

P1-4

ヒト臍帯由来間葉系幹細胞培養上清液の皮膚科学的機能性の検討2

Research on functionality for skin science of Human Umbilical Mesenchymal Stem Cell Cultured Supernatant 2

○上田向勇¹ 岩野英生² 佐々木美帆¹ 大橋秀一¹ 松本隆明¹

1 株式会社エテルナム

2 株式会社テクノブル ライフサイエンス総合研究所

目的

ヒト幹細胞から得られる培養上清については、細胞分泌物由来のサイトカインやエクソソーム等の細胞外小胞を含み、血管新生や組織再生等の効果が期待されていることから、皮膚科学的な機能性についても検討が行われている。我々は特にヒト臍帯由来間葉系幹細胞(UCMSC)の効率的な培養方法、並びに安全性の高い専用培地による上清回収方法等を検討して開発されたUCMSC培養上清について調べたところ、従来の幹細胞培養上清よりも多くのサイトカインやエクソソームを含有することが判明した。このUCMSC培養上清に関する皮膚科学的機能性として、昨年、真皮線維芽細胞におけるECM代謝に関する報告を行った。今回、表皮角化細胞及び線維芽細胞における、様々なタンパク質の遺伝子発現に対する影響について知見が得られたので報告する。

試験方法

●各細胞の培養について

・表皮細胞

表皮細胞NHEKを24ウェルプレートに播種し、1日培養後、サンプルの添加を行い、さらに24時間培養を行った。培養終了後、それぞれのウェルからtotalRNAの抽出を行った。

・線維芽細胞

線維芽細胞NB1RGBを24ウェルプレートに播種し、1日培養後、サンプルの添加を行い、さらに6時間培養を行った。培養終了後、それぞれのウェルからtotalRNAの抽出を行った。

●totalRNAの抽出～qPCR

培養終了した各細胞に対して、PBS(-)を用いて1回洗浄を行った後、ISOGEN II試薬(ニッポン・ジーン社製)で溶解・回収した。回収した細胞に対してRNaseフリー水を添加して攪拌混合し室温放置後、遠心分離し、上清のみを分取した。回収した上清にイソプロパノールを添加して攪拌混合し、室温放置後遠心分離してtotalRNAの沈殿物を得た。75%エタノールで2回洗浄後、風乾し、RNaseフリー水に溶解させた。回収したtotalRNAについて逆転写反応によってcDNAを合成した。合成したcDNAをサンプルとして、qPCRを行い、各種遺伝子の発現と、内部標準遺伝子の発現の検出を行った。試験結果は、内部標準遺伝子の発現量に対するそれぞれの試験区での各遺伝子の相対発現量を比較した。

●遺伝子記号について

- KLK7: Kallikrein-related peptidase 7
- FLG: Filaggrin
- PADI1: Peptidyl arginine deiminase, type I
- IVL: Involucrin
- CLDN1: Claudin-1
- TGM1: Transglutaminase-1
- LAMA3: Laminin subunit alpha-3
- FN1: Fibronectin-1
- NID: Nidogen
- COL4A1: Collagen alpha-1(IV) chain
- COL7A1: Collagen alpha-1(VII) chain
- COL1A1: Collagen alpha-1(I) chain
- LOX: Lysyl oxidase

参考文献

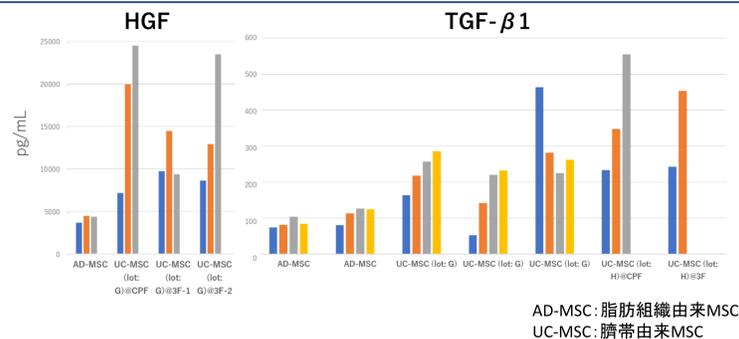
- 1, Keisuke Miyake et al., Regenerative Effect of Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells in a Rat Model of Established Limb Ischemia, Circulation Journal, 87: 412 - 420, 2023
- 2, Rosenbloom J, et al., Structure of the elastin gene, Ciba Found Symp, 192: 59-74, 1995
- 3, 佐山浩二 角化細胞における細胞内シグナル伝達 日皮会誌:113(12), 1791-1797, 2003

まとめ

我々は、引き続き独自のヒト臍帯由来の間葉系幹細胞からの培養上清液について皮膚科学的な機能性の検討を行った。その結果、希釈した培養上清液であっても、ヒト正常表皮細胞に対して、角化を促進し、皮膚の保湿・バリア機能を改善する効果や、ヒト正常線維芽細胞に対して、ECM関連タンパク質発現を促進し、皮膚組織構造を改善する効果が示唆された。ECM成分の合成には様々なサイトカイン類が影響していることが報告されている²⁾。我々が開発した培養上清液は、他細胞由来のものよりも高濃度のHGF、TGF-β1等が含まれていることが確認されている。特にTGF-β1はSMADと共役し、コラーゲン等のECMの発現に関与することや、FN1をはじめとする基底膜タンパク質の発現にも影響していることが知られている。また、TGF-β1は表皮細胞の増殖を抑制し、分化に関与しているとの報告もある³⁾。本試験の各種表皮分化マーカータンパク質の発現促進は、その影響と考えられる。一方でHGFは表皮細胞に対して増殖促進効果を示すことが報告されており、UCMSC培養上清液としては、その両方の効果が表皮細胞に作用していると考えられる。このように表皮細胞や線維芽細胞に対して効果を示したことから、UCMSC培養上清液の化粧品学的効果として、皮膚の保湿性改善やシワ改善などの抗老化効果を期待している。

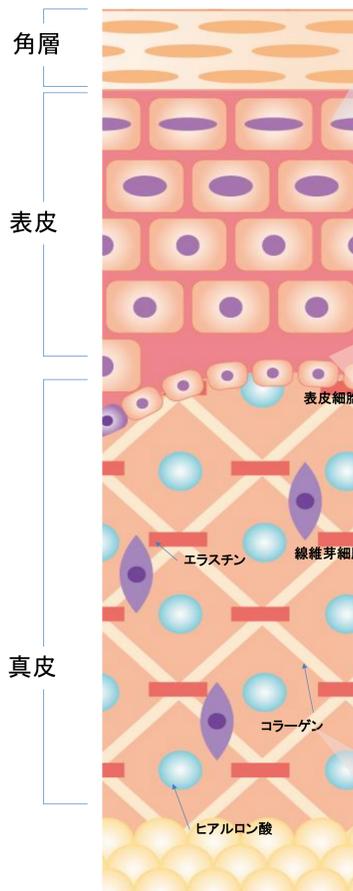
特徴

ヒトの臍帯を収集し、コラゲナーゼをもちいて分散させ、得られた臍帯由来細胞の培養を行った¹⁾。培養UCMSCsは、CD44、CD73、CD90などのMSCの代表的な表面マーカーを発現したが、造血細胞、マクロファージ、および内皮細胞マーカー(CD14、CD19、CD34、CD45、HLA-DRなど)については陰性だった。培養UCMSCsの上清液を回収し分析を行うと、多くのサイトカインを含むことが判明した。特にHGF、TGF-β1については、脂肪由来のものよりもUCMSCs由来の方が含有量が高いことが判明した(右図)。



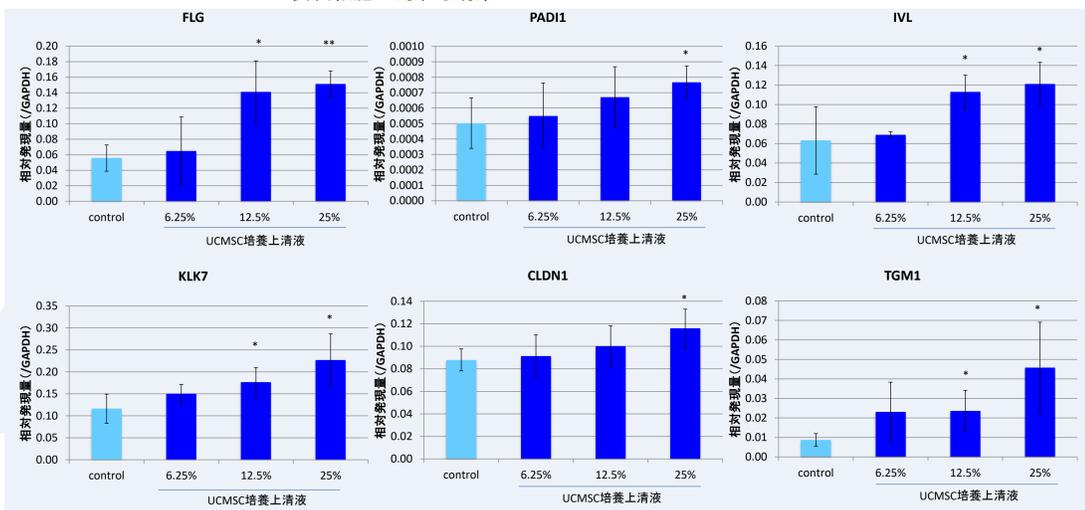
評価結果

表皮細胞NHEKに対して、分化マーカー(IVL,TGM1)及び保湿・バリア関連タンパク質(FLG、PADI1,CLDN1)の発現亢進が認められた。線維芽細胞NB1RGBに対して真皮マトリックス関連タンパク質(COL1A1,LOX)の他、基底膜関連タンパク質(COL4A1,COL7A1,LAMA3,FN1,NID)の発現亢進が認められた。

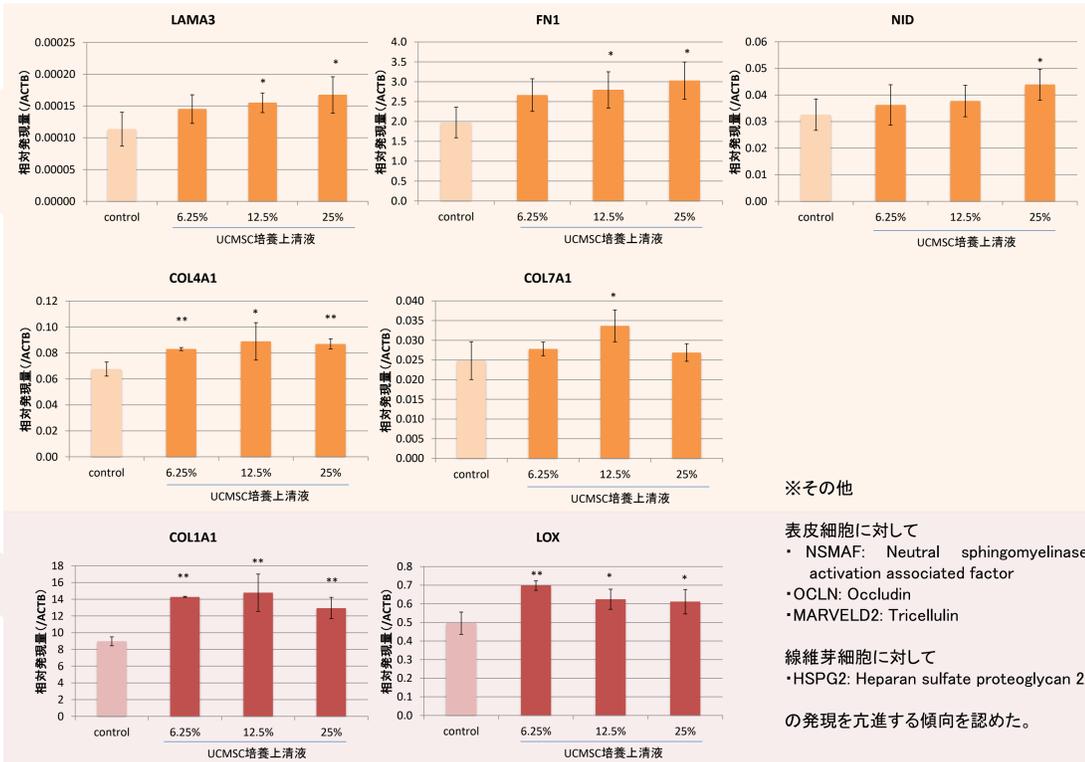


皮膚断面の模式図とUCMSC培養上清液の作用ポイント

表皮細胞に対する効果



線維芽細胞に対する効果



※その他

表皮細胞に対して
 ・NSMAF: Neutral sphingomyelinase activation associated factor
 ・OCLN: Occludin
 ・MARVELD2: Tricellulin
 線維芽細胞に対して
 ・HSPG2: Heparan sulfate proteoglycan 2
 の発現を亢進する傾向を認めた。

備考

日本皮膚科学会
COI開示

発表者名: 上田向勇

私は今回の演題に関連して、開示すべき利益相反はありません。