

# 皮膚付属器官を有する三次元再生皮膚器官系の開発

国立研究開発法人理化学研究所 生命機能科学研究センター

武尾 真

The skin plays essential roles in temperature control, barrier, bacteriostatic action, buffering action, and excretory action. Three-dimensional (3D) human skin equivalents (HSEs) are widely used for researches in the field of cosmetology and skin care biology as alternative model for animal experiments. However, the conventional HSE has quite simple structure consists of epithelium and dermis, and can partially mimics the physiological function of natural skin due to the lack of skin appendages such as hair follicles, sebaceous glands, and sweat glands.

In this study, we aimed to develop a three-dimensional regenerated skin organ system with the same tissue structure and function as the natural skin. To this end, 1) we developed a novel HSE that maintains the normal ECM and cellular alignment observed in the natural skin in accordance with tension by reproducing tensional homeostasis. 2) We established a technology to regenerate mature hair follicles *in vitro* and succeeded in constructing a skin organ system (Bioskin) *in vitro* by incorporating the mature hair follicles into functional three-dimensional human skin. This Bioskin was able to maintain hair shaft growth, demonstrating usefulness of the Bioskin as an *in vitro* evaluation model that have similar function as a natural skin organ system. Our study will provide the basic technology and novel skin model not only for cosmetology but also for clinical field.

## 1. 緒言

皮膚は表皮層、真皮層、皮下脂肪層の三層から成り、さらに毛包や汗腺、皮脂腺などの皮膚付属器が複雑に三次元配置された「器官系」であり、温度調節機能、バリア機能、静菌・緩衝作用、排泄作用などを有し生体の恒常性の維持において重要な役割を担っている。このため、スキンケアやコスメトロジーにおける研究開発においては、安全性は当然のことながら、機能性の評価が重要となってくる。現在欧州を中心に研究開発における動物実験の縮小を求める社会的需要が世界的に普及しつつあり、動物実験代替法として三次元培養ヒト皮膚モデルが広く用いられている。しかしながら、従来のヒト皮膚モデルは上皮と真皮という非常に単純な構造であり、正常ヒト皮膚に存在する毛包・皮脂腺・汗腺などの皮膚付属器や皮下組織が存在せず、構造的、機能的に不十分なモデルである(図1)。一方、より生体に近い条件での安全性、有効性の試験のために国外から輸入したヒト生体皮膚もしくは死体皮膚が使用されているが、個体差に起因するロット間差や皮膚の絶対量の不足などの問題がある。これまでに本研究グループは、三次元的な細胞操作技術である「器官原基法」を開発し、幅広い器官再生の研究に道を拓いた<sup>1)</sup>。この再生した器官原基を歯や毛髪、分泌腺を失った部位に移植することにより、完全な

## 皮膚付属器を有する三次元培養再生皮膚器官系の開発

生体の皮膚と同等に毛包や皮脂腺を有する構造と機能を有する三次元培養ヒト再生皮膚器官系(バイオスキン)を生体外で構築する。この技術を、ヘルスケアサイエンス領域で求められている動物実験代替法の開発を進めると共に、機能的な皮膚の再生を目指す。

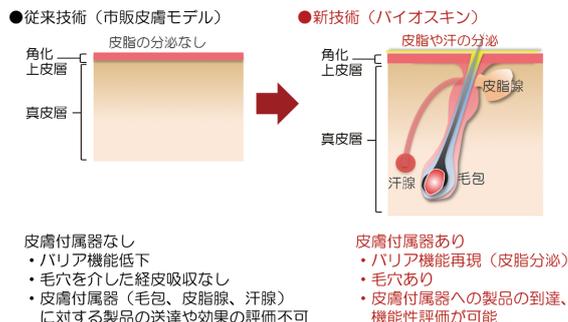


図1 皮膚付属器を有する三次元再生皮膚器官系の構築

歯や毛髪、分泌腺が発生し、生体器官と同じように機能することを実証した<sup>2-5)</sup>。また、iPS細胞から作製した胚様体から毛包や皮脂腺を含む皮膚器官系を再生する技術を世界に先駆けて開発した<sup>6)</sup>。そこで本研究課題ではこれらの技術を応用し、人工皮膚に生体外で発生させた毛包や皮脂腺を組み込み、生体の皮膚と同等の構造と選択透過性や径毛穴透過性などの機能を有する三次元再生皮膚器官系(バイオスキン)を構築することを目的とした。本研究の成果としての天然皮膚と同等の構造と機能を持つ次世代三次元人工皮膚モデルは、動物実験代替法としてより生体に近い状態での安全性試験を行うことを可能とするだけでなく、これまでの人工皮膚モデルでは不可能であった機能性、有効性の評価も可能とし、コスメトロジーの発展に大きく寄与すると期待できる。



Development of regenerative skin organ system with skin appendages

Makoto Takeo

RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research

## 2. 方法

### 2.1. 実験動物

C57BL/6Nマウスは、日本SLC株式会社より購入した。また、この研究は理化学研究所神戸支部施設内動物管理使用委員会によって承認されたプロトコールに従って実施した。

### 2.2. 細胞培養

ヒト表皮角化細胞 (NHEK ; Kurabo, Osaka, Japan)、ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF ; Kurabo) は 37℃、5% CO<sub>2</sub> 環境下でそれぞれの専用培地 (Humedia-KG2, 10% FBS, 1% Penstrep, 10ng/mL bFGF 含有 DMEM) を用いて培養を行い、皮膚モデルの作製に供した。

### 2.3. 人工皮膚モデルの作製

THSモデル；コラーゲン溶液 (KOKEN, Tokyo, Japan) に異なる濃度の NHDF をそれぞれ混合し、カルチャーインサート (Corning, NY, USA) に積層し固化させた (Dermal equivalent, DE)。これを Snapwell インサート (Corning) に挟み込み、上層に NHEK を播種した。4日間浸漬培養後、7日間気相培養を行った。TRSモデル；THSモデルと同様に細胞を播種し、気相培養4日目に Snapwell

インサートから外し、さらに3日間気相培養した。Bell型モデル；コラーゲン溶液に NHDF を混合し固化させた後7日間浮遊培養し収縮させた。その後上層に NHEK を播種し4日間浸漬培養後、7日間気相培養を行った。(図2)

### 2.4. 再構成原基の作製および生体外培養

E18 胎児皮膚由来上皮細胞および間葉細胞、もしくは、成体マウスヒゲ由来バルジ領域上皮細胞および初代培養毛乳頭細胞を用いて「器官原基法」により再構成原基を作製した。これらをカルチャーインサート上に置き、専用培地にて培養を行った(図3)。

### 2.5. 組織学的解析

作製した人工皮膚を4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、パラフィンまたはティッシュ・テック O. C. T. コンパウンド (Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan) に包埋した。パラフィン組織切片(10μm厚)を作製後、HE染色を行い、Axio Scan.Z1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)にて撮影した。また、パラフィン組織切片(10μm厚)または凍結組織切片(10μm厚または50μm厚)を作製後、免疫染色を行い、LSM780 共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss)にて撮影した。

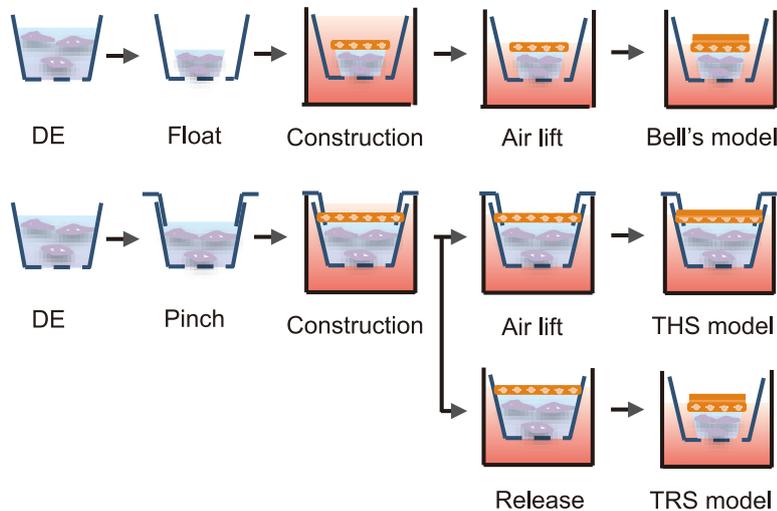


図2 皮膚モデル作製方法の概略図



図3 再構成原基作製方法の概略図

## 2. 6. バリア機能測定

表皮バリア機能はOECDテストガイドラインに従って評価した。各濃度のSDS溶液を人工皮膚表面に1時間塗布し、24時間培養後の細胞生存率をMTTアッセイにより評価した。TEER測定は、EndOhm (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) を用いて行った。TEWL測定は、VAPO SCAN system (ASAHI BIOMED, Kanagawa, Japan) を用いて行った。

## 2. 7. 遺伝子発現解析

RNeasy Plus Mini kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands) を用いて人工皮膚からRNAを抽出し、SuperScript VILO (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いてcDNAを合成した。Real-time PCRは、Applied Biosystems Quant Studio 12K Flex (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。

## 3. 結果

### 3. 1. 張力均衡型人工皮膚の構築および構造評価

はじめに、バイオスキンの土台となる機能的人工皮膚の構築を行った。皮膚は圧迫や引張といった外的な力だけでなく、組織内部で細胞同士がコラーゲン線維を介して引っ張り合うことで生じる内的な力も存在し、これらの張力が均衡した状態にある。この張力の均衡は機械的ストレス信号を介して皮膚器官の恒常性を維持する上で重要な役割を果たしている<sup>7)</sup>。従来のBell型モデルは、コラーゲングル中に線維芽細胞を播種した後に浮遊培養し、線維芽細胞の収縮力による人工真皮の収縮がコラーゲン線維の再編成を促すとされてきた。しかし、従来のこの工程は切除皮膚同

様に組織全体が収縮しており、張力均衡は喪失している。そこで、コラーゲングル中に線維芽細胞を播種した後、すぐにSnapwellインサートに人工真皮を固定することにより、横方向の牽引力バランスを再現する張力恒常性皮膚モデル (Tensional Homeostasis Skin model; THS モデル) を構築した。このTHSモデルは、培養中に容器から切り離されると天然皮膚同様に収縮する (Tension Release Skin model; TRS モデル) ことから、張力均衡の再現が示された (図4A)。線維芽細胞の三次元的な形態とコラーゲン線維を比較すると、天然皮膚やTRSモデルは張力方向に配向性をもって引張された形態をとるのに対し、Bell型モデルやTRSモデルではその配向性を失っていた (図4A)。さらに、THSモデルでは、表皮細胞層が分化し、気層培養から7日目には、ケラチン5 (KRT5)、ケラチン10 (KRT10)、フィラグリン (FLG)、クローディン1 (CLDN1) などのケラチノサイト分化マーカーの局在が表皮層で観察され、天然皮膚と同様に基底層、有棘層、顆粒層、角質層の細胞層に組織化されていることが確認された (図4B)。

### 3. 2. 張力均衡型人工皮膚の皮膚機能評価

次に、THSモデルとTRSモデル、Bell型モデルの皮膚機能を比較評価した。化学物質の安全性評価項目の一つであるSDS塗布による皮膚一時刺激性評価では表皮バリア機能については、THSモデルは従来モデルと同レベルの細胞生存率、TEWL値、TEER値を示した (図5A-D)。また、フルオレセインを使用した局所投与試験では、PBS塗布群と比較するとSDS塗布群ではフルオレセインの表皮層への劇的な拡散が見られた (図5E, F)。これらの結果から、THSモデルは既存の人工皮膚モデルと同様のバリア

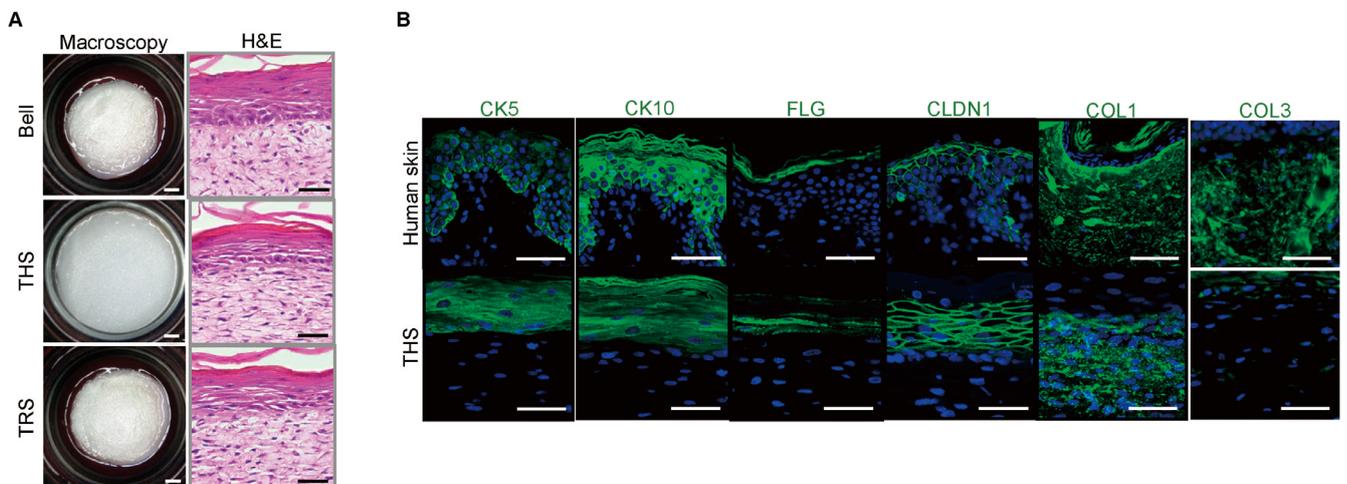


図4 張力均衡型人工皮膚の構造

A. 各人工皮膚モデルの実体像およびHE染色像、Scale bars, 1 mm (実体像) or 50  $\mu$ m (HE染色像)  
B. 天然ヒト皮膚およびTHSモデルの免疫染色像、Scale bars, 50  $\mu$ m

機能試験に使用することができることが示された。

次に真皮機能として、線維症や老化に伴うしわ、たるみの形成に重要な役割を果たす細胞外基質関連タンパク質の遺伝子発現と線維形成を評価した。その結果、THSモデルではコラーゲン・エラスチン線維形成機能の向上が確認された(図6A)。更に、老化に伴う真皮細胞外基質の減少に対して効果的とされるレチノイン酸誘導体(ATRA)を各人工皮膚に添加したところ、THSモデルにおいて顕著なコラーゲンおよびヒアルロン酸合成遺伝子の発現促進とコラーゲン線維の形成促進が確認された(図6B)。この薬物に対する応答性は、内服・血中投与を想定した培地への薬物添加だけでなく、外用剤塗布を想定したローション製

剤の塗布によっても確認された(図6C)。以上の結果から、THSモデルは既存の人工皮膚と比較し、より生体に近い機能性を有することが示された<sup>8)</sup>。

### 3. 3. 毛包の生体外培養方法の構築

皮膚器官系の生体外での再構築に向けて、生体外培養において成熟毛包を再生する技術の確立を行った。初めに、マウス胎児皮膚由来細胞を用いて「器官原基法」により再生毛包原基を作製し、生体外で発生させる培養条件の検討を行った。その結果、毛包発生時に作用するサイトカインシグナルの制御下で培養することにより、再生毛包原基の初期発生誘導から成長期VI期の毛包にまで成熟させること

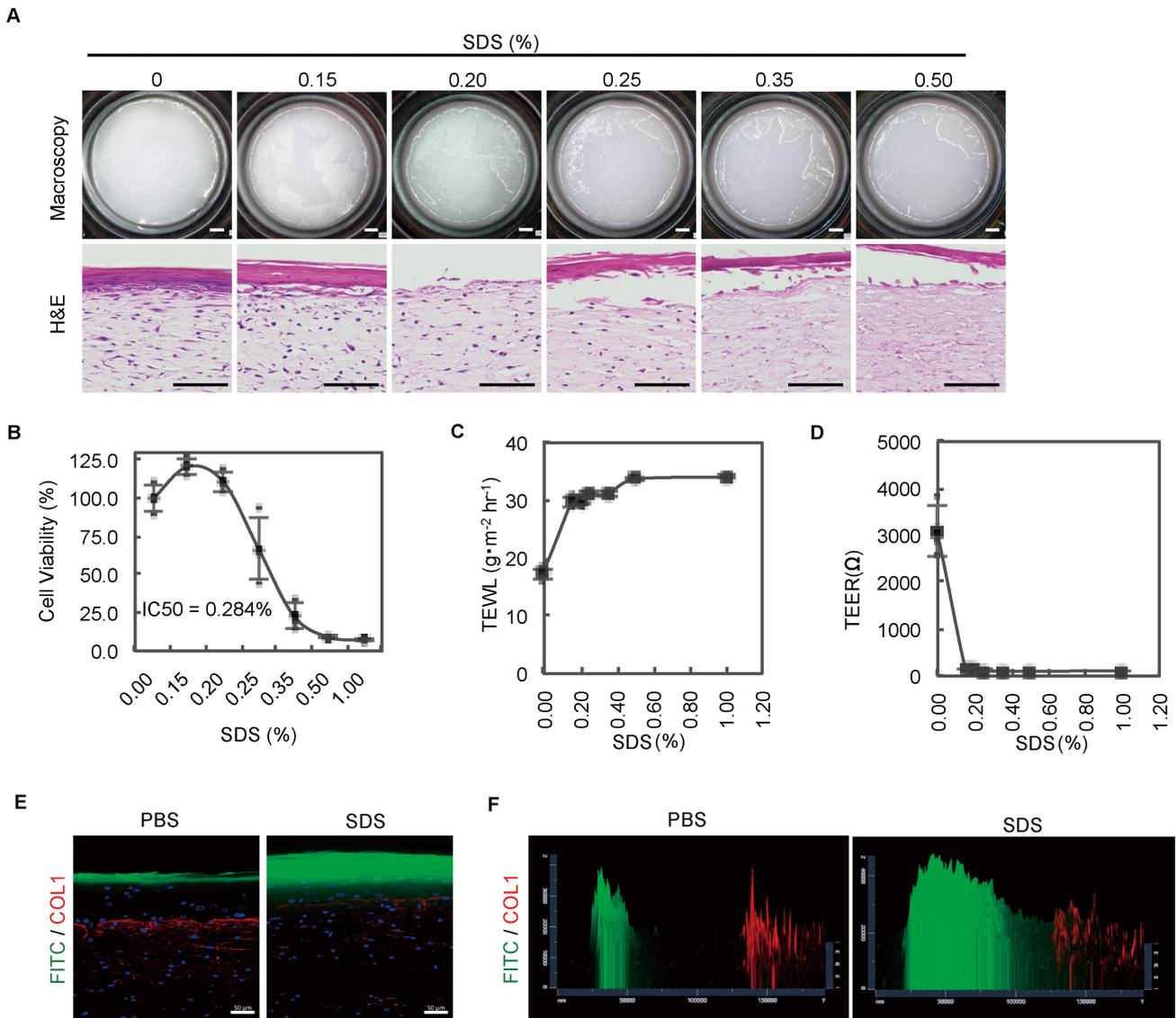


図5 THSモデルの皮膚バリア機能の解析

A-D. SDSを用いた皮膚刺激性試験 A. 実体像およびHE染色像、Scale bars, 1 mm (実体像) or 50 μm (HE染色像)  
 B. 細胞生存率 C. TEWL分析 D. TEER分析 E. F. フルオレセインを用いた局所投与アッセイ 垂直断面の共焦点画像(E)、  
 2.5D強度プロット(F) Scale bars, 50 μm

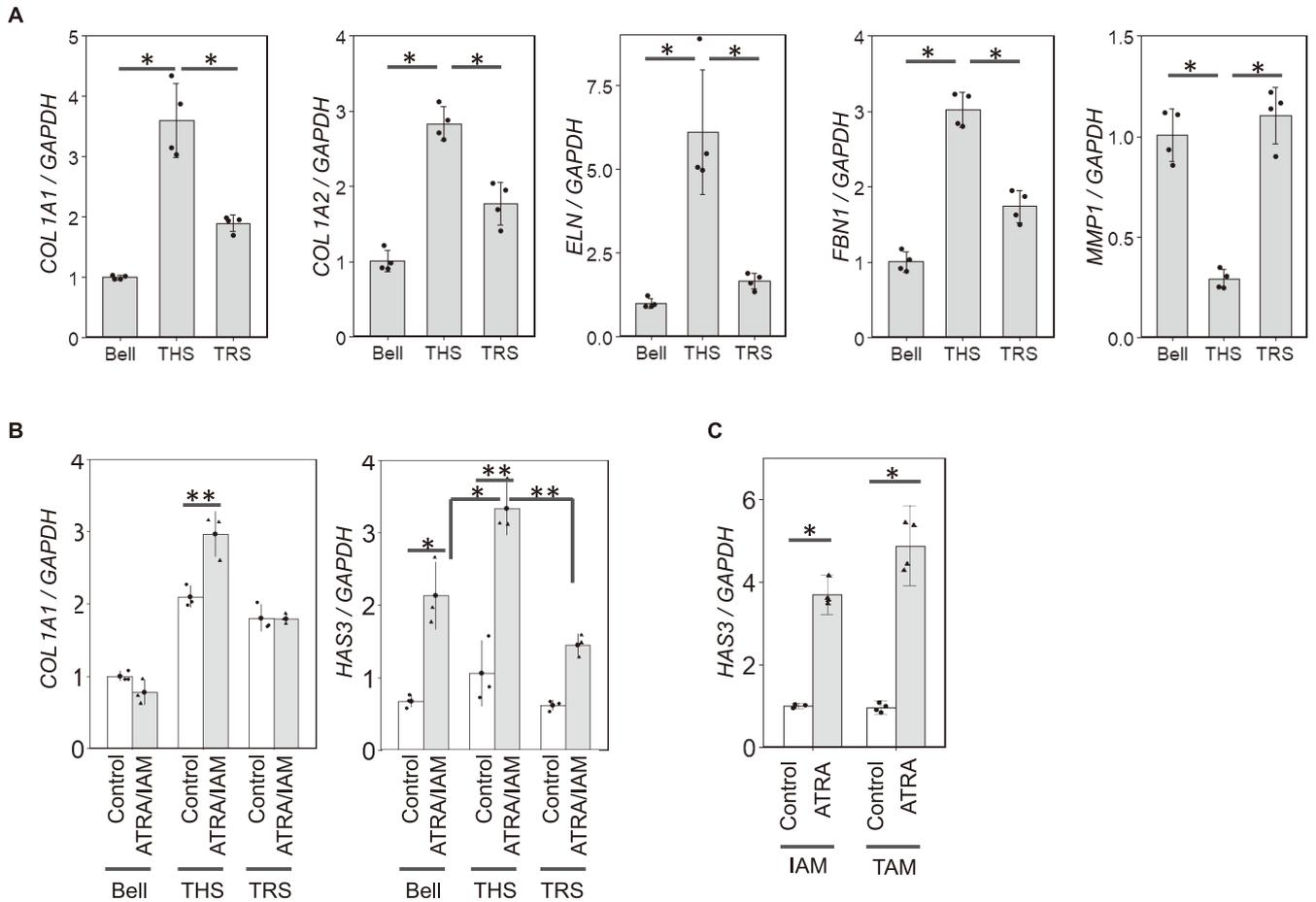


図6 THSモデルの真皮機能の解析

A. 真皮ECM関連タンパク質のReal-time PCR解析 B. C. 人工皮膚モデルのATRAに対する反応性試験、IAM ; the intravenous administration model、TAM ; the topical application model

に世界に先駆けて成功した。さらに、これまでに生体外増幅に成功している毛包間葉性幹細胞である毛乳頭細胞と毛包上皮性幹細胞を用いて作製した成体マウスヒゲ由来再生毛包原基の初期発生も同様に誘導可能であり、間葉系幹細胞を毛包周囲に配置することにより、成長期VI期まで成熟することが明らかとなった。

次に、3. 1. で作製した機能性三次元人工皮膚に成体マウス由来成熟再生毛包を組み込んだところ、再生毛の上皮組織と人工皮膚の表皮組織が接続し、毛幹が伸長し、健全な毛包組織が維持されていたことから、成体由来体性幹細胞を用いた生体外人工皮膚器官系(バイオスキン)構築に向けた概念が実証された。

#### 4. 考察

本研究において、三次元人工皮膚に張力を付加することにより、天然皮膚に近い組織構造と生体反応を示すことが明らかとなり、組織および器官の機械的刺激が組織・器官構造と機能発現に重要な役割を果たしていることが示され

た。また、胎児性および成体組織幹細胞を用いて生体外で毛包を発生させることに世界で初めて成功し、この毛包を人工皮膚へ組み込むことによって長期的な毛幹形成が認められ、バイオスキンの概念が実証された。

近年、化粧品・ヘルスケア業界では科学的根拠に基づく製品開発への期待と関心が高まっている。しかしながら動物実験の規制や動物実験代替法が十分でなく、機能評価可能な人工皮膚の開発に期待が寄せられている。しかし、これまで組織再生によって構築された皮膚は正常ヒト皮膚に存在する毛包・皮脂腺・汗腺などの皮膚付属器や皮下組織が存在せず、不完全な皮膚構造であり、十分な高度化がなされていないという現状にある。本研究課題における成果により、これまで克服できなかった組織からの器官再生、さらに皮膚付属器である毛包を有する三次元人工皮膚器官系の再生が達成可能であることが示された。また、本研究において得られた既存の人工皮膚に様々な付属器官や細胞を組み込むための技術と知見は、樹状細胞や活性型肥満細胞、抗原特異的リンパ球などの組み込みを可能とし、皮膚

炎やアクネ菌感染モデル、非アレルギー性皮膚炎モデル、アレルギー性皮膚炎モデルなど、研究のニーズに応じた様々な評価系へとカスタマイズできる可能性を示しており、コスメトロジーのみならず医薬品分野を含む多くの研究分野の進歩・発展において、多大なる貢献が可能であると期待される。今後は、皮膚器官系としての機能評価および生体外評価モデルとしての機能評価を行い社会実装を目指す。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたりご支援を頂きました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に感謝いたします。

## (引用文献)

- 1) Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, Saitoh M, Tomooka Y, Tsuji T. The development of a bioengineered organ germ method. *Nature Methods* 4, 227-230 (2007)
- 2) Ikeda E, Morita R, Nakao K, Ishida K, Nakamura T, Takano-Yamamoto T, Ogawa M, Mizuno M, Kasugai S, Tsuji T. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 13475-80 (2009)
- 3) Toyoshima K, Asakawa K, Ishibashi N, Toki H, Ogawa M, Hasegawa T, Irie T, Tachikawa T, Sato A, Takeda A, Tsuji T. Fully functional hair follicle regeneration through the rearrangement of stem cells and their niches. *Nature Commun.* 3, 784 (2012)
- 4) Hirayama M, Ogawa M, Oshima M, Sekine Y, Ishida K, Yamashita K, Ikeda K, Shimmura S, Kawakita T, Tsubota K, Tsuji T. Functional lacrimal gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ. *Nature Commun.* 4, 2497 (2013)
- 5) Ogawa M, Oshima M, Imamura A, Sekine Y, Ishida K, Yamashita K, Nakajima K, Hirayama M, Tachikawa T, Tsuji T. Functional salivary gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ. *Nature Commun.* 4, 2498 (2013)
- 6) Takagi R, Ishimaru J, Sugawara A, Toyoshima K, Ishida K, Ogawa M, Sakakibara K, Asakawa K, Kashiwakura A, Oshima M, Minamide R, Sato A, Yoshitake T, Takeda A, Egusa H, Tsuji T. Bioengineering a 3D integumentary organ system from iPS cells using an *in vivo* transplantation model. *Sci. Adv.* 2, e1500887 (2016)
- 7) Hsu CK, Lin HH, Harn HIC, Hughes MW, Tang MJ, Yang CC. Mechanical forces in skin disorders. *J. Dermatol. Sci.* 90, 232-240 (2018)
- 8) Kimura S, Tsuchiya A, Ogawa M, Ono M, Suda N, Sekimoto K, Takeo M, Tsuji T. Tissue-scale tensional homeostasis in skin regulates structure and physiological function. *Commun. Biol.* 3, 637 (2020)