

革新的ハイブリッド型三次元ヒト皮膚モデルの開発

弘前大学大学院医学研究科生体構造医科学講座

下田 浩

Establishment of full-thickness human cutaneous three-dimensional (3D) equivalent containing blood and/ or lymphatic vasculature is required for drug discovery and development of chemicals and cosmetics, because microcirculatory system in nature human skin plays an important role in regulating cutaneous morphogenesis and physiological function. The present study employed our developed layer-by-layer (LbL) nanofilm coating and unique collagen gel cell-accumulation techniques to fabricate human epidermis on dermis-like cellular and fibrous tissue with or without blood or lymphatic capillary network. Our constructs without vascular network exhibited a well-organized epidermal tissue involving cellular differentiation of keratinocytes and distinctive layer formation with cornification on basement membrane of dermal connective tissue and a high barrier function after exposure to a cytotoxic corrosive. Additional equipment of horizontal capillary network within the dermal tissue by LbL coating method facilitates formation of every layer in epidermis, as well as dermal tissue, to increase thickness of each tissue. Three-dimensional configuration of the vascular network introduced by collagen gel cell-accumulation procedure further accelerates maturation and thickening of both tissues. However, the lymphatic network prepared by the current LbL coating method was somewhat different in its form from that in normal nature human skin and leave little impression on both epidermal and dermal structure in the engineered cutaneous tissue, so that improved procedure for building lymphatic vasculature, being closely like that in nature dermis, has been currently developed. The present results consequently demonstrate that our peculiar tissue-engineering methods afford *in vitro* full-thickness human cutaneous 3D model like nature skin simply and substantial vascular network, being effective in tissue maturation, in a shorter period than that described previously. Our vascularized cutaneous tissue constructs are expected as next-generation *in vitro* skin models for drug and cosmetic development and as biomaterials for regenerative medicine.

1. 緒言

化粧品の開発において、EUでは既に動物実験が禁止され、本邦でも自主規制が強化されている。また、評価成績のヒトへの応用を考慮した場合、皮膚構造が異なる実験動物ではなくヒトにおける研究が好ましいのは明白であるが、このことは倫理的に困難な問題を含んでいる。これに対して近年、ヒト表皮細胞を分化・重層化した表皮組織¹⁾が汎用されているが、最近ではよりヒト皮膚に近い構築を模倣する真皮様結合組織に表皮組織を積層した擬似皮膚相同体の開発が報告されている²⁻⁹⁾。しかし、その多くは体液の通路と生体反応の環境を提供する微小循環系(血管・リンパ管)を真皮組織内に装備しておらず¹⁻⁶⁾、組織内における脈管の組織化に乏しい例⁷⁾と脈管の構築に特殊なデバイスや多種多様な生理活性添加剤、加えて長い期間と多数の煩雑な工程を要する例⁸⁾を見るに止まっている。これらの課題を同時に解決するには、血管やリンパ管が解剖学的正確性をもって配置された真皮組織と優れた機能形態を有する表皮組織から成る三次元(3D)構造体が短時間で自己組織

化される、再現性の高い簡便な技術の確立が不可欠である。このことは化粧品などの化成品の開発のみならず、医薬品や再生医療材料の開発においてもきわめて大きな意義を有する。我々の研究グループは独自に開発した細胞集積法⁹⁾によりこれまで心筋¹⁰⁾、腹膜¹¹⁻¹²⁾、動脈¹³⁾など様々なヒト三次元組織を創製するとともに、その内部に数日で血管やリンパ管のネットワークを自己組織化させることに成功している。この3D組織構築技術を応用し、化粧品・医薬品の開発と再生医療への応用性に優れた、高度な機能解剖学的特性をもつ血管・リンパ管網含有3Dヒト皮膚モデルを確立することが本研究の目的である。

2. 方法

2.1. 細胞培養

ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF; Lonza, NJ, USA)、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC; Lonza)、ヒト皮膚リンパ管内皮細胞(HDLEC; PromoCell, Heidelberg, Germany)、正常ヒト表皮角化細胞(NHEK; Kurabo, Japan)を37℃、5% CO₂濃度下で、それぞれの専用培地(10% fetal bovine serum (FBS)含有DMEM (Lonza), EGM™-2MV, NHEK増殖添加剤含有EpiLife™ (Thermo Fisher Scientific, MA, USA))を皮膚モデルの作製に供した。

2.2. LbL・細胞集積法による三次元皮膚モデルの構築

細胞表面にフィブロネクチン(Sigma-Aldrich, MO, USA)とゼラチン(Wako Pure Chemical Industries, Japan)による



Development of progressive human cutaneous 3D model

Hiroshi Shimoda

Department of Anatomical Science, Neuroanatomy, Cell Biology and Histology, Hirosaki University Graduate School of Medicine

多層性 (layer-by-layer ; LbL) ナノフィルムコーティングを施したNHDFを24-well用Transwell® insert (Corning, NY, USA) に8層となるように播種・積層化し、翌日～数日後にNHDF積層組織表層をType IV collagen溶液 (0.04mg/ml ; Sigma-Aldrich) でコーティングした後、その上層にNHEKを3層性に播種した (図1)。NHEK積層翌日より10% FBS含有DMEMとEpiLife™の等量混合培地に25μg/mlアスコルビン酸 (Wako Pure Chemical Industries) を添加した培地を用いてair-liftによる培養を7日間行い、真皮と表皮より成る皮膚モデルを構築した (図1)。

2. 3. LbL・細胞集積法による血管(リンパ管) 網含有三次元皮膚モデルの構築

NHDFおよびHUVECの細胞表面に2. 2. と同様のコーティングを行い、1層のHUVECを各4層のNHDFでサンドイッチ状に挟み込むように播種・積層化した (図1)。翌日～数日後に2. 2. と同様にNHEKの培養を7日間行い、血管網含有皮膚モデルを構築した (図1)。

リンパ管網含有皮膚モデルについては、HUVECの代わりにコーティングを施していない0.5層分のHDLECを用いて上記と同様の操作を行うことによりリンパ管網含有皮膚モデルを構築した (図1)。

2. 4. コラーゲングル・細胞集積法による血管網含有三次元皮膚モデルの構築

コラーゲングル溶液 (3mg/ml ; collagen from human placenta ; Sigma-Aldrich) にNHDF (1 × 10⁵) とHUVEC (0.5 × 10⁵) を浮遊させ、遠心平衡化 (1100G, 15分) した後、24-well用Transwell® insertに播種し、翌日より2. 2. と同様にNHEKの培養を7日間行い、血管網含有皮膚モデルを構築した (図2)。

2. 5. 光学顕微鏡的解析

2. 2. ～2. 4. において構築した各種三次元組織 (各3体) を4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、5μm厚のパラフィン包埋組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (H. E.) 染色ならびに下記の免疫染色に供した。また、2. 3.

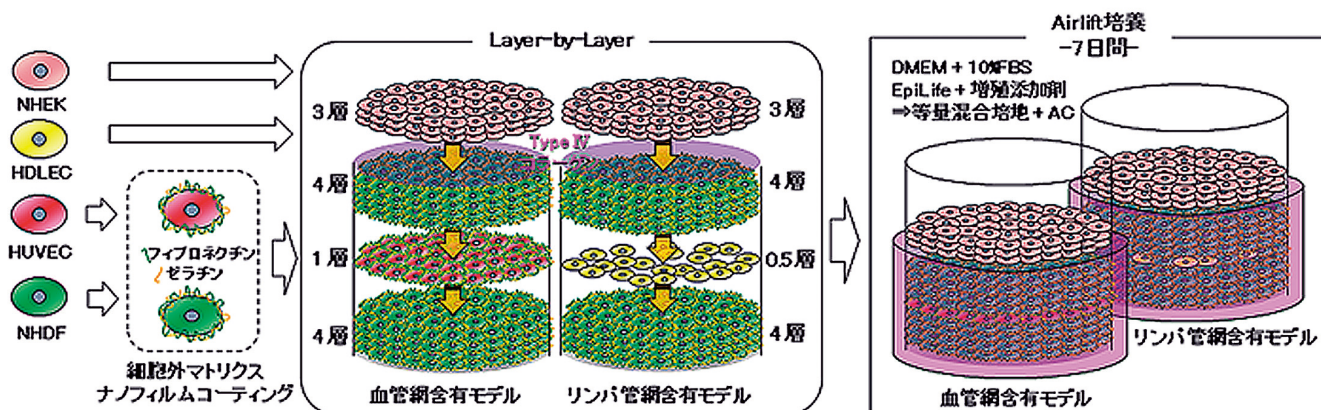


図1 LbL・細胞集積法による血管(リンパ管) 網含有3D皮膚モデルの構築。主にフィブロネクチンとゼラチンによる多層化(Layer-by-Layer ; LbL) ナノフィルムコーティングを行ったヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) とヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) またはヒト皮膚リンパ管内皮細胞 (HDLEC) を積層化した後、上層に正常ヒト表皮角化細胞 (NHEK) を播種し、air-liftの状態 で分化・誘導する。

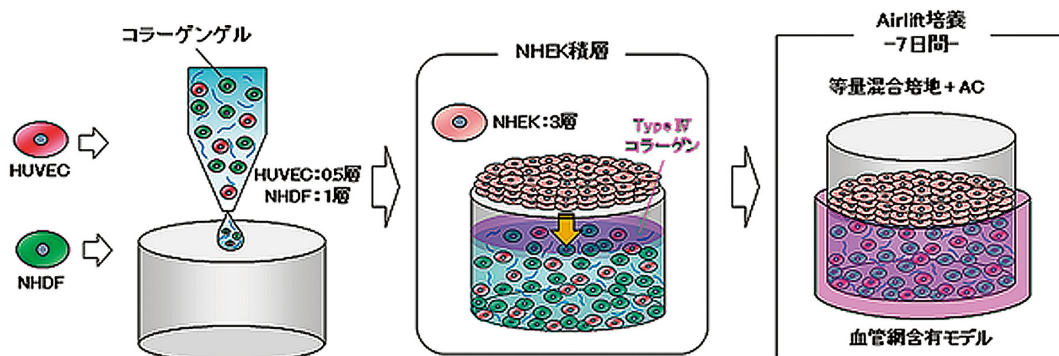


図2 コラーゲングル・細胞集積法による血管網含有3D皮膚モデルの構築。コラーゲングル溶液にヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) とヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) と浮遊・遠心し、積層化した後、上層に正常ヒト表皮角化細胞 (NHEK) を播種し、air-liftの状態 で分化・誘導する。

～2.4.において構築した血管網含有皮膚モデル各2体を4%パラホルムアルデヒド溶液で固定後、whole-mount標本として下記の免疫染色に供した。

2.6. 免疫染色

2.2.で構築した皮膚モデルの組織切片をクエン酸緩衝液(0.01M, pH6.0)で煮沸した(121℃, 15分)後、anti-occludin IgG (abcam, Cambridge, UK)、anti-desmoglein IgG (Heiderberg, Germany)、anti-laminin IgG (Sigma-Aldrich)を一次抗体として、各一次抗体の動物種に特異的なIgGに蛍光物質(fluorescein isothiocyanate, Cy3, Cy5)を結合させた二次抗体を用いてレーザー共焦点顕微鏡で各タンパクの局在を可視化した。

2.3.～2.4.のwhole-mount標本については、anti-CD31 IgG (DAKO, Glostrup, Denmark)を一次抗体として、Cy3を結合させた特異的二次抗体を用いてレーザー共焦点顕微鏡で血管網を可視化した。

2.4.で構築したリンパ管網含有皮膚モデルの組織切片をクエン酸緩衝液で煮沸した後、anti-LYVE-1 IgG (R&D Systems, MN, USA)を1次抗体として、peroxidaseを結合させた特異的二次抗体を用いて3,3'-diaminobenzidineを免疫反応産物としてLYVE-1の局在を光学顕微鏡で可視化した。

2.7. 電子顕微鏡的解析

2.2.で構築した皮膚モデル各2体を透過型電子顕微鏡(TEM)および走査型電子顕微鏡(SEM)による解析に供した。TEM解析については、検体を2.5%グルタルアル

デヒド溶液で固定した後、常法に従い超薄切片を作製し、JEM1250 (JEOL, Tokyo)で観察した。また、SEM解析については、上述のパラフィン包埋組織より組織切片を作製した残りの組織を1%オスmium酸溶液で導電染色した後、凍結乾燥と白金コーティングを行い、JSM-6510LV (JEOL, Tokyo)で観察した。

2.8. 皮膚刺激性評価試験

三次元皮膚モデルのバリア機能を評価するために、2.2.で構築した三次元皮膚モデルならびにNHDFのみで構成された三次元真皮モデルに対して生理食塩水ならびにドデシル硫酸ナトリウム(SDS)溶液(1, 2, 4, 10, 50mg/ml)を組織表面に暴露し、18時間後に洗浄した後、常法通りにMTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)アッセイを行い、得られた測定値から細胞生存度(各濃度のSDS溶液暴露後の検体の吸光度/生理食塩水暴露後の検体の吸光度×100(%))を算出した。

3. 結果

3.1. 三次元皮膚モデルの構造

本研究で用いた細胞集積法は10日以内に真皮様結合組織と表皮様組織から成る3Dヒト皮膚モデルを構築することができた。24-well insert内に構築された3D組織は1cmの径をもち、多数の線維芽細胞と細胞外マトリクスから成る80～100μm厚の真皮様組織とその上に形成された基底層から角質層の各層が識別される50～70μm厚の表皮組織で構成されていた(図3A, B)。表皮組織において基底層と有棘層は明瞭であったが、顆粒層はやや乏しく、

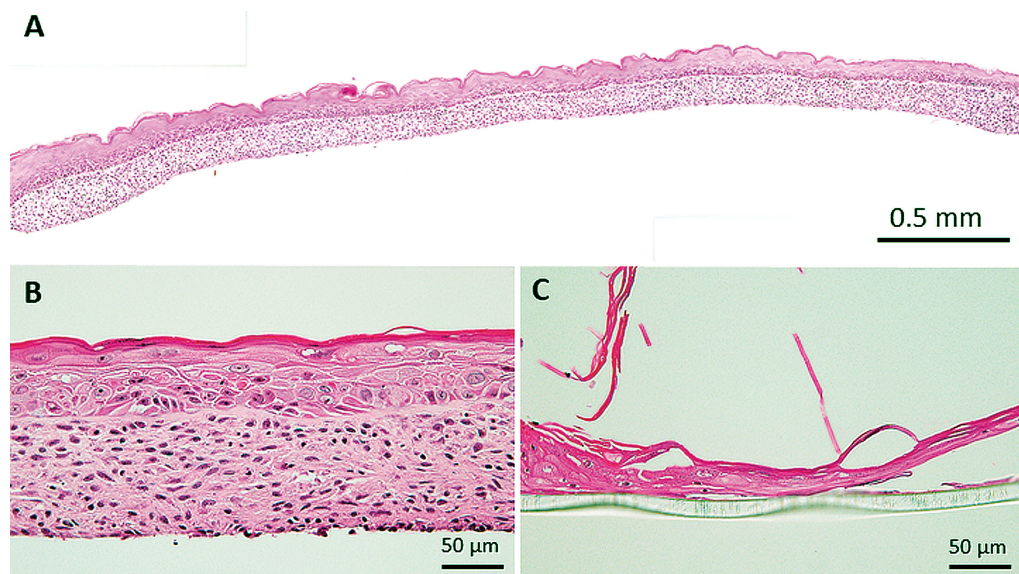


図3 3D皮膚モデルの構造。A. LbL細胞集積法で構築された三次元皮膚モデルの組織切片の全体像。B. A.の一部の拡大像。線維芽細胞と細胞外マトリクスから成る真皮様組織上に細胞分化と角質化を伴う表皮組織が見られる。C. ヒト表皮角化細胞のみで分化誘導した表皮様組織。細胞分化による層形成が乏しく、重層化されない。A. - C. H.E. 染色

角化層には扁平な細胞核をもつ錯角化を示す細胞も散見された(図3B)。真皮様組織を構築せずにNHEKのみで作製した構造体は表皮としての分化傾向を呈したが、組織化されなかった(図3C)。

LbL・細胞集積法により構築された皮膚モデルの表皮組織では、トノフィラメントをはじめとするケラチノサイト

の特性を有する細胞がデスマゾームを備えた細胞間橋を無数に発達させて基底層と有棘層を構築し、基底膜の形成に伴いヘミデスマゾームをもつ基底細胞が散見された(図4A)。顆粒細胞内ではトノフィラメントの間に大小のケラトヒアリン顆粒が散在し、その上層には扁平な細胞が屋根瓦様に堆積する角質層が形成されていた(図4A, B)。ま

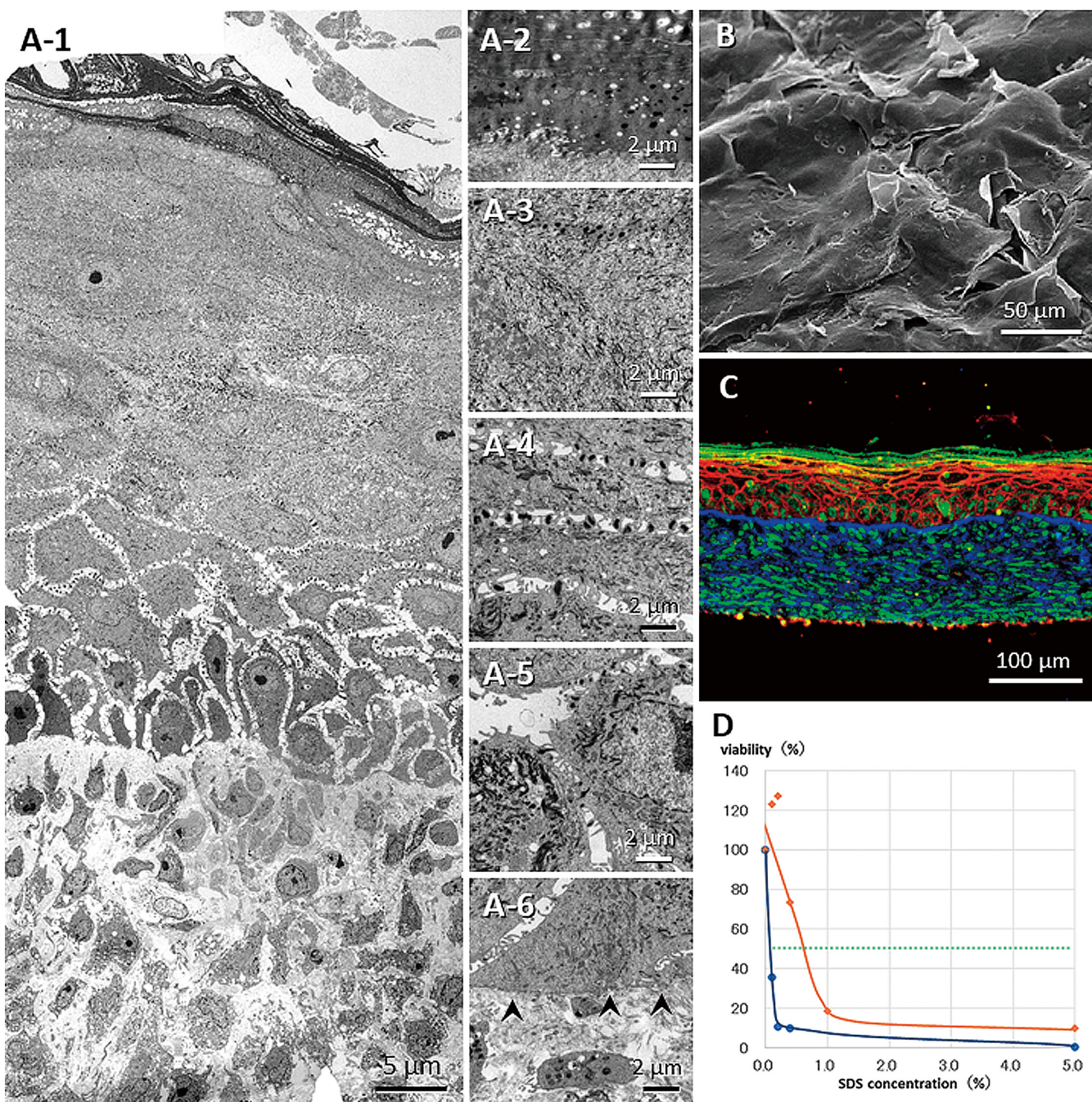


図4 3D皮膚モデルのTEM像(A)、SEM像(B)、desmoglein(赤)・occludin(緑)・laminin(青)に対する免疫染色像(C)、皮膚刺激性試験(D)。A-1. 表皮から真皮にかけての全体像。A-2. A-1. の表皮角質層から顆粒層の拡大像。A-3. A-1. の表皮顆粒層の拡大像。A-4. A-1. の表皮有棘層の拡大像。A-5. A-1. の表皮基底層から基底層の拡大像。A-6. A-1. の表皮基底層から真皮にかけての拡大像。矢頭は基底膜とヘミデスマゾーム様構造を指す。B. 角質層の表面は扁平な細胞の屋根瓦状の堆積から成る。C. desmoglein, occludin, lamininはそれぞれ表皮全体、表皮表面、表皮と真皮の境界層および真皮全体に局在が見られる。D. 青曲線と赤曲線はそれぞれ真皮様結合組織と3D皮膚モデルに対するSDS各濃度溶液(横軸)暴露後のMTTアッセイ後の吸光度(縦軸)を示す。

た、基底層から有棘層の細胞間でデスモゾームが発達するのに対し、顆粒層から角質層では desmoglein などのデスモゾーム構成タンパクに加えて occludin を含む閉鎖結合構成タンパクが密に分布していた (図 4C)。一方、真皮様結合組織では表皮組織との境界面に laminin を含む基底膜が形成されたが、laminin は結合組織深層にも散在性に分布していた (図 4A, C)。

3.2. 三次元皮膚モデルのバリア機能の評価

SDS 溶液と MTT アッセイを用いた 3D 皮膚モデルのバリア機能評価において、NHDF のみで構築した 3D 結合組織では暴露される SDS 溶液の濃度上昇に伴い急激に細胞生存率が減少し、1mg/ml 溶液で 50% 未満になるのに対し、真皮様組織上に表皮構造が形成された 3D 皮膚モデルは SDS 溶液濃度の上昇に対してより緩やかな細胞生存率の減少を示し、細胞生存率が 50% に低下する溶液濃度は 4~7mg/ml であった (図 4D)。

3.3. 血管網含有三次元皮膚モデルの構造

LbL または コラーゲングルを用いたいずれの細胞集積手法においても毛細血管網を有する全層性の 3D 皮膚モデルを 10 日以内に構築することができた (図 5)。LbL 法による皮膚モデルの真皮様組織では、二次元的に広がる毛細血管網が中層部に形成され、その厚さは血管網を有しないモデルの真皮様組織より約 1.5 倍に増加していた (100~150 μm ; 図 5A, B)。同モデルの表皮組織は、明瞭な顆粒層を形成する細胞分化を呈し、血管網をもたない皮膚モデルに比べて約 1.5 倍に肥厚していた (約 100 μm ; 図 5A)。また、角質層は細胞核をもたない扁平な細胞の堆積のみで構成され、その上層はしばしば脱落していた (図 5A)。

一方、コラーゲングル法で構築した 3D 皮膚モデルは、真皮様組織内に三次元的に広がる毛細血管網が形成され、LbL・細胞集積法による毛管網含有皮膚モデルよりさらに真皮様組織の厚み (約 150 μm) が増していた (図 5C, D)。また、本モデルの表皮組織は LbL 法による皮膚モデルと同様に明確な細胞分化と角化を呈し、その厚さは 120~150 μm に達していた (図 5C)。

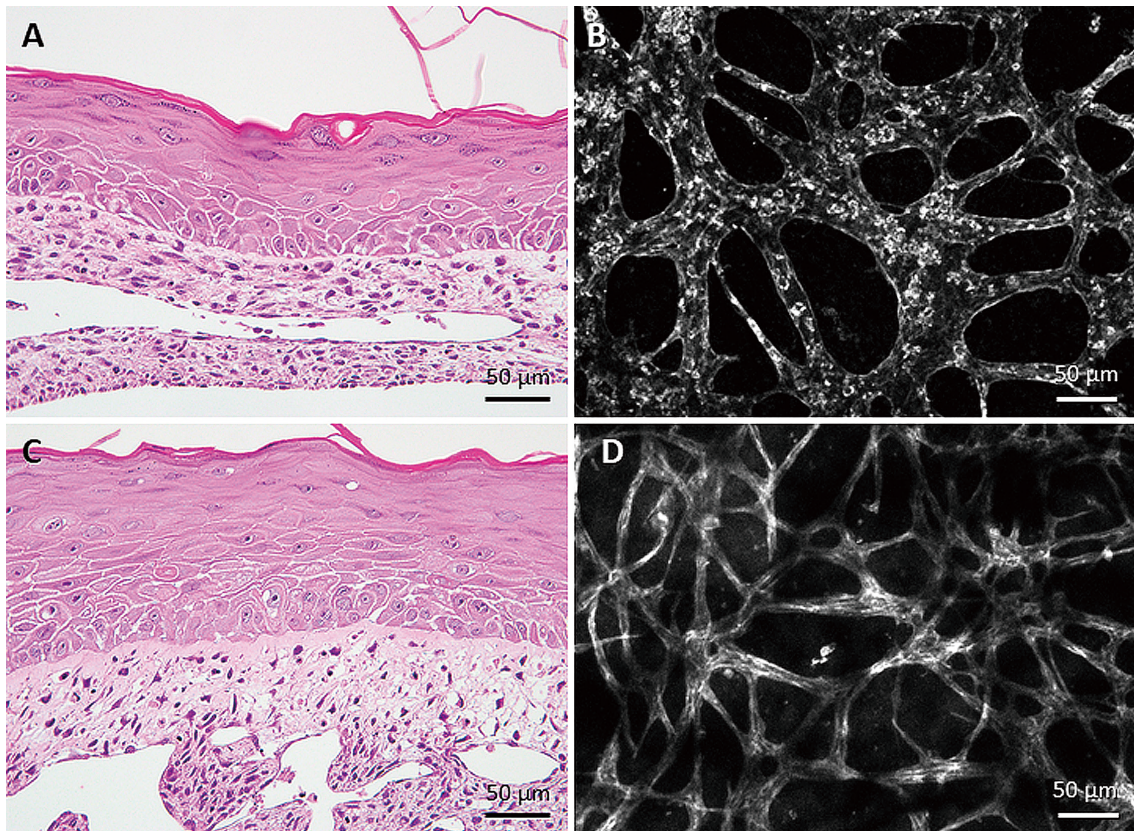


図 5 血管網含有 3D 皮膚モデルの構造. A. LbL・細胞集積法により構築された 3D 皮膚モデルの組織切片像。真皮様組織中層に管腔を形成する血管が見られる。H.E. 染色 B. LbL・細胞集積法により構築された 3D 皮膚モデルの真皮様組織内で二次元的に広がる血管網。Whole-mount 標本における CD31 に対する免疫染色 C. コラーゲングル・細胞集積法により構築された 3D 皮膚モデルの組織切片像。真皮様組織の浅層から深層にわたり管腔を形成する血管が見られる。H.E. 染色 D. コラーゲングル・細胞集積法により構築された 3D 皮膚モデルの真皮様組織内で三次元的に広がる血管網。Whole-mount 標本における CD31 に対する免疫染色

3. 4. リンパ管網含有三次元皮膚モデルの構造

LbL法によりリンパ管網を含有する全層性の3D皮膚モデルを10日以内に形成することができた(図6)。真皮様組織の中層部を中心に、リンパ管内皮マーカーの一つであるLYVE-1陽性の拡張した毛細リンパ管網が二次元的に発達していたが、真皮様組織の厚さは80~100 μ mと血管・リンパ管網をもたない皮膚モデルとほぼ同等であった(図6A, B)。その表皮組織では紡錘状の細胞への分化傾向と角質層(20 μ m)の形成が明瞭であったが、その厚さは約70 μ mで血管網を有する皮膚モデルより薄い傾向を示した(図6A)。

4. 考 察

我々の研究グループが独自に開発した細胞外マトリクスのLbL・コーティング技術を用いた細胞集積法⁹⁻¹³⁾は、真皮様結合組織上でケラチノサイトが生体と同様の分化・成熟と角質形成を呈する全層性の皮膚組織を構築した。本構造体は、特殊なデバイスや多種多様の添加剤を用いることなく、細胞自身が自己組織化することにより形成され、ヒト生体皮膚に類似する組織学的特性を有していた。加えて、従来の皮膚相同体²⁻⁸⁾に比べて、簡便に10日以内で構築できることも大きな特徴である。本法では線維芽細胞が分布する真皮様組織上においてのみ表皮が形成されることから、本構造体はケラチノサイトの表皮形成に真皮との接触・相互作用を必要とする生体皮膚¹⁴⁾と同様の微小環境を提供することでヒト表皮と相同の細胞・組織構造と分子発現を再現していると思われる。このことが、細胞毒性基準物質に対して本構造体がヒト表皮モデル¹⁵⁾より高いバリア機能を発揮することに寄与していると考えられる。しかし、表皮の分化と角質形成は未だ十分とは言えず、真皮様組織においても微小循環系をはじめとする組織構築が不足しており、生体皮膚に代わる評価系の確立にはこれを解決する必要があると思われる。

上記の課題に応えるために、本研究ではさらに全層性皮

膚モデルの結合組織内に血管網の付与を行った。我々のLbL・細胞集積法は立体組織内に血管・リンパ管網を組織化することに優れ、これまで微小循環系を内蔵する様々な3D組織を創製している¹⁰⁻¹³⁾。先行研究の脈管網含有皮膚相同体⁹⁾がその作製に煩雑な操作と28日以上長い期間を要する⁹⁾のに対して、LbL・細胞集積法は10日以内に真皮様組織内に二次元的に広がる毛細血管網を有する皮膚モデルを作製し、さらに新たに開発したコラーゲングル・細胞集積法は同期間内に真皮全層に広がる3次的毛細血管網を構築した。コラーゲングル法による3D皮膚モデルはLbL法に比べて線維芽細胞の密度を抑えて細胞外マトリクスの増加と分散配置を図ることにより、より生体真皮に近い組織を構築することが可能であり、このことが血管網の3次元化に働いていると推測される。結合組織内に血管網が構築されたことにより皮膚モデルの真皮様組織が厚くなるとともに、表皮組織が明確な細胞分化による肥厚を示したことは、血管網の形成と配置が真皮組織だけでなく表皮組織の機能形態形成にも深く関与することを示唆している。コラーゲングル法による3D皮膚モデルではさらに真皮、表皮ともにその厚みを増していたことから、血管網の三次元化は栄養素やガスの各組織への供給を迅速に有効化することで皮膚組織の分化・成熟を促進すると思われる。

生体の皮膚には血管系だけでなく、細胞の代謝物、異物などを含む組織液の排導や高分子物質と細胞の輸送に関わるリンパ管が配備され、近年では皮膚の恒常性の維持や免疫の機能調節に密接に関与することが知られている¹⁶⁾。これより、3D皮膚モデルの結合組織内にリンパ管網を構築し、皮膚組織の形態形成について解析を行ったが、血管網の場合と異なり、脈管を有さない皮膚モデルとの間に明らかな差は見られなかった。このことは脈管本来の機能的差異によるものかもしれないが、今回構築されたリンパ管網は拡張した管腔による平面的な洞様構造を呈し、生体皮膚のリンパ管網の機能形態と乖離していることがその結果

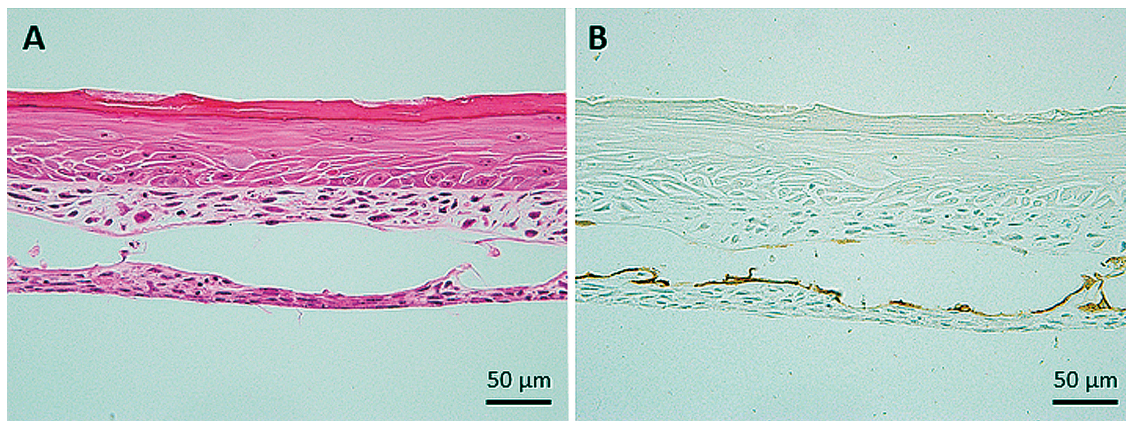


図6 リンパ管網含有3D皮膚モデルの構造。A. LbL・細胞集積法により構築された3D皮膚モデルの組織切片像。真皮様組織中層を中心に洞様に拡張したリンパ管が見られる。H.E.染色 B. Aの隣接切片におけるLYVE-1に対する免疫染色像。LYVE-1陽性の内皮細胞が管腔を形成する。

に影響している可能性が否定できないことから、より解剖学的に正確なリンパ管網含有3D皮膚モデルを構築すべく現在その技術改善を行っている。

5. 総括

本研究成果は独自に開発した立体組織構築技術がヒト生体皮膚に類似した*in vitro* 3D皮膚モデルを簡便に短期間で構築できることを示している。加えて、解剖学的に高い相同性をもつ毛細血管網を本構造体の真皮内に装備することにより真皮組織だけでなく、表皮組織の分化・成熟と機能性を亢進させることが明らかになり、微小循環系を内蔵する本皮膚相同体は*in vitro*における薬剤や化粧品・化成品の開発に高い有用性をもつ実験動物代替ヒト皮膚モデルとして、さらには再生医療材料としての応用が期待される。

謝辞

本研究の遂行にあたり、多大なるご支援を賜り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心より感謝申し上げます。

また、本研究は当教室の高橋一人氏と成田大一氏の尽力によるものであり、研究の遂行にあたり明石満教授（大阪大学生命機能研究科）と松崎典弥教授（大阪大学工学研究科）に温かいご指導を頂きました。この場をお借りいたしまして厚く御礼申し上げます。

(引用文献)

- Alépée N, Grandidier MH, Cotovio J: sub-categorization of skin corrosive chemicals by the EpiSkinTM reconstructed human epidermis corrosion test method according to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicology in Vitro* 28: 131-145, 2014
- Black AT, Hayden PJ, Casillas RP, Heck DE, Gerecke ER, Sinko PJ, Laskin DL, Laskin JD: Expression of proliferative and inflammatory markers in a full-thickness human skin equivalent following exposure to the model sulfur mustard vesicant, 2-chloroethyl ethyl sulfide. *Toxicol Appl Pharmacol* 249: 178-187, 2010
- Thakoersing VS, vanSmeden J, Mulder AA, Vreeken RJ, El Ghalbzouri A, Bouwstra JA: Increased presence of monounsaturated fatty acid in the stratum corneum of human skin equivalents. *J Invest Dermatol* 133: 59-67, 2013
- Falanga V, Isaacs C, Paquette D, Downing G, Kouttab N, Butmarc J, Badiavas E, Hardin-Young J: Wounding of bioengineered skin: cellular and molecular aspects after injury. *J Invest Dermatol* 119: 653-660, 2002
- Pupovac A, Senturk B, Griffoni C, Maniura-Weber K, Rottmar M, McArthur AL: Toward immunocompetent 3D skin models. *Adv Healthcare Mater* 7, 1701405, 2018
- Groeber F, Holeiter M, Hampel M, Hinderer S, Schenke-Layland K: Skin tissue engineering - *in vivo* and *in vitro* applications. *Adv Drug Deliv Rev* 128: 352-366, 2011
- Black AF, Berthod F, Heurreux NL, Germain L, Auger FA: *In vitro* reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. *FASEB J* 12: 1331-1340, 1998
- Bourland J, Fradette J, Auger FA: Tissue-engineered 3D melanoma model with blood and lymphatic capillaries for drug development. *Sci Rep* 8: 13191, 2018
- Matsusaki M, Fujimoto K, Shirakata Y, Hirakawa S, Hashimoto K, Akashi M: Development of full-thickness human skin equivalents with blood and lymph-like capillary networks by cell coating technology. *J Biomed Mater Res A* 103A, 3386-3396, 2015
- Narita H, Shima F, Yokoyama J, Miyagawa S, Tsukamoto Y, Takamura Y, Hiura A, Fukumoto K, Chiba T, Watanabe S, Sawa Y, Akashi M, Shimoda H: Engraftment of vascularized human iPS cell-derived 3D-cardiomyocyte tissue after xenotransplantation. *Sci Rep* 7: 13708, 2017
- Asano Y, Odagiri T, Oikiri H, Matsusaki M, Akashi M, Shimoda H: Construction of artificial human peritoneal tissue by cell-accumulation technique and its application for visualizing morphological dynamics of cancer peritoneal metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 494: 213-219, 2017
- Oikiri H, Asano Y, Matsusaki M, Akashi M, Shimoda H, Yokoyama Y: Inhibitory effect of carbonyl reductase 1 against peritoneal progression of ovarian cancer: evaluation by ex vivo 3D-human peritoneal model. *Mol Biol Rep* 46: 4685-4697, 2019
- Shima F, Narita H, Hiura A, Shimoda H, Akashi M: Construction and histological analysis of a 3D human arterial wall model containing vasa vasorum using a layer-by-layer technique. *J Biomed Mater Res A*. 105:814-823, 2017
- Liu N, Matsumura H, Kato T, Ichinose S, Takada A, Namiki T, Asakawa K, Morinaga H, Mohri Y, De Arcangelis A, Georges-Labouesse E, Nanba D, Nishimura EK: Stem cell competition orchestrates skin homeostasis and aging. *Nature* 68, 344-350
- 化学物質の試験に関する OECD ガイドライン 439 *in vitro* 皮膚刺激性：再構築ヒト表皮試験法
- 下田 浩：リンパ管の解剖学と老化. *アンチエイジング医学* 14：191-196, 2018