ヒトiPS細胞に由来する若齢および加齢様の性質を示す積層および立体皮膚オルガノイドの作製

関西医科大学大学院医学研究科医科学専攻 イノベーション再生医学 iPS・幹細胞再生医学講座

服部　文幸

It goes without saying that healthy skin is the most important foundation of cosmetics. Easily evaluate the benefits of new ingredients such as protective ingredients from external stimuli such as ultraviolet rays and dryness, and ingredients supplied from the dermis to the epidermis in order to maintain a higher degree of skin health against aging. That is important. On the contrary, it is also important to predict the negative effects on skin health by applying or drinking these new ingredients in order to prevent the occurrence of side reactions. Traditionally, these evaluations have been performed exclusively with animals. However, physiological difference between spiecies that have hindered accurate screening has not been overcome, yet. Furthermore, in recent years, the spirit of animal protection and the development of laws and regulations have rapidly become widespread, and there is a social demand for the complete abolition of animal experiments, especially in the field of cosmetics. Under such circumstances, human iPS cells have few ethical problems in establishment and can be widely used in industry. Human iPS cells are theoretically infinitely self-renewable and can differentiate into any somatic cell, so the merit of utilizing them in the field of cosmetology is immeasurable. Therefore, we created a three-dimensional skin model using human iPS cells derived from a Japanese Werner Syndrome patient. Furthermore, we introduced a p16INK4A reporter that is activated in senescent cells into the above cell line to develop a system that can observe aging in real time. Using this system, we also found that the aging of them was accelerated by exposure to Doxorubicin.

1. 緒　言

健やかな皮膚は、コスメトロジーにおいて最も重要な基盤であることは言うまでもない。加齢に抗して皮膚の健康状態をより高度に維持するために、紫外線や乾燥など外部刺激からの防御成分や、真皮から表皮への供給成分など、新規成分の有益性を簡便に評価することは重要である。また、逆にこれら新規成分の塗布や飲用により、皮膚健康に与える負の影響を予見することも、副反応の発現を未然に防ぐために重要である。従来、これらの評価は、専ら動物を用いて実施されてきた。しかしながら、従来の動物を用いた試験には根本的な種差の壁があり、正確なスクリーニングが妨げられてきた。さらに、昨今では動物愛護精神と法令の整備が急速に普及し、特にコスメトロジー分野では、動物実験を完全に廃止することが社会的に求められている。

このような状況にあって、ヒトiPS細胞は、樹立における倫理的問題も少なく、産業界で広く活用できる。ヒトiPS細胞は、理論的に無限に自己複製可能であり、またどの体細胞へも分化できる点で、コスメトロジー分野で利活用するメリットは計り知れない。

そこで、我々は、日本人の早老症（Werner Syndrome）由来のヒトiPS細胞を用いて立体皮膚モデルを作製した。さらに老化細胞で活性化されるp16INK4Aレポーターを遺伝子導入し、リアルタイムに老化を観察できるシステムを構築した。さらにこの老化がDoxorubicinの暴露により加速されることを見出した。

Preparation of laminated and three-dimensional skin organoids derived from human iPS cells showing young and age-like properties

Fumiyuki Hattori

Department of Innovative Regenerative Medicine Kansai Medical University Graduate School of Medicine

2. 方　法

2. 1. 細胞

日本人、健常人およびWerner患者由来iPS細胞は、共に理研細胞バンクから入手した。

2. 2. 細胞分化

ヒトiPS細胞の未分化維持培養方法は、文献1に基づき一部改良を加えた。

ヒトiPS細胞の線維芽細胞分化は、文献2および文献3の方法に基づき実施した。

ヒトiPS細胞のケラチノサイト分化は、文献4の方法に基づいて行った。

立体皮膚モデルの作製方法は、文献2の方法を一部改良して実施した。

2. 3. p16INK4Aレポーター株の作製

老化指標としてp16INK4Aの発現をリアルタイムで観察するために、レポーターを作製し、ヒトiPS細胞に対し恒常的遺伝子導入を行い、遺伝子導入株を作製した。レポーターは、p16INK4Aプロモーター領域をクローニングし、この支配下にEGFPを配した。さらにこの遺伝子発現ユニットをPiggyBacプラスミドへと薬剤耐性遺伝子の恒常的発現ユニットとタンデムに挿入した。ウェルナー症候群患者由来iPS細胞に対して上記のレポータープラスミド

をリポフェクション法により遺伝子導入した。恒常的遺伝子導入株の選別を薬剤耐性により実施し、数株のクローンを得た。

2. 4. 人工的老化誘導の実施

人工的な老化を発生させるために、ゲノムの二重鎖切断を発生させる抗がん剤: Doxorubicin を低濃度 20, 30, 50 nM で 5 日間暴露し、その後増殖促進培地において 1 週間培養を行ってから、蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。

3. 結　果

3. 1. 積層皮膚モデルの構築

コラーゲンなどの細胞外マトリックスの混合物に対し、分散したヒト iPS 細胞由来線維芽細胞を懸濁した後、半透膜培養カップ上に播種を行った後にゲル化処理を行った。これにより、細胞外マトリックス真皮の構造を模した。培養直後は、ゲル中に均一に分散して存在した線維芽細胞は、1 週間の後には、線維芽細胞どうしが相互作用した編み目状の構造を呈した。さらに、緑色蛍光タンパク質を恒常的に発現させる遺伝子組み換えを行ったヒト iPS 細胞から分化誘導したケラチノサイトを真皮上に播種したところ、迅速に接着、平面状に広がった。これらにより構築された立体皮膚モデルは、構築後 2 ヶ月以上安定して維持できた（図 1）。

健常人および Werner syndrome 患者由来 iPS 細胞から線維芽細胞およびケラチノサイトを分化誘導することに成功した。

3. 2. 老化レポーターiPS細胞株の作製

次に、皮膚細胞の老化度をリアルタイムに検出し、選別可能とするために、老化レポーターを有するヒト iPS 細胞株の樹立を行った。プラスミド遺伝子の構造は図 2 A のとおりであり、ウェルナー症候群患者由来 iPS 細胞への遺伝子導入株（図 2B）は、正常な増殖能と多分化能を維持していた。未分化状態では蛍光レポーターを発現することはなかった。

3. 3. ウェルナー症候群患者由来分化細胞の自然老化

ウェルナー症候群由来 iPS 細胞から自然分化した細胞を 5 回継代したところ、増殖性が低下し細胞体が大きくなる

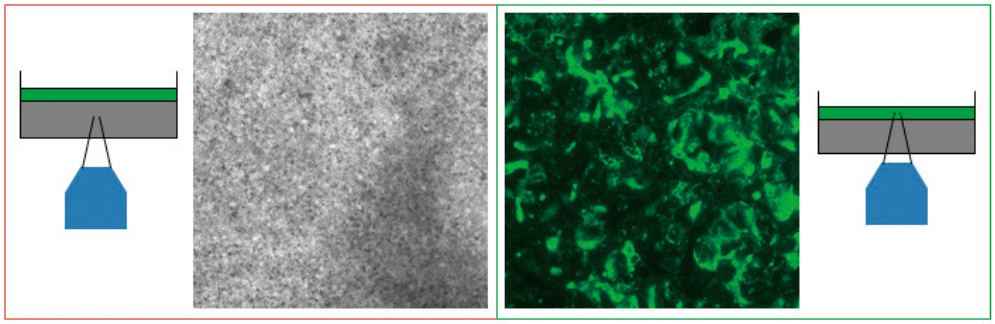

図1　積層皮膚モデル

トランスウェル上において、下層にヒトiPS細胞由来の線維芽細胞を、上層にヒトiPS細胞由来のケラチノサイトを培養した。ケラチノサイトにはGFPを恒常的に発現させた。

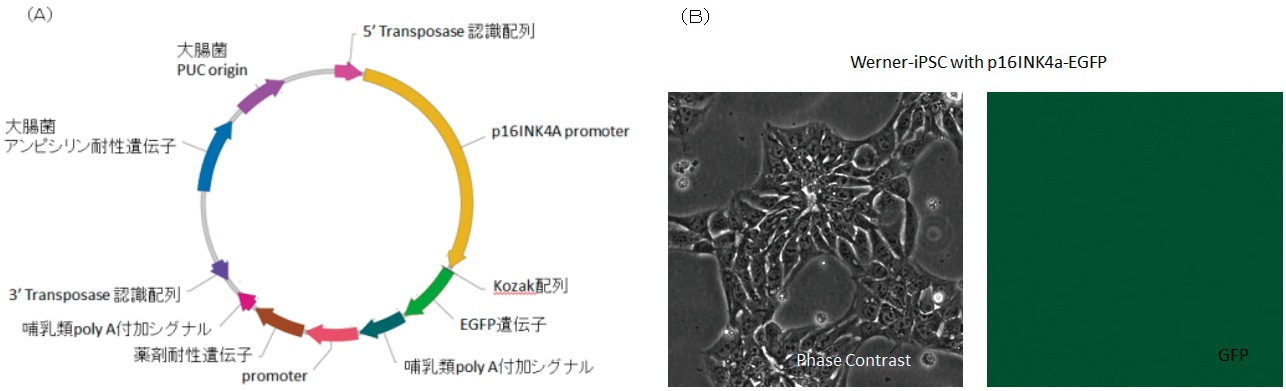

図2　p16INK4Aレポータープラスミドと導入したウェルナー症候群患者iPS細胞

(A) レポータープラスミドの構造を示した。(B) 遺伝子導入したウェルナー症候群患者由来iPS細胞とその緑色蛍光（老化していない細胞ではGFPを発現していない）。

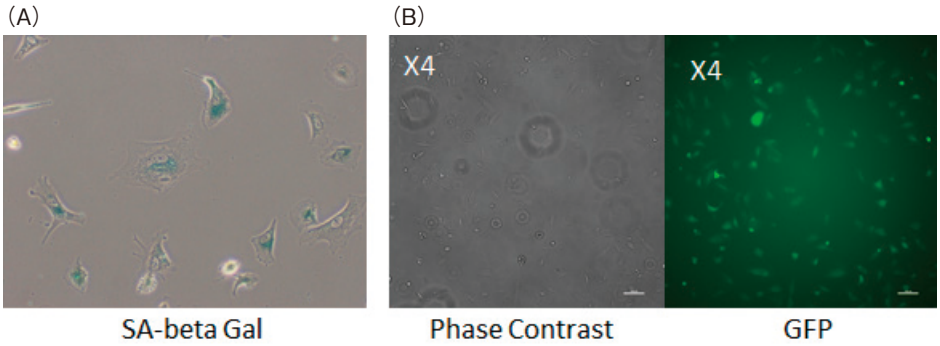

図３　ウェルナー症候群患者由来iPS細胞から分化した細胞の老化
ウェルナー症候群由来iPS細胞から分化した細胞を継代し得られた老化形質細胞。

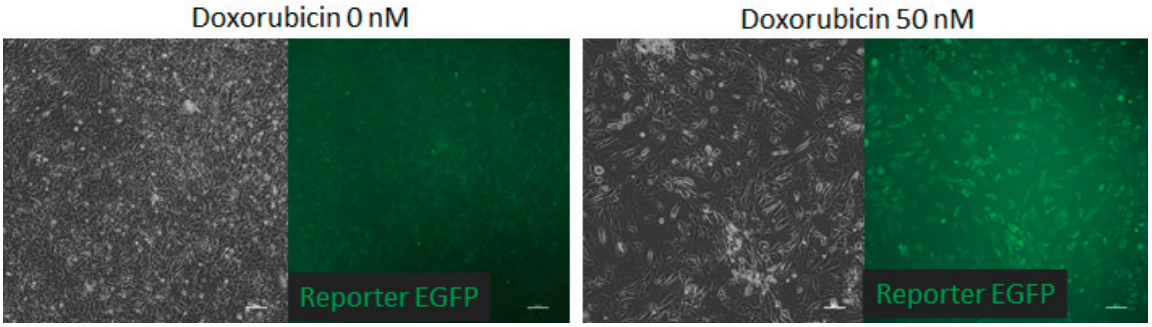

図4　ウェルナー症候群患者由来iPS細胞から分化した細胞の人工的老化促進

肥大を呈する状態に至った。この細胞のレポーターGFP発現状態を確認したところ、図3Bのように蛍光性を示した。同時に、この細胞を老化依存的βgal染色に供したところ、陽性を示した(図3A)。

3. 4. ウェルナー症候群患者由来線維芽細胞の人工的老化促進

続いて、p16INK4Aレポータープラスミドを導入したウェルナー症候群患者由来iPS細胞から、線維芽細胞を分化誘導した。この細胞は継代を3回経た状態では、蛍光性を示さなかった。この細胞に抗がん剤であり二本鎖DNA切断を惹起するDoxorubicinを5日間添加し、その後増殖可能な培地に交換して7日間培養を行った。Doxorubicin処理を行った細胞では、増殖が完全に停止し、細胞体が大きくなる、いわゆる老化細胞の様態を示した。この時にレポーターGFPの発現を観察したところ、図4に示すように、Doxorubicinに暴露された細胞にだけ強い蛍光シグナルを検出した。

4．考察と今後

ウェルナー症候群患者由来iPS細胞から分化誘導した線維芽細胞およびケラチノサイトから成る積層皮膚モデルを構築した。この時、ケラチノサイトの生存期間が単体で培養している時よりも著明に延長されたことは興味深い。次に老化の状態をリアルタイムで観察できるように、p16INK4Aのプロモーター配列を用いた「老化レポーターiPS株」を作製した。この株を線維芽細胞に分化誘導した直後においては、老化レポーターの発現は見られなかったが、分化後の継代を重ねることでレポーターの発現が誘導された。さらにDNAの二重鎖切断を引き起こす抗がん剤Doxorubicinを低濃度で長期間処理したところ、細胞の増殖性は完全に失われ、細胞質の肥大を呈する、いわゆる老化細胞様の形質を示した。この細胞においては、極めて強い老化レポーターの発現が観察された。このことから、ウェルナー症候群由来iPS細胞と、p16INK4Aレポーターの組み合わせにより、比較的短期間に老化の形質を呈する細胞を生きたまま入手可能であること、さらにDoxorubicinへの暴露により、老化形質細胞の出現を加速できることが示唆された。今後、老化レポーターを有するウェルナー症候群患者および正常人由来のiPS細胞から積層皮膚モデルを作成し、様々な抗老化候補物質の探索や効能確認に応用してゆく。

(引用文献)

1）Sci Rep. 2014 Jan 8; 4: 3594.
2）PLoS One. 2013 Oct 11; 8 (10) : e77673.
3）Stem Cell Res. 2011 Jan; 6 (1) : 83-9.
4）PLoS One. 2015 Aug 26; 10 (8) : e0136713.