

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月5日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H01851

研究課題名(和文)皮膚附属器を有する革新的三次元皮膚評価モデル、バイオスキンの開発

研究課題名(英文) Development of bio-skin, an innovative three-dimensional skin evaluation model with skin appendages

研究代表者

辻 孝(Tsuji, Takashi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：50339131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,560,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、生体の皮膚と同様の組織構造と機能を有する三次元再生皮膚器官系の開発を目的とし、1) 生体外において成熟毛包を形成する技術を確認し、機能的なヒト皮膚三次元組織に組み込むことにより皮膚器官系(バイオスキン)の生体外構築に成功した。2) 1)で構築したバイオスキンは毛幹伸長維持および皮脂が検出され、天然皮膚器官系に近い機能を有する生体外評価モデルとしての有用性を実証した。3) 生体外評価モデルとしての機能評価を行い、構築したバイオスキンが天然皮膚により近い生理機能を再現していることを実証した。以上の成果より、臨床応用化に向けた基盤技術と、幅広い器官再生医療の応用可能性を実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題における成果により、これまで克服できなかった組織からの器官再生、さらに皮膚附属器である毛包を有する三次元人工皮膚器官系の再生が達成可能であることを示した。さらに、三次元人工皮膚器官系を用いた評価モデル系は、動物実験が規制されている医薬・ヘルスケア分野の企業にとって科学的エビデンスに基づく製品開発に向けて先駆的な評価系であり、企業のニーズに応じた様々な評価系をカスタマイズして提供することができる。さらに再生医療として皮膚器官系再生医療として産業化への道が拓けることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this project, we aimed to develop a bioengineered three-dimensional integumentary organ system, which mimics tissue structure and function of the natural skin. 1) We established a technology to regenerate mature hair follicles in vitro and succeeded in constructing a skin organ system (bio-skin) in vitro by assembling the mature hair follicles into functional three-dimensional human skin. 2) The bio-skin constructed in 1) was able to maintain hair growth and sebum secretion, demonstrating its usefulness as an in vitro evaluation model, which have the similar function as a natural skin organ system. 3) We further evaluated the function as an in vitro evaluation model and demonstrated that the constructed bio-skin reproduces the physiological function of natural skin. These results indicated that we have demonstrated the basic technology for clinical application and the applicability of a wide range of organ regenerative medicine.

研究分野：複合領域

キーワード：機能性三次元人工皮膚 三次元人工皮膚器官系 バイオスキン 毛包 器官再生医療 再生毛包 皮膚生理機能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

次世代を担う再生医療として、複数種の細胞を立体的に再構築した再生臓器・器官を、機能不全に陥った臓器・器官と置き換える「器官再生医療」が期待されている。これまで本研究グループは、三次元的な細胞操作技術である「器官原基法」を開発し、歯や毛包などの幅広い器官再生医療の実現可能性を実証してきた。これまでに組織再生により構築された再生皮膚は皮膚付属器が存在せず、皮膚としての十分な構造と機能を有していない。従って、器官再生医療の実現や、ヘルスケアサイエンス分野への応用に向けて、皮膚付属器を有する画期的三次元皮膚評価モデルとしてバイオスキンの開発を進めていくことが大いに期待される。

2. 研究の目的

本研究課題では、生体の皮膚と同等の皮膚付属器を有する構造とその機能を有する三次元ヒト再生皮膚器官系を構築する。

(1) 皮膚器官系バイオスキンの生体外構築に向けて、毛包上皮性幹細胞の増幅システムおよび生体外における成熟毛包の形成技術開発を進める。さらに皮膚三次元組織に、再生毛包原基、または成熟再生毛包を組み込み、バイオスキンを構築する。

(2) バイオスキンへの応用に向けた細胞シーズの開発に向けて、多能性幹細胞からの皮膚表皮細胞ならびに真皮細胞を誘導する技術開発を進める。

(3) 皮膚器官系の機能解析に向けて、構築した三次元皮膚器官系の組織構造ならびに細胞外マトリクスなどの分泌量を解析する。また、再生毛包原基からの毛包伸長と維持期間の解析、再生皮脂腺からの皮脂分泌量の定量化と皮脂分泌による皮膚バリア機能の向上を評価する。

(4) 生体外評価モデルとしての機能評価に向けて、皮膚刺激性試験および皮膚透過性試験を行う。また、皮膚付属器である毛包や表皮に対する新規機能評価系を確立する。

(5) 皮膚器官系による皮膚の再生に向けて、三次元皮膚器官系を免疫不全マウスへ移植し、従来の皮膚シートではなし得なかった皮膚付属器を有する再生皮膚器官系による機能的に完全な皮膚再生を目指す。

3. 研究の方法

(1) 皮膚器官系バイオスキンの生体外構築に向けて、皮膚器官系を構築するため、毛包上皮性幹細胞の増幅システムを開発すると共に、生体外で成熟した毛包を形成させる技術開発を進めた。また、ヒト表皮細胞、並びに真皮細胞を三次元的に構築し、ヒト皮膚三次元組織を構築した。さらに、皮膚三次元組織に、天然毛包、または成熟再生毛包を組み込み、毛包と皮脂腺を有する三次元皮膚器官系を構築した。

(2) バイオスキンへの応用に向けた細胞シーズの開発に向けて、iPS細胞から皮膚を構成する細胞の誘導方法の検討を行った。

(3) 皮膚器官系の機能評価に向けて、組織構造、並びに細胞外マトリクスなどの分泌量を解析した。また、天然毛群、成熟再生毛包の毛包伸長とその維持期間を解析した。さらに天然毛群、成熟再生毛包からの皮脂分泌量の定量化を行った。

(4) 三次元評価モデルとしての機能評価に向けて、皮膚刺激性試験および化合物の皮膚内への送達性を皮膚透過性試験により解析した。また、各種化合物、天然物により、表皮の肥厚や細胞外マトリクスの産生、毛幹の伸長を促進する機能評価系を確立した。

(5) 皮膚器官系による皮膚の再生に向けて、ヒト皮膚をマウス皮膚に移植する技術を参考に、三次元皮膚器官系の免疫不全マウスへの移植を行った。

4. 研究成果

(1) 皮膚器官系バイオスキンの生体外構築に向けて、生体マウスから毛包を採取し、毛包上皮性幹細胞を三次元培養することにより、毛包形成能を保持したまま増殖可能な培養条件を確立した(論文査読中)。一方、成熟毛包の生体外培養においては、毛の発生に重要なサイトカインと、間葉系細胞を組み合わせることにより、生体外の環境下において再生毛包器官原基を成長期 IV 期まで再生させることに世界に先駆けて成功した(図 1)。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

ヒト表皮角化細胞とヒト皮膚繊維芽細胞を用いて、ヒト皮膚に類似した4層の表皮層と2層の真皮層からなるヒト皮膚三次元組織を構築した(図2)。また一般的なヒト皮膚三次元組織は、真皮組織が収縮しているのに対し、天然皮膚は常に張力が付加されている状態である。そこで構築方法を検討し、組織の周囲を固定化することにより、天然皮膚と同様に張力方向への細胞外マトリクスの配向性を有するヒト皮膚三次元組織の開発に成功した(論文投稿準備中)。皮膚三次元組織への毛包の移植方法を開発し、移植した再生毛包の上皮と皮膚三次元組織の表皮が接続し、健全な毛包組織が維持されていたことから(図2)成体由来体性幹細胞を用いた生体外人工皮膚器官系(バイオスキン)の構築に成功した。

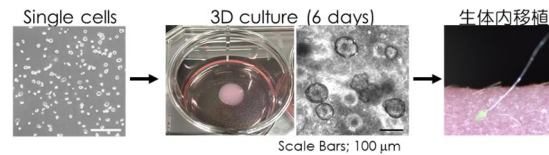
(2) バイオスキンへの応用に向けた細胞サイズの開発に向けて、項目(1)において生体からの安定的なヒト毛包幹細胞の増幅が可能となったことから、iPS細胞からの皮膚構成細胞の誘導検討は中止とした(平成29年度実績報告書にて報告済み)

(3) 皮膚器官系の機能評価に向けて、表皮組織の構造が天然皮膚組織と同等であり(図3)張力を付加したことにより細胞外マトリクスなどの分泌が促進していることを示した。また、皮膚三次元組織に移植した天然毛群、成熟再生毛包の毛幹伸長を解析したところ、3日間の毛幹伸長維持が可能であり、皮脂を検出した。これらの結果から、構築したバイオスキンの天然皮膚器官系により近い機能を有する生体外評価モデルとしての有用性を実証した。

(4) 三次元評価モデルとしての機能評価に向けて、SDSによる皮膚刺激性試験を実施したところ、安定した細胞生存率を示した。さらに、皮膚表面に塗布した蛍光物質の皮膚透過性試験の結果から、皮膚バリアが形成されていることが示された。また、各種化合物、天然物を経皮吸収または血中投与を想定して表皮または培地添加することにより、表皮の肥厚や細胞外マトリクスの産生促進、毛幹伸長促進/抑制を評価可能であったことから(図4)構築したバイオスキンが天然皮膚に近い生理機能を再現していることを実証した。

(5) 皮膚器官系による皮膚の再生に向けて、ヒト皮膚をマウス皮膚に移植する技術を参考に移植技術の確立を行い、三次元皮膚器官系が免疫不全マウスに移植可能であることを示した。しかしながら、皮膚の生着や血流の改善などいくつかの課題が明らかとなった。

●毛包上皮性幹細胞の培養



●再生毛包器官原基の生体外培養

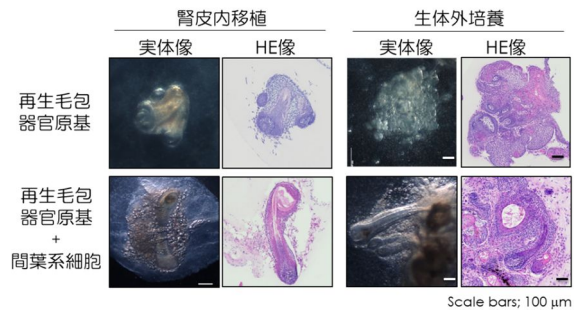
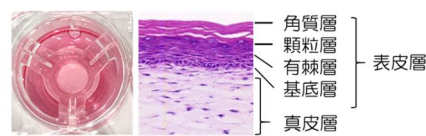


図1 毛包上皮性幹細胞と再生毛包器官原基の培養方法の確立

●ヒト皮膚三次元組織の構築



●毛包を移植したヒト皮膚三次元組織

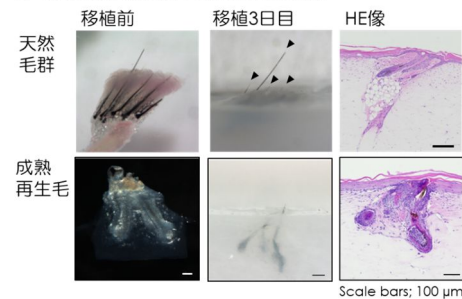


図2 生体外人工皮膚器官系の構築

●ヒト皮膚三次元組織の免疫染色による組織構造の解析

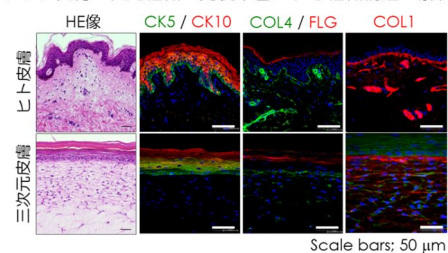


図3 生体外人工皮膚器官系の構造解析

●薬剤添加による真皮・及び真皮への影響解析

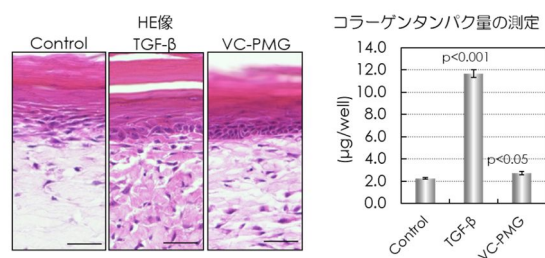


図4 生体外人工皮膚器官系の機能評価

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計21件)

木村駿、小野美姫、土屋綾子、須田菜央、関本佳織、豊島公栄、白崎舞、七里博章、手塚克成、小川美帆、辻 孝、人工皮膚モデルにおける張力負荷による皮膚リモデリング機構の解析、第18回日本再生医療学会総会、2019.03.23、兵庫・国際会議場

辻 孝、日本再興戦略としての健康医療産業創造を目指した基礎のイノベーションとその応用、第29回美容・アンチエイジング食品研究会、2018.06.28、大阪・大阪国際会議場

Takashi Tsuji, Functional 3d-organ regeneration as a future organ replacement therapy, The 13th International Conference on Tissue Engineering & Regenerative Medicine (Key note Forum), 2018.06.12, Paris (France)

手塚克成、土屋綾子、小川美帆、木村駿、豊島公栄、辻 孝、機能性評価に向けた次世代三次元皮膚モデルの開発とアンチエイジングへの応用、第18回抗加齢医学会総会、2018.05.25、大阪・大阪国際会議場

辻 孝、次世代再生医療としての器官再生医療と機能性ヘルスケアの産業化を目指して、2017年理研イブニングセミナー 講演、2017.12.06、兵庫・理化学研究所

辻 孝、次世代再生医療としての器官再生研究の戦略と展開、理研/iCONM/物材機構医工学ネットワーク、2017.12.12、神奈川・川崎市キングスカイフロント

辻 孝、次世代再生医療としての器官再生研究の戦略と展開、第464日本皮膚科学会大阪地方会における第24回小林浩記念講演、2017.12.02、大阪・大阪科学技術センター

手塚克成、小川美帆、土屋綾子、木村駿、豊島公栄、岡本尚一、辻 孝、新規機能性分子評価モデルとしての次世代人工皮膚モデル「Advanced Skin」の開発とその可能性、動物実験代替法学会第30回大会、2017.11.23、東京・大田区産業プラザ

辻 孝、再生医療の最前線、神戸市・先端医療復興財団・LINK-J、2017.10.18、東京・再生医療産業化フォーラム、日本橋ライフサイエンスハブ

辻 孝、次世代再生医療としての器官再生とiPS細胞の展開、一般社団法人生命科学文化推進機構 設立5周年記念講演(第5回健康文化フォーラム)、2017.09.03、愛知・キャッスルプラザ「孔雀の間」

辻 孝、上皮・間葉相互作用における器官再生の戦略と展開、日本本組織培養学会第90回大会(特別講演) 岡山理科大学創立50周年記念館、2017.6.30、岡山・岡山理科大 Takashi Tsuji, Functional ectodermal organ regeneration by bioengineered organ germs between epithelial and mesenchymal stem cells, CDB Symposium 2017, 2017.05.28, Kobe (Japan)

手塚克成、土屋綾子、木村駿、小川美帆、豊島公栄、岡本尚一、宇都宮永、奥山洋美、平峯靖、杉村泰宏、辻 孝、次世代人工皮膚モデル「Advanced Skin」の開発と機能性分子評価モデルとしての可能性、第17回再生医療学会総会、2017.3.21、横浜・パシフィコ横浜

辻 孝、上皮・間葉相互作用による器官再生の戦略と展開、第16回日本再生医療学会総会、2017.03.09、宮城・仙台国際センター

小川美帆、土屋綾子、須田菜央、木村駿、宇田純輝、井上敦、豊島公栄、辻 孝、新規機能評価モデルとしての第二世代人工皮膚モデルの開発、第16回日本再生医療学会総会、2017.03.09、宮城・仙台国際センター

辻 孝、新規機能性分子評価モデルとしての次世代人工皮膚モデルの開発、第7回化粧品開発展のアカデミックフォーラム、2017.01.24、東京・東京ビッグサイト

辻 孝、上皮・間葉相互作用による外胚葉性器官の再生、第21回分生研シンポジウム「発生再生のダイナミズムと細胞間相互作用」、2016.12.21、東京・東京大学 弥生講堂 一条ホール

辻 孝、次世代器官再生医療としての毛髪再生医療の実現に向けて、第21回臨床毛髪学会学術集会、2016.11.27、横浜・はまぎんホール

Takashi Tsuji, Functional Ectodermal Organ Regeneration by Bioengineered Organ Germs between Epithelial and Mesenchymal Stem Cells, EMBO | EMBL Symposia 2016 Organoids: Modelling Organ Development and Disease in 3D Culture, 2016.10.14, Heidelberg, (Germany)

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

辻 孝、次世代再生医療としての器官再生の新展開、第 25 回日本形成外科学会基礎学術集会 (特別講演)、2016.09.16、大阪・ナレッジキャピタル コングレ・コンベンションセンター

② 辻 孝、次世代器官再生医療とヘルスケアの産業化 (特別講演)、神戸医療産業都市クラスター交流会、2016.04.27、神戸・臨床研究情報センター

〔図書〕(計 7 件)

小川美帆、武尾真、岡本尚一、辻 孝、東京化学同人、現代化学：毛包を "種" から再生する未来の再生医療、2019、76 (pp26-29)

辻 孝、技術情報協会、皮膚の安全性・有用性評価法：マウス iPS 細胞を用いた皮膚器官系の再生、2018、332 (第 3 章 第 1 節)

辻 孝、克誠堂出版、毛髪 ガイドライン 2017 を踏まえた治療 update：e 毛包上皮性・間葉性幹細胞による毛包器官再生、2018、228 (第 2 章 pp143-154)

辻 孝、朝日新聞出版、やさしくわかる！毛髪医療最前線：「毛包再生」が開く世界初の器官再生医療実用化への道のり、2018、167 (第 2 章 pp98-107)

岡本尚一、手塚克成、小川美帆、豊島公栄、木村駿、土屋綾子、辻 孝、シーエムシー出版、バイオインダストリー Vol. 35：機能性評価に向けた次世代三次元人工皮膚モデルの開発、2018、72 (pp34-43)

杉村泰宏、辻 孝、バイオインダストリー協会、バイオサイエンスとインダストリー Vol. 75 No. 6：毛包再生が切り拓く器官再生医療、2017、508 (pp495-499)

浅川杏祐、辻 孝、北隆館、BIO Clinica Vol. 31(11)、頭部外胚葉性器官の再生、2016、46 (pp28-32)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)

名称：毛包、皮脂腺、および毛穴を有する人工皮膚の製造方法

発明者：辻 孝、豊島公栄、小川美帆

権利者：株式会社オーガンテクノロジーズ

種類：特許

番号：PCT/JP2017/022479

出願年月日：平成 29 年 6 月 19 日

国内外の別：国外

名称：皮膚附属器官を有する全層皮膚の製造方法

発明者：辻 孝、豊島公栄

権利者：株式会社オーガンテクノロジーズ

種類：特許

番号：PCT/JP2015/075287

出願年月日：平成 27 年 9 月 7 日

国内外の別：国外

名称：皮膚附属器官を有する全層皮膚の製造方法

発明者：辻 孝、豊島公栄

権利者：株式会社オーガンテクノロジーズ

種類：特許

番号：特願 2014 - 182611 号

出願年月日：平成 26 年 9 月 8 日

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕ホームページ等

<https://www.bdr.riken.jp/jp/research/labs/tsuji-t/index.html>

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：武田 啓
ローマ字氏名：TAKEDA, Akira
所属研究機関名：北里大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号(8桁)：20197297

研究分担者氏名：佐藤 明男
ローマ字氏名：SATO, Akio
所属研究機関名：北里大学
部局名：医学部
職名：客員教授
研究者番号(8桁)：80255356

研究分担者氏名：寺師 浩人
ローマ字氏名：TERASHI, Hiroto
所属研究機関名：神戸大学
部局名：医学部附属病院
職名：教授
研究者番号(8桁)：80217421

研究分担者氏名：榊原 俊介
ローマ字氏名：SAKAKIBARA, Shunsuke
所属研究機関名：神戸大学
部局名：医学研究科
職名：客員准教授
研究者番号(8桁)：50444592

研究分担者氏名：武尾 真
ローマ字氏名：TAKEO, Makoto
所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所
部局名：生命機能科学研究センター
職名：研究員
研究者番号(8桁)：50782116

研究分担者氏名：浅川 杏祐
ローマ字氏名：ASAKAWA, Kyosuke
所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所
部局名：多細胞システム形成研究センター
職名：研究員
研究者番号(8桁)：60747187

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。