第125回 日本皮膚科学会総会　2026年6月11日~6月14日　国立京都国際会館

P1-17

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3

Research on functionality for skin science of Human Umbilical Mesenchymal Stem Cell Cultured Supernatant 3

○上田向勇[1]　岩野英生[2]　河野美帆[1]　松本隆明[1]

1 株式会社エテルナム
2 株式会社テクノーブル　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培養上清について皮膚科学的機能性を継続して研究を行っている。今回炎症及び色素沈着に関する機能性について評価を行った。

試験方法

●プロスタグランジンE2合成評価
ヒト正常表皮細胞（NHEK）を、96ウェルプレートに播種し、翌日試料を添加し、さらに1日間培養を行った。その後、培養器底面から約50mJ/cm2のUV-Bを照射し、さらに培養を継続した。1日間培養した上清を回収してプロスタグランジンE2測定用の試料とした。測定はProstaglandin E2 ELISA Kit-Monoclonal（Cayman Chemical, USA）のプロトコルに従い行った。

●NLRP3インフラマソーム評価
ヒト正常表皮細胞（NHEK）を、96ウェルプレートに播種し、翌日試料を添加し、さらに1日間培養を行った。その後、培養器底面から約100mJ/cm2のUV-Bを照射し、さらに4時間培養を継続した。
その細胞に対し、FAM-FLICA Caspase-1 Assay (ImmunoChemistry Technologies, LLC)を用いてインフラマソーム形成によるカスパーゼ1の活性を評価した。その後、Hoechst33342によるDNA染色を行い、蛍光強度（Ex=355nm、Em=460nm）を測定し、FLICAの蛍光強度をDNAの蛍光強度で割ることで、DNA当たりのカスパーゼ1活性（インフラマソーム形成）を求めた。

●細胞膜過酸化評価
ヒト正常表皮細胞（NHEK）を96ウェルプレートに播種し試料を添加して2日間培養し、HBSSに置換した後にUV-B（100mJ/cm2）を照射した。1μMとなるようにLiperFluoをHBSSに溶解させて30分間染色した。HBSSで2回洗浄し、蛍光プレートリーダー（Ex=470nm, Em=525nm）で蛍光強度を計測してグラフ化した。

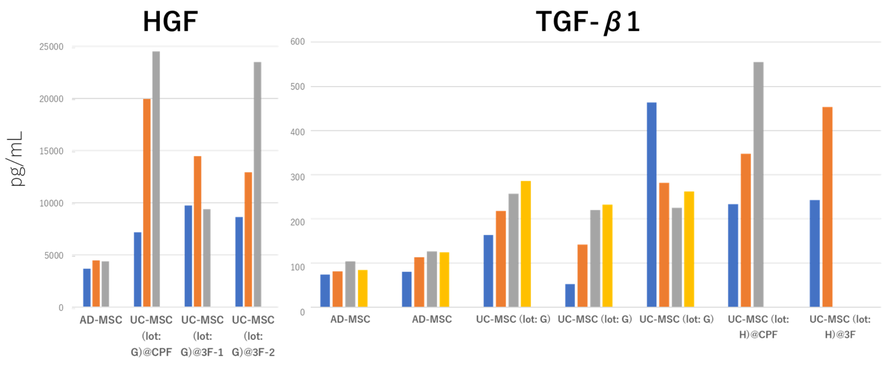
●ヒト好塩基球脱顆粒評価
ヒト好塩基球（KU-812）を、96ウェルプレートに播種し、1日間培養を行った。緩衝液で洗浄後、同じ緩衝液で調整した各濃度の試料溶液を添加した。その上からcompound 48/80含有緩衝液を添加し、脱顆粒の誘導を開始した。1時間培養後、上清を別の96ウェルプレートに移し、フタルアルデヒドを用いたヒスタミンの蛍光測定を行った（Ex=355nm, Em=460nm）。一方細胞に対してはMTT還元法による呼吸活性を測定し、細胞の生存率（ABS570-630nm）を評価した。

●表皮細胞ーメラノサイト共培養系
ヒト正常メラノサイト（NHEM）及びヒト正常表皮細胞（NHEK）を、96ウェルプレートに播種し、翌日試料を添加し、さらに72時間培養を行った。その後PBS(-)で1回洗浄を行った後、15%中性ホルマリン液で30分間浸漬し、固定処理を行った。精製水で洗浄を行った後、フォンタナアンモニア銀溶液を添加し、60℃で2時間反応させた。精製水で洗浄後、顕微鏡観察を行った。

●ヒトメラノソーム関連タンパク質発現評価
ヒト正常メラノサイト（NHEM）を24ウェルプレートに播種し、翌日試料を添加し、さらに24時間培養を行った。その後ISOGEN II試薬で溶解・回収した。常法によりtotalRNAを回収し、さらに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ACTB遺伝子の発現の検出を行った。試験結果は、ACTB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。

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。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事が判明した（右図）。



AD-MSC：脂肪組織由来MSC
UC-MSC：臍帯由来MSC

評価結果



皮膚断面の模式図と
UCMSC培養上清液の作用ポイント

ヒト正常表皮細胞における、紫外線照射によるプロスタグランジンE2の誘導、NLRP3インフラマソームの形成、細胞膜の過酸化に対して抑制効果が確認された。

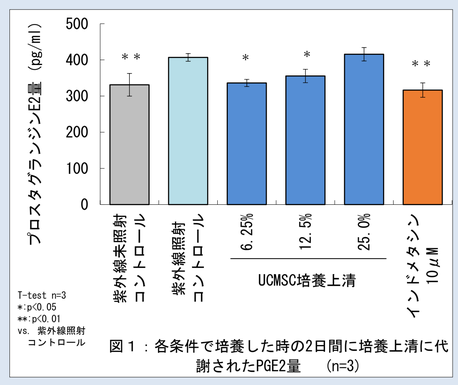


図１：各条件で培養した時の2日間に培養上清に代謝されたPGE2量　(n=3)

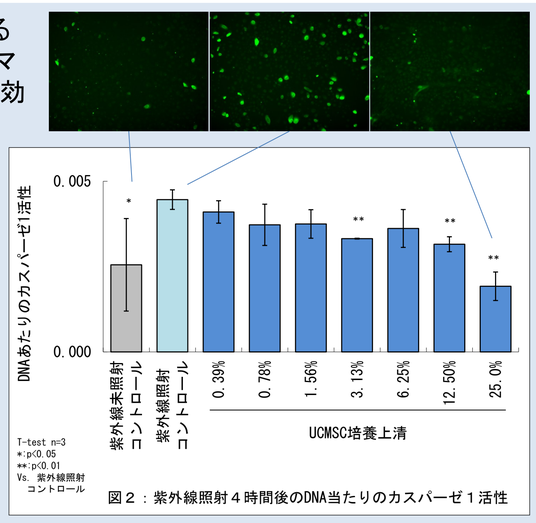


図２：紫外線照射４時間後のDNA当たりのカスパーゼ１活性

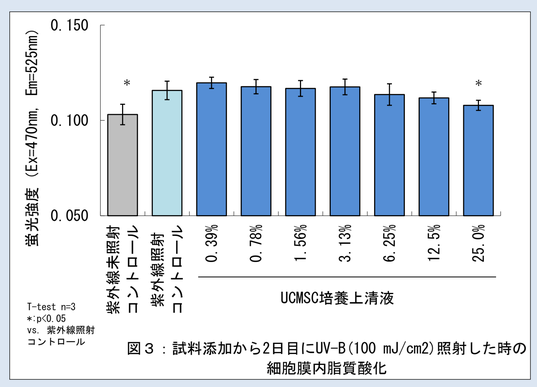
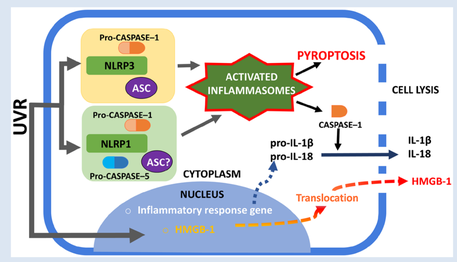
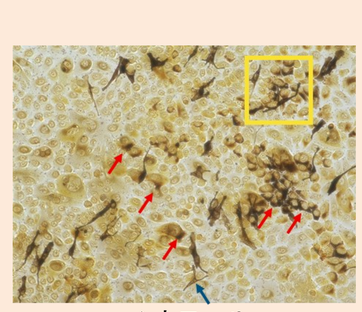


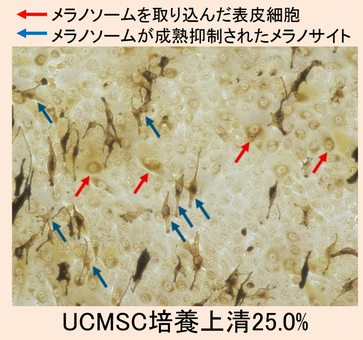
図３：試料添加から2日目にUV-B（100 mJ/cm2）照射した時の細胞膜内脂質酸化



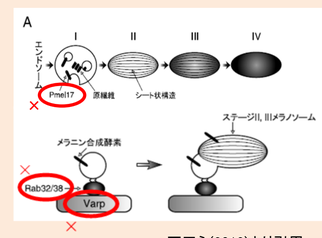
Magdalena Ciążyńska, et al. (2020)より引用



コントロール



UCMSC培養上清25.0%



石田ら(2013)より引用

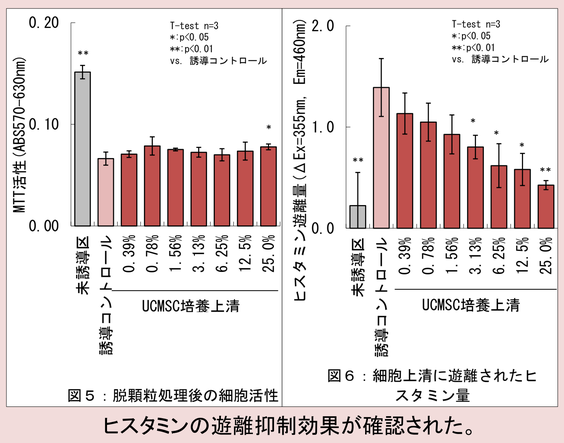


図５：脱顆粒処理後の細胞活性

図６：細胞上清に遊離されたヒスタミン量

ヒスタミンの遊離抑制効果が確認された。

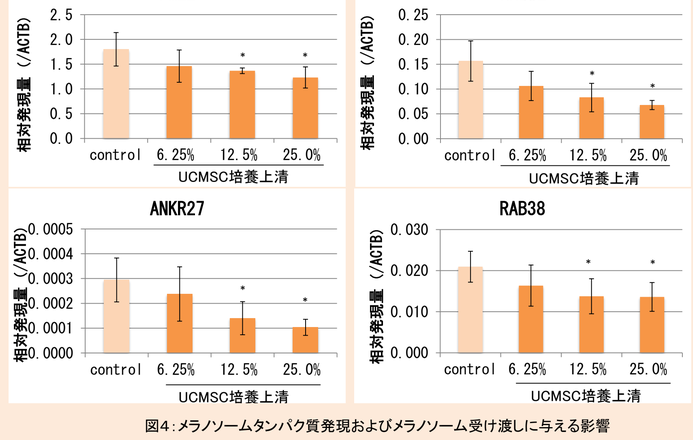


図4：メラノソームタンパク質発現およびメラノソーム受け渡しに与える影響

ヒト正常メラノサイトのメラノソーム関連タンパク質PMEL、RAB32、RAB38、ANKR27の発現抑制が確認された。
また、メラノソームの受け渡しを阻害している可能性が示唆された。

T-test n=3
*:p<0.05
vs. control

参考文献

1, Magdalena Ciążyńska, Igor A. Bednarski, Karolina Wódz, Joanna Narbutt, Aleksandra Lesiak (2020) NLRP1 and NLRP3 inflammasomes as a new approach to skin carcinogenesis. Oncology Leters 19, 1649-1656.
2,石田ら、メラノソームの形成・成熟・輸送の仕組み　顕微鏡　Vol.48, No.1(2013)

まとめ

我々は、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、引き続き皮膚科学的な機能性の検討を行った。
今回炎症及び色素沈着に関する機能性について評価を行った。その結果、ヒト正常表皮細胞における、紫外線照射によるプロスタグランジンE2の誘導、NLRP3インフラマソームの形成、細胞膜の過酸化に対して抑制効果が確認された。またヒト正常メラノサイトのメラノソーム関連タンパク質PMEL、RAB32、RAB38、ANKR27の発現抑制が確認された。さらに表皮細胞とメラノサイトの共培養系において、メラノソームの受け渡しを阻害している可能性が示唆された。UCMSC培養上清には、炎症を抑えることでシワ・ハリなどの肌老化の改善に寄与できる他、色素沈着も抑え、肌を明るく導く可能性が示唆された。

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。