

角化細胞の分化に及ぼす線維芽細胞の影響

久保 康明・松澤 陽子・中村富美男・竹之内一昭・近藤 敬治
北海道大学農学部, 札幌市 060

Effect of fibroblasts on differentiation of keratinocytes

Yasuaki KUBO, Yoko MATSUZAWA, Fumio NAKAMURA, Kazuaki TAKENOUCI, Keiji KONDO

Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060

キーワード: 角化細胞, 線維芽細胞, 分化, 3次元培養

Key words: Keratinocyte, Fibroblast, Differentiation, Three-dimensional culture

要 約

マウス皮膚から単離した角化細胞と線維芽細胞および、コラーゲンをういた3次元培養により再構成皮膚モデルを作成し、角化細胞の分化に対する線維芽細胞の影響を検討した。

コラーゲンゲル上の角化細胞は低 Ca^{2+} 濃度の培養液中で増殖し、高 Ca^{2+} 濃度の培養液中で重層化し、空気曝露により角質化した。角化細胞は単独でもコラーゲンゲルを収縮させ、基底膜の構成成分を産生し重層し扁平角質化した。しかし、線維芽細胞の存在により扁平角質化した細胞は層状構造を形成するようになり、コラーゲンゲルの収縮の割合は高まり、線維芽細胞が角化細胞の最終分化に関与していることが示唆された。

緒 言

哺乳動物の皮膚を構成している表皮と真皮の主要構成細胞はそれぞれ角化細胞と線維芽細胞である。表皮は重層扁平上皮であり、最下層の基底層において分裂、増殖した細胞が角質層へと移行するが、この分化過程で細胞内小器官は消失し、活性化したトランスグルタミナーゼが形質膜の裏打ち成分であるマージナルバンドを形成する。最終分化した角質層は、密に詰まったケラチン線維と肥厚した細胞膜により物理的、化学的侵襲に対する障壁としての役割を果たすようになる。一方、真皮の線維芽細胞は自ら産生したコラーゲンをはじめとする細胞外マトリックス中に埋め込まれたようにして存在している。これらの細胞をコラーゲンゲルを用いた3次元培養に供すると、角化細胞の分化や

ゲルの収縮等により生体の皮膚に類似した構造物を形成することが知られている (BELL *et al.*, 1983)。このような3次元培養物は、皮膚の複雑な構造や機能の研究に有効であり、動物愛護の観点からも生体における皮膚の機能を反映した皮膚モデルの作成は望ましい。そこで本研究ではマウスより単離した角化細胞と線維芽細胞をコラーゲンゲルを用いた3次元培養に供し、再構成皮膚モデルにおける角化細胞の分化への線維芽細胞の影響を組織化学的に検討した。

材料および方法

生後5日以内のc57BL/6系マウスの皮膚を0.25%トリプシンを含むPBS中で4℃で12~18時間保持した後、表皮と真皮を剥離した。剥離した表皮および真皮を0.02%EDTAを含むPBS中で37℃で10分間攪拌振盪した。解離した細胞に培養液を加え、混入した線維芽細胞をシャーレに付着させた後、角化細胞を回収した。角化細胞を採取した後の真皮を0.25%トリプシンを含むPBS中でさらに37℃で30分間攪拌振盪して線維芽細胞を採取した。

ラット尾腱を0.1%氷酢酸中で4℃、2日間攪拌して得た酸可溶性コラーゲンをういてカルチャーインサート中でコラーゲンゲルを作成し、3次元培養を行った。線維芽細胞を含むコラーゲンゲルは $1 \sim 3 \times 10^5$ 個/mlの線維芽細胞を含むように調製した。それぞれのコラーゲンゲル上に $3 \sim 5 \times 10^6$ 個の角化細胞を播種した。

増殖用の低 Ca^{2+} 培養液には10%透析ウシ胎児血清を含むS-MEMに1%非必須アミノ酸、1%ウシ胎児大脳抽出液、10 ng/ml EGF、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トランスフェリン、10 ng/ml コレラトキシン、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ インシュリン、10 μM ヒドロコルチゾン、0.05 mM 塩化カルシウ

ムを添加したものを用いた。角化細胞重層化用の高Ca²⁺培養液としては、10%FBSを含むDME(Ca²⁺濃度1.8 mM)を用いた。角化細胞の重層化を確認後、コラーゲンゲル上の培養液を取り除き、角化細胞の最上層を6日間空気暴露した。

得られた3次元培養物(培養15日目)の凍結横断切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン(H・E)染色および間接蛍光抗体法の手順により染色した。なお、間接蛍光抗体染色の第一抗体として、抗IV型コラーゲン抗血清、抗ラミニン抗血清、抗ケラチン抗血清、抗トランスグルタミナーゼ抗血清を二次抗体としてFITC標識した抗ウサギIgGを用いた。また、3次元培養物をグルタルアルデヒドと四酸化オスミウムに

より二重固定し、走査電子顕微鏡(SEM)により観察した。

結 果

角化細胞は播種後3日目にコンフルエントに達し、上皮性細胞に特異的な敷石状の配列が観察された。重層化は6日目に確認され、高Ca²⁺培養液によって促進された。9日目には扁平化した角化細胞が観察された。

コラーゲンゲルは5日目から収縮を始め、その直径は9日目には線維芽細胞を含むゲルで約1/2、線維芽細胞を含まないゲルで約3/5になった(図1)。

横断切片のH・E染色像では、線維芽細胞を含まないゲル上の角化細胞でも最上層に薄い扁平角質化した細胞が認められた(図2 A)。線維芽細胞を含むゲル上では、有核細胞層上部に扁平角質化した無核の角化細胞が数層にわたって明確な層状構造を形成しており、また、層状構造の上部ではエオシンで濃染された顆粒状の物質が観察された(図2 B)。

横断面のSEM像では、コラーゲンのみのゲル上の角化細胞は扁平角質化していたが、その細胞が非常に薄く、また数層しか観察されないのに対し(図3 A)、線維芽細胞を含むコラーゲンゲル上の扁平角質化した細胞は層板状を呈していた(図3 B)。

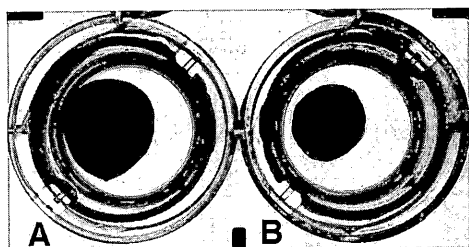


図1 コラーゲンゲルの収縮

Aはコラーゲンのみのゲル上で、Bは線維芽細胞を含むコラーゲンゲル上で角化細胞を15日間培養したもの。ウェルの直径は25 mm。

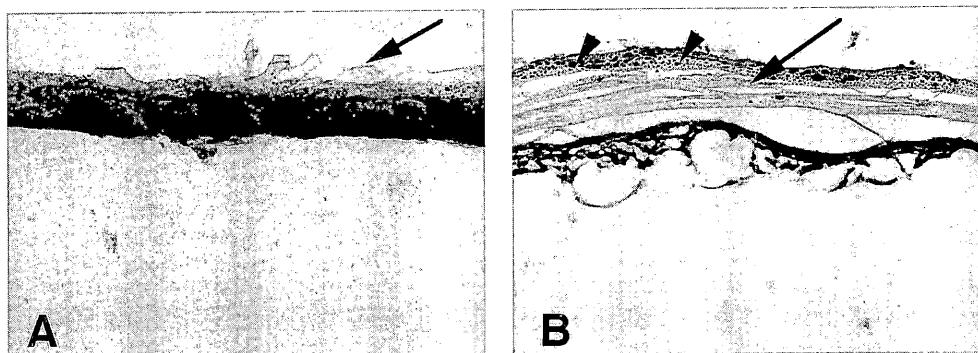


図2 培養皮膚モデル横断面のH・E染色像

Aは線維芽細胞を含まないコラーゲンゲル、Bは線維芽細胞を含むコラーゲンゲル上で角化細胞を15日間培養したもの。矢印は扁平角質化した角化細胞を矢尻は顆粒状の染色物を示す。倍率は80倍。

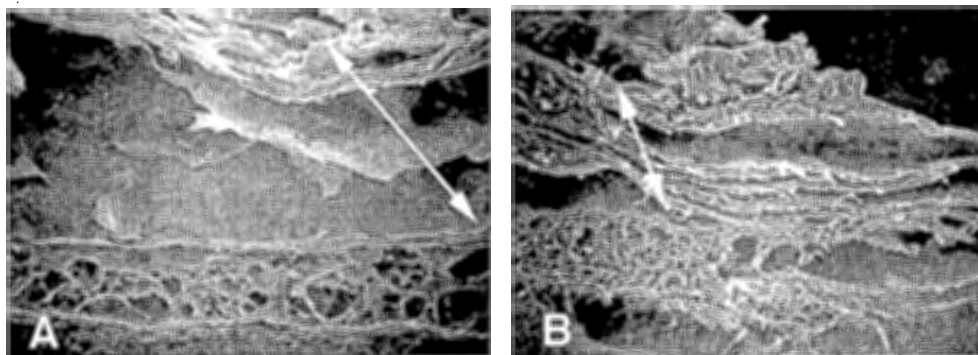


図3 培養皮膚モデル横断面のSEM像

Aは線維芽細胞を含まないコラーゲンゲル、Bは線維芽細胞を含むコラーゲンゲル上で角化細胞を15日間培養したもの。矢尻間は扁平角質化した角化細胞層を示す。倍率は200倍。

基底膜の構成成分であるⅣ型コラーゲンとラミニンに対する抗血清による免疫染色像では線維芽細胞の存在の有無に関わらず、角化細胞層とコラーゲンゲルの境界部が染色された (図 4 A, B, C, D). ケラチン抗血清による免疫染色像では、基底部から角質化した細胞層まで全体にわたって陽性反応が観察された (図 4

E, F). トランスグルタミナーゼ抗血清ではどちらの角化細胞においても、角化細胞層の扁平角質化していない部位における特徴的な染色像が認められた。しかし、その染色強度は線維芽細胞を含むコラーゲンゲルの方が強かった (図 4 G, H).

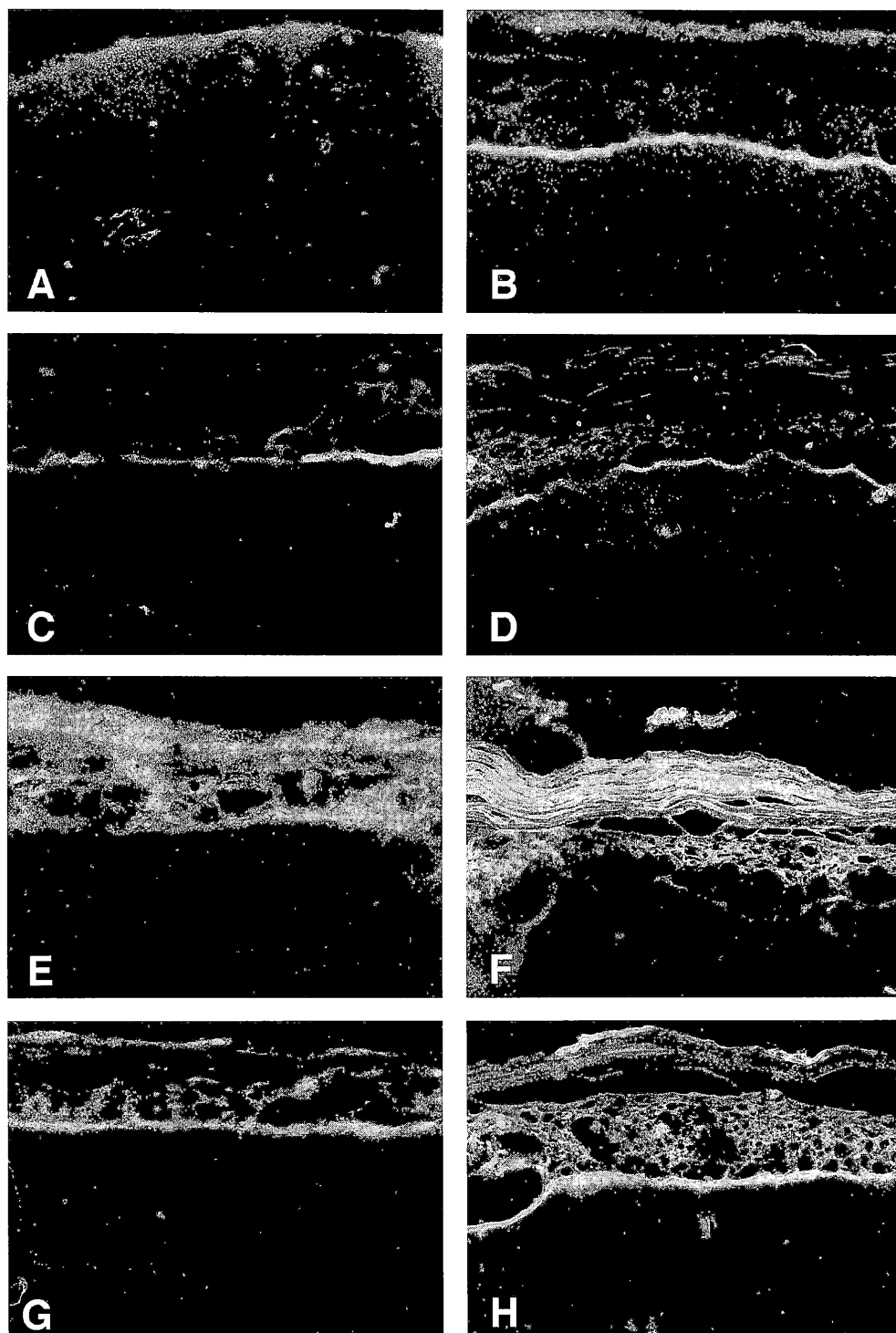


図 4 培養皮膚モデル横断面の免疫染色像

A, Bは抗Ⅳ型コラーゲン抗血清, C, Dは抗ラミニン抗血清, E, Fは抗ケラチン抗血清, G, Hは抗トランスグルタミナーゼ抗血清を第一抗体として用いた免疫染色像を示す。A, C, EおよびGは線維芽細胞を含まないコラーゲンゲル, B, D, FおよびHは線維芽細胞を含むコラーゲンゲル上で角化細胞を15日間培養したもの。倍率は80倍。

考 察

再構成皮膚モデルとしての3次元培養においては、真皮相当物としての収縮したコラーゲングルと表皮相当物としての分化した角化細胞層の形成が重要である。角化細胞と線維芽細胞はそれぞれ単独でもコラーゲンを収縮させるが、その効果はゲル上に角化細胞、ゲル中に線維芽細胞が存在したときが最大であることが報告されており (SOUREN *et al.*, 1989), 本研究でも同様の結果が得られた。

角化細胞の分化において線維芽細胞の存在は、分化マーカーの発現 (SAINTIGNY *et al.*, 1993) や発達した角質層の形成 (PARENTEAU *et al.*, 1992; MITSUHASHI *et al.*, 1993) に関与することが知られている。本研究でも線維芽細胞を含まないコラーゲングル上で培養した角化細胞は最上層でわずかに扁平角質化したのみであったが、線維芽細胞を含むコラーゲングル上の角化細胞層は厚く、下層に細胞核が密集し、上層では細胞核を失い扁平化した細胞が観察され、細胞層の約半分が角質層化していた。この線維芽細胞の有無による角化細胞層の分化程度の差は、トランスグルタミナーゼの免疫染色像、即ち角質化していない細胞層における陽性反応の強弱と一致しており、最終分化マーカーであるトランスグルタミナーゼの発現には線維芽細胞が関与していると考えられた。

基底膜構成成分であるIV型コラーゲンおよびラミニンはいずれも角化細胞層とコラーゲングルとの境界部分に局在しており、線維芽細胞の存在に影響されずに角化細胞が足場としての基底膜を形成したことを示していた。しかし、線維芽細胞の非存在下で培養した角化細胞の形成した基底膜は構造的に不完全とする報告もあり (BOHNERT *et al.*, 1986; SCHAFFER *et al.*, 1991), 角化細胞による足場としての基底膜形成と上方に向かって起きる分化過程との関連性が推測される。従って再構成皮膚モデルを用いた本研究において、角化細胞による基底膜構成成分の産生や重層扁平化といった機能は単独でも発現するものの、十分な構造をとるためには、コラーゲン線維の再構築も含めた線維芽細胞による調節が必要不可欠であることが示唆された。

文 献

BELL E., SHER S., HULL B., MERRILL C., ROSEN S., CHAMSON A., ASSELINEAU D., DUBERTRET L.,

COULOMB B., LAPIERE C., NUSGENS B. and NEVEUX Y. (1983) The reconstitution of living skin. *J. Invest. Dermatol.*, **81**: 2s-10s.

BOHNERT A., HORNUNG J., MACKENZIE I.C. and FUSENIG N.E. (1986) Epithelial-mesenchymal interactions control basement membrane production and differentiation in cultured and transplanted mouse keratinocytes. *Cell Tissue Res.*, **244**: 413-29.

CONTARD P., BARTEL R.L., JACOBS L. 2d., PERLISH J. S., MACDONALD E.D. 2d., HANDLER L., CONE D. and FLEISCHMAJER R. (1993) Culturing keratinocytes and fibroblasts in a three-dimensional mesh results in epidermal differentiation and formation of a basal lamina-anchoring zone. *J. Invest. Dermatol.*, **100**: 35-9.

MITSUHASHI Y., MIKAMI Y., MIKAMI H., ISHIKAWA H., TAMAI K. and HASHIMOTO I. (1993) Simultaneous and separated culture of keratinocytes and fibroblasts on each side of a collagen membrane. *J. Dermatol. Sci.*, **5**: 3-13.

PARENTEAU N.L., BILBO P., NOLTE C.J., MASON V. S. and ROSENBERG M. (1992) The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. *Cytotechnology.*, **9**: 163-71.

SAINTIGNY G., BONNARD M., DAMOUR O. and COLLOMBEL C. (1993) Reconstruction of epidermis on a chitosan cross-linked collagen-GAG lattice: effect of fibroblasts. *Acta Derm-Venereol.*, **73**: 175-80.

SCHAFFER I. A., KOVACH M., PRICE R. L. and FRATIANNI R. B. (1991) Human keratinocytes cultured on collagen gels form an epidermis which synthesizes bullous pemphigoid antigens and alpha 2 beta 1 integrins and secretes laminin, type IV collagen, and heparan sulfate proteoglycan at the basal cell surface. *Exp. Cell Res.*, **195**: 443-57.

SOUREN J. M., PONEC M., and VAN WIJK R (1989) Contraction of collagen by human fibroblasts and keratinocytes. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **25**: 1039-45.