シリカナノ不織布を用いた汎用皮膚三次元モデルの開発

横浜国立大学大学院工学研究院
飯島　一智

In this study, epidermal and epidermal-dermal skin models were constructed using silica nano-nonwoven fabrics. To construct the epidermal skin model, epidermal keratinocyte line, HaCaT cells, or primary normal human epidermal keratinocytes (NHEK) were seeded onto silica nano-nonwoven fabrics placed in cell culture inserts and cultured at the air-liquid interface for two weeks in keratinocyte differentiation medium. In order to construct the epidermal-dermal skin model, fibroblast cell line, NIH3T3 cells, or primary normal human dermal fibroblasts (NHDF) were seeded and cultured for five days in silica nano-nonwoven fabrics prior to seeding of keratinocytes. Constructed models were evaluated by microscopic observation after hematoxylin and eosin staining, trans-epithelial electrical resistance (TEER) measurement and quantification of various epidermal/dermal-related gene expressions using real-time PCR. The thickness of epidermis of the models constructed with silica nano-nonwoven fabrics was thicker than that constructed in cell culture inserts. The expression of genes such as *hTGM1* and *hLOR* in epidermal models constructed on silica nano-nonwoven fabrics were much higher than those of cell culture inserts. This means that silica nano-nonwoven fabrics may mimic the basal lamina structure and increase the functions of keratinocytes. In the construction of epidermal-dermal skin models, similar positive effect of silica nano-nonwoven fabrics were observed. Finally, the prepared three-dimensional epidermal and epidermal-dermal skin models were evaluated by a method similar to the OECD TG skin corrosiveness test. The three-dimensional skin models met the evaluation criteria of the skin corrosiveness test. These results suggested the usefulness of the silica nano-nonwoven fabrics-based three-dimensional skin models.

1．緒　言

EU圏内における化粧品製品および原料の動物実験の完全禁止を受け、我が国の化粧品メーカー各社も動物実験廃止を表明しており、その代替法の開発が進められている。皮膚刺激性試験としては、OECDテストガイドラインに収載されている代替法としてコラーゲンマトリックスを用いた人工皮膚三次元モデル[1]などが用いられているが、非常に高価である。今後、発展途上国を含めた世界中で実験動物を用いない皮膚刺激性試験法を普及させるためには、より安価で取り扱いの簡便な三次元皮膚モデルの開発が必要と考えられる。

我々はシリカナノ不織布を用いた細胞の三次元培養法の開発に取り組んできた[2-4]。ゾル-ゲルプロセスを介して電界紡糸により作製されるシリカナノ不織布は高い生体適合性を示すとともに、シリカのもつ高い熱安定性のためオートクレーブにより滅菌することができる。さらに、シリカナノ不織布は、細胞外マトリックス（ECM）を形態的に模倣することで細胞の高機能化に寄与する。高い空孔率を有し、細胞は多くの交互連結した孔を通じて不織布中を移動し三次元に分布することができ、十分な機械的強度により長期的な細胞培養に伴う収縮を防ぐこともできる。さらに高い物質拡散性を有し、三次元培養において問題となる内部への栄養、酸素、増殖因子などの十分な供給が可能となる。また、近年、シリカナノ不織布中で培養することで、線維芽細胞のコラーゲン産生能が顕著に増加することを見出した[4]。

本研究では、シリカナノ不織布を細胞足場として用い、表皮層のみ、あるいは、真皮層と表皮層からなる人工皮膚三次元モデルを作製した。作製した人工皮膚三次元モデルについては、従来法である表皮モデルやコラーゲンを用いた真皮-表皮モデルと比較し、シリカナノ不織布が表皮角化細胞や線維芽細胞に与える影響について解析を行った。

Development of a versatile three-dimensional skin model using silica nano-nonwoven fabrics

Kazutoshi Iijima
Yokohama National University

2．方　法

2．1．細胞剥離方法の検討

皮膚モデルの作製にあたり、まず真皮層を構成する線維芽細胞の剥離方法の検討を行った。通常のトリプシン-EDTAを用いた剥離と感温性培養プレートを用いた剥離について、それぞれの手法で剥離した細胞を播種した際のシリカナノ不織布への侵入能を評価した。両者に有意な差は認めなかったため、以降の実験ではより安価なトリプシン-EDTAを用いた細胞剥離手法を採用することとした。

2．2．表皮のみからなる三次元皮膚モデルの作製

表皮のみからなる三次元皮膚モデルは、セルカルチャーインサート内にセットしたシリカナノ不織布上にヒト表皮

角化細胞株HaCaTまたは正常ヒト表皮角化細胞（NHEK）を播種し、市販の角化培地で14日間気-液界面培養し角化させることで作製した（シリカ表皮モデル）。対照として、セルカルチャーインサートに直接HaCaTまたはNHEKを播種し、シリカ表皮モデル同様に角化培地で14日間の気-液界面培養により角化させた（インサート表皮モデル）。播種細胞数は用いるセルカルチャーインサートのサイズによるが、例えば12ウェルセルカルチャーインサートを用いる場合には、播種細胞数は2.5×10^5 cellsとした。

2. 3. 表皮と真皮からなる三次元皮膚モデルの作製

表皮と真皮からなるモデルは、マウス胎児線維芽細胞株NIH3T3または正常ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF）をシリカナノ不織布へ播種し5日間培養した後、上部からHaCaTまたはNHEKを播種し表皮モデルと同様に角化させることで作製した（シリカ真皮・表皮モデル）。対照は、NIH3T3またはNHDFを含むコラーゲンゲルを作製し、培養することなくその上部にHaCaTまたはNHEKを播種し角化させて作製した（コラーゲン真皮・表皮モデル）。播種細胞数は用いるセルカルチャーインサートのサイズによるが、例えば12ウェルセルカルチャーインサートを用いる場合には、播種細胞数は線維芽細胞が5×10^5 cells、表皮角化細胞が2.5×10^5 cellsとした。

2. 4. 作製した各種三次元皮膚モデルの評価

作製した各種三次元皮膚モデルについては、形態、バリア機能および遺伝子発現に基づいて評価を行った。形態観察のための試料はパラフィン包埋ブロックをミクロトームにより薄切後、ヘマトキシリン-エオジン（HE）染色を行うことで作製した。バリア機能は経上皮電気抵抗（TEER）測定により評価した。遺伝子発現解析では、各種表皮関連遺伝子および真皮関連遺伝子の発現をリアルタイムPCRにより定量した。リアルタイムPCRは*hGAPDH*および*mGAPDH*をコントロールとし、ΔΔCt法により定量化した。さらに、OECD TG皮膚腐食性試験[5]に準ずる手法により、作製した各種三次元皮膚モデルを用いた皮膚腐食性試験を行った。具体的には、陽性対照の8N KOHおよび14.4% HCl処理後の生存率を3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide（MTT）アッセイにより定量化し、陰性対照の水に対する相対値で表した。

Fig. 1 Hematoxylin and eosin staining of skin model constructed with immortalized cell lines

3. 結　果

3. 1. 不死化細胞株を用いた三次元皮膚モデルの作製と評価

Fig. 1に不死化細胞株を用いた皮膚モデルの組織像を示す。シリカ表皮モデルにおいて表皮角化細胞はシリカナノ不織布中には侵入せず、その表面において角化が起こっていることがわかった。シリカ表皮モデル（Fig. 1b）の表皮層の厚みはインサート表皮モデル（Fig. 1a）と比較してより大きく、扁平重層構造が観察された。一方、シリカ真皮・表皮モデル（Fig. 1c）の表皮層の厚みはコラーゲン真皮・表皮モデル（Fig. 1d）と同程度であった。

不死化細胞株を用いた三次元皮膚モデルの構築では、表皮層を構成する表皮角化細胞HaCaTがヒト由来、真皮層を構成する線維芽細胞NIH3T3がマウス由来の細胞株であるため、表皮層と真皮層の遺伝子発現を区別して評価することができる。遺伝子発現解析の結果の概要をFig. 2にまとめた。シリカ表皮モデルでは、インサート表皮モデルと比較して*hTGM1, hLOR, hIVL, hFLG, hZNF750*の有意な発現上昇がみられた。さらにNIH3T3細胞を播種したシリカ真皮・表皮モデルでは、コラーゲン真皮・表皮モデルと比較して、*hTGM1, hTGM2, mCol4*の発現が有意に高かった。

Fig. 2 Summary of gene expression in skin models constructed with immortalized cell lines

3. 2. 初代培養細胞株を用いた皮膚モデルの作製

次に、より生体に近い初代ヒト細胞を用いて各種皮膚モデルを作製した。各種モデルについてMTTアッセイにより細胞活性を評価した。結果、シリカ表皮モデルはインサート表皮モデルよりも、シリカ真皮・表皮モデルはコラーゲン真皮・表皮モデルよりも高い活性を示した。

遺伝子発現解析の結果の概要をFig. 3にまとめた。シリカ表皮モデルではインサート表皮モデルと比較して*hTGM2*の発現上昇がみられた。また、シリカ真皮・表皮モデルでは、シリカ表皮モデルと比較して*hTGM1, hTGM2, hZNF750*が高発現であった。さらにシリカ真皮・表皮モデルは、コラーゲン真皮・表皮モデルと比較して*hTGM2, hCOL1, hCOL3, hCOL4*の発現が上昇した。

Fig. 3　Summary of gene expression in skin models constructed with human primary cells

3. 3. 皮膚モデルとしての利用可能性の評価

作製した各種三次元皮膚モデルについて、OECD TG皮膚腐食性試験[5]に準ずる手法により評価を行った。シリカ表皮モデルにおいて皮膚腐食性の評価基準である、陽性対照物質添加後3minにおける生存率50％以下、または添加後60minにおける生存率15％以下のいずれかを満たしていた(Fig. 4)。

Fig. 4　MTT assay of primary cell skin models conducted according to protocol of skin corrosion test

4. 考　察

シリカナノ不織布を細胞足場として用い、不死化細胞株または初代培養細胞より表皮のみからなる皮膚三次元モデル(シリカ表皮モデル)および、真皮と表皮からなる皮膚三次元モデル(シリカ真皮・表皮モデル)を作製した。

シリカ表皮モデルは扁平重層構造を有しており、表皮層の厚みは、セルカルチャーインサート内で作製される従来の表皮モデルと比較して2倍程度の厚みを有していた。インサート表皮モデルと比較してシリカ表皮モデルにおいて発現が亢進していた遺伝子群について詳細に調べると、*hTGM1*および*hLOR*は角化マーカーであり、*hIVL*および*hFLG*はバリア機能に関連するタンパク質をコードし、*hZNF750*はマーカー細胞増殖・接着マーカーである。これより表皮層の厚みの増加は、表皮角化細胞の高機能化(表皮の角化、バリア機能上昇や細胞増殖の促進)によるものと推測された。シリカナノ不織布の剛性の高い繊維構造が形態的に基底膜構造を模倣することで、その上部に播種された表皮角化細胞の機能が亢進された可能性が考えられる。

一方、シリカ真皮・表皮モデルの表皮層の厚みはコラーゲン真皮・表皮モデルと同程度であったが、表皮角化細胞の角化に関わる*hTGM1*、表皮の基底層付近の細胞において高発現する*hTGM2*および真皮の基底膜付近の細胞において高発現する*mCol4*の発現が有意に高かった。シリカ表皮モデルと同様にシリカナノ不織布の剛性の高い繊維構造が基底膜を模倣することで表皮の角化を促進するとともに、過去の我々の報告[4]と同様にシリカナノ不織布中における三次元培養が線維芽細胞の機能を高めたと考えられる。

次に、より生体に近い初代ヒト細胞を用いて各種皮膚モデルを作製した。MTTアッセイにおいてシリカ表皮モデルはインサート表皮モデルよりも、シリカ真皮・表皮モデルはコラーゲン真皮・表皮モデルよりも高い活性を示した。シリカナノ不織布を用いて作製した両方の三次元皮膚モデルでは細胞数が多く、播種後の増殖能が高い可能性が示唆された。

遺伝子発現解析の結果、シリカ表皮モデルではインサート表皮モデルと比較して*hTGM2*の有意な発現上昇が確認された。*TGM2*は表皮の基底層付近の細胞において高発現することが知られている。さらにシリカ真皮・表皮モデルでは、コラーゲンモデルと比較して*hTGM2, hCOL1, hCOL3, hCOL4*の発現が有意に上昇した。これらの結果は、初代培養細胞を用いた場合にも、不死化細胞の結果同様に表皮細胞の高機能化がもたらされることを表している。興味深いことに、シリカ真皮・表皮モデルではシリカ表皮モデルと比較して*hTGM1, hTGM2, hZNF750*の有意な発現上昇が確認され、線維芽細胞との共培養による影響が

不死化細胞株を用いた時と比較してより顕著にみられた。これはおそらく、初代培養細胞においては線維芽細胞が分泌し表皮角化細胞に影響を与える因子の分泌量が多い、あるいは表皮角化細胞のこれらの因子への感受性が高い、ためと考えられる。

最後に、作製した各種三次元皮膚モデルについて、OECD TG皮膚腐食性試験[5]に準ずる手法により評価を行った。作製した各種三次元皮膚モデルは、皮膚腐食性試験の評価基準を満たしていた。

三次元皮膚モデルのバリア機能を評価するために実施したTEER測定では、シリカナノ不織布とセルカルチャーインサートとの間に生じる空隙の影響のため、極端に低い値を示し、正確な評価を行うことができなかった。今後、作製した三次元皮膚モデルを固定するなどの対策を講じたうえで、物質透過性とともに評価を行う予定である。

5．総　括

シリカナノ不織布を細胞足場として用い、表皮層のみ、または真皮層と表皮層からなる皮膚三次元モデルの作製に成功した。シリカナノ不織布は表皮角化細胞や線維芽細胞の機能を高め、優れた皮膚三次元モデルの構築を可能にすることが示された。さらに、化学合成されるシリカナノ不織布は動物由来のコラーゲンのような供給リスクなどもなく、安価で安定的に供給可能である。今後、皮膚腐食性試験における被験物質の種類を拡大して検証を行うことで、シリカナノ不織布を用いた新規皮膚モデルの有効性を明らかにする予定である。

（引用文献）

1）OECD TG439

2）Iijima K, Ishikawa S, Sasaki K, Hashizume M, Kawabe M, Otsuka H, Osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in electrospun silica nonwoven fabrics, *ACS Omega*, **3**, 10180-10187 (2018).

3）Ishikawa S, Iijima K, Sasaki K, Hashizume M, Kawabe M, Otsuka H, Cartilage differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in three-dimensional silica nonwoven fabrics, *Appl. Sci.*, **8**, 1398 (2018).

4）Ishikawa S, Iijima K, Matsukuma D, Iijima M, Osawa S, Otsuka H, Silica-based nonwoven fiber fabricated by electrospinning to promote fibroblast functions, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **93**, 477-481 (2020).

5）OECD TG431