

令和 4 年 4 月 28 日現在

機関番号：82718

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K20208

研究課題名(和文)毛包を備えた皮膚モデルの作製技術の開発

研究課題名(英文)Engineering of a skin model containing hair follicles

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・「再生毛髪の大量調整革新技术開発」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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：動物実験に変わる *in vitro* 評価系として、培養皮膚モデルが注目を集めている。本研究では、従来モデルに欠けていた“毛包”を備えた培養皮膚モデルの構築を目的とした。成果として、毛髪再生能を有する上皮系細胞と間葉系細胞の自己組織化に適した培養環境を整えることで、培養皮膚内に毛包を備えた組織の構築に成功した。この培養皮膚モデルに毛髪形成に関わる因子を投与し、動物実験と同様の応答を示すことも確認している。本培養皮膚モデルは、新たな動物実験代替モデルとして期待できる。

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モデルは、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)：In vitro skin models have been expected as an alternative to animal experiments. In this study, we developed a method for the preparation of skin models containing hair follicles via self-organization of epithelial and mesenchymal cells. The effects of hair generation factors could be accurately determined using in vitro model. This in vitro platform will have a transformative impact on the development of new drugs and hair regeneration technologies as an alternative model to animal experiments.

研究分野：生物学、組織工学

キーワード：培養皮膚 毛髪再生 *in vitro*モデル 自己組織化

1. 研究開始当初の背景

培養皮膚モデルは、培養細胞を用いた試験で実現できなかった薬物応答を簡潔に予測できる画期的なツールとして利用されている。しかし現在のモデルは、皮膚に存在すべき毛髪や皮脂腺などの皮膚付属器をもたないために、スクリーニングの予測精度や評価できる項目が少ないことが課題である。つまり、皮膚付属器を有する培養皮膚モデルが求められている。近年、申請者は、皮膚付属器の1つである毛包の原基を大量調製する技術を開発し、この原基を長期培養することで生体外で毛髪を再生することに成功した。本研究では、この独自技術をもとに、生体外で毛包を備えた培養皮膚モデルの構築を目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、毛包を備えた培養皮膚モデルを構築することである。毛髪再生能を有する上皮系細胞と間葉系細胞をセルカルチャーインサートに播種し、各種培養条件(細胞数、培地成分、細胞外マトリクスなど)を最適化することで、生体外で皮膚モデル内に毛包を再生する手法を開発した。また、この皮膚モデルが毛髪に対する薬剤応答を評価するモデルとして利用できる可能性を検討した。

3. 研究の方法

毛髪再生能を評価する動物実験に hair reconstruction assay がある。この方法では、マウス皮膚に直径 1 cm 程度の傷口を作製し、そこに毛髪再生能を有する上皮系細胞と間葉系細胞を移植する。移植した細胞はホストからの栄養を受けながら増殖・分化することで、毛包を有する皮膚を形成する(図1)。

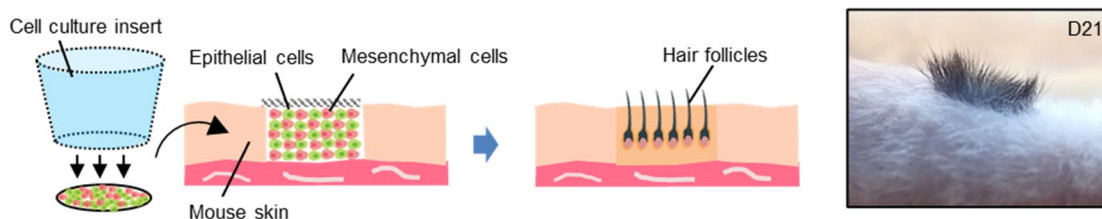


図1 Hair reconstruction assay

上皮系細胞と間葉系細胞を混合し、ヌードマウスの皮膚欠損部に貼り付ける。移植 21 日後には、毛髪を有する皮膚が再生する(写真)。

我々はこの動物実験を *in vitro* で再現することで毛髪を有する皮膚組織が再生できないかと考えた。そこで、C57BL/6 マウスの E18 胎児皮膚から上皮系細胞および間葉系細胞を酵素処理により単離し、これらの細胞を細胞比 1: 1 となるように混合後、96 well のセルカルチャーインサート内で 14 日間培養した(図2)。この際、総細胞数を 2×10^4 、 10×10^4 、 20×10^4 cells/well の 3 条件で、培地に添加するマトリゲルの濃度を 0、1、2、5、10 v/v% の 5 条件で最適化することで、毛髪再生に適した条件を決定した。最適化した条件で皮膚モデルを作製し、毛髪再生阻害効果のある PI3k/Akt pathway inhibitor、LY294002 に対する薬剤応答を hair reconstruction assay の結果と比較した。

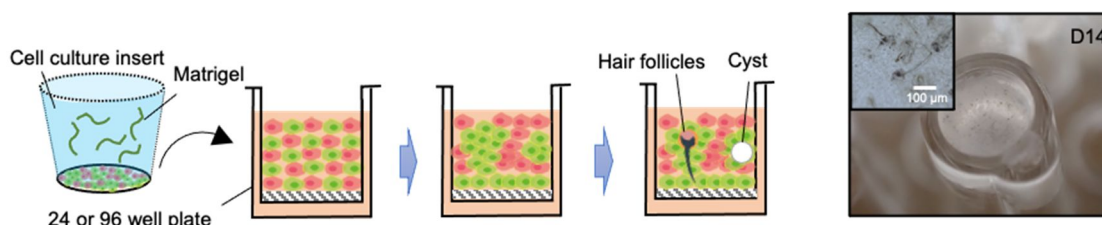


図2 開発した毛包付き培養皮膚モデルの作製方法

マトリゲルを含む培地でインサート培養を行うことで毛包を有する皮膚が形成される。培養 14 日後には、毛髪様組織の形成がみられる(写真)。

4. 研究成果

セルカルチャーインサート内で上皮系細胞と間葉系細胞の培養を行うと、2種類の細胞が自己組織化によりコロニー状の構造を形成し、そこから毛髪様組織が伸長する様子が観察された(図3A)。この毛髪様組織はマトリゲルの濃度に依存して増加し、10 v/v%のマトリゲル添加時でピークを迎えた(図3B)。毛髪様組織の長さは平均250 μmであった。しかし、この組織の断面を染色すると、表皮がメンブレン側、真皮が培養液側となり、予想される層配置とは逆転することがわかった(図3C,D)。組織構造としては、いまだ完全とは言えないものの、本手法は2種類の細胞をインサートに播種するだけで、高効率(~100%)で毛包を有する培養皮膚モデルを構築できる。このシンプルでスケーラブルなプラットフォームは、動物実験の代替モデルとして利用価値が高いと考えられる。

続いて、このモデルの薬剤応答性を評価した。PI3k/Akt pathwayは、毛包の発生と再生に重要な役割を果たしており、動物実験でのPI3k/Akt pathway阻害は、毛髪形成を阻害する。我々の皮膚モデルの細胞をLY294002(0、50、100 μM)で処理し、毛髪様組織の本数を観察すると、平均再生本数が有意に減少する様子が観察された(図4)。この結果は、我々の培養皮膚モデルでの薬剤応答が動物実験の結果を反映していることを示している。

本研究において、*in vitro*で毛包を有する皮膚を構築したことは注目に値するものの、皮膚の層配置など、生体とは異なる部分も多く存在する。今後、*in vivo*と*in vitro*の皮膚の違いを探り、培養皮膚モデルの質をさらに向上させる必要があるだろう。また本研究では、組織工学技術の確立のために毛髪再生効率が高いマウスの細胞を使用した。今後はヒト細胞に置き換え同様の検証を行う必要がある。これらの課題を1つずつ解決し、ヒト細胞からなるよりリアルな毛包付き皮膚モデルの構築を目指していきたい。

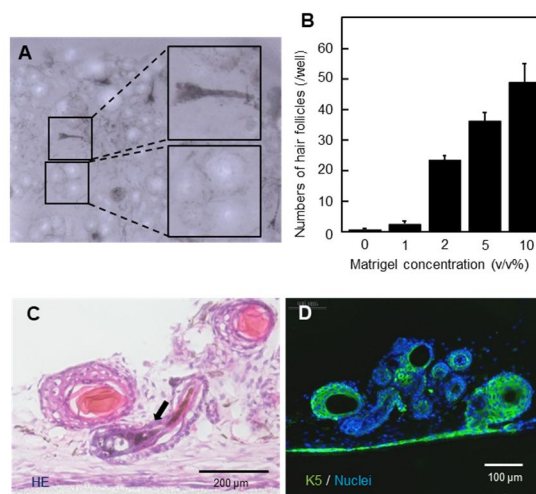


図3 作製した毛包付き皮膚モデル

A: 培養14日目の顕微鏡写真、B: マトリゲル濃度を変更した際に再生した毛髪様組織の数、C: 皮膚モデル断面のHE染色像、D: 皮膚モデル断面の免疫染色像(K5:緑)

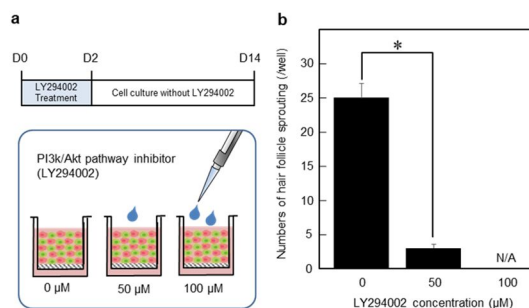


図4 LY294002への薬剤応答

A: 実験プロトコル、B: LY294002処理後の毛髪様組織の数

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakajima Rikuma, Tate Yoshiki, Yan Lei, Kageyama Tatsuto, Fukuda Junji	4. 巻 -
2. 論文標題 Impact of adipose-derived stem cells on engineering hair follicle germ-like tissue grafts for hair regenerative medicine	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2021.02.001	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 Kageyama Tatsuto, Chun Yang-Sook, Fukuda Junji	4. 巻 11
2. 論文標題 Hair follicle germs containing vascular endothelial cells for hair regenerative medicine	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-79722-z	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 Kageyama Tatsuto, Nanmo Ayaka, Yan Lei, Nittami Tadashi, Fukuda Junji	4. 巻 130
2. 論文標題 Effects of platelet-rich plasma on in vitro hair follicle germ preparation for hair regenerative medicine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 666 ~ 671
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2020.08.005	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tatsuto Kageyama, and J. Fukuda
2. 発表標題 Large-scale preparation of hair beads and hair follicle germs for regenerative medicine.
3. 学会等名 11TH WORLD BIOMATERIALS CONGRESS (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 景山達斗・福田 淳二
2. 発表標題 創薬及び毛髪再生医療のための毛包オルガノイド
3. 学会等名 第30回日本色素細胞学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

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 -
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2件

産業財産権の名称 毛髪再生能を有する細胞凝集塊の製造方法及びこれに関連する方法	発明者 福田淳二, 景山達斗, 穴竈理樹, 肥高龍彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-165888	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 移植用毛様組織及びこれに関連する方法	発明者 福田淳二, 景山達斗, 穴竈理樹, 肥高龍彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-165889	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------