

Title	Studies on Construction and Functional Evaluation of 3D-Skin Equivalents with the Dermis Constructed by in vitro Cell Manipulation
Author(s)	村上, 将登
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/88175
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏 名 (村上 将登)

論文題名

Studies on Construction and Functional Evaluation of 3D-Skin Equivalents with the Dermis Constructed by *in vitro* Cell Manipulation
 (生体外細胞操作で構築した真皮を有する3次元皮膚モデルの構築と機能に関する研究)

論文内容の要旨

Skin, consisting of the epidermis and dermis, is a barrier to protect human body from various stimuli. The stratum corneum and epidermal tight junctions (TJs) in the stratum granulosum are responsible for the skin barrier function. Dysfunction of these barrier causes serious damage to the homeostasis. Therefore, when skin is lost due to wounds or burns, transplantation with skin equivalents is necessary. In pharmaceutical and cosmetic development, it is also essential to evaluate the skin irritation of compounds using skin equivalents. However, skin equivalents have limitations in application to those fields because they have an immature epidermis and weak barrier compared to native human skin. Some reports clearly suggest that dermal models with fibroblasts contribute to epidermal maturation. On the other hand, it is unclear that dermis contribute to improve epidermal barrier function. In this thesis, I tried to reveal the effect of dermal models on epidermal barrier in order to construct skin equivalents with a higher barrier function *in vitro*.

For investigation of the effect, I adopted a unique skin equivalent consisting of epidermis and dermis constructed by layer-by-layer (LbL) method (LbL-3D Skin). This is because its dermis consisting of dermal fibroblasts only was easy to construct and control structure. Whereas, its epidermis formed an abnormal structure with no barrier function like dermatitis. Hence, LbL-3D Skin could not be used to evaluate the contribution of the dermis to the epidermal barrier. At first, I tried to establish a reproducible method to construct LbL-3D Skin with a barrier function. In native human skin, the position of proliferating keratinocytes (KCs) is extremely restricted in basal layer of the epidermis. Whereas, proliferating KCs extended above area of basal layer in LbL-3D Skin. In novel construction method, proliferating KCs were restricted in basal layer by controlling the number of seeded KCs on the dermal model. This improvement allowed for the reproducible construction of LbL-3D Skin which has a human-like epidermis with barrier function.

Next, I focused on epidermal TJs because this structure is an essential barrier and regulator for other barrier functions such as the stratum corneum. Although TJs should play an essential role in skin equivalents, the effect of dermal models on epidermal TJ formation and function was unknown. First, I clarified TJs of LbL-3D Skin in terms of expression of TJ-related proteins and dense cell-cell adhesion structure. These results showed that LbL-3D Skin has epidermal TJs consisting of TJ-related proteins such as claudin-1 and ZO-1 closely to human skin. Second, I compared TJs of the epidermal model and LbL-3D Skin to investigate the effect of the dermal model on the epidermal TJs. In the epidermal model, TJs did not function as a permeability barrier, despite the expression of TJ-related proteins. LbL-3D Skin with thick dermis has functional TJs as a barrier for a long time. These results showed that dermal models contribute to the formation and maintenance of functional TJs as in native human skin.

This thesis shows that the dermal model regulates epidermal barrier function through the formation and maintenance of functional TJs in skin equivalents. It is also the first to reveal the involvement of the dermis in the formation and maintenance of functional epidermal TJs. Thus, these results suggested the necessity of dermal models in the construction of skin equivalents with a higher barrier function. This study is an important piece of research on skin equivalent that contributes greatly to a wide range of applied research such as in regenerative medicine and pharmaceutical and cosmetic discovery as well as basic research on the elucidation of skin barrier function.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (村上 将登)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	八木 健
	副 査	教授	山本 亘彦
	副 査	教授	平岡 泰
	副 査	教授	岡村 康司

論文審査の結果の要旨

表皮と真皮からなる皮膚は、さまざまな刺激から人体を守るためのバリアである。皮膚のバリア機能は、表皮の角質層と顆粒層のタイトジャンクション (TJ) が担っている。これらのバリアが機能不全に陥ると、生命維持に重大な障害が生じる。生体外で皮膚のモデルを構築し、医療や創薬への応用に向けた取り組みが進んでいる。しかし、皮膚モデルは表皮が未熟であり、バリアも弱いため、これらの分野への応用には制限がある。本論文では、線維芽細胞から成る真皮を構築し、真皮と表皮のTJとの相関を明らかにすることで、より生体に近いバリアをもつ皮膚モデルの構築に取り組んでいる。

筆者は初めに表皮と真皮から成る皮膚モデルの構築に向けLayer-by-Layer (LbL) 法により構築した表皮と真皮からなるユニークな皮膚モデル (LbL-3D Skin) に着目した。しかしながら、本モデルは生体と異なる表皮構造を形成する課題があった。この課題に対し筆者は表皮を形成する細胞 (NHEK) の増殖位置に着目し、それを制御することで、再現性の高い生体類似構造と機能をもつ表皮の構築に成功した。筆者が考案した手法は生体外での生体類似構造の構築に重要な知見を与える。

さらに、筆者は表皮モデルとLbL-3D SkinのTJおよびバリア機能を比較することで、真皮と表皮TJの相関の解明を試みた。その結果、真皮をもつLbL-3D Skinにおいて、TJ形成に必須なタンパク質の発現とTJによる物質透過抑制機能の向上が確認された。また、バリア機能の指標となる経上皮電気抵抗 (TEER) の測定の結果より、表皮モデルではTJ機能の低下以降、TEERが急激に低下した。一方で、LbL-3D SkinではTEER値の向上と維持が確認された。以上の結果より、生体外において、真皮の付加により、表皮TJの機能向上を介し、表皮全体のバリア機能の向上に寄与することが示唆された。

以上の結果は、より高いバリア機能を持つ皮膚モデルの構築における真皮の必要性を示唆するものであった。本論文は、生体外での皮膚バリア機能の解明といった基礎研究だけでなく、再生医療や医薬・化粧品開発などの幅広い応用研究にも大きく貢献する重要な成果である。よって、博士号取得に値するものであると考える。