

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08801

研究課題名(和文)皮膚由来3次元組織構造体(オルガノイド)の培養法の確立と解析

研究課題名(英文) Establishment and Analysis of Skin-derived multicellular 3-dimensional in vitro cell models (Organoid)

研究代表者

大内 健嗣 (OUCHI, TAKESHI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・専任講師

研究者番号：30528419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウス皮膚より3次元組織構造体；オルガノイドを作成した。皮膚オルガノイドは基底層側が外側、角化層が内側を向き、内腔に角化物が充満する嚢腫構造を呈し、正常皮膚を模倣する。経時的に観察すると、複数のケラチノサイトの集塊が発育し、成熟したオルガノイドが形成された。克服すべき課題は、長期培養を可能にすることであった。初代培養と継代培養を比較したRNA-seq解析から、継代によりmTORシグナル伝達経路の抑制が判明した。継代培養群でAktのリン酸化レベルが減少しており、Akt活性が減少しmTOR経路が抑制されることが示唆された。現在、Aktを活性化する小分子SC79が長期培養に寄与するか検証中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、マウス皮膚から正常の皮膚(表皮)を試験管内で再現した機能的オルガノイドの培養系を確立した。皮膚の表皮細胞は生体の恒常性の維持に重要な役割を担っており、皮膚の生体外の器官培養系を確立することは、生体外評価モデルの構築として重要な意味を持つ。長期の継代培養が課題であるが、今後、皮膚オルガノイドの長期培養が可能となることで、表皮の恒常性維持、がん化メカニズムを理解するために最適なプラットフォームを提供することが期待される。また遺伝子改変による疾患モデルに応用可能であり、薬剤スクリーニングも容易となり、臨床に貢献しうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mouse skin-derived multicellular 3-dimensional in vitro cell models (Organoid) was established and analyzed. In-vitro generated organoid occur as cysts with a central lumen. Organoid epithelium contains stratum corneum, stratum granulosum, stratum spinosum and basal layer comprising epidermis in vivo. According to the serial observation, it was revealed that aggregated keratinocytes developed into organoids in the presence of cocktails of growth factors. The challenge to overcome was to enable long-term culture. RNA-seq analysis comparing primary and passaging cultures revealed suppression of mTOR signaling pathway upon passaging. The phosphorylation level of Akt was decreased in the passaging culture group, suggesting that down regulated Akt inhibits mTOR pathway. We are currently testing whether SC79, a small molecule that activates Akt, contributes to long-term culture.

研究分野：細胞生物学

キーワード：3次元構造体 オルガノイド ケラチノサイト

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の細胞培養技術の進歩により、特定の組織に形態学的のみならず、機能的にも類似した 3 次元組織構造体 (オルガノイド) の作成が次々に報告されている。オルガノイドは大きく 2 つに大別される; ①ES 細胞や iPS 細胞から作成されたもの、②組織特異的な生体幹細胞から作成されたもの、である。後者の組織幹細胞については長年の間、体外培養は不可能であると考えられてきた。しかし、近年の組織幹細胞の恒常性維持に関わる研究により、幹細胞と幹細胞を支える微小環境のシグナルが同定され、それらを模倣するような形で成長因子のカクテルを培地中に添加することで、組織幹細胞の長期間培養が可能となった。体外培養された組織幹細胞は機能を保ちつつ、分化した上皮細胞を産生し、その組織の重要な機能を反映しながら、3 次元組織構造体 (オルガノイド) として増殖する。

現在まで組織特異的な生体幹細胞からオルガノイド作成が報告されている組織は、肺、肝臓、胃、小腸、大腸、食道、舌である。本研究と関係が深いのは、重層扁平上皮である食道 (DeWard et al. *Cell Rep* 2015) と舌 (Hisha et al. *Sci Rep* 2013) である。いずれも内腔にいくに従って角化する重層扁平上皮を模倣したオルガノイドが作成されている。皮膚では、iPS 細胞を用い間葉系細胞と相互作用させることで作成した皮膚オルガノイドが報告されている (Takagi et al. *Sci Adv* 2016) が、分化した表皮組織から直接的に皮膚オルガノイドを作成できた報告は未だない。

皮膚は人体を覆い、外界から保護するとともに、生命の保持に不可欠の種々の機能を営む重要な臓器である。皮膚は表皮、真皮、皮下組織から構築され、最外層に位置する表皮はその 95% 以上が角化細胞 (ケラチノサイト) から構築される重層扁平上皮である。近年、腸管上皮を端緒として、特定の組織に形態学的のみならず、機能的にも類似した 3 次元組織構造体 (オルガノイド) の作成が報告されている。皮膚においては、マウス歯肉から樹立した iPS 細胞を用いた皮膚オルガノイドの作成が報告されているが、皮膚細胞から直接オルガノイドを作成できた報告は未だない。今回、我々はマウス皮膚から機能的なオルガノイドの培養系を確立し、その構造解析と疾患モデルへの応用を試みる。皮膚由来オルガノイドは表皮の恒常性維持を理解するために最適なプラットフォームを提供することが期待される。

2. 研究の目的

腸管上皮では、Wnt シグナルの標的遺伝子である *Lgr5* が幹細胞に特異的に発現し (Barker et al. *Nature* 2007)、分離された単一の *Lgr5* 陽性腸管上皮からオルガノイドが形成できることが報告された。皮膚表皮組織には複数の幹細胞が存在する。毛包のバルジ領域には毛包組織の幹細胞となる *Lgr5* 陽性細胞、バルジ領域直上の毛包峽部には毛包間表皮の幹細胞となる *Lgr6* 陽性細胞が存在する (Leushacke et al. *Oncogene* 2012)。Lgr6 は *Lgr5* に高い相同性を示すことから (Gong et al. *PlosOne* 2012)、腸管、舌、食道上皮と同様の培養方法を用いて、皮膚由来オルガノイドが作成可能であることが期待される。皮膚の表皮細胞は生体の恒常性維持に重要な役割を担っており、その生体外の器官培養系を確立することは、動物実験代替法となる生体外評価モデルの構築として重要な意味を持つ。これまでにマウスケラチノサイトの初代培養は報告されているが、2 次元の培養方法であり、継代培養が困難であるなど、手技的にも熟練を要するものであった。本研究にて得られた皮膚オルガノイドは生体外で遺伝子改変による疾患モデルに適用可能であり、薬剤スクリーニングも可能となり、臨床に貢献できる可能性がある。

3. 研究の方法

予備実験の段階でマウス皮膚ケラチノサイト由来のオルガノイドの作成に成功した。具体的には野生型マウスの耳介より採取した皮膚を使用した。皮膚はディスパーゼを使用し、真皮から表皮を剥離し、トリプシンを用いて表皮細胞を分離した。この細胞をマトリジェル®内に包埋し、EGF、Noggin、R-Spondin1、および Y27632 の成長因子存在下で培養したところ、7 日目には囊腫構造を呈する 3 次元組織構造体を形成した。

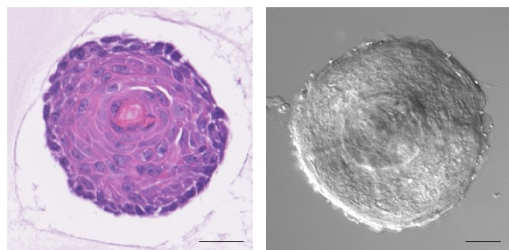


図1 マウス皮膚由来オルガノイド
左; HE 染色
右; Phase contrast 像

Bar; 50 μ m

この皮膚オルガノイドを形態学的に解析するとともに、長期培養が可能かを解析した。

4. 研究成果

皮膚オルガノイドの形態学的な解析

電子顕微鏡による観察で、皮膚オルガノイドにケラチンフィラメント、デスモゾームを確認した。また、基底層側のヘミデスモゾーム、正常皮膚には観察されるメラノサイトおよびランゲルハンス細胞は確認されなかった（図2）。

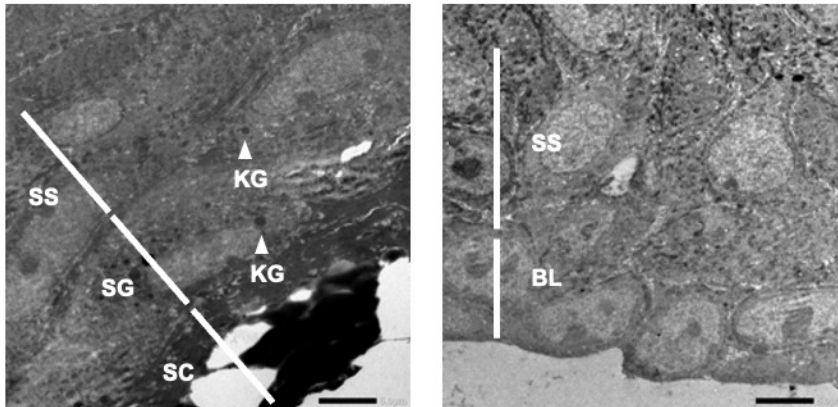


図2 電子顕微鏡像
左；内腔側
右；外腔側

Bar; 5 μ m

SC;角層、SG;顆粒層、
SS;有棘層、BL;基底層、KG; ケラトヒアリン顆粒

皮膚オルガノイドにおける角化細胞の分化を確認するために、基底層特異的(ケラチン5/14)、有棘層特異的(インボルクリン)および顆粒層特異的(ロリクリン)マーカーを、免疫組織染色によって確認した。また、デスモグレイン1/3(デスモゾーム構成タンパク)、ZO-1およびClaudin-1(タイトジャンクション構成タンパク)染色で細胞間接着分子の発現を確認した(図3)。この細胞間接着分子の解析により、基底層側が外側、角化層が内側を向き、内腔に角化物が充満する嚢腫構造を呈し、正常皮膚を模倣した分化を示す皮膚オルガノイドの構造が明らかとなった。

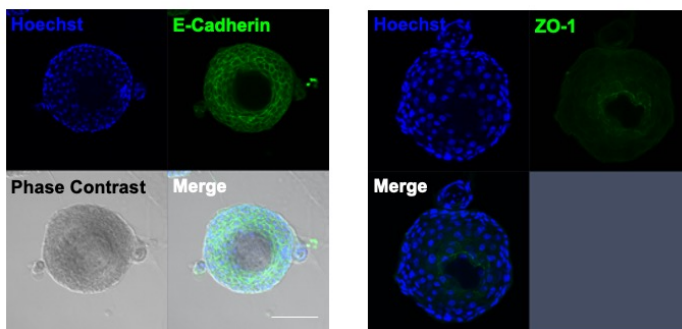


図3 細胞間接着分子発現
左；E-Cadherin 染色
右；ZO-1 染色

Bar; 50 μ m

培養した皮膚オルガノイドの経時的な成長をIncuCyteS3 Live-Cell Analysis Systemを用いて記録した。このシステムは、培養期間を通して安定した環境下で細胞にストレスを与えることなく、自動的かつ連続的に画像を収集することを可能にする。この観察から、トリプシンを用いて表皮細胞を分離した後、複数個のケラチノサイトの集塊からオルガノイドが発育し、成熟したオルガノイドが形成されることが判明した。

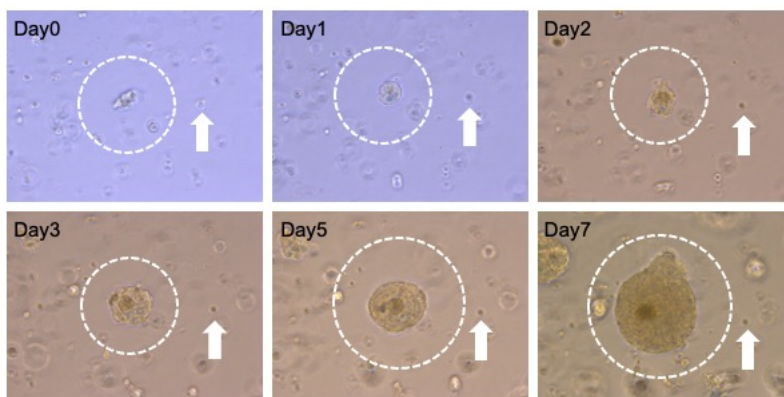


図4 皮膚オルガノイドの経時的な成長

点線内；トラッキングした細胞塊

矢印；トラッキングに用いた視野内のマーカー（細胞デブリ）

皮膚オルガノイドの機能的解析

皮膚オルガノイドの機能的解析を試みた。具体的には皮膚オルガノイドの上皮の透過性を評価

した。具体的には Sulfo-NHS-LC-biotin を培養液に加えて、ビオチン標識されたタンパク質を蛍光標識されたストレプトアビジンで可視化した。Sulfo-NHS-LC-biotin はタンパク質をビオチン化する試薬であるが、水溶性であるため、細胞膜を通過できず、かつ分子量が 556.59 とタイトジャンクションバリアを通過できない大きさをもつ (Kubo et al, *J Exp Med* 2009)。すなわち細胞膜表面のタンパク質をビオチン化しつつ細胞間隙を拡散していく。予想では、オルガノイドは外側にはタイトジャンクションを有さないため、表皮細胞間は外側から内腔側のタイトジャンクションまでビオチン化されるはずであったが、表皮細胞間のビオチン化は確認されなかった (Data Not Shown)。

皮膚オルガノイド上皮の恒常性について、表皮剥脱毒素を用いて評価した。表皮剥脱毒素はそのタンパクサイズからタイトジャンクションを通過する事はできないことが証明されている (Ouchi et al, *J Exp Med* 2011)。表皮剥脱毒素は表皮間の接着分子であるデスモグレイン 1 を切断するため、培養液に添加した場合、細胞間隙を拡散し、顆粒層での棘融解を起こすはずである。具体的には 4 μg/ml となるように表皮剥脱毒素を培養液に添加し 1 時間培養し、形態変化を確認した。予想に反して、表皮剥脱毒素存在下に培養した皮膚オルガノイドでは内腔側の存在する顆粒層での棘融解は確認されなかった。

次に、分裂が盛んな細胞の局在を、EdU を用いて評価した。予想通り、皮膚オルガノイドの最外層で盛んな細胞分裂が確認され、基底層に一致することが確認された。次に、分裂が盛んな細胞の局在を、EdU を用いて評価した。予想通り、皮膚オルガノイドの最外層で盛んな細胞分裂が確認され、基底層に一致することが確認された。

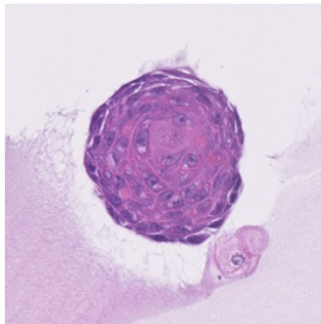


図 5 表皮剥脱毒素との共培養結果 (HE 染色)
左; コントロール
右; 表皮剥脱毒素存在下

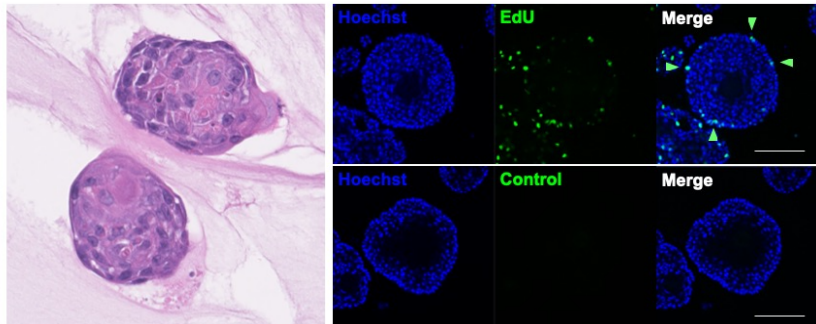


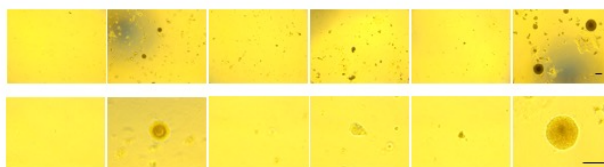
図 6 EdU 染色
Bar; 50 μm

皮膚オルガノイドを長期培養可能にするための試み

予備実験で作成したマウス皮膚オルガノイドを継代培養したところ、約 3 回の継代 (約 1 ヶ月) にて発育が停止することが確認された。生体外で遺伝子改変による疾患モデルへの応用や薬剤スクリーニングを行うには、腸管由来のオルガノイドのように無限に継代培養が可能であることが重要である。現在、長期培養に最適な条件を検討した。基本的な培養条件に添加している Y27632 を除くと、皮膚オルガノイドは形成されないことから、Rho-associated kinase (ROCK) の過剰な活性化がオルガノイドの継代培養を阻害していることが予想された (図 7)。

EGF	-	-	+	+	+	+
Noggin	-	+	-	+	+	+
R-Spondin	-	+	+	-	+	+
Y27632	-	+	+	+	-	+

図 7 Noggin および Y27632 は皮膚オルガノイドの形成に必須である。



著者らは 2021 年に幹細胞の stemness、上皮細胞の恒常性を失った腸管オルガノイドにおいて Rho-associated kinase (ROCK) の過剰な活性が起きていることを報告し、ROCK 阻害薬の添加により失われた上皮の恒常性が回復することを報告した (Ouchi et al, *Cells* 2011)。この知見をもとに Y27632 から別の ROCK 阻害薬を添加し、長期培養が可能かを検討した。具体的には選択的

ROCK I 阻害薬である 10 μ M の 1-Phenyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-4-hydroxypyrrolo[2, 3-b]-7-methylquinolin-4-one (Blebbistatin)、0.31 μ M の (S)-(+)-2-Methyl-1-[(4-methyl-5-iscquinolinyl) sulfonyl]-hexahydro-1H-1,4-diazepine dihydrochloride (H1152) を培養液中に添加し、継代培養を試みた。結果、継代培養される率は若干ながら改善が見られたが、明らかな有意差をもって改善はしていない (Data Not Shown)。

継代ごとに ROCK 活性が上昇するか否か、初代培養と継代培養ごとに ROCK 活性アッセイを用いて評価したが、ROCK の活性化は確認されなかった (図 8)。

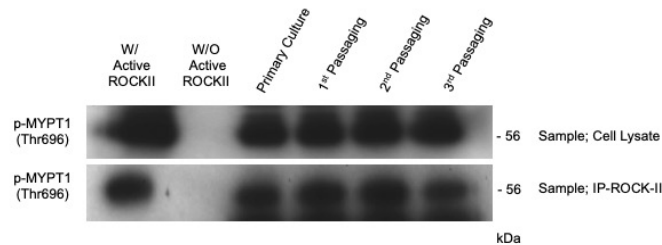


図 8 細胞ライセートおよび ROCK のアイソフォームに対する抗体で免疫沈降したものについて MYPT1 のリン酸化をもって ROCK 活性を測定した。

Y27632 のオフターゲットとして Akt 伝達経路が知られている (Zhang et al. *PLoS ONE* 2011)。PI3K-AKT 伝達経路は上皮細胞の生存と増殖、タンパク合成、グルコース代謝に重要な役割を果たす事が知られている。活性化 Akt は、アポトーシス促進因子の BAD の不活化、グリコーゲンや脂肪酸合成を促進する GSK3 β の活性化、蛋白質合成促進に関係する mTOR の活性化などに働き、また細胞周期促進への関与や、細胞が生存・成長しやすい環境に整える。初代培養と継代培養を比較した RNA-seq 解析から継代培養細胞において mTOR シグナル伝達経路が抑制されていることが示唆された (図 9)。

Ingenuity Canonical Pathways	$-\log(p\text{-value})$	Ratio	Downregulated	No change	Upregulated
Phospholipase C Signaling	9.92E00	1.71E-01	5/265 (2%)	0/265 (0%)	42/265 (16%)
Glycolysis I	4.13E00	1.95E-01	14/41 (34%)	0/41 (0%)	2/41 (5%)
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	4.16E00	1.33E-01	7/195 (4%)	0/195 (0%)	25/195 (13%)
MIF-mediated Glucocorticoid Regulation	4.13E00	1.95E-01	8/42 (20%)	0/42 (0%)	0/42 (0%)
mTOR Signaling	3.73E00	1.22E-01	22/213 (10%)	0/213 (0%)	8/213 (4%)
Apoptosis Signaling	3.41E00	1.5E-01	4/100 (4%)	0/100 (0%)	11/100 (11%)
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	3.49E00	1.48E-01	2/171 (2%)	0/171 (0%)	19/171 (11%)
Nicotine Degradation II	3.42E00	1.41E-01	3/85 (4%)	0/85 (0%)	11/85 (13%)
ILK Signaling	3.11E00	1.17E-01	11/205 (5%)	0/205 (0%)	13/205 (6%)

図 9 初代培養と 3 回継代培養した皮膚オルガノイドからの RNA-seq データからパスウェイ解析を行った。

アポトーシスマーカーである Cleaved Caspase-3 は継代が出来なくなる段階で著明に活性化していた。Akt シグナル伝達経路に注目して細胞ライセートから Western Blot 法で Akt 活性を測定した。発育が停止する継代培養群で Akt のリン酸化レベルが減少していた。さらに Akt の下流にある GSK-3 α ・GSK-3 β のリン酸化レベルも減少していることが示された。以上から継代培養を経ると Akt 活性が減少することで、mTOR 経路の抑制から細胞増殖が抑制されることが示唆された。現在、Akt を活性化する小分子 SC79 が皮膚オルガノイドの長期培養に寄与するかを検証中である。

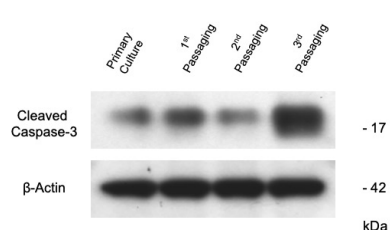


図 10 Cleaved Caspase-3 の活性

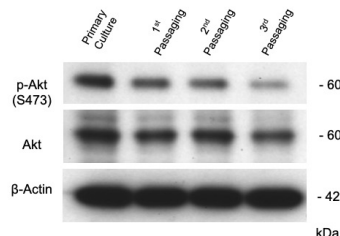


図 11 Akt の不活性化

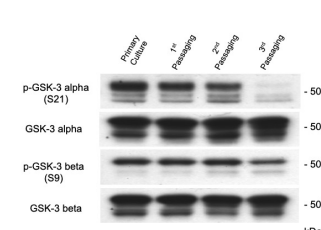


図 12 GSK-3 の不活性化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------