

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293255

研究課題名(和文) 新規低侵襲パーソナル3次元表皮の応用 アトピー性皮膚炎新規遺伝子異常の探索

研究課題名(英文) Application for a new less-invasive, personalized 3-dimensional epidermal model:
Search for new responsible genes related to Atopic Dermatitis

研究代表者

松江 弘之(Matsue, Hiroyuki)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：10250424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：コマーシャルに販売されているヒト3次元表皮は、動物実験の代替法として使用が義務づけられてきている。しかし、問題点も多い。例えば、遺伝的背景が不明な点、個人差の評価ができない点などが挙げられる。我々は、個人の抜去毛由来の角化細胞から新規低侵襲パーソナル3次元表皮の作製法を開発した。それを用いて再現性を検証し、汎用性を確立した。これを用いてアトピー性皮膚炎の角化細胞の新規責任遺伝子を探索中である。

研究成果の概要(英文)：Commercially available 3D epidermal models reconstructed from human skin-derived keratinocytes have been used as an alternative to animal testing. However, a tailor-made system is needed to investigate the individual differences. For this, it is possible to make an individual 3D epidermis using keratinocytes obtained by skin biopsy. To overcome the drawback, we developed a new less-invasive method using keratinocytes derived from plucked hair follicles. The epidermal architecture was similar to that of normal human epidermis with the similar differentiation as in the skin-derived 3D epidermis. Gene expression profiles were also similar between the two. Therefore, our model was similar to the standard model in terms of morphology, genetic make-up and function. We are also investigating hair follicle-derived 3D epidermis between atopic dermatitis and normal controls in terms of gene expression profiles and gene mutations, which may provide a new responsible genes for the disease.

研究分野：皮膚科学

キーワード：ケラチノサイト 三次元表皮 アトピー性皮膚炎 責任遺伝子 毛包

1. 研究開始当初の背景

1990年、ヒト3次元表皮モデルが開発されて以来、改良され、研究目的のみならず化学物質の皮膚刺激試験などに、動物試験の代替として用いられている (*Toxicology in Vitro* 24:257, 2010)。現在、商業ベースで数社から販売されている。特に動物愛護の観点から、動物試験の代わりに化学物質の皮膚刺激性/腐食性試験、経皮吸収試験の代替法として、これらのヒト3次元表皮モデルの使用がEU諸国では義務づけられている。日本ではそのような厳しい規制がないが、今後、動物実験が厳しく規制されると考えられる。一方、販売されている3次元ヒト表皮にはいくつかの問題点がある。例えば、需要増大に伴う供給不足の懸念、販売目的でヒト表皮を得る倫理的問題、製品の感染症チェックのすり抜けや未知の感染症のリスク、日本人の表皮由来の製品がない点、遺伝的背景が不明の個人由来のため結果の普遍性に対する問題、人種差、個体差の評価ができない点などが挙げられる。一方、3次元ヒト表皮を研究目的で使用する利点は、角化細胞の分化・機能などの研究を分子レベルで解析できる点が挙げられる。例えば、最近の報告では、正常ヒト3次元表皮を用いて、Congenital Ichthyosisのモデルを *In vitro* で再現した (*J Invest Dermatol* 131:1938, 2011)。また、filaggrin を knockdown すると3次元表皮において顆粒層の減少や表皮透過性の亢進が報告されている (*J Invest Dermatol* 130:2286, 2010)。これはアトピー性皮膚炎の病態の一部を再現したといえる。3次元ヒト表皮を研究目的に用いる欠点として、遺伝的背景が不明な角化細胞を用いる点を挙げたが、特定の疾患や健常人の外部刺激の反応性など個体差の評価が最近注目されてきている。その際、従来の3次元表皮作製では、患者や健常人から皮膚生検をしなければならず、特に健常人の一次刺激性皮膚炎を惹起する物質や化粧品などの表皮に対する影響を検討するときには皮膚生検の承諾は得にくいことが予想される。このような欠点を補うために我々は抜毛という低侵襲の方法で得られる毛包由来角化細胞から3次元表皮モデルを作製に成功した。多くの点で皮膚由来の3次元表皮と同一であることを示し、特許を申請した。

2. 研究の目的

本申請研究ではこの3次元表皮を一人ひとり、個々に評価できるシステムを構築し、その応用を目指す。特にアトピー性皮膚炎のフィラグリン以外の角化細胞由来の新規疾患責

任遺伝子などを探索してその有用性を示す。まず、我々が開発した個人の抜毛由来3次元表皮モデルの作製法の再現性を検証し、汎用性があり、簡便な作製法の確立を目指す。研究開発当初の背景で述べた問題点の補完を目指すだけでなく、幅広い応用も目指す。特に我々が開発した3次元表皮を用いてアトピー性皮膚炎の角化細胞の新規責任遺伝子を探索することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究を行うにあたり、千葉大学医学部生命倫理委員会の承認を得ており、毛包(頭髮)や皮膚片の提供者から文書による同意を得た。皮膚片は、採皮片ないし皮膚悪性腫瘍切除検体の余った正常皮膚片を用いた。皮膚片からはトリプシン処理により表皮を分離し、角化細胞を回収した。

(1) 抜去毛包由来ないし皮膚由来の角化細胞から作製される3次元表皮の形態、分化パターンの比較

① 同一提供者からの抜去毛包由来ないし皮膚由来の角化細胞を平面培養後、トリプシン処理により回収した角化細胞を化学樹脂上で14日間3次元培養した。培養後、各々の3次元表皮を10%ホルマリン固定、パラフィン包埋し、HE染色標本で形態を比較検討した。

② さらに、各々の3次元表皮の分化パターンの比較検討のために、正常表皮において基底層に発現するケラチン5と14、有棘層に発現するケラチン1と10、顆粒層と角質層に発現するフィラグリンの発現についても免疫染色を行った。用いた抗体のcloneは、LHK1(ケラチン1)、XM26(ケラチン5)、DE-K10(ケラチン10)、LL002(ケラチン14)、SPM181(フィラグリン)である。

(2) 抜去毛包由来ないし皮膚由来の角化細胞の平面培養(2次元培養)や3次元培養表皮の遺伝子発現プロファイルのDNA microarrayによる解析

同一提供者からの抜去毛包由来ないし皮膚由来の角化細胞を平面培養(2次元培養)後、TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)によりtotal RNAを抽出した。一方、同一提供者からの抜去毛包由来ないし皮膚由来の角化細胞を平面培養後、トリプシン処理により回収した角化細胞を化学樹脂上で14日間培養し作製した3次元表皮からも同様にtotal RNAを抽出した。

Total RNAを増幅し、Agilent Low Input Quick Amp Labeling Kit, one-color (Agilent)を用いてCyanine 3 (Cy3)で標識した。Cy3標識cRNAをAgilent Human GE 4x44K Microarray (Design ID: 014850)にハイブリ

ダイゼーションさせ、Agilent DNA microarray scanner を用いて microarray をスキャンした。Agilent feature extraction software (ver. 10.7.3.1) を用いてスキャンした feature の Intensity values を定量化した。41000 個の遺伝子について、下記 4 パターンで遺伝子発現について比較検討した。

- ① 抜去毛包由来ないし皮膚由来の角化細胞の 2 次元培養の比較検討
- ② 抜去毛包由来ないし皮膚由来の角化細胞からの 3 次元培養表皮の比較検討
- ③ 皮膚由来の角化細胞の 2 次元培養と 3 次元培養表皮の比較検討
- ④ 抜去毛包由来の角化細胞の 2 次元培養と 3 次元培養表皮の比較検討

(3) *in vitro* 皮膚刺激試験を用いた、抜去毛包由来ないし皮膚由来の角化細胞から作製される 3 次元表皮の機能の比較検討

市販の 3 次元表皮モデルを用いた *in vitro* 皮膚刺激試験は新規化学物質の皮膚刺激性の評価法として OECD で承認され、動物実験の代替法として使用されている。本研究において、皮膚刺激試験の方法として、3 次元表皮モデルを 42 分間被験物質で刺激後、洗浄し、42 時間培養後に MTT assay で生細胞率を測定する 42bis protocol を用いた。*in vitro* Toxicology assay kit, MTT-based (SIGMA-ALDRICH) を用いて MTT assay を行った。

3 人の異なる提供者からの抜去毛包由来の角化細胞を化学樹脂上で 14 日間培養し作製した 3 次元表皮と、市販の 3 次元表皮の EPI-200 (MatTek corporation, MA, USA) に対して、42bis protocol を用いて既知の物質による皮膚刺激試験を行った (各々 n=3)。

被験物質は European Centre for Validation of Alternative Methods (ECVAM) Performance Standards に従って、陰性コントロールとして PBS、陽性コントロールとして 5% sodium dodecyl sulfate (SDS) (nacalai tesque, Kyoto, Japan)、非刺激物質として 2-propanol (Wako, Osaka, Japan) と dipropylene glycol (SIGMA-ALDRICH)、刺激物質として α -terpineol (Alfa Aesar, Lancashire, UK) と heptanal (Wako, Osaka, Japan) を選択した。

(4) 平面培養液と 3 次元培養液の変更に伴う、再現性、汎用性のある抜去毛包由来の角化細胞の平面培養 (2 次元培養) 方法や 3 次元表皮作製方法の確立

我々がこれまで使用していた販売会社の平面培養液と 3 次元培養液の販売中止、変更があり、これまで使用していた培養液を使用で

きなくなった。培養液の詳細な成分が未公開であった。

他社製品の培養液を含め数種の平面培養液を用いて、平面培養での抜去毛包由来角化細胞の増殖状態を比較検討した。

次に新しい 3 次元培養液を用いて、抜去毛包由来角化細胞から 3 次元表皮を作製する方法を検討した。

さらに、抜去毛包を処理する酵素やその処理時間についても比較検討した。

変更前の培養液ないし新しい培養液で作製された毛包由来 3 次元表皮の形態を比較検討した。

(5) パーソナル抜去毛包角化細胞由来の 3 次元表皮を用いた、アトピー性皮膚炎の病因に關与する角化細胞由来新規原因遺伝子の探索

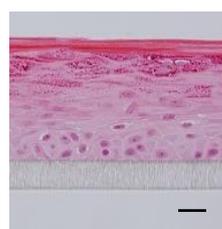
アトピー性皮膚炎患者 (11 例) と健常人 (8 例) の抜去毛包角化細胞由来の 3 次元表皮の遺伝子発現の網羅的解析を施行した。従来の gene array (Agilent) に加え、イルミナ HiSeq2000 を使用し、19 例の全エクソーム塩基配列の分析のデータを得た。

4. 研究成果

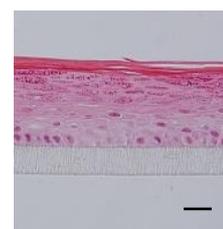
(1)

① 抜去毛包由来ないし皮膚由来の角化細胞から作製される 3 次元表皮はともに基底層、有棘層、顆粒層、角層を伴う重層化した表皮を認め、形態的に類似した構造を認めた。

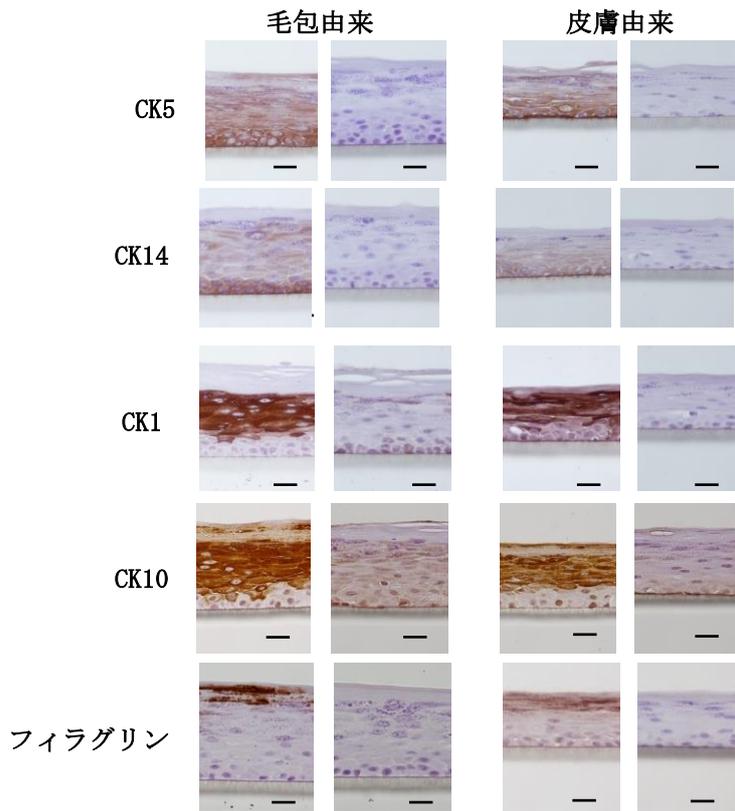
毛包由来



皮膚由来

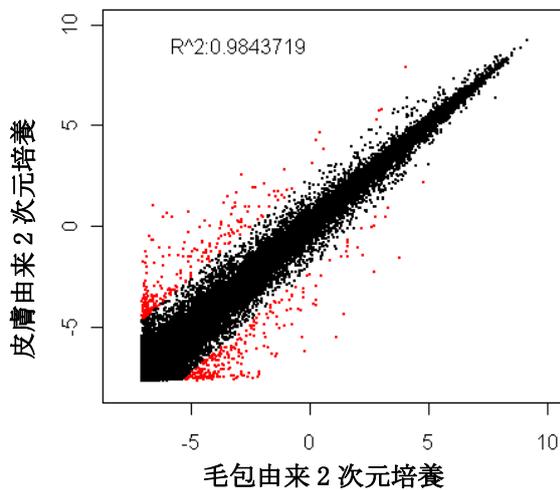


② 抜去毛包由来ないし皮膚由来の角化細胞から作製される 3 次元表皮はともに基底層にケラチン 5 と 14、有棘層にケラチン 1 と 10、顆粒層から角層にフィラグリンが発現し、同等の分化を示した。

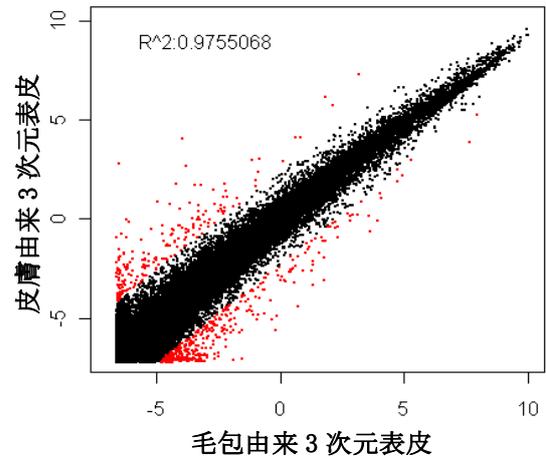


(2)

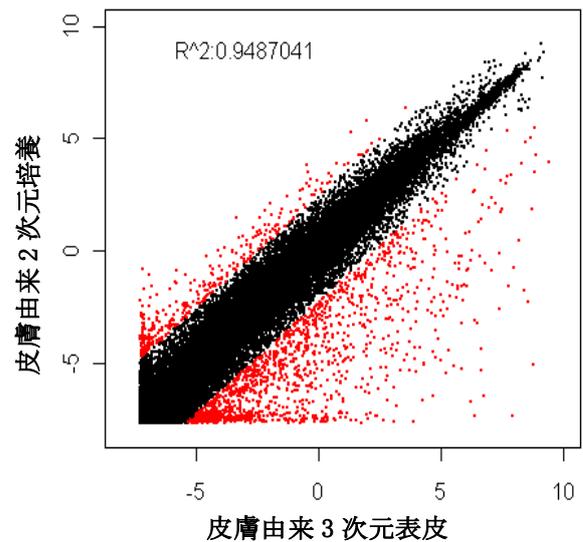
① 抜去毛包由来ないし皮膚由来の角化細胞の2次元培養では、発現する遺伝子の相関を認めた (相関係数 R^2 が 0.984)。



② 抜去毛包由来ないし皮膚由来の角化細胞からの3次元培養表皮では、発現する遺伝子の相関を認めた (相関係数 R^2 が 0.975)。



③ 皮膚由来の角化細胞の3次元培養表皮は2次元培養と比べ、発現が上昇している遺伝子が多く、963個の遺伝子の発現が5倍以上上昇していた。

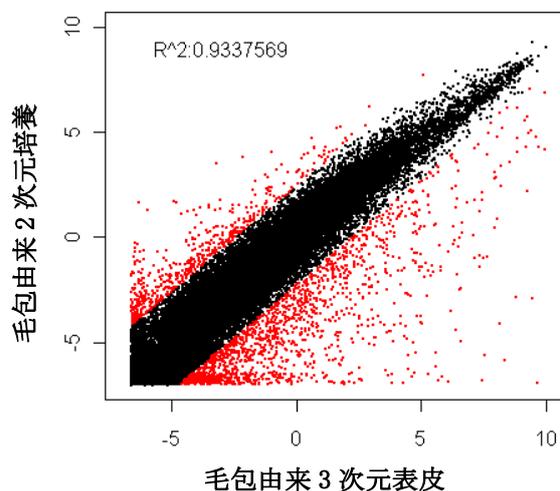


上図の赤点は、3次元培養表皮で2次元培養と比べ、発現が5倍以上上昇している遺伝子を示す。

Gene Name	Fold Change
LOR (loricrin)	40853.8
KRT1 (keratin 1)	15504.6
KRT77 (keratin 77)	14231.7
FLG (filaggrin)	8245.9
LCE2B (late cornified envelope 2B)	4126.1

上記の表は、皮膚由来の3次元培養表皮で発現が高かった遺伝子の上位5位までを示す(表皮終末分化に伴う遺伝子であった)。

④ 抜去毛包由来の角化細胞の3次元培養表皮は2次元培養と比べ、発現が上昇している遺伝子が多く、1013個の遺伝子の発現が5倍以上上昇していた。



Gene Name	Fold Change
KRT1 (keratin 1)	100418.9
SPRR2G (small proline-rich protein 2G)	20342.1
LOR (loricrin)	19742.7
FLG (filaggrin)	8615.1
LCE2B (late cornified envelope 2B)	6124.0

上記の表は、毛包由来の3次元培養表皮で発現が高かった遺伝子の上位5位までを示す(表皮終末分化に伴う遺伝子であった)。

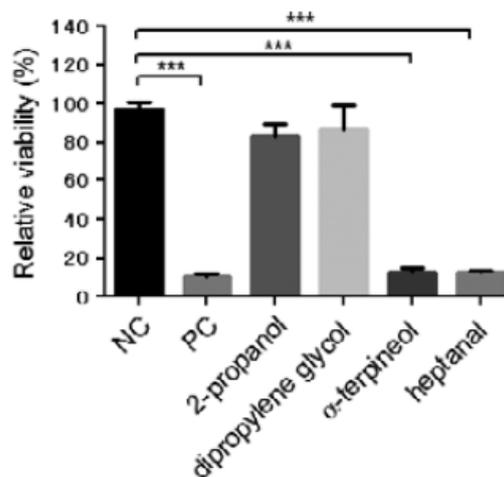
したがって、皮膚由来ばかりでなく抜去毛包由来の3次元表皮は、これらの遺伝子異常を伴う疾患の解析に有用であると示唆された。

(3)

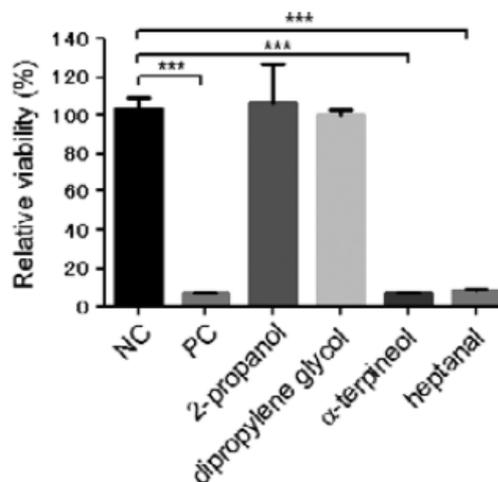
in vitro 皮膚刺激試験において、抜去毛包由来3次元表皮(①、②、③)は、市販の3次元表皮(EPI-200)④と同様に、非刺激物質による刺激で50%超の生細胞率を示し、刺激物質で50%以下の生細胞率を示した(mean±SD、

n=3, *** $P < 0.001$, Student's *t* test)。

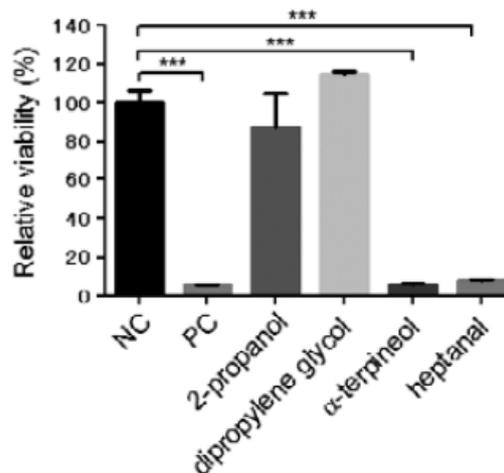
提供者① 毛包由来3次元表皮



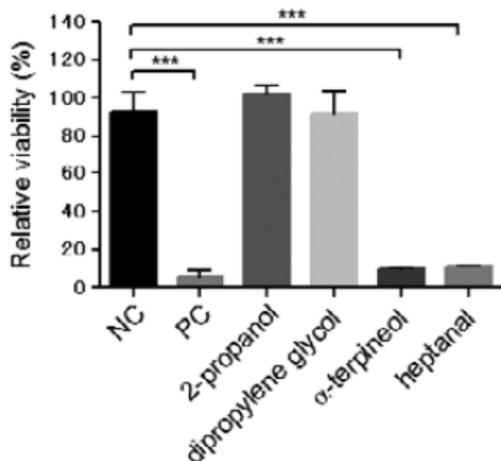
提供者② 毛包由来3次元表皮



提供者③ 毛包由来3次元表皮



市販④ 皮膚由来3次元表皮 (EPI-200)



以上から、毛包由来3次元表皮は従来の皮膚由来3次元表皮と機能的にも類似しており、刺激試験にも使用可能であることが示唆された。

(4)

平面培養液と3次元培養液の変更に伴う、再現性、汎用性のある抜去毛包由来の角化細胞の平面培養(2次元培養)方法や3次元表皮作製方法を確立した。

さらに培養液変更前と同様に抜去毛包を500PU/ml Dispase IIで37度5分間処理することが毛包由来角化細胞の分離、培養に適していた。

さらに培養液変更前と同様に培養液変更後の毛包由来3次元表皮は角質層、顆粒層など正常表皮構造を有していた。

毛包由来3次元表皮の作製方法について、その詳細なプロトコールを作成し現在英語論文に投稿中である。

(5)

Gene arrayにて、アトピー性皮膚炎患者ではバリア機能に関する遺伝子群の発現が減弱していた。

さらに、全エキソーム塩基配列の分析のデータを得て、特にすべてのアトピー性皮膚炎患者共通に遺伝子変異を認める遺伝子はなかったが、数例のアトピー性皮膚炎患者で共通した変異は認めた。それらをアトピー性皮膚炎の病因に関与する角化細胞由来新規原因遺伝子の候補遺伝子として解析する必要があるが、遺伝子を絞り切れていない。

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2件)

① Staphylococcus aureus virulent PSM α peptides induce keratinocyte alarmin release to orchestrate IL-17-dependent skin inflammation. Nakagawa S, Matsumoto

M, Katayama Y, Oguma R, Wakabayashi S, Nygaard T, Saijo S, Inohara I, Otto M, Matsue H, Gabriel Núñez, and Nakamura (Matsuoka) Y. *Cell Host & Microbe*. 査読有, 22:667-677 (2017) DOI: 10.1016/j.chom.2017.10.008

② Establishment of a new three-dimensional human epidermal model reconstructed from plucked hair follicle-derived keratinocytes. Nakano M, Kamada N, Suehiro K, Oikawa A, Shibata C, Nakamura (Matsuoka) Y, Matsue H (corresponding author), Sasahara Y, Hosokawa H, Nakayama T, Nonaka K, Ohara O. *Exp Dermatol*. 査読有, 25:903-906 (2016) DOI: 10.1111/exd.13066

[学会発表] (計1件)

Nakano Michiyo, et al. Development of a novel three-dimensional human epidermal model from plucked hair follicle-derived keratinocytes. Society for Investigative Dermatology (USA) 2016

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松江 弘之 (MATSUE Hiroyuki)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 10250424

(2) 研究分担者

松岡 悠美 (MATSUOKA Yuumi)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号: 10402067

中野 倫代 (NAKANO Michiyo)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 20645634
(平成27年度より研究分担者)

末廣 敬祐 (SUEHIRO Keisuke)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号: 50375721
(平成27年度より研究分担者)

鎌田 憲明 (KAMATA Noriaki)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 00334186

(平成27年度より分担者から外れる。退職し、科研費応募資格を喪失するため)

神戸 直智 (KAMBE Naotomo)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号: 50335254
(平成27年度より分担者から外れる。科研費応募資格は有するが、転出先が遠方で連携が困難のため)