



Title	皮膚細胞の三次元組織化技術と血管・リンパ管の再現
Author(s)	松崎, 典弥; 白方, 裕司; 平川, 聡史 他
Citation	バイオインダストリー. 2012, 29(1), p. 46-51
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/50607">https://hdl.handle.net/11094/50607</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 皮膚細胞の三次元組織化技術と血管・リンパ管の再現

Development of Human Skin Equivalents Containing Reconstructed Blood and Lymph Capillaries

松崎典弥<sup>\*1</sup> 白方裕司<sup>\*2</sup>

平川聡史<sup>\*3</sup> 橋本公二<sup>\*4</sup> 明石 満<sup>\*5</sup>

細胞積層法を用いることで、全く新しい皮膚モデルを構築した。真皮層の層数は播種細胞数により自在に制御できるだけでなく、従来のコラーゲンゲルとは異なる均一な構造とKCの完全被覆を実現できるため、TERなどの微小応用を評価することが可能であった。さらに、真皮層に毛細血管網やリンパ管網を導入した皮膚モデルを構築することができた。本手法を用いることで、様々な附属器を導入した次世代型皮膚モデルの実現が期待される。

### 1. はじめに

化粧品・化成品分野において、動物実験に代わる皮膚モデルの開発と評価試験法の確立が求められている。特に、EUでは、2003年に化粧品指令7次改正が公布され、2013年の延長期間終了までに動物実験代替法の開発が急務となっている。2007年に、EPISKINなどの培養表皮モデルを用いた*in vitro*皮膚刺激性試験が欧州代替法評価センター（ECVAM）にて承認されたが、適用範囲が極めて限定的であり、強刺激試験での細胞生存率しか評価できないのが現状である。この原因の一つとして、現状の表皮モデル・皮膚モデルは、寿命が短く、構造が不均一（再現性に乏しい）であり、抵抗値や水分量、物質透過性などの微小な

応答を評価できない点が挙げられる。また、血管、リンパ管、毛髪、色素細胞、免疫細胞など「附属器を有する皮膚モデル」が構築できれば、アレルギー、発毛、美白試験など、より詳細な評価試験の確立が期待される。

筆者らは、最近、細胞積層法を応用した新しい皮膚モデルを構築した。細胞積層法とは、細胞接着タンパク質であるフィブロネクチン（FN）とゼラチン（G）の厚さ約10 nmのナノ薄膜（FN-G薄膜）を細胞表面に作製して擬似的な細胞外マトリックス（ECM）層を細胞表面に形成することで細胞間接着を誘起し、望みの細胞を望みの場所に配置した三次元積層組織を構築する手法である<sup>1)</sup>。これまで、積層化による生体類似の細胞機能の発現<sup>2)</sup>や、血管モデルの構築と一酸化窒素の

<sup>\*1</sup>Michiya Matsusaki 大阪大学 大学院工学研究科 応用化学専攻 助教；科学技術振興機構 さきがけ

<sup>\*2</sup>Yuji Shirakata 愛媛大学 大学院医学系研究科 感覚皮膚医学

<sup>\*3</sup>Satoshi Hirakawa 愛媛大学 大学院医学系研究科 感覚皮膚医学

<sup>\*4</sup>Koji Hashimoto 愛媛大学 大学院医学系研究科 感覚皮膚医学

<sup>\*5</sup>Mitsuru Akashi 大阪大学 大学院工学研究科 応用化学専攻

三次元拡散試験への応用<sup>3,4)</sup>などを報告している。また、最近、本手法の改良により1日で10~20層の積層構造を作製できることや、毛細血管網様のネットワークを導入した三次元積層組織の構築が可能であることを見出した<sup>5)</sup>。本細胞積層法を用いることで、経上皮電気抵抗(TER)が評価できる均一な真皮層構造を有する皮膚モデルが作製可能であり、TER値が真皮層の厚さに依存して変化することを見出した。さらに、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(EC)やヒト皮膚微小リンパ管内皮細胞(LEC)を真皮層に導入することで、毛細管状の血管とリンパ管を同時に有する皮膚モデルの構築にも成功した。本手法は、附属器を有する次世代型皮膚モデルの開発と評価試験法の確立を可能とする革新的手法として期待される。

## 2. 細胞積層法による皮膚モデルの構築

皮膚の構造は大きく分けて表皮層と真皮層に大別され、人工皮膚モデルの研究開発も表皮層のみの「表皮モデル」と表皮層+真皮層の「皮膚モデル」の2種類に分けることができる。一般的に、

皮膚モデルの真皮層として線維芽細胞を含むI型コラーゲンゲルが用いられてきたが<sup>6)</sup>、ゲルの収縮による構造の不均一性、ケラチノサイト(KC)の低い接着性と低分化誘導効率、不均質構造のためTER測定ができない、移植時の縫合処置に対する脆弱性、生体組織への接着性が低い、などの課題があった。また、組織学的観察による構造は類似しているように見えるが、力学特性、物質透過性、コラーゲン線維の構造など、実際の生体皮膚の真皮層とは全く異なることが報告されている。

筆者らはこれまで、ゲル表面を羊膜で被覆する手法を考案し、KCの高い分化誘導、より広範囲の均質性、移植後の高い血管網導入効果を報告してきた<sup>7)</sup>。この手法は、より生体皮膚の状態に近いKC層を得ることができるため有効であるが、根本的な解決には至らなかった。そこで、これらの課題を解決するためには真皮層にコラーゲンゲル以外の物質を使用する必要があると考え、細胞積層法で作製した線維芽細胞の積層組織を真皮層として使用する手法を考案した(図1)。本手法を用いることで、約10~20層(40~100 $\mu$ m)の均

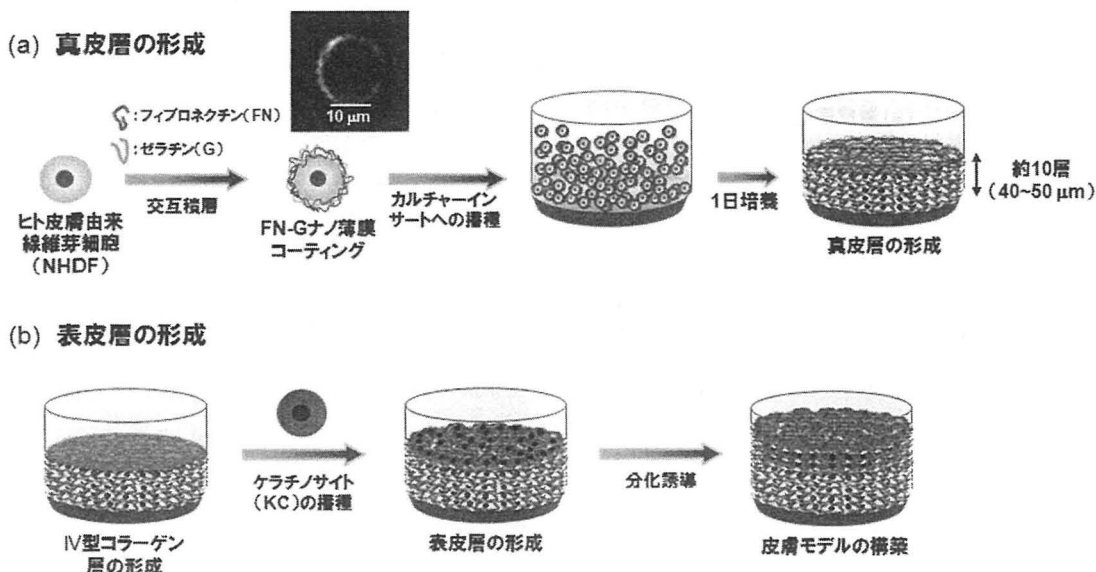


図1 細胞積層法による皮膚モデル構築のイメージ

(a)の挿入写真は、ローダミンラベル化FNとFITCラベル化Gを用いてNHDF表面に作製した薄膜の共焦点レーザー顕微鏡の観察結果である。

質な構造かつ平滑な表面を有する真皮層を1日で作製できるため、その表面にKC層を形成してリフトアップによる分化誘導を行うことで、ゲルよりも短期間で均一な皮膚モデルの構築が期待される。

写真1は、セルカルチャーインサート上に作製した(a)KCのみの表皮層、(b)10層のヒト皮膚由来

正常線維芽細胞 (NHDF) の真皮層とその上に形成した表皮層で構成される皮膚モデルの分化誘導における経時的な組織学的観察結果を示した。NHDFの積層組織を真皮層に用いることで、インサート全域において平滑かつ均質な表面および内部構造の皮膚モデルが得られた。KCに着目すると、表皮層のみの場合は分化誘導4日後には既

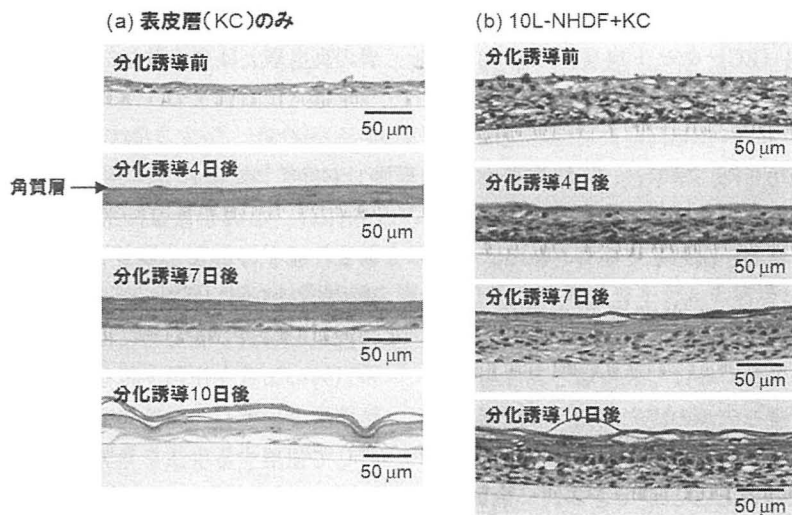


写真1 表皮層 (KC) のみ(a)および10層のNHDF真皮層と表皮層で構成された皮膚モデル(b)の分化誘導10日後までのヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色写真

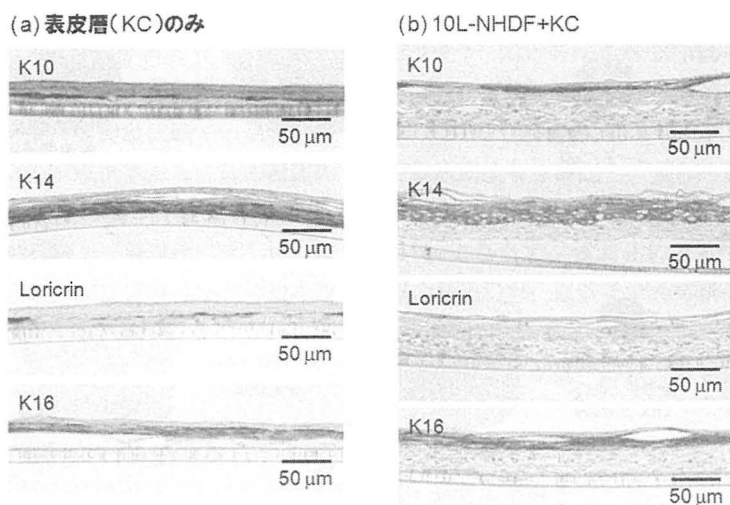


写真2 分化誘導10日後におけるKCのみ(a)および10L-NHDF+KC(b)のケラチン10(K10), K14, Loricrin, K16での免疫染色写真

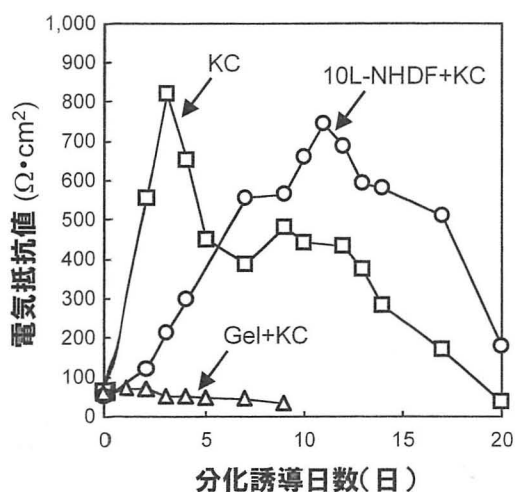


図2 KC および 10L-NHDF+KC, コラーゲンを真皮層に用いた従来型の皮膚モデル (Gel+KC) の分化誘導日数と電気抵抗値 (TER) の関係

に角質層の形成が認められたが、本皮膚モデルにおいては角質層の形成はおおよそ7日後から観察された。また、本真皮層上においてKCが良好に分化誘導することが確認された。KCの分化誘導をより詳細に検討するため、分化誘導10日後に免疫染色を行った(写真2)。顆粒層・有棘層に発現されるケラチン10(K10)陽性の細胞層がKCの上部で観察され、顆粒層に発現するLoricrinに対しては弱陽性であった。基底層で発現されるK14に陽性の細胞層がKCの下部で確認された。増殖期のKCに発現するK16は通常のヒト皮膚では陰性であるが、表皮層のみおよび本皮膚モデルの両方において顆粒層・有棘層付近で陽性であった。以上の結果より、本皮膚モデルにおいてKCは良好に分化誘導し、角質層・顆粒層・有棘層・基底層を形成していることが明らかとなった。

本皮膚モデルの特徴の一つである電気抵抗値を経時的に評価した(図2)。これまで、表皮モデルにおけるTERは報告例があるが、真皮層にコラーゲンをを用いた場合はゲルの収縮により空隙ができるためTERを測定することができなかった。従って、皮膚モデルの分化誘導時間におけるTERの変化は、これまでほとんど報告例がない。一方、本皮膚モデルは均一な真皮層構造により表面が

KCで完全に被覆されるため、TER値を測定することが可能である。一般的に、KCの分化誘導が進行するとTER値が上昇し、角質層が形成されて脱核が進むとTER値が減少することが知られている。表皮層のみの場合、分化誘導3日後で急激に最大値となり、その後は緩やかな減少を示した。これは、組織切片観察の結果と一致している。本皮膚モデルにおいてはTER値は徐々に増加を示し、分化誘導12日後においてTERは最大値に到達した後に緩やかに減少する傾向となった。表皮層のみの場合と比較した最大値への到達が遅延する理由は不明であるが、筆者らの以前の報告で真皮層の層数が2層で6日、4層で7日、8層で9日と、真皮層の層数の増加に伴い最大値が遅延する傾向が得られており<sup>8)</sup>、生体皮膚の分化誘導日数に近づいていると推察される。これまでこのような現象は報告例がなく、均一かつ安定な構造の皮膚モデルを作製できる本手法により初めて見出された結果であると考えられる。

### 3. 血管およびリンパ管を有する皮膚モデルの構築

これまで、真皮層のコラーゲンゲル内に線維芽細胞と血管内皮細胞(EC)を共存させることで、毛細血管網を真皮層に有する皮膚モデルの*in vitro*構築が報告されている<sup>9)</sup>。しかし、前述のようにコラーゲンゲルの真皮層には課題があり、また、毛細血管網を均一かつ全体に構築することは困難であった。

筆者らは、最近、4層のNHDF層でECをサンドイッチ培養することで、VEGFなどのサイトカインを用いずに直径1cmのインサート全面に毛細血管様のネットワークが形成されることを見出した<sup>5)</sup>。ネットワークが占める面積はおおよそ60%であり、血管網間距離は50~150μmであった。細胞シート法においてECをサンドイッチ培養することでチューブ形成が起こることが報告されており<sup>10)</sup>、本研究においても同様の現象が見出されたと考えられる。そこで、本手法を皮膚モデルに応用することで、付属器として真皮層に血管

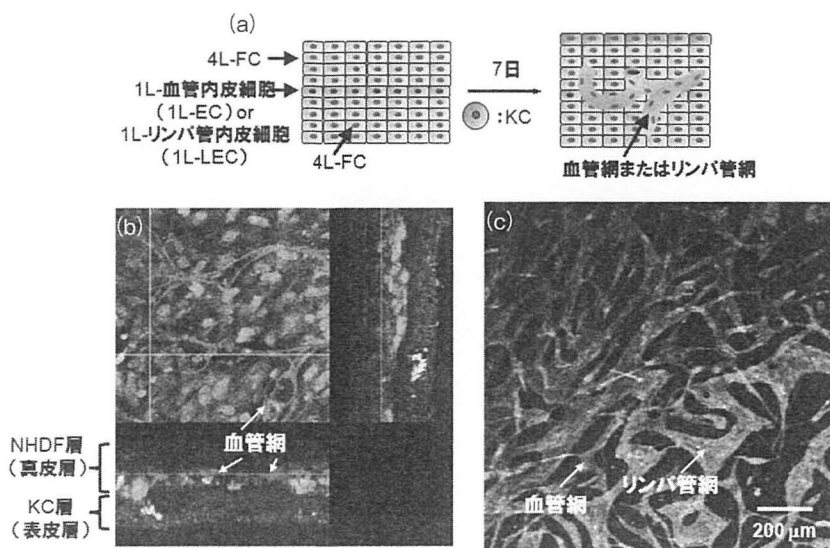


図3 真皮層での血管内皮細胞(EC)とリンパ管内皮細胞(LEC)のサンドイッチ培養による毛細管構築のイメージ(a), 真皮層に毛細血管様のネットワークを構築した皮膚モデルのCLSM写真(b), ECとLECの混合サンドイッチ培養で作製した毛細血管およびリンパ管様のネットワークのCLSM写真(c)

網を有する皮膚モデルの構築が期待される。

4層のNHDF層でECを挟み込んだ9層の真皮層を構築し、最表面にKCを播種して1週間分化誘導を行った(図3a)。NHDFとKCをセルトラッカーグリーンとセルトラッカーブルーで蛍光染色し、ECを抗CD31抗体で蛍光免疫染色したサンプルを共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)で観察した(図3b)。その結果、管腔構造を有するECチューブが全面に形成されていることが確認された。また、本手法はヒト皮膚微小リンパ管内皮細胞(LEC)に対しても同様のチューブ形成効果があることを見出した。そこで、ECとLECを共存してサンドイッチ培養することで、血管網とリンパ管網の両方を有する皮膚モデルの構築を検討した。ECを抗CD31抗体で緑に染色し、LECを抗ヒアルロン酸レセプター1(LYVE-1)抗体で赤に蛍光染色した時のCLSM観察結果を図3cに示した。LECはCD31にも陽性であるため、赤と黄色が混在した染色像を示しており、ECの血管網とは独立してネットワークを形成していることが明らかとなった。興味深いことに、リンパ

管網が毛細血管網と並走してネットワークを形成している様子が観察され、生体内の毛細血管網とリンパ管網の関係を*in vitro*で再現できている可能性が示唆された。現在、これらの毛細血管網およびリンパ管網の機能を詳細に検討中である。

#### 4. おわりに

細胞積層法を用いることで、全く新しい皮膚モデルを構築することができた。真皮層の層数は播種細胞数により自在に制御できるだけでなく、従来のコラーゲンゲルとは異なる均一な構造とKCの完全被覆を実現できるため、TERなどの微小応用を評価することが可能である。さらに、真皮層に毛細血管網やリンパ管網を導入した「付属器を有する皮膚モデル」を構築することができた。また、本手法を用いることで、血管やリンパ管以外の機能細胞を導入することも可能であり、様々な付属器を導入した次世代型皮膚モデルの実現が期待される。

〔謝辞〕本研究の一部は、JST-さがけ事業ならびに最

先端・次世代研究開発支援プログラム (LR026) により実施された。

## 文 献

- 1) M. Matsusaki *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 4689 (2007)
- 2) K. Kačowaki *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **402**, 153 (2010)
- 3) M. Matsusaki *et al.*, *J. Biomater. Sci. Polymer Ed.* (2011), DOI:10.1163/092050610X541953
- 4) M. Matsusaki *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 7557 (2011)
- 5) A. Nishiguchi *et al.*, *Adv. Mater.*, **23**, 3506 (2011)
- 6) E. Bell *et al.*, *Science*, **211**, 1052 (1981)
- 7) L. Yang *et al.*, *Cell Tissue Res.*, **326**, 69 (2006)
- 8) 松崎典弥ほか, *FRAGRANCE JOURNAL*, **39** (8), 55 (2011)
- 9) A. F. Black *et al.*, *FASEB J.*, **12**, 1331 (1998)
- 10) T. Sasagawa *et al.*, *Biomaterials*, **31**, 1646 (2010)

