

令和元年5月30日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19707

研究課題名(和文)毛包由来ヒト3D表皮-免疫デバイスを用いたヒト皮膚炎モデル解析法の確立

研究課題名(英文)To establish the method of dermatitis model using hair follicle derived human 3D epidermis-immune device

研究代表者

中野 倫代(Michiyo, Nakano)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20645634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：従来の方法と比べより簡便な方法で毛包由来ヒト3D表皮デバイスの作成に成功し、形態学的にも機能的にも皮膚由来のものと同等であることを示せていたので、免疫学的検討を行う前に、刺激物質と非刺激物質による刺激で細胞毒性、IL-1 $\alpha$ の産生検討を行った。刺激に対する反応は刺激物質の場合では細胞死と、IL-1 $\alpha$ の産生を起こすことから、このモデルがin vitroでヒト皮膚環境を構築するのに適していることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、当初の目的である免疫細胞の導入と相互作用を検討するには至らなかったが、繰り返し3Dデバイスを作成し手技の習熟を図ることで、より効率的な3Dデバイスの作成法を見出すことができた。免疫系を刺激するサイトカインの産生を確認するとともに、汎用性のあるヒト3Dデバイスを構築できたことは今後、薬剤スクリーニングや免疫反応を検討する上でこの分野に貢献できるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in creating hair follicle-derived human 3D epidermal devices by a simpler method than conventional methods, and showed that it is morphologically and functionally equivalent to skin-derived ones. Before conducting the study, we examined the production of IL-1 $\alpha$ , which is cytotoxic by stimulation with irritants and non-irritants. The response to the irritants causes cell death and the production of IL-1 $\alpha$ , confirming that this model is suitable for constructing a human skin environment in vitro.

研究分野：皮膚科学

キーワード：3D表皮デバイス Langerhans細胞 ヒト皮膚炎モデル

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚 3D デバイス (EpiSkin、EpiDerm など) は製品化されており、化粧品の刺激試験や微生物感染試験など様々な研究に使用されている。しかし、市販のものではケラチノサイトの由来は不明であり、免疫担当細胞を導入し、炎症反応の機序を検討することは不可能であった。皮膚由来のケラチノサイトを使用して 3D 表皮を作成することは可能であるが、皮膚切除などの身体に侵襲的な手段を要するという欠点がある。以前より、毛包由来のケラチノサイトを使用した 3D 表皮が皮膚潰瘍の治療などに使用された報告 (Limat, et al. *J Am Acad Dermatol* 2003) はあるが、我々は、従来の方法と比べより簡便な方法で毛包由来ヒト 3D 表皮デバイスの作成に成功し、形態学的にも機能的にも皮膚由来のものと同等であることを示した。表皮デバイス内への Langerhans 様細胞の導入は臍帯血や末梢血を用いた報告があり、(Schaerli, et al. *Immunity*, 2005; Regnier, et al. *J Invest Dermatol* 1997; Ganor, et al. *Mucosal Immunol* 2010)、移入された細胞は Langerhans 細胞の特徴である、表面マーカー CD207+HLA-DR+、細胞内 Birbeck 顆粒陽性となる。また、表皮デバイス内への CD4+T 細胞の導入を行い表皮ケラチノサイト CD4+T 細胞導入を行い表皮ケラチノサイトの発現する抗菌ペプチド (S100A7, S100A8 など) や T 細胞の遊走に関わるケモカイン CXCL10、CD4+T 細胞の Th17 関連サイトカイン (IL-17, IL-22) などを測定し、いずれも T 細胞の導入により上昇することが報告されている (Bogaard, et al. *J Invest Dermatol* 2013)。一方で、これらの誘導モデルに用いられている皮膚 3D デバイスと、免疫担当細胞は個体の由来が違うため、主要組織適合遺伝子複合体を介した抗原提示の解析には適さない。これまで多くの抗原提示反応を介した研究が、マウスを中心とした動物モデルを用いた手法で行われてきた。しかしながら、齧歯類とヒトでは表皮の構築が異なる事に留まらず、免疫応答に係る細胞分画や発現分子の認識機構は大きく異なる。例えば、ニッケル (Ni) 皮膚炎は金属アレルギー性による皮膚炎の中で頻度が圧倒的に高い疾患であるが、Ni 分子がヒトでは、TLR4 による認識に依存していることが明らかになった (Schmidt, et al. *Nat Immunol* 2010)。一方、Ni はマウスの TLR4 には認識されず、ヒト TLR4 を過剰発現したマウスモデルにより、*in vivo* で TLR4 依存性に皮膚炎を惹起する事が示された (Schmidt, et al. *Nat Immunol* 2010)。しかしながら、こういった過剰発現マウスモデルの解析では既存の LPS といった、TLR4 のリガンドとの相互関係や、MHC 抗原提示への TLR4 シグナルの寄与は明らかではない。さらに、皮膚の細菌、真菌の感染免疫応答により誘導される Th17 細胞に関しても、ヒト末梢血の刺激モデルでは、*S. aureus* と *C. albicans* では全く異なるタイプの Th17 細胞が誘導される事が報告されている (Zielinski, et al. *Nature* 2012)。実際、我々の教室で行われてるマウスを用いた経表皮感染モデルにおいても、それぞれの病原微生物を用いた IL-17 細胞の誘導機構は異なっている。

## 2. 研究の目的

皮膚における免疫反応の解析にはマウス個体を用いた実験が広く行われてきた。しかしヒトとは免疫反応には違いがあること、動物愛護の観点などから *in vitro* でヒト皮膚環境を構築できれば、動物実験代替法として画期的である。これまで同一人物から免疫細胞と表皮角化細胞の両方を樹立することは困難であったが、我々は、数本の毛包を抜去するだけという低侵襲な方法でヒト 3D 表皮デバイスの作製に成功した。この先行研究を足がかりに同一人物からの Langerhans 細胞や免疫担当細胞を樹立し 3D 表皮デバイスに導入を行う。さらに自己と非自己の免疫細胞導入時の免疫応答の差を検討し最終的にニッケル皮膚炎や微生物感染応答の解析を行いヒト 3D 表皮-免疫デバイスを用いた新規ヒト皮膚炎モデルの創出を目指す。

## 3. 研究の方法

- 毛包由来 3D 表皮デバイス内に自己および非自己から得られた末梢血 CD34+細胞から分化させた Langerhans 細胞移入法を確立する。
- 末梢血から種々の免疫担当細胞を単離・分化誘導し、自己及び非自己の免疫細胞を 3D 表皮デバイスに導入した際の導入時の免疫応答の異差を解析する。

その後、樹立したヒト 3D 表皮-免疫デバイスを用い、① Ni 皮膚炎モデル構築による TLR4-MHC 相互採用を介したヒト 3D 表皮-免疫デバイスの動態解析、および *C. albicans* および、*S. aureus* モデルにおける Th17 細胞を中心としたヒト 3D 皮膚-免疫応答の動態解析を行う。

## 4. 研究成果

確立した表皮 3D デバイスを用いて、Langerhans 細胞の導入および T 細胞や種々の免疫応答を導入し Ni や微生物の刺激反応を加えた場合のヒト 3D 表皮-免疫デバイスの応答を確認するため、以下の 5 つのステップで段階的に解析系の確立を行う。 ) 3D 表皮デバイス内への自己および非自己から得られた Langerhans 細胞の導入法樹立：表皮デバイス内への Langerhans 様細胞の導入は臍帯血や末梢血を用いた報告があるが (Schaerli, et al. *Immunity*, 2005; Regnier, et al. *J Invest Dermatol* 1997; Ganor, et al. *Mucosal Immunol* 2010)、同一個体からの主要組織適合遺伝子複合体の一致した表皮-免疫 3D デバイスを作製するため、Schaerli らの確立した末梢血 CD34+細胞による方法を用いて検討を行う。 ) 末梢血からの、

免疫担当細胞の単離：すでにわれわれの教室では、Th17 細胞の末梢血からの単離法を確立している。同様の方法を用いて、末梢血分画の好中球などや、マクロファージ系や分化させた種々の真皮樹状細胞様の細胞を確立する。自己及び非自己の免疫細胞を 3D 表皮デバイスに導入した際の導入時の免疫応答の解析：まず、基本的な免疫応答が惹起されるかどうかのコントロール実験として、自己および非自己の免疫細胞を導入した 3D 表皮-免疫細胞デバイスによる移植片対宿主病様の免疫応答が起こるか否かを確認する。Ni 皮膚炎モデル構築によるヒト 3D 表皮-免疫デバイスの動態解析：ニック Ni による *in vitro* におけるヒト TLR4 による認識および、ヒト TLR4 過剰発現マウスによる *in vivo* 刺激モデルはすでに確立している (Schmidt, et al. Nat Immunol 2010)。これらの系を参考に樹立した表皮-免疫 3D デバイスにおける TLR4-MHC の複合的な免疫応答を検討する。C.albicans および、S. aureus モデルにおけるヒト 3D 皮膚-免疫応答の動態解析：ヒト末梢血 S. aureus と C. albicans では全く異なるタイプの Th17 細胞が誘導される事が報告されている (Zielinski, et al. Nature 2012)。また興味深いことに、我々の教室で解析を行っている S. aureus のマウス経皮感染モデルでは表皮角化細胞の MyD88 シグナルを介したサイトカインネットワークが IL-17 産生細胞に重要であることが明らかになってきた。一方、C. albicans を用いた系では IL-17 産生細胞が同様に誘導されるが、このシグナルには依存しない。このそこでヒト 3D 皮膚-免疫デバイスに死菌刺激や生菌の感染実験を行い、感染皮膚局所で誘導される Th17 細胞の異差や表皮内への好中球遊走の機序の解明の足がかりとする。

従来方法と比べより簡便な方法で毛包由来ヒト 3D 表皮デバイスの作成に成功し、形態学的にも機能的にも皮膚由来のものと同であることを示せていたので、免疫学的検討を行う前に、刺激物質である (terpineol and heptanal) と非刺激物質 (2-propanol and dipropylene glycol) などを一般的な 42 bis protocol に基づいて細胞毒性、IL-1 $\alpha$  の産生検討を行った (図 1)。刺激に対する反応は刺激物質の場合では細胞死と、IL-1 $\alpha$  の産生を起こすことから、このモデルが *in vitro* でヒト皮膚環境を構築するのに適していることを確認した。これらの成果は、先行研究とともに、英文論文として報告を行った。過去の報告 (Immunity, 2005) に基づき、ヘパリン採血によって得た健常者末梢血を FicolI 比重分離を行い、PBMC 分画を採取し、その後、CD14<sup>+</sup>単球は CD1d<sup>-</sup>, CD14<sup>+</sup>の MACS (Miltenyi Biotech 社) 単離システムを利用し単離、単離した細胞は、単相化した、3D デバイスのケラチノサイトのレイヤー上に蒔き、Langerhans 細胞を確認することを計画していたが、導入後、1-2 週で Langerhans 様細胞の誘導を確認するには至らなかった。

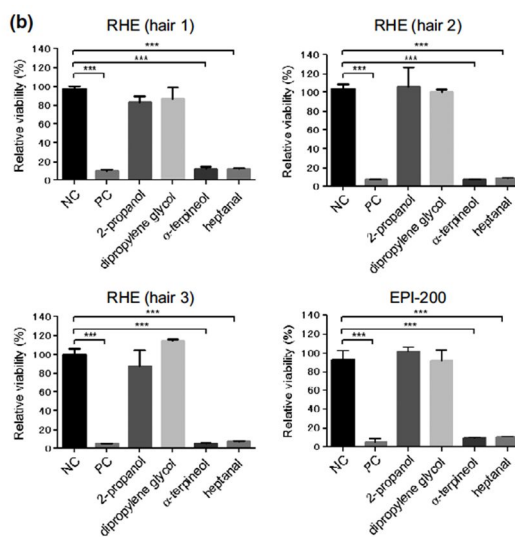


図 1：右下の皮膚由来 3D デバイスと、毛根鞘由来 3D デバイス (RHE) の刺激物質に対する生存率の比較。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Nakano M, Kamada N, Suehiro K, Oikawa A, Shibata C, Sasahara Y, Hosokawa H, Nakayama T, Nonaka K, Ohara O, Nakamura Y, Matsue H. Establishment of a new three-dimensional human epidermal model reconstructed from plucked hair follicle-derived keratinocytes. *Exp Dermatol*. 査読あり 25:2016.903-6.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8 桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

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。