上では著しく抑制されることがわかった。最高値レベルで比較すると約1/4に抑えられていた。pp27aのリン酸化はH7 (プロテインキナーゼC阻害剤) で抑制される。またジェニステイン (チロシンキナーゼの阻害剤) でも70%のリン酸化抑制がみられた。これらの結果は pp27a タンパク質のリン酸がコラーゲン線維上では抑制され、そのことが細胞のEGF反応性を鈍くしている可能性を強く示唆している。

3.3 皮膚再構築体の中での表皮細胞と線維芽細胞の相互作用

3.1の項で述べた方法によってヒト真皮由来の線維芽細胞をコラーゲン線維の三次元的立体格子の中に埋め込んで培養することによって真皮様構造を構築する。この構築体の上面に別途調製した表皮細胞を播取し、皮膚様構造を構築する。これはBell等によって開発された人工的に作られた皮膚等価物である¹¹⁾。

この皮膚等価物をラット (Fisher) の皮膚細胞を用いて構築したところ次のような現象を見いだした¹²⁾。表皮細胞や線維芽細胞をそれぞれ単独にコラーゲン上 (表皮細胞の場合) であるいはコラーゲンゲル中 (線維芽細胞の場合) で培養してもゲルの溶解現象はみられない。ところが皮膚等価物では、ゲルの溶解が起こる。この溶解現象を詳しく調べたところ、次のようなことがわかっている。表皮細胞は分子量48,000のタンパク質を分泌しているが、このタンパク質は線維芽細胞によるコラーゲナーゼ合成促進作用をもっている。

しかも興味あることにこの因子はプラスチック上に培養された線維芽細胞に対しては効果を示さずに、コラーゲンゲル中の線維芽細胞に効果を持つことである。

この分子量48,000を持つタンパク質の本体に興味をもたれたので、本研究で次の実験を行った。表皮細胞による conditioned medium を調製し、これを抗原としてマウスを免疫した。脾細胞とミエローマを常法に従って融合させハイブリドーマを作製した。このハイブリドーマの中にコラーゲンゲル溶解を阻害するクローンがあるかどうかを検討したところ、いくつかのクローンが得られた。この中でも最も阻害効果の高いクローンに注目し、このモノクローナル抗体に結合するタンパク質の分析を現在行っているところである。

3.4 人工皮膚に毛を導入するための基礎的研究

現在までに種々の細胞組み込み型の人工皮膚を開発する試みがなされてきた。毛細胞は表皮細胞が分化したものである。この分化過程で毛乳頭細胞 (真皮毛乳頭細胞の一種) が重要な働きをしており、この細胞の影響下で表皮細胞が毛母細胞へ分化する¹³⁾。毛乳頭細胞が合成する特殊な成長因子がこの作用をもっているのではないかと考えられているが、その実体は不明である。人工皮膚に毛を導入する技術を開発するに当たって、この因子の実体解明が必要と考えられるのでこのための基礎研究を行った。因子解明の障害となっているものの一つは毛乳頭細胞の増殖力である。毛乳頭細胞を *in vitro* で培養することは可能であるが増殖力が弱く、因子を解明するのに必要な数の細胞を得ることが困難であった。そこで次の試みを行った。ラット (Fisher) の頬髭を抜き取り、毛乳頭を顕微鏡下にて分取した。直ちに explant culture を行い細胞を増殖させ primary culture を得た。この細胞にSV40ウイルス遺伝子を常法に従って感染させたところ、増殖クローンを7つ得た。このクローンには確かにウイルス遺伝子が組み込まれていることを Large T 抗原に対する

特異抗体によって免疫染色することによって確認した。このうちの1つのクローンについて次の実験を行った。まず頬髭毛胞を別途調製し下半分を切除し上半分のみとした後、さらに毛幹を抜き取った。この毛胞の切断面に毛乳頭を挿入しこれを positive control とした。この実験の negative control は無挿入の毛胞である。実験群はSV40によって形質転換した細胞（およそ 10^3 個）を挿入したものである。これら毛胞をラット腎臓の皮膜下に植え込んだ。20日後に開腹し毛胞の変化を調べたところ、positive control と実験群では白い毛幹の伸長がみられたが、negative control ではそのようなことはみられなかった。この実験は形質転換して無限増殖能をもった毛乳頭細胞が毛の誘導能を保持していることを示している。今後、毛誘導因子の実体解明にこの形質転換細胞は大変有用であると考えている。

4. 考 察

本研究は人工皮膚をモデル実験の対象として扱い、皮膚の性質を明らかにしようとして行われた。皮膚は体の表面を覆っており、美容や外傷などの問題を考えるとき第一に考慮に入れる必要のある臓器である。その意味で皮膚の人工モデルを作ることは重要である。これまでいくつかの試みが報告されている。言うまでもなく本物に近いモデルが理想であるが現状ではほど遠い。

この中でもBellらによって開発された人工皮膚は注目に値する。この人工皮膚は全て生体由来の材料で作られているからである。3項でも述べたごとく、このモデルはコラーゲン、表皮細胞、真皮線維芽細胞によって作られている。非常に単純なモデルではあるが、現実の生体皮膚の性質を *in vitro* で再現することができる。勿論全ての性質の再現には至っていないが重要ないくつかの性質の研究には優れたモデルであることは間違いない。

本研究はこのモデルを利用して次の研究を行った。① 線維芽細胞とコラーゲン線維の結合様式、

② コラーゲン線維による細胞のタンパク質合成の量的および質的制御、③ コラーゲンタンパク質のリン酸化の変化および、④ 人工皮膚への毛の導入に関する基礎研究。これらの研究は皮膚の正常な機能と構造を可能にしている仕組みを理解する上で役に立つものと期待している。

5. 総 括

本研究は予定の課題に向かって比較的順調に展開できたと思っている。本研究は4つの項目に分けて実施された。それぞれの項目について最終目標に達するまでには今後の研究が必要である。これからもこれら項目について研究を継続して理想的皮膚モデルに一步でも近づきたいと考えている。

引用文献

- 1) K. Yoshizato, S. Kikuyama and N. Shioya, *Biochim. Biophys. Acta*, 67, 23 (1980).
- 2) K. Yoshizato, A. Nishikawa and T. Taira, *J. Cell Sci.*, 91, 491 (1988).
- 3) K. Yoshizato, T. Taira and N. Yamamoto, *Biomed. Res.*, 6, 61 (1985).
- 4) E. Bell, B. Ivarsson and C. Merrill, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76, 1274 (1979).
- 5) H. Asaga, S. Kikuchi and K. Yoshizato, *Exp. Cell. Res.*, 193, 167 (1991).
- 6) P. H. O'Farrell, *J. Biol. Chem.*, 250, 4007 (1975).
- 7) N. Koseki and K. Yoshizato, *Cell Adhesion and Communication*, 1, 355 (1994).
- 8) R. Sarber, B. Hull, C. Merrill, T. Soranno and E. Bell, *Mech. Age. Dev.* 17, 107 (1981).
- 9) K. Yoshizato, A. Makino and K. Nagayoshi, *Biomed. Res.* 9, 33 (1988).
- 10) N. Koseki and K. Yoshizato, in preparation (1994).
- 11) E. Bell, H. P. Ehrlich, D. J. Buttle and T. Nakatsuji, *Science* 211, 1052 (1981).

12) K. S. Nishikawa and K. Yoshizato, Biomed.
Res. 11, 231 (1990).

13) C. A. B. Jahoda, K. Horne and R. F. Oliver,
Nature 311, 560 (1984).