

令和 2 年 4 月 16 日現在

機関番号：82718

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H05945・19K21107

研究課題名(和文)皮膚附属器を有する培養皮膚のin vitro再生

研究課題名(英文)Fabrication of skin tissue constructs with skin appendages

研究代表者

景山 達斗(Kageyama, Tatsuto)

地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所・戦略的研究シーズ育成プロジェクト・研究員(任期有)

研究者番号：40822177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：新薬開発における薬剤スクリーニング法として、生体を模した培養皮膚モデルを構築する手法が注目を集めている。特に、毛包は皮膚を代表する附属器であり、これを備えた培養皮膚は、従来モデルで課題であったスクリーニングの予測精度や評価項目の少なさを改善できる可能性がある。本研究では、胎児期における毛髪の発生過程を生体外で再現することで、上皮と間葉の細胞の自己組織化により毛包組織を調製する技術を開発し、これを培養皮膚に組み込むことで毛包を有する培養皮膚を再生する技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により構築した毛包を有する培養皮膚は、ヘルスケアや医薬部外品の新規評価モデルとしての応用や附属器を有する移植用皮膚開発への多大なる貢献が期待される。また、本技術によって確立される新たな組織工学的手法は、上皮-間葉の相互作用により形成する多くの臓器・組織の生体外構築に適用できる可能性もあり、再生医療の中核技術の1つとして新しい治療法の進歩に貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Engineering a skin model containing hair follicles in vitro may be useful for screening of drug candidates. During embryonic development, hair follicle morphogenesis is triggered by the formation of hair follicle germs (HFGs) via interactions between the epidermal and mesenchymal layers. In this study, we demonstrated that HFGs can be prepared in vitro through the self-organization of mesenchymal and epithelial cells, thereby efficiently generating hair follicles even in in vitro cultures. We also fabricated skin model containing hair follicles using in vitro cultured hair follicles.

研究分野：組織工学、生物学

キーワード：毛包原基 培養皮膚 毛髪再生 マイクロウェルアレイチップ オルガノイド

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々の体表面を覆う皮膚は、表皮と真皮、毛包や皮脂腺などの皮膚付属器により構成され、表皮のバリア機能に加え、毛髪による紫外線からの保護や皮脂や汗による水分調節など様々な器官が関わって機能している。再生医療の分野では、表皮と真皮の2層構造を生体外で再現した培養皮膚と呼ばれる組織構築技術が開発され、薬物の透過性や刺激などを簡潔に予測できる画期的なツールとして製薬企業などで利用されてきた。しかし、従来の培養皮膚は備わるべき血管や神経、皮膚付属器が存在せず、構造が不完全であるため、創薬試験において大きな制約となっていた。近年では、バイオマテリアルや3Dプリンティング技術の発展により、血管や神経を組み込んだ培養皮膚の開発は世界中で進められているものの、いまだ毛包を含む培養皮膚モデルの作製には至っていない。

### 2. 研究の目的

皮膚には、膨大な数の毛包が存在するため、毛包を有する培養皮膚を構築するには、数百~千個の均質な毛包組織を調製する技術が必要であり、培養皮膚内でこの毛包組織が機能するように組み立てる技術の開発が不可欠である。近年、我々は、細胞の自発的な分離現象を発見し、これを応用して独自の細胞培養器を開発することで付属器の1つである毛包の原基を大量調製する技術を確立してきた (T. Kageyama et al., *Biomaterials*, 154, 291-300, 2018)。本研究では、この毛包原基を培養し毛包として成熟させた組織を培養皮膚に組み込み生体外で培養することで、皮膚付属器を有する培養皮膚を作製する。この際、発生過程で皮膚を構成する細胞が自己組織化して複雑な皮膚構造を形成するプロセスを生体外で再現することで、毛包の細胞周囲環境を精密に構築し、革新的培養皮膚の構築を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 毛髪モデルの生体外構築

ボールエンドミルを用いてオレフィン樹脂に直径1 mm、深さ500 μmの丸底微小ウェルを規則的に切削し、これをエポキシ樹脂に転写後、さらにポリジメチルシロキサン (PDMS) に転写することで、小さなウェルが培養器底面に高密度に設置された培養デバイスを作製した。この培養器に、マウス胎児から採取した上皮系細胞と間葉系細胞の混合液を播種した後、23日間培養を行った。培養後に形成した組織は、電子顕微鏡によってその構造を解析した。

#### (2) 毛髪モデルの薬剤応答試験

上記(1)の培養系において、毛幹様構造の形成と伸長を指標とすれば、発毛・育毛剤のスクリーニングが可能ではないかと考えた。この可能性を検討するため、美容クリニックで発毛剤として使用されている Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) を培養液に添加して評価した。

#### (3) 毛包組織を含む培養皮膚の構築

マウス胎児から採取した上皮系細胞と間葉系細胞の混合液を培養デバイスに播種した後、3日間培養することで形成した毛包原基を表皮角化細胞と真皮線維芽細胞を含む細胞懸濁液に混合し、セルカルチャーインサートに播種し、1日培養することで毛包原基を含むシート状組織を作製した。この組織を、ヌードマウスの背部皮膚を切除して作製した移植床に移植し、経時的に観察を行った。移植4週後の皮膚を採取し、組織切片の染色像により、形成した構造を解析した。

#### (4) 細胞外マトリクスを含む毛髪モデルの生体外構築

発生過程で毛包の形成が生じる際の毛包周囲環境の再現は、生体外で毛髪を効率よく再生するために重要と考えられる。そこで、基底膜由来の細胞外マトリクスを上皮系細胞と間葉系細胞の培養時に加えた条件で、毛髪モデルの形成効率が向上するかを評価した。作製した組織は、電子顕微鏡および組織切片の免疫染色により、その構造を解析した。

#### (5) 毛包組織を含む培養皮膚の生体外構築

上記(4)で再生した毛髪モデルを組み込んだ培養皮膚を再生するため、上皮系細胞と間葉系細胞の混合液を96ウェル型セルカルチャーインサートに播種して、長期培養を行った。形成した組織は、組織切片の染色像によりその構造を解析するとともに、形成した培養皮膚のバリア機能をTEER測定により評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 毛髪モデルの生体外構築

2種類の細胞の混合懸濁液を作製したPDMS製(酸素透過性)の培養デバイスに注ぐと、細胞は各ウェル内にほぼ一定の細胞数で播種されたのち、数時間後には、均一な粒径を持つ凝集塊を形成した。そして、培養3日目には細胞の自己組織化により、すべてのウェル内で毛包原基の形成が確認された。つまり、培養デバイスに細胞懸濁液を播種するといった簡便な操作のみで、一度に大量(5,000個まで実証済み)の毛包原基を調製することが可能であった。興味深いことに、同様の構造を持つアクリル製(非酸素透過性)の培養デバイスを用いて同様に大量培養を行ったところ、毛包原基は形成されなかった。したがって、培養器底面からの酸素供給が毛包原基の大量調製に重要であることを示唆している。また、培養3日間で形成された毛包原基をそのまま長期間培養すると、培養系において毛幹様の構造が徐々に伸長してくる様子が観察された(図1左)。培養23日目の毛幹様構造の電子顕微鏡像からは、生体の毛幹の基本的な構造であるコルテックスも確認されている(図1右)。

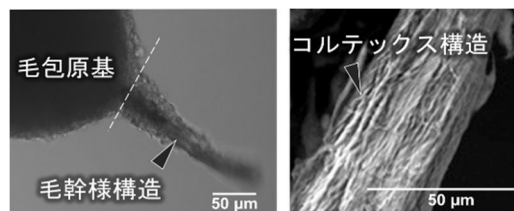


図1 毛包原基の長期培養で形成した毛幹

### (2) 毛髪モデルの薬剤応答試験

美容クリニックで発毛剤として使用されているFibroblast growth factor 2 (FGF)を培養液に添加して評価したところ、FGF-2を添加した場合は添加しなかった場合と比べて、毛幹様構造の形成効率が約6倍向上することが分かった(図2)。この結果は、従来のPCR法を用いた発毛関連遺伝子(Versican)の発現と関連した(図2)。ヒト毛包由来の2種類幹細胞を用いてこの実験を再現する必要があるものの、毛幹形成を指標とした薬剤評価やこれが形態形成に及ぼすメカニズムを詳細に解析できる可能性が示唆された。

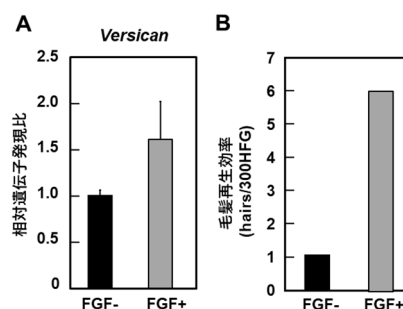


図2 毛髪モデルのFGFへの応答

(A)Versican 遺伝子発現、(B)生体外培養での毛髪再生効率

### (3) 毛包組織を含む培養皮膚の構築

表皮角化細胞、真皮線維芽細胞、毛包原基を混合した懸濁液を播種し、シート状にした組織をマウス背部に移植すると、表皮層と真皮層に加え、毛髪や皮脂腺などの皮膚付属器を有する皮膚が再生した(図3)。さらに、このような皮膚付属器を備えた培養皮膚を生体外で作製できれば、毛包に直接作用する薬剤のみならず、毛髪周囲の細胞活性を向上させることで連鎖的に発毛効果を示す薬剤についても、評価が可能になると考えられる。

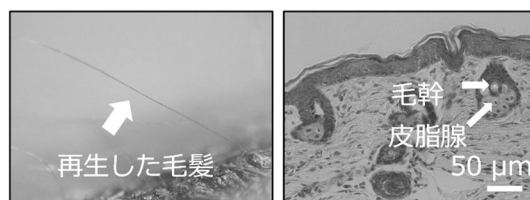


図3 毛包組織を含む皮膚の再生

(左)再生した毛髪(右)切片のHE染色像

### (4) 細胞外マトリクスを含む毛髪モデル

上記(1)-(3)の検討において、生体外で毛幹様構造の形成およびマウス皮膚欠損部に毛包組織を含む皮膚を再生できることを示した。しかし、培養条件が確立していないために、毛幹の形成確率は1/300程度と非常に低く、マウスへの移植なしでは毛包を含む皮膚の再生は困難であった。そこで、基底膜由来の細胞外マトリクスを培養液に混合し、上皮系細胞および間葉系細胞の三次元培養を行った。

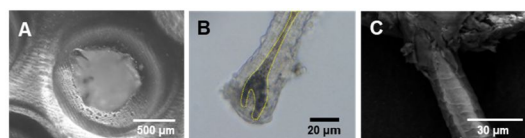


図4 生体外で再生した毛髪モデル

(A)培養デバイス内で形成したモデル、(B)黒色の毛髪の再生、(C)キューティクルの形成

2種類の細胞は、数時間で1つの凝集体を形成した後、3日間の培養中に各種細胞が自発的に分離することで毛包原基を形成し、培養4-6日目に毛包様組織を形成した。さらに培養を行うと、約9割以上の非常に高い確率で黒色の毛髪が伸長する様子が観察され(図4A, B)。形成した毛髪は特徴的なキューティクル構造を有していた(図4C)。培養後の組織切片の免疫染色像より、バルジの形成と毛根部でのメラノソームの輸送が確認された。このように再生した毛包組織は、生体再現性が非常に高く培養皮膚に組み込む毛包の再生方法として適していると判断した。

#### (5) 毛包を含む培養皮膚の生体外構築

培養皮膚を生体外で再生する方法として、セルカルチャーインサートを利用した積層培養が一般に用いられる。そこで、2種類の細胞をセルカルチャーインサート内で長期培養すると、約2週間の培養により、毛包と皮膚が同時に誘導され、皮膚内に毛包を含む組織体が形成された(図5)。本研究では、毛包を有する培養皮膚を生体外で構築するための基盤技術を開発した。今後、この培養皮膚を創薬

の分野に応用するためには、細胞をマウスからヒトに置き換えても、同様に組織が形成できるかを確認する必要がある。この際、どのような幹細胞を利用するか、幹細胞の機能維持培養をどのように行うか、ヒトの毛包形成に必要な因子として何を加えるかなど、検討すべき項目は多岐にわたるだろう。これらの課題を1つずつ解決することで、ヒト細胞由来の毛包を含む培養皮膚を構築し、皮膚疾患に対する新薬を開発するためのツールとして展開できるよう努力していきたい。

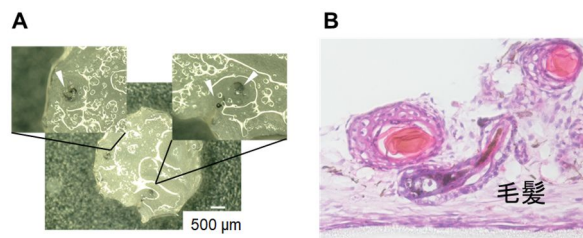


図5 毛包を有する培養皮膚

(A) 培養皮膚内で形成した毛髪、(B) 作製した皮膚組織の切片のHE染色像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tatsuto Kageyama, Chisa Yoshimura, Dina Mysnikova, Ken Kataoka, Tadashi Nittami, Shoji Maruo, Junji Fukuda	4. 巻 154
2. 論文標題 Spontaneous hair follicle germ (HFG) formation in vitro, enabling the large-scale production of HFGs for regenerative medicine	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 291-300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biomaterials.2017.10.056.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tatsuto Kageyama, Lei Yan, Akihiro Shimizu, Shoji Maruo, Junji Fukuda	4. 巻 212
2. 論文標題 Preparation of hair beads and hair follicle germs for regenerative medicine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 55-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.05.003">https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.05.003</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 5件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Tatsuto Kageyama and Junji Fukuda
2. 発表標題 Large-scale preparation of hair follicle germs for hair regenerative medicine.
3. 学会等名 The Korean Society for Biomaterials (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tatsuto Kageyama and Junji Fukuda
2. 発表標題 Large-scale preparation of hair follicle germs using hydrogel bioprinting.
3. 学会等名 International conference on biofabrication (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 景山達斗, 福田淳二
2. 発表標題 毛包ビーズを用いた毛髪再生技術
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第37回研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 景山達斗, 福田淳二
2. 発表標題 毛の種を大量につくるバイオ技術
3. 学会等名 第8回CSJ化学フェスタ2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 景山達斗, 福田淳二
2. 発表標題 毛包原基の大量調製技術を用いた毛髪再生医療
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 景山達斗, 福田淳二
2. 発表標題 毛包原基の大量調製および毛髪再生医療への応用
3. 学会等名 日本医工学治療学会第35回学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tatsuto Kageyama and Junji Fukuda
2. 発表標題 Dermal papilla cells-encapsulated hair beads for hair regenerative medicine.
3. 学会等名 ISSCR 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatsuto Kageyama, Chisa Yoshimura, Sugi Hirano, Keiichiro Kasai, Junji Fukuda
2. 発表標題 Hair follicle germ formation on oxygen-permeable microwell array chips for hair regenerative medicine.
3. 学会等名 11th world congress hair research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 景山達斗
2. 発表標題 微細加工技術を用いた三次元組織構築技術の開発
3. 学会等名 化学とマイクロナノシステム学会第39回研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 景山達斗, 福田 淳二
2. 発表標題 薬剤スクリーニングのための毛包オルガノイド
3. 学会等名 第29回日本色素細胞学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 景山達斗
2. 発表標題 毛髪再生医療のための三次元培養技術の開発
3. 学会等名 2019 年度 材料技術研究協会討論会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計7件

1. 著者名 吉村知紗, 景山達斗, 福田淳二	4. 発行年 2018年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 203
3. 書名 再生医療・創薬のための3次元細胞培養技術、毛髪再生医療のための毛包原基の大量調製技術	

1. 著者名 清水亮啓, 景山達斗, 福田淳二	4. 発行年 2018年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 311
3. 書名 創薬のための細胞利用技術の最新動向と市場, 創薬研究のための球状組織培養デバイス	

1. 著者名 景山達斗, 福田淳二	4. 発行年 2018年
2. 出版社 化学とマイクロ・ナノシステム学会	5. 総ページ数 1
3. 書名 化学とマイクロ・ナノシステム学会誌, 毛包原基の大量調製のためのバイオプリンティング技術	



1. 著者名 景山達斗, 福田淳二	4. 発行年 2018年
2. 出版社 バイオマテリアル学会	5. 総ページ数 2
3. 書名 バイオマテリアル -生体材料-, 毛包原基の大量調製技術を用いた毛髪再生医療	

1. 著者名 平野杉, 景山達斗, 福田淳二	4. 発行年 2019年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 420
3. 書名 再生医療の開発戦略と最新研究事例集, 毛髪再生医療の現状と実用化へ向けた課題	

1. 著者名 中嶋陸満, 景山達斗, 福田淳二	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 283
3. 書名 毛髪科学の新展開, 毛包原基の大量調製技術の開発	

1. 著者名 南茂彩華, 景山達斗, 福田淳二	4. 発行年 2020年
2. 出版社 ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 64
3. 書名 月刊「細胞」4月号, Hair on a chip のための生体外における毛包誘導技術	

〔出願〕 計7件

産業財産権の名称 再生毛の色制御方法、毛の再生方法及び毛包原基の製造方法	発明者 福田淳二, 景山達斗, 吉村知紗, 中嶋陸満	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/020185	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 細胞含有ハイドロゲル体及びその製造方法	発明者 福田淳二, 景山達斗	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/016332	出願年 2018年	国内・外国の別 外国
産業財産権の名称 間葉系細胞の培養方法、活性化間葉系細胞の製造方法、毛包原基の製造方法、間葉系細胞の活性化方法、及び上皮系細胞の活性化方法	発明者 福田淳二, 景山達斗, Yan Lei	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/038934	出願年 2018年	国内・外国の別 外国
産業財産権の名称 毛包原基及びその製造方法、並びに間葉系細胞の活性化方法	発明者 福田淳二, 景山達斗, 楯芳樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/040444	出願年 2018年	国内・外国の別 外国
産業財産権の名称 培養容器、及び細胞 - 担体複合体の製造方法	発明者 福田淳二, 景山達斗, Yan Lei	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-047298	出願年 2019年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 毛包原基及びその製造方法	発明者 福田淳二, 景山達斗, 清水亮啓, 中嶋陸 満, 穴竈理樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/031142	出願年 2019年	国内・外国の別 外国
産業財産権の名称 ファイバー担体 - 細胞含有ゲル複合体及びその製造方法、並びにファイバー担体 - 細胞含有ゲル複合体製造用キット	発明者 福田淳二, 景山達斗, 南茂彩華	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-204500	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<a href="http://www.fukulab.ynu.ac.jp/labmembers/kageyama.html">http://www.fukulab.ynu.ac.jp/labmembers/kageyama.html</a>
---

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
---------------------------	-----------------------	----