

創薬のための毛嚢を有する in vitro 人工皮膚モデルの開発

岡山理科大学理学部臨床生命科学科

片岡 健

The skin has a complex tissue architecture composed of a large variety of cell types of ectodermal and mesodermal origins. Most of these cells are produced from corresponding progenitor/stem cells by tightly regulated mechanisms. In our previous studies, we have demonstrated the utility of in vivo skin reconstitution assay. The characteristics of this assay system we used are that the cells in a mixed suspension segregate from each other and actively form tissue architecture through cell-cell and cell-environment interactions.

However, few studies have succeeded in generating a three-dimensional (3D) tissue-like structure. During embryogenesis, the cells accumulate and form complicated organ structure. Cellular interactions of epithelial, mesenchymal and endothelial progenitors are very important steps of this early organogenesis.

In this study, we have generated a 3D tissue-like structure in vitro using mouse skin epidermal and dermal cells mixed with human umbilical vein endothelial cells and mesenchymal stem cells. These cells formed a 3D spheroid within 72 hours after inoculation on a Matrigel-coated dish. Epidermal keratinocytes were mainly located at the surface of the spheroids and endothelial cells were positioned inside of the spheroids. Mixed cell spheroids formed hair follicles 3 weeks after subcutaneous transplantation into the back skin of nude mice.

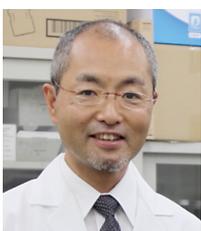
1. 緒言

皮膚は身体の表面を覆う最大の組織であり、微生物や抗原などによる身体への侵入を防ぐための被覆・防御機能が発達した組織の1つでもある。皮膚の構造は表面より表皮層、真皮層、脂肪や筋層などの皮下組織に分類される。さらに付属器と呼ばれる毛嚢、汗腺、皮脂腺などを有することにより、体温調節や乾燥予防、排泄などの複合機能を発揮する。これらの機能を維持するために、表皮に存在する幹細胞が絶えず体細胞分裂を繰り返している。この幹細胞はバルジと呼ばれる皮脂腺の根元部分に存在し、上下方向に分化することで皮膚表面と付属器の両方へ表皮細胞を供給していることが知られている。このバルジには毛嚢の幹細胞と色素幹細胞も存在していることより、皮膚は幹細胞に富んだ組織でもある¹⁾。また容易に採取することもできるため、皮膚は組織細胞を用いた治療が最も進んだ組織でもある。初めてヒト表皮細胞の培養に成功したのは1970年代である^{2,3)}。その後、重症熱傷患者から採取した表皮細胞を培養して表皮細胞シートを作製し、その患者へ移植したことが1981年に報告されている⁴⁾。これが組織工学の手法を用いた再生医療による世界初の治療症例であった。通常、真皮に到達していない、または付属器が残存し

ている浅い損傷であれば、バルジから供給される表皮幹細胞や周囲の細胞の進展によって速やかに治癒に至る。しかし、皮下組織の脂肪組織や筋層まで損傷が達し付属器が残存していない時、周囲の細胞による完全な治癒には非常に長い時間がかかる。その場合、患者の皮膚を採取して移植する自家植皮法が行われる。さらに広範囲な損傷においては自家植皮に使用できる皮膚が不足するため、代わりに同種・異種の培養皮膚シートを利用した治療が現在行われている⁵⁾。この皮膚シートは表皮ケラチノサイトと真皮線維芽細胞により構成され、皮膚の被覆・防御機能は有している。しかし、毛嚢、汗腺、皮脂腺などの付属器を欠損している。このように創傷治癒した皮膚が付属器を欠損していることは、皮膚の美容や体温調節など生理的に大きな問題であり、付属器を有する正常により近い皮膚の供給が望まれている。

これまでの研究において我々は、移植したマウスの表皮細胞と真皮細胞に由来するほぼ完全な皮膚組織が形成される in vivo 皮膚付属器形成モデルを開発した⁶⁾。これは胎生16日目ICRマウスより単細胞として回収した表皮細胞と真皮細胞を 1.0×10^7 cells ずつヌードマウスの背側部にシリコンチャンバーを用いて移植する方法である。この方法により移植3週間後には、ICRマウスに由来する毛嚢や皮脂腺などの付属器を有したほぼ完全な皮膚組織が形成されていた。一方で、このような付属器を有する皮膚組織を in vitro で作製することは非常に困難である。

近年、武部らは、iPS細胞に由来する肝臓細胞を血管内皮細胞と間葉系幹細胞と共に培養しマウスへ移植すると、機能を有する肝臓組織を形成する肝臓の組織原基の作製に成功した⁷⁾。これは複数種の細胞が3次元構造を形成しな



In Vitro Artificial Skin Model with Appendages for Drug Discovery

Ken Kataoka

Department of Life Sciences, Okayama University of Science

から分化できる環境を保証することで、発生初期のプロセスを培養環境内で再現し組織を形成させる方法である。この方法を皮膚の組織原基へ応用した。またChih-Chiangらは付属器の再生過程においてマクロファージが重要な役割を果たすと報告した⁸⁾。

以上より、我々は武部らの方法を参考にin vitroにおける組織原基形成実験を行い、混合培養に使用した各細胞の局在を調べた。並びにマクロファージを加えて作製した組織原基をマウスへ移植する皮膚組織形成実験を行い、付属器を有する正常により近い皮膚組織の形成を目指し検討した。

2. 方法

2.1. 細胞の調製

妊娠16日目ICRマウス(日本クレア)胎仔より採取した背部皮膚を、ディスパーゼII溶液に浸して4℃で24時間処理し表皮層と真皮層に分離した後、トリプシン・EDTA溶液処理(15分)により単細胞とした。ヒト血管内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVEC)、ヒト間葉系幹細胞(Human Mesenchymal Stem Cells: hMSC)の初代培養細胞(クラボウ)を推奨されている培地を用いて培養し、3次元培養用に調製した。マクロファージはICRマウス(8週齢メス、日本クレア)の腹腔へ3.84g/dLに調整したチオグリコレート培地2mLを投与し、72時間後に腹腔より回収した。

2.2. in vitro 組織原基形成実験

あらかじめマトリゲルでコーティングした24wellプレートに表皮細胞、真皮細胞、HUVEC、hMSCを2:2:3:1の割合で総数 2.0×10^6 cells/wellとなるように播種し、表皮細胞用培地と血管内皮細胞用培地を等量混ぜ合わせた培地を用いて3次元混合培養を行った。マウスへ移植する実験にのみマクロファージを 2.5×10^5 cells/wellとなるよう

に混ぜ合わせた。

2.3. 免疫染色

混合培養72時間後の細胞塊をOCTコンパウンドで包埋し、液体窒素を用いて凍結ブロックを作製した。薄切はクリオスタットを用いて7μmの厚さに調整し、蛍光免疫染色に用いた。一次抗体には抗体Pan-Cytokeratin抗体(Sigma)、CD31抗体(DAKO)を用い、二次抗体には抗Anti-mouse IgG Alexa Fluor 488抗体とAnti-mouse IgG Alexa Fluor 594抗体を用いた。

2.4. 細胞のラベリングとその観察

混合培養に使用する細胞をあらかじめ蛍光色素でそれぞれラベリングした。このラベリングにはmolecular probesキット(Life technologies)を利用した。混合培養に使用する細胞をあらかじめPKH67(真皮細胞)、PKH26(hMSC)、CLARET(HUVEC)でラベリングし混合培養した後、凍結ブロックを作製しクリオスタットを用いて7μmに薄切し蛍光観察した。

3. 結果

3.1. in vitro 組織原基の形成

我々が武部らの手法を参考にマウス胎児由来の表皮細胞、真皮細胞をhMSC、HUVECと混合してマトリゲル上で培養したところ、散在していた細胞は徐々にまとまり始めた。培養24時間後には播種した細胞はほぼまとまり、72時間後には1つの球状な細胞塊を形成していた(図1)。

3.2. 形成された組織原基の免疫染色

3次元混合培養により形成された細胞塊において、構成細胞であるマウス表皮細胞、マウス真皮細胞、HUVEC、hMSCの配置を明らかにするために蛍光免疫染色を行った。細胞塊の蛍光免疫染色では細胞塊の表層にケラチン陽性の

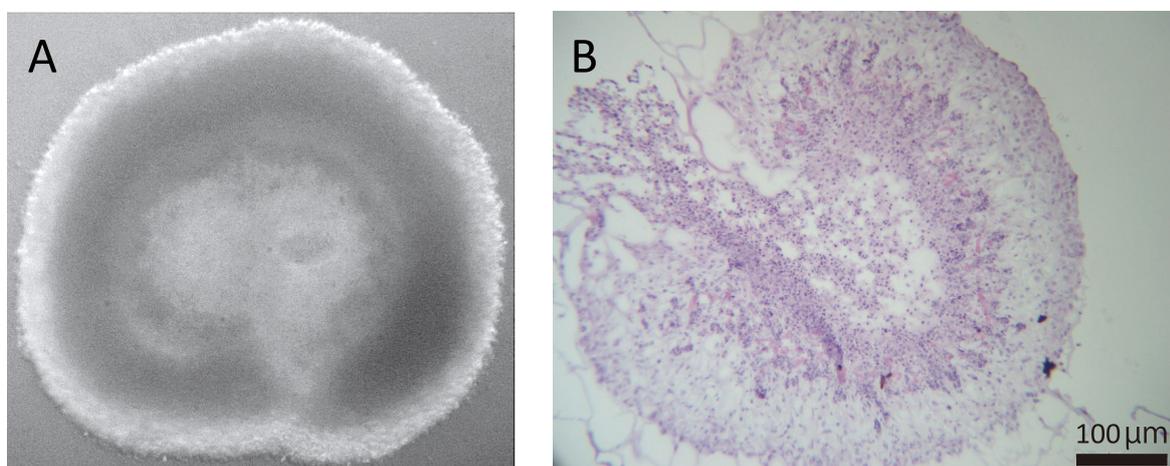


図1 形成された皮膚組織原基(培養3日目) A. 位相差顕微鏡像、B. H&E染色像

表皮細胞が局在しており、内部にはCD31 陽性の血管内皮細胞が存在していた(図2)。

3. 3. ラベリングした細胞の追跡

播種する細胞をラベリングした後に3次元培養を行い、組織原基を形成した。形成された組織原基(細胞塊)を蛍光観察したところ、真皮細胞とHUVECが共局在し、hMSCは細胞塊中に散在していた。

3. 4. 組織原基の移植による組織形成実験

さらにこの細胞塊をヌードマウス皮下に移植したところ、数は少ないが移植部分に毛嚢形成が観察された(図3)。さらにマクロファージを加えて作製した細胞塊をヌードマウスの背側部へ皮下移植し、その3週間後に組織形成能を評価するために移植部位の皮膚を採取してHE染色を行った。興味深いことに、マクロファージが細胞塊中に存在していた方が移植細胞の定着率がよかった。これらの実験結果が

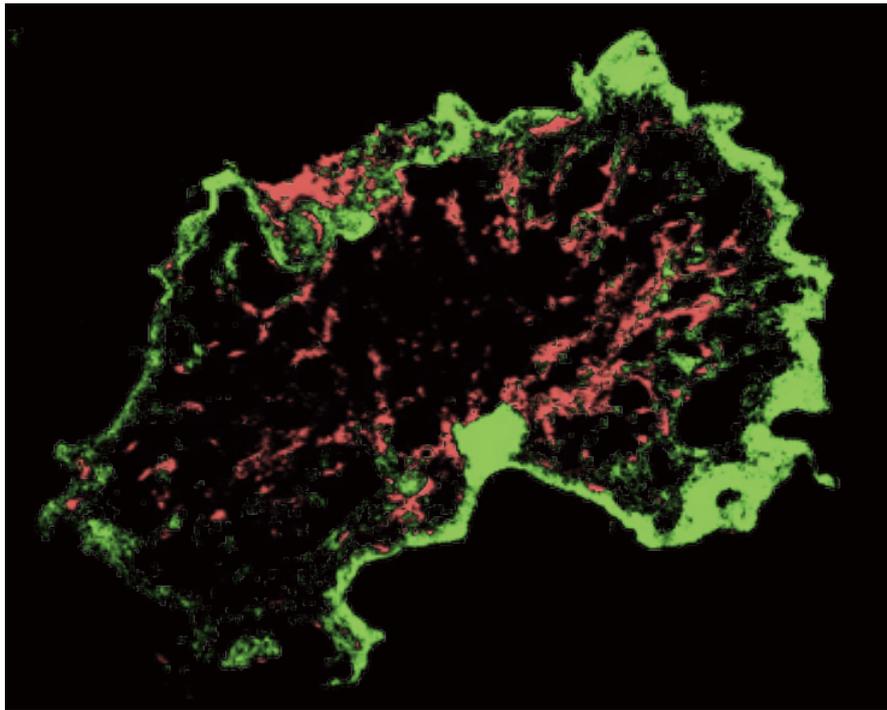


図2 形成された皮膚組織原基の免疫染色像 緑：Pan-cytokeratin、赤：CD31

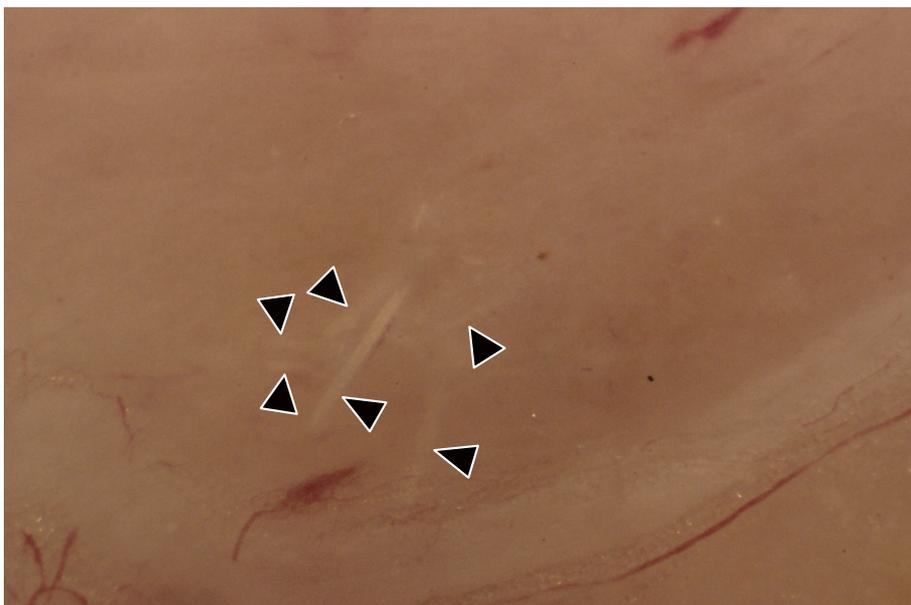


図3 皮膚組織原基移植3週後のヌードマウス皮膚組織(翻転して真皮側より観察している)
矢頭：形成された羽毛芽原基

らこの細胞塊は培養内で作成された人工的な皮膚付属器原基と考えられた。

4. 考察とまとめ

in vitro組織原基形成実験において、細胞塊を構成している4種の細胞の局在をほぼ明らかにした。細胞塊の表層が表皮細胞、内部が血管内皮細胞により構成されている理由として、身体の表面を覆う役割に特化した表皮細胞の特性が大いに影響していると思われる。また真皮細胞と血管内皮細胞が局在していた理由として、真皮中には毛細血管が網状に張り巡らされており、生体環境の組織構造をそのまま反映しているのではないかと想定された。

ヌードマウスに移植した細胞塊から形成された毛嚢が少数であった原因として、生体細胞を培養系に移すことによって皮膚幹細胞の多分化能が失われたことが考えられる。この問題を克服するためには、生体の微小環境に近い培養環境内で3次元混合培養し細胞の能力の低下を最小限に抑えた状態で移植するのが良いと考えられる。今後この原基のヌードマウスへの移植効率を改善する方法を開発したい。

(引用文献)

- 1) Nishimura E. K. et al: Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science* 307: 720-724, 2005
- 2) Rheinwald JG and Green H: Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6: 331-343, 1975
- 3) Green H et al: Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Nature science* 76: 5665-5668, 1979
- 4) O' Connor NE et al. *The Lancet* 317: 75-78, 1981
- 5) 井家 益和 : *生物工学* 92: 110-114, 2014
- 6) Kataoka K et al: Participation of adult mouse bone marrow cells in reconstitution on skin. *Am J Pathol* 163: 1227-1231, 2003
- 7) Takebe T et al: Vascularized and functional human liver from a iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 499: 481-484, 2013
- 8) Chih-Chiang C et al: Organ-level quorum sensing directs regeneration in hair stem cell populations. *Cell* 161: 277-290, 2015