

発生再生の分子メカニズムを応用した人工皮膚作製

秋田大学 医学部生化学第一講座

杉山 俊博、亀田 隆

Sonic hedgehog (Shh) regulates the principal processes in many developmental stages including the epithelial-mesenchymal interaction. The extraordinary acceleration of signaling by Shh is responsible for the development of human basal cell carcinomas and trichoepitheliomas; they might originate from the very immature keratinocytes including the stem cells. We tried to utilize the mitogenic effect of Shh to accelerate the formation of cultured epithelium, which is already used in the medical field practically. To this end, we transfected shh cDNA into a Swiss-3T3 cell line, widely used as a feeder for keratinocytes, and established a Shh expressing cell line. The lethally irradiated Shh expressing feeder cells remarkably accelerated the growth of keratinocyte colonies obtained from the human neonatal foreskin, and the formation of well-stratified cultured epithelium, which is rich in immature small keratinocytes, expressing cytokeratin 14. This acceleration was suppressed by the addition of cyclopamine, a specific inhibitor of Shh signaling. These data indicate that the Shh is a promising mitogen to improve the technology for cultured epithelium formation.

1. 緒言

人体外表面はケラチノサイトが形成する表皮により覆われている。この薄い層は人体を乾燥・紫外線・物理的障害・免疫学的侵襲から保護する上で重要な役割を担っている。このように重要な役割を担う表皮細胞層は非常に高い再生能力を持っているが事故などによりその大半が失われると生命活動の維持が危機に陥る。

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¹⁾。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²⁾。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³⁾。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。生化学的には

Hedgehog タンパク質がリガンドとして Patched という膜レセプターに結合することで Smoothed という別の膜蛋白への抑制が解除され転写因子 Gli を介した標的遺伝子の発現制御が誘導されると考えられている⁴⁾。

近年、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では高頻度で patched-1 に変異が生じていることが報告され、また遺伝子改変動物を用いた実験から Hedgehog シグナル系を人為的に活性化することにより、これらのがんを誘発できることが報告されている⁴⁾。これらの報告は 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を示唆する。本研究で我々はこのような未熟なケラチノサイトにおける Hedgehog シグナル系の生理作用を培養表皮作製系へ応用することを旨とした。

2. 実験

2.1 細胞

Swiss-3T3 細胞 (JCRB no. 9019 from HSRRB, Osaka, Japan) 並びに遺伝子導入 Swiss-3T3 細胞は全て 10% のウシ胎児血清を加えたダルベッコ改変 MEM 培地にて培養を行った。継代培養には 0.05% トリプシンと 0.02% EDTA を加えた PBS を用いた。Swiss-3T3 細胞はクローン化されていない細胞株であるため遺伝的なバックグラウンドを揃えた実験のために我々はケラチノサイトに対して優れたフィーダー効果を示すクローン (クローン no.5; 以下 no.5 cell と標記) を選択した。実験に用いたヒト新生児包皮由来ケラチノサイトは全て米国 Cell Applications, Inc. より購入した。凍結細胞を融解後、インビトロゲン社のケラチノサイト培養用培地で 2 日ほど快復培養を行った後に培養表皮作製実験に用いた。



A new technology for cultured skin formation using developmental molecular mechanism

Toshiro Sugiyama, Takashi Kameda

Department of Biochemistry Akita University School of Medicine

2.2 Shh 発現ベクターの作製と遺伝子導入

ニワトリの sonic hedgehog 遺伝子 cDNA (ハーバード大学 Tabin 博士より分与) をクロンテック社の真核細胞用発現ベクター pEGFP-N1 に組み込み Shh 発現用ベクター pSHH を作製した。本ベクターを組み込んだ細胞はジェネティシンによる選択が可能である。我々は no.5 cell への pShh ベクターの導入 (インビトロゲン社リポフェクタミンプラスキットを使用) とジェネティシン (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) による選択を行い、Shh 蛋白を安定的に発現するフィーダー細胞株 (no.5-Shh) を樹立した。Shh 蛋白の発現はサンタクルツ社の抗 Shh 抗体 (H-160) を用いたウエスタンブロット法にて確認した。

2.3 培養表皮作製

フィーダー細胞の増殖停止のためにはガンマー線照射法を用いた。培養皿でコンフレントにまで増殖した no.5 または no.5-Shh 細胞に対して約 70 Gy の照射を行ったのちトリプシナイズを行い 60mm 培養皿当たり 4×10^5 個の割合で播種した。12-24 時間後に培養表皮作成用培地 (10% ウシ胎児血清・ 1.8×10^{-4} M アデニン・ $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ デキサメサゾン・ 1×10^{-10} M コレラ毒素・ $10\text{ng}/\text{ml}$ EGF・ 2×10^{-9} M トリヨードサイロニンを含むダルベッコ改変 MEM 培地) に培地を交換し、快復培養を終えたヒト表皮ケラチノサイトは 60 mm 培養皿あたり 5000-20000 細胞 (lot により調節) を播種した。培地交換は週に 2 回のペースで行った。

2.4 ケラチノサイトコロニーの染色と培養表皮の組織化学的解析

ケラチノサイトコロニーの染色は培養皿をホルマリン固定した後、ローダニル染色液 (1% Rhodamin B, 1% Nile Blue) を用いて行った。培養表皮の組織化学的解析のためには、培養表皮をディスペーゼを用いて培養皿より剥離させた後にホルマリン固定を行いパラフィン切片を作製した。HE 染色並びにバイオメダ社の抗サイトケラチン 14 抗体を用いた免疫染色による解析を行った。

3. 結果

3.1 Shh 発現フィーダー細胞株の樹立と Shh 遺伝子産物の発現確認

Shh 遺伝子産物のケラチノサイト増殖促進効果は再生医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 発現遺伝子を導入することを計画した (図 1 A)。本法では Shh 発現フィーダー細胞とケラチノサイトを共培養することで十分な Shh タンパク質の供給が可能になると期待される。またケラチノサイト自体の遺伝子改変は行わないため細胞がん化などの危険性も低いと期待される。

Swiss-3T3 はクローン化された細胞株ではないため、フィーダー細胞のバックグラウンドを揃えるために我々はケラチノサイトへのフィーディング効果を指標に Swiss-3T3 由来クローン化細胞株 (no.5 cell) を樹立した (詳細は省略)。Shh 発現誘導のため、我々は CMV プロモータによりニワトリ shh mRFNA を発現し、G418 による細胞株の選択を可能とする発現プラスミド p-Shh を作製した。リポフェクション法により no.5 cell に p-Shh プラスミドを導入後、G418 による選択を行った。選択した細胞株における Shh タンパク質の発現を抗 Shh タンパク質抗体を用いてウエスタンブロット法により検出した (図 1 B)。Shh タンパク質は合成後に自己触媒作用で N 末断片 (Shh-N) と C 末断片 (Shh-C) に分離する。使用した抗体は生理活性を持つ N 末断片に特異的であり、p-Shh 導入細胞におけるニワトリの Shh-N (23kD) の発現が確認された。我々はこの細胞株を no.5-Shh と名付けた。No.5-Shh は親株の

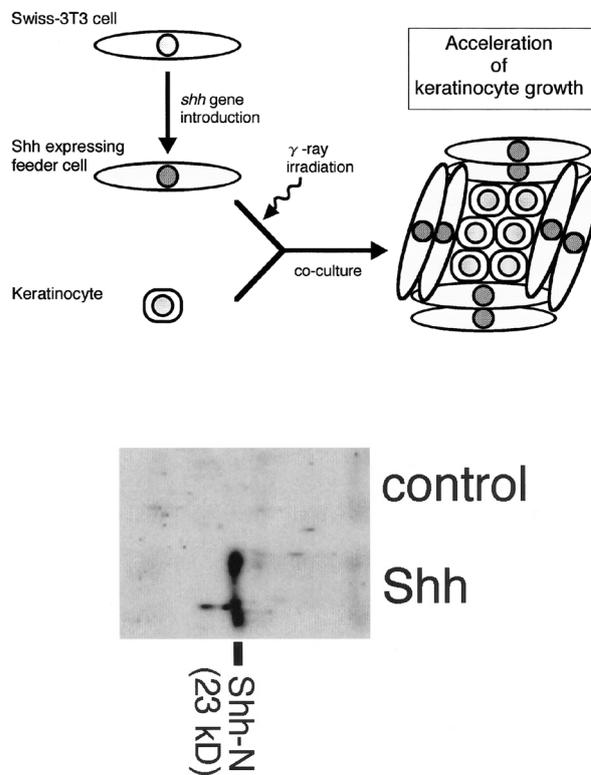


図 1 : A 本研究開発の概念図 Swiss-3T3 細胞に Shh 発現遺伝子を導入し改良フィーダーを作製する。

B Shh 発現ベクターの導入による Swiss-3T3 細胞株における Shh タンパク質の発現。

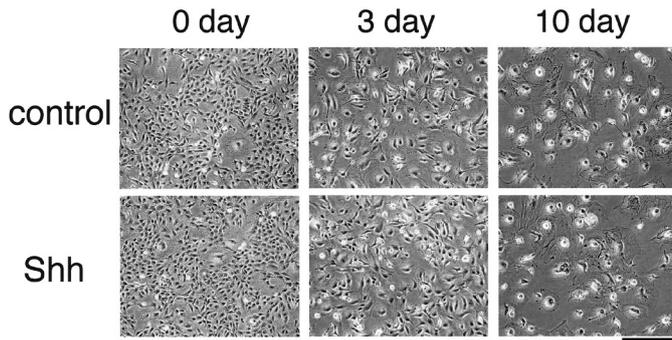


図2：放射線照射によるno.5ならびにno.5-Shh細胞のフィーダー化。

no.5に形態・増殖とも類似している（図2・データ省略）。放射線照射後は両細胞株とも増殖停止・細胞肥大化が誘発され、良好なフィーダー細胞として利用可能であると考えられた（図2）。

3.2 培養表皮の増殖における Shh 発現フィーダー細胞の有用性

我々は Shh 発現フィーダー細胞の有用性を確認するためにヒト包皮由来ケラチノサイトを用いた培養表皮作製実験を行った。放射線照射によりフィーダー化した no.5 細胞ならびに no.5-Shh 細胞とケラチノサイトを共培養し1週ごとに、各培養系でのコロニーの成長を比較した（図3）。ケラチノサイト播種後1週目では顕著な差を認めなかったが、2・3週目では Shh 発現フィーダー細胞との共培養において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。顕微鏡下において成長の良いケラチノサイトコロニーを観察したところ Shh 発現フィーダー細胞との共培養で、コントロールではほとんど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像が観察された（図4）。以上の効果が実際に Shh の生理作用によるものかを確認するために Shh のシグナル伝達系を強力且つ高い特異性で抑制するサイクロパミンを用いた実験を行ったところ Shh 発現フィーダーによるケラチノサイト増殖促進はサイクロパミンにより顕著に抑制された（図5）。Shh 発現フィーダー細胞を用いて作製した培養表皮を組織化学的に解析したところ基底細胞層に重層した細胞層の形成が認められた（図6）。これらの細胞層は免疫染色により、未熟なケラチノサイトのマーカーであるサイトケラチン14陽性を示した。

4. 考 察

線維芽細胞との共培養が上皮系細胞の増殖に有用であることは古くから知られているが、その分子メカニズムについては未だ解明されていない点が多い。現在では完全合成培地によりケラチノサイトを培養して培養表皮を作製する

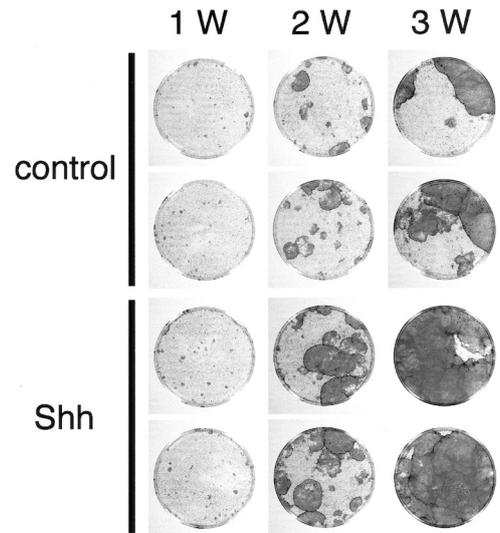


図3：Shh発現フィーダーによるケラチノサイトコロニーの増殖促進。

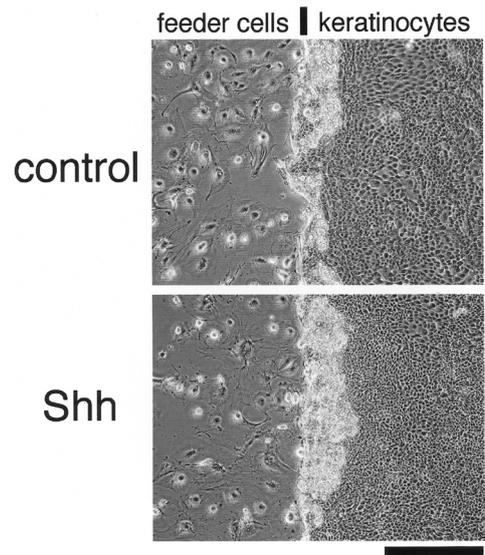


図4：Shh発現フィーダー細胞との共培養で観察された極小サイズケラチノサイトの活発な増殖像。

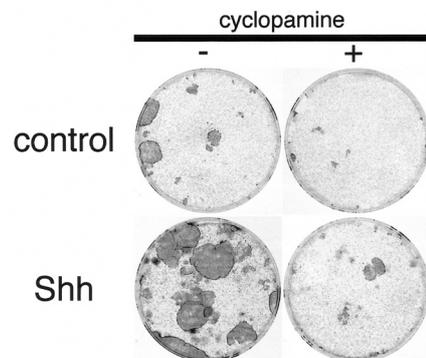


図5：Shh発現フィーダー細胞によるケラチノサイト増殖促進のHedgehogシグナル伝達系阻害剤サイクロパミンによる抑制。

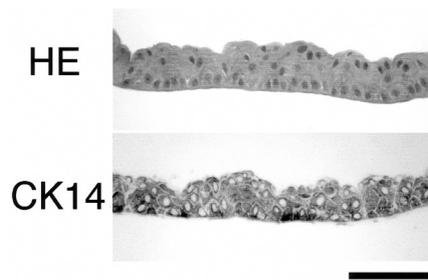


図6：Shh 発現フィーダー細胞を用いて作製された培養表皮の組織切片像。(上段：HE 染色 下段：抗サイトケラチン 14 抗体による免疫染色)

ことも可能であるが非常に高価な成長因子などを必要とするため Green らによる Swiss-3T3 フィーダー細胞を用いる手法は依然として培養表皮作製のための簡便且つ確実なプロトコルである。我々はこの Swiss-3T3 細胞に表皮細胞の増殖・分化の調節に重要な役割をなしていると考えられる Shh 遺伝子産物を発現させることで培養表皮作製法の改良を目指した。Shh 発現フィーダー細胞はヒト包皮由来ケラチノサイトの増殖を有意に促進した。Hedgehog シグナルは体性幹細胞に対する増殖因子である可能性が示唆されており、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⁵⁾。

(引用文献)

- 1) Reinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6, 331-343, 1975
- 2) O'connor NE, Mulliken JB, Banks-Schlegel, et al. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* 1, 75-78, 1981
- 3) Murone M, Rosenthal A, deSavauge FJ. Hedgehog signal transduction: from flies to vertebrates. *Exp. Cell. Res.* 253, 25-33, 1999
- 4) Bale AE, Yu K. The hedgehog pathway and basal cell carcinomas. *Human Mol Gen.* 10, 757-762, 2001.
- 5) Kameda T, Hatakeyama S, Terada K, Sukiyama T. Acceleration of the formation of cultured epithelium using the hedgehog expressing feeder cells. *Tissue Eng.* 7, 545-555, 2001