

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01303

研究課題名(和文) in vitro 附属器原基を用いた毛嚢等を有するリアル培養皮膚組織の開発

研究課題名(英文) Skin tissue bud formation by in vitro self-organization approach

研究代表者

片岡 健 (Kataoka, Ken)

岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号：10293317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：胎児マウス皮膚より調製した表皮細胞・真皮細胞にヒト血管内皮細胞・間葉系幹細胞をマトリゲル上で混合培養したところ、培養24時間で細胞は凝集してまとまり始め、72時間で球状のスフェロイドを形成した。このスフェロイドを染色して観察したところ、皮膚組織様の層状構造を形成していた。免疫染色をしたところ、スフェロイドの外側には表皮細胞が存在し、内側には血管内皮細胞が存在することが明らかになった。さらに形成したこの組織原基(スフェロイド)をヌードマウス皮膚へ移植したところ、数は少ないが移植部分の毛嚢形成が観察された。

研究成果の概要(英文)：Human mesenchymal stem cells, human endothelial cells, mouse skin dermal cells and epidermal cells were cultured with/without mouse macrophages on Matrigel-coated culture plates in vitro. Inoculated cells were aggregated and formed spheroids with layers. When the spheroids were transplanted on the back of immune-deficient mice, very few fair follicles were observed at the transplantation site.

研究分野：再生医学

キーワード：附属器原基 培養皮膚

1. 研究開始当初の背景

皮膚は体の表面を覆う最大の臓器であり、また組織細胞の治療応用が最も進んだ臓器でもある。事故や熱傷による皮膚組織の欠損に対して、患者自身の皮膚や同種・異種の培養皮膚が実際の医療現場で利用されている。しかし実際に用いられている移植用の培養皮膚は表皮細胞(ケラチノサイト)と真皮細胞(線維芽細胞)による多層シートで構成され、被覆・防護機能は果たせるものの正常組織構築とは大きく異なる形態をとり、毛嚢や皮脂腺等の皮膚付属器を欠いている。例えば熱傷後に再生した皮膚には毛が生えていないだけでなく汗をかくことができないため、広範囲の熱傷を受けた場合は将来に渡って体温調節が困難になる。このように創傷より治癒した皮膚が付属器を欠くことは生理的および美容的に大きな問題であり、毛嚢・皮脂腺・汗腺を有する正常により近いリアルな皮膚組織の供給が望まれている。

これまでの研究で我々はマウス胎児皮膚より単一細胞として調整した表皮細胞と真皮細胞をヌードマウス背部皮膚にシリコンチャンバーを用いて移植すると、3週間で毛嚢等付属器を有する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(文献1)。しかしこのような皮膚組織の完全な再形成は、培養環境(*in vitro*)では残念ながら再現することができない。その原因として、皮膚付属器もとなる幹細胞とその微小環境であるニッチを構成する細胞からなる最小単位(幹細胞ユニット)が培養環境では維持されずに失われてしまうことが考えられる。

2. 研究の目的

この知見を基盤に我々は、培養内でより生体に近い3次元皮膚組織を作製する研究を進めている。研究課題では *in vitro* で付属器原基を作製し、さらにその原基を利用して毛嚢等を有するリアルな皮膚組織を形成させる方法を開発する。

3. 研究方法

近年、横浜市立大学 武部 貴則准教授らはマウスに移植すると機能する肝臓組織を形成できる肝臓原基の作成に成功した(文献2)。これは複数種の細胞が3次元構造を形成しながら分化できる環境を保證することで、発生初期のプロセスを培養内で再現して臓器(組織)を形成させる方法である。

この方法を応用して我々はマウス胎仔皮膚より調製した表皮細胞、真皮細胞に血

管内皮細胞と間葉系幹細胞を加えてマトリゲル上で混合培養した。

さらにこのスフェロイドが皮膚原基として皮膚組織の形成に寄与するかどうかについて検討するため、細胞塊をヌードマウス皮下に移植し組織形成能を検討した。

4. 研究成果

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、真皮細胞を血管内皮細胞、間葉系幹細胞と混合してマトリゲル上で培養したところ培養開始から数時間で自己凝集しはじめ、3日間で組織原基と考えられる細胞塊が形成された。このスフェロイドを染色して観察したところ、皮膚組織様の層状構造を形成していた。免疫染色を行って確認したところ、スフェロイドの外層にはケラチン陽性の表皮細胞が、内部にはCD31陽性の血管内皮細胞が存在していることが確認された。

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の毛嚢形成が観察された。これらの結果からこの細胞塊は培養内で作成された人工的な付属器原基と考えられる。

今後は付属器を有する完全な人工皮膚を作製するための必要条件と再生医療応用への課題を明らかにしたい。

(参考文献)

- 1) Kataoka K. et al. : Participation of adult mouse bone marrow cells in reconstitution on skin. *Am J Pathol* 163: 1227-1231, 2003
- 2) Takebe T. et al. : Vascularized and functional human liver from a iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 499: 481-484, 2013

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計10件)

Kataoka K, Maehara N, Ayabe Y, Murata H, Huh NH, Sakaguchi M. Tumor necrosis factor- downregulates the REIC/Dkk-3 tumor suppressor gene in normal human skin keratinocytes. *Mol Med Rep.* 2018; 17(5):6661-6666. doi: 10.3892/mmr.2018.8676.

Kageyama T, Yoshimura C, Myasnikova D, Kataoka K, Nittami T, Maruo S, Fukuda J. Spontaneous hair follicle germ (HFG) formation *in vitro*, enabling the

large-scale production of HFGs for regenerative medicine. *Biomaterials*. 2018 ; 154:291-300. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.10.056.

Putranto EW, Kinoshita R, Watanabe M, Sadahira T, Murata H, Yamamoto KI, Futami J, Kataoka K, Inoue Y, Winarsa Ruma IM, Sumardika IW, Youyi C, Kubo M, Sakaguchi Y, Saito K, Nasu Y, Kumon H, Huh NH, Sakaguchi M. Expression of tumor suppressor REIC/Dkk-3 by a newly improved adenovirus vector with insertion of a hTERT promoter at the 3'-side of the transgene. *Oncol Lett*. 2017; 14(1):1041-1048. doi: 10.3892/ol.2017.6201.

諫田泰成、中村和昭、山崎大樹、片岡健、青井貴之、中川誠人、藤井万紀子、阿久津英憲、末盛博文、浅香勲、中村幸夫、小島肇、関野祐子、古江 - 楠田美保：「細胞培養における基本原則」の提案．組織培養研究 36: 13-19, 2017

片岡健：本当に知ってる？正しい細胞培養の手法（その12）．*PHARM TECH JAPAN* Vol.32 No.9, 57-58, 2016

Kataoka K, Rikitake Y, Ayabe Y. Expression pattern of Dkk-3, a secreted Wnt pathway inhibitor, in mouse intestinal tissue and three-dimensional cultured Caco-2 spheroids. *J Stem Cells Regen Med*. 2015; 11(2): 48-50.

Murata H, Takamatsu H, Liu S, Kataoka K, Huh NH, Sakaguchi M. NRF2 Regulates PINK1 Expression under Oxidative Stress Conditions. *PLoS One*. 2015; 10(11):e0142438. doi: 10.1371/journal.pone.0142438.

片岡健：細胞培養における基礎知識と注意点．*日本臨床エンブリオロジスト学会雑誌* Vol.17, 1-4, 2015

[学会発表](計8件)

片岡健：3次元皮膚組織の作製と再生医療への課題．第5回細胞凝集研究会、2017年11月、倉敷

清住哲也、多田真由美、辻極秀次、片岡健：ニワトリ胎仔より調製した表皮シート・真皮細胞の3次元培養による in vitro 羽毛芽の形成．*日本組織培養学会第90回大会*、2017年6-7月、岡山

片岡健、力武祐治、辻極秀次、：3次元混

合培養による in vitro 皮膚組織原基の作製．第16回日本再生医療学会総会、2017年3月、仙台

Ken Kataoka, Yuji Rikitake, Hidetsugu Tsujigiwa: 3D culture of mouse skin cells by in vitro self-organization approach. The 27th CDB meeting "Body surface tactics". 2016.11. Kobe

力武祐治、鶴田太輝、綾部雄基、辻極秀次、片岡健：皮膚組織原基の培養内作製とその移植．*日本組織培養学会第89回大会ワークショップ*、2016年5月、大阪

Yuki Ayabe, Taiki Tsuruda, Masakiyo Sakaguchi, Ken Kataoka: Potential role of tumor suppressor gene REIC/Dkk-3 as a regulator of skin tissue inflammation. 2015 ASCB Annual Meeting. 2015.11. San Diego

綾部雄基、鶴田太輝、阪口政清、片岡健：TNF- α による REIC/Dkk-3 の発現制御とケラチノサイトの挙動への影響．*日本組織培養学会第88回大会*、2015年5月、広島

鶴田太輝、綾部雄基、辻極秀次、片岡健：in vitro 自己組織化による皮膚組織原基の形成．*日本組織培養学会第88回大会*、2015年5月、広島

[図書](計1件)

片岡健他(全24名) 組織工学ライブラリ 3次元細胞システム設計論(新井健生編) コロナ社、全228ページ(担当50-56) 2016

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

岡山理科大学理学部臨床生命科学科

片岡研究室 HP

<http://www.dls.ous.ac.jp/staff2/kataoka/saito3/TOP.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

片岡 健 (KATAOKA KEN)

岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号：10293317

(2)研究分担者

辻極 秀次 (TSUJIGIWA HIDEETSUGU)

岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号：40431762