

ヒト皮膚三次元モデル作製の留意点と展望

Key notes and prospects for the methodology of preparing on three-dimensional models of human skin

森山 博由
Hiroyuki MORIYAMA

近畿大学 薬学総合研究所 先端バイオ医薬研究室 准教授 (PI)
Pharmaceutical Research and Technology Institute,
Laboratory of Advanced Biomedical Products, KINDAI UNIVERSITY (Associate Professor (Principal Investigator))

森山 麻里子
Mariko MORIYAMA

近畿大学 薬学総合研究所 アンチエイジングセンター 客員准教授
Pharmaceutical Research and Technology Institute,
Anti-aging center, KINDAI UNIVERSITY (Visiting Associate Professor)

KEYWORD ▶

評価モデル

皮膚構成細胞

間葉系幹細胞

皮膚組織

ヒト三次元構成皮膚組織

はじめに

01

本稿では、ヒト皮膚の構造とヒト皮膚科学研究の現状を概説し、それらの知見からヒト皮膚三次元モデルを構築する際に重要な3要素を提案する。筆者がどのようにしてそれら3要素を選択しヒト皮膚評価モデルを構築したか、科学的知見の礎となった論文を踏まえ解説する。また現在研究中である新規ヒト皮膚三次元モデルの内容を紹介しつつ、ヒト皮膚科学の基礎・応用研究の展望について述べる。

ヒト皮膚の構造と科学研究の現状

02

皮膚は基底層から角質層へと常にターンオーバーを繰り返す表皮組織層と、それを支持している真皮層からなる最大の臓器である。さらに、皮膚に隣接した下部組織である脂肪組織および感覚器、機能的細胞種とも連携している。さらに、ヒト皮膚は多様な細胞・器官と連携することで、ヒト外表として物理的・生理学的機能を保っている。例えば、細菌やウイルスなどの侵入を防ぐランゲルハンス細胞などの免疫系の細胞、または有害な紫外線への防御能を有するメラノサイトなど、これら機能的細胞との連携は生体防御のフロントラインとして日々、皮膚の恒常性維持に貢献している(図1)。ゆえに、皮膚の生理学的な機能や体内側からの水分蒸散を防ぐなどといった物理学的な機能などの安定的な維持・いわゆる恒常性の理解は、生命医科学分野において重要な課題のひとつとなっている。実際、多くの病原体に対抗する皮膚感染防御能に関する創薬・臨床開発分野(生命医科学的実用化)や、健康な皮膚から心身のQOL(Quality of Life;生活および人生の質)を高めるためのサプリメントや化粧品の開発分

野(ヘルスケア産業製品化)、ナノ粒子等の先端分析評価のための材料工学としての人工皮膚、次世代型アンドロイドなどの人工皮膚、生体センサーとしてのセンシング皮膚の開発(先端工学科学応用化)など、皮膚の恒常性を解明する科学的成果が多分に寄与している派生分野をあげれば枚挙に暇がない。さらに近年では、内閣府より提唱されている我が国が目指す未来社会像たるSociety 5.0という社会モデル(https://www8.cao.go.jp/cstp/society5_0/)が唱道されている。それはサイバー空間(仮想空間)とフィジカル空間(現実空間)を高度に融合させたシステムにより、経済発展と社会的課題の解決を両立する、人間中心の理想空間社会である。このSociety 5.0の未来社会では、時間や空間の隔たりを埋めるために、高精度かつ評価・診断に必須なバイオモデルも重要なキートンとして位置づけられている。つまり、ここでも先鋭的な人工的ヒト皮膚およびそれをを用いた評価モデルの存在が重要視されている。しかしながら、このような背景・期待に積極的に貢献すべきヒト皮膚科学研究の実状といえば、細胞レベルや遺伝子組換えマウス動物モデルに依る研究が主体であり、ヒト皮膚組織を用いる多様な研究との連携もしくは移行へと転じたいものの、進捗に乏しい状態が続いている。背景には、動物実験倫理等に準じる側面からも動物を用いた生体実験が規制され続けていることも大きい。これは肝要な生命科学研究倫理であり無論に否定の余地はないが、皮膚科学研究の推進には実質的な足かせとなっている側面もみせる。だがなにより、適切な研究素材(使えるヒト人工皮膚)の開発状態が律速となっていること、これが問題の中心に位置し続けていることに目を背けてはいけない。この潮流は、とりわけ産学の研究開発環境の閉塞を醸し出す傾向まで生じている現状からも、決して看過できない。つまりは「機能的な研究開発基材としてのヒト皮膚三次元評価モデルの不在」こそが、上述の諸問題の解決を阻む大きな壁なのである。そこでこの障壁を打破する一助たるべく、ヒト皮膚三次元評価モデル作製の在り方や作製における留意点を整理し、

科学的な観点をベースとした述懐的考察と提言を進めたい。

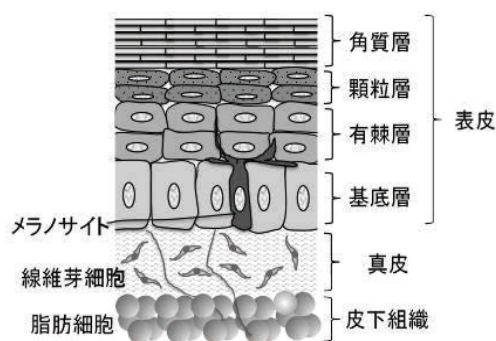


図1 簡素化したヒト皮膚の基本構造

評価系に適切な ヒト皮膚評価モデルの構成要素

03

ヒト皮膚評価モデルを構築する際には、細胞の種類・ソース、細胞の位置・配置、組織（層）間の連絡という、少なくとも3点の要素が重要となる。これらの要素の選択を執り決める際には、必要十分にして最低限なことは何であるか、それらを意識しつつ、研究従事者や評価者が求める内容を正確に反映するような要素を峻別する必要がある。そのための一助として、ヒト皮膚組織を図1のように皮膚層・皮下組織層までの層組織連絡体としてのエッセンスを抽出し、必要最低限にシンプルな構造として捉えることが有用である。これには、ヒト皮膚評価モデルを構成する、表皮組

織層や真皮組織層の構成要素について、必要条件を満たす最低限の項目を精査・選別することが有効である。つまり、ヒト皮膚モデルを構築するうえで重要な3要素をどのように構成し、目的にあった評価系に資する研究素材としてヒト皮膚評価モデルに落とし込むかが鍵となる。

細胞の種類・ソースの選択

04

購入可能な初代細胞、および株化された細胞ソースとして、ヒト表皮細胞 [human primary epidermal keratinocytes (HPEK)] やヒト線維芽細胞 [human dermal fibroblasts (HNDF)]、またはヒト間葉系幹細胞（一般的なヒト脂肪由来幹細胞） [adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells (hASCs)] などが存在する^{1, 2)}。これは使用する細胞の選択性を拡げるうえでもたいへん有用である。我々の研究室では、ヒト皮膚に近い条件を必要とするデータ取得および評価が必須なため、市販の初代細胞および、適切な倫理下において共同研究機関から供与いただいているヒト由来初代細胞の種々を目的に応じて選択または複合して用いている。実際、これらの細胞種の特性については、その科学的な理解を深める興味深い知見が得られている。

筆者らはヒト真皮から正確に分取したHNDFとヒト皮下組織から正確に分取したhASCsを用い、これら細胞のおもだった細胞表面マーカーを調べたところ、そのプロファイルに際立った差異は生じていないことが分かった（図2a）³⁾。また、両者の間葉系幹

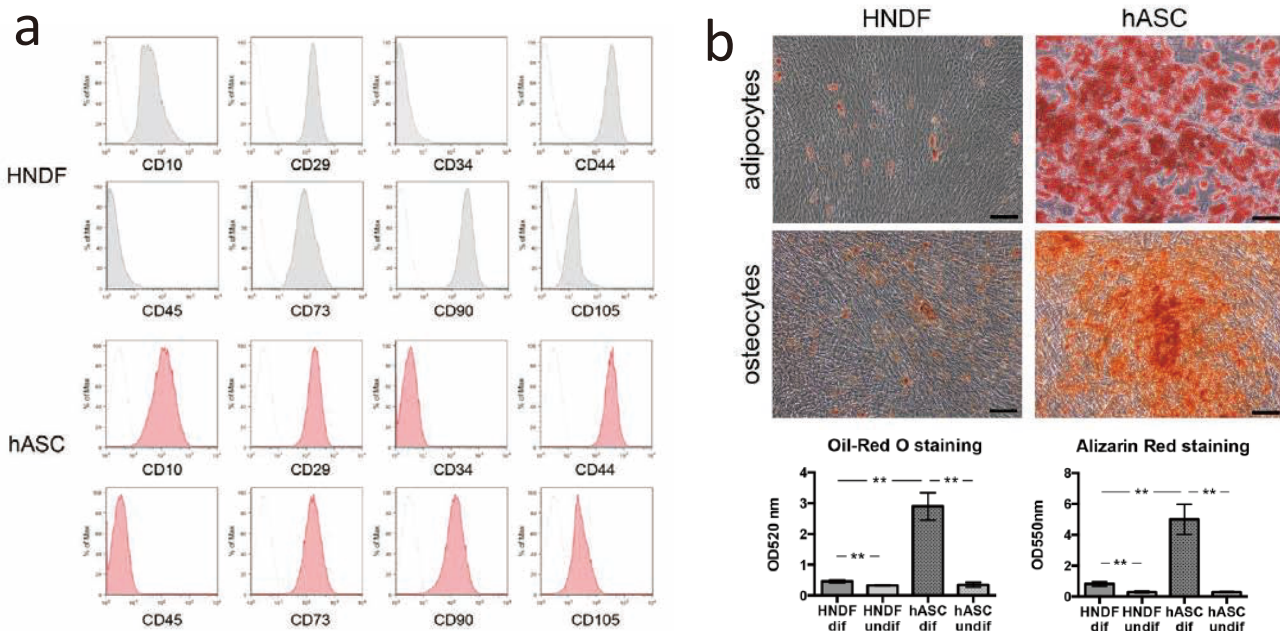


図2 ヒト線維芽細胞(HNDF)とヒト脂肪由来幹細胞(hASCs)の性状細胞表面マーカーの比較

(a) フローサイトメトリー法による細胞表面マーカーの比較 (b) HNDFとhASCsの分化能特性の評価 adipocytes: 脂肪細胞, osteocytes: 骨細胞。Oil-Red O染色: 脂肪細胞の含有する油滴の染色 (= 分化した脂肪細胞)。Alizarin Red 染色: 骨分化細胞に沈着したカルシウムの染色 (= 骨細胞)。写真は分化像を示している。グラフは全ての細胞から抽出した染色物の吸光度を示した(ただし, dif = 分化誘導処理あり, undif = 分化誘導処理なしの状態を表す)、複数回の独立した実験から得られた統計学的データであることを示す。* P < 0.01。スケールバー: 200 μm。

細胞への分化能については、分化能を携えた細胞集団の様相に著しい差異が生じるものの、両者には少なくとも分化能を示す集団の存在が確認された(図2b)³⁾。これらの結果は、従来のマーカー分類法のみによるHNDFとhASCsの分別は難しいことに加え、興味深いことに、一般的にHNDFは分化能を有さないと考えられているが、実際にはHNDFにも多分化能を示す細胞が一定数含まれていることを示す。つまり、真皮層のHNDFには、真皮層と密に隣接する脂肪組織にあるhASCsに極めて類似した性状をもつ集団が存在しうることを想起させる。これらの結果は、未同定の真皮線維幹細胞の存在や、未同定のヒト脂肪由来幹細胞の亜集団が線維芽細胞様細胞へ遷移する可能性なども示唆しており、皮膚組織(皮膚・皮下組織)の新規細胞や機能の発見につながる事が期待される。これらの考察を背景に、筆者らは、現状までに理解できうる皮膚・皮下組織を構成する細胞の性状を精査し、ヒト皮膚三次元モデル作製の主要細胞ソースとしてHNDFおよびhASCsに注視し、それらの皮膚組織層における局在や性状が皮膚バリアのフロントラインである表皮層にどのような影響を及ぼすかについて検証した。

(層)間の連絡を考慮することは必須の要件である。これらの利用を熟考するうえで、HNDFまたはhASCsにおける上皮層への影響を探索する必要がある。そこで、HNDFまたはhASCsを評価対象細胞とした種々の共培養系を試行し、これら細胞の位置・配置が表皮の発達に及ぼす影響を評価する系を構築した(図3)。このとき、評価対象細胞の特性を評価する共培養系はおもに2つの系に分かれる。ひとつはオプションリング(関東化学株式会社製)をキーツールとした両面培養系(Double sided co-culture)であり、もうひとつは培養インサートをツールとした共培養系(Separate culture)である。前者のオプションリングを活用した両面培養系では、インサート外の底面に評価対象細胞を、インサート内の底面にヒト表皮細胞(HPEK)を播種し、膜を境に細胞(層)間を可能な限り密接させた共培養系である点がポイントである(図3a)。後者の共培養系では、培養プレート底面に評価対象細胞を、セルカルチャーインサート内にHPEKを播種した共培養系であり、それぞれの層間の距離を保った培養系である点がポイントである(図3b,c)。本評価系は、これらの空間的に解釈を分けられる基礎的な2つの評価系に加え、両面培養時におけるセルカルチャーインサート底面の基材(以下、セパレータ基材)として、コラーゲンのみで膜が形成された関東化学株式会社製のad-MED ビトリゲル[®]2(以下、コラーゲンビトリゲル[®]膜)⁴⁾と、ポリカーボネート(PC)膜の2種類のセパレータ基材を用いること、共培養時はポリエチレンテレフタレート(PET)膜を加えた3種類のセパレータ基材を用いることにより、細胞(層)の足場や接着性などの性状をも考慮できるパラメータを加えた多角的な培養

細胞の位置・配置と組織(層)間の連絡

05

ヒト皮膚三次元モデル作製においては、これを形作る細胞の位置や配置、またそれらを考慮して構成される組織と、他の組織

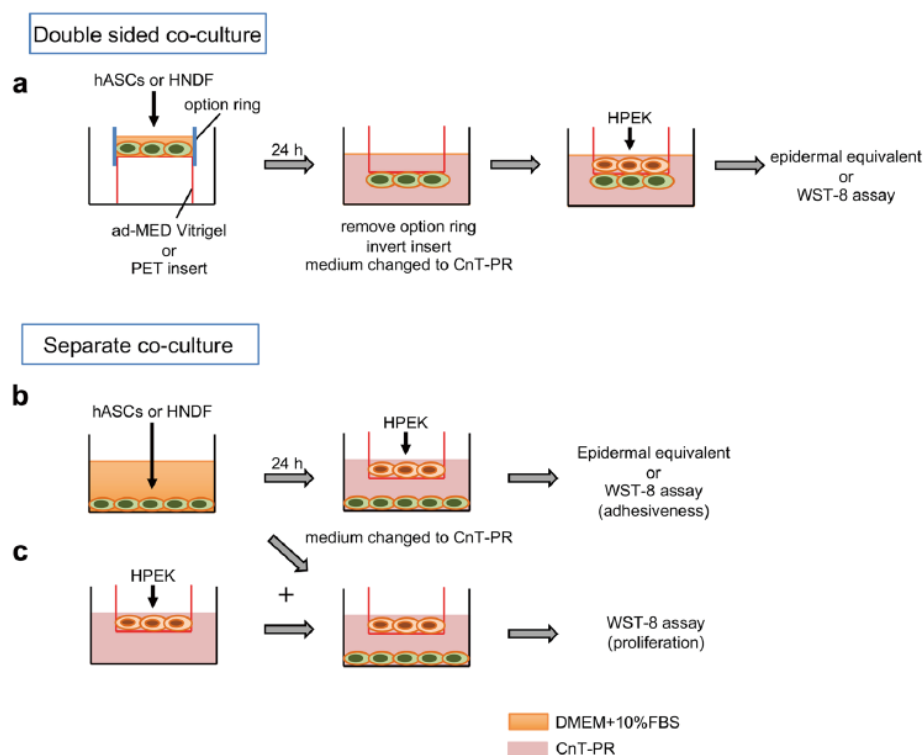


図3 共培養系の概略図 (a)両面培養系 (Double sided co-culture) では、オプションリング(関東化学株式会社製)を使用してヒト線維芽細胞(HNDF)またはヒト脂肪由来幹細胞(hASCs)をad-MED ビトリゲル[®]2(関東化学株式会社製)の裏面に播種し、ヒト表皮細胞(HPEK)をインサートの内側に播種した。(b、c)共培養系 (Separate culture)では、hASCまたはHNDFのいずれかを12ウェル培養プレートに播種した。(b)接着性アッセイでは、hASC/HNDFを播種してから24時間後にHPEKを培養インサートに播種した。(c)ヒト人工表皮の再構成、増殖アッセイでは、HPEKを培養インサートに播種し、24時間インキュベートした。次に、インサートをhASC/HNDFが播種された12ウェル培養プレートに配置した。

実験系となっている。以上の特色を有した共培養系(両面培養と共培養)およびセパレータ基材の違い(コラーゲンビトリゲル®膜とPET膜、PC膜)を組み合わせた培養系において、HNDFおよびhASCsの有する皮膚組織層における局在や性状の評価を行った。このとき、それらの作用を評価する対象細胞としてHPEKを選択した。当然ながら、表皮構成細胞であるHPEKは、皮膚の中で最もターンオーバーに富み、分化成熟を繰り返す皮膚の最外表組織体として恒常性のゲートキーパーを担っているため、ヒト皮膚生体内で起こる様々な要因の影響を最もセンシティブに感受する細胞集団である。そのため、本実験系の評価対象細胞としてHPEKは最も至適かつ、その影響の度合いを測るセンシング細胞として適切な素材なのである。実験系では、コンディションを整えて正確に維持したHPEKを、セパレータ基材上に正確な密度を計算して播種し、そこに評価対象細胞とともに培養する環境に暴露させ、各条件が均等となるよう精緻な培養実験を行った(図3)。その後、それぞれの実験系に暴露され得られた評価対象細胞であるHPEK(層)は、さらに気相-液相培養法にてヒト人工表皮の再構成物(以下、再構成表皮)に分化成熟させ、それを詳細に解析することも加え、HNDFおよびhASCsの有する皮膚組織層に与える影響について、生体皮膚組織の構築作用に近似した系にて総合的に評価した。

その結果、コントロール群となる、HPEKのみを各種セルカルチャーインサートへ播種しそこから作製された再構成表皮について、HE(Hematoxylin Eosin)染色にて表皮組織の構成を比較解析したところ、各種のセパレータ基材(コラーゲンビトリゲル®膜、PET膜およびPC膜)の違いに顕著な差はなく、全て健全な再構成表皮の組織層の構造が観察された(図4:ControlのHE染色パネル群)。ただし、コラーゲンビトリゲル®膜を用いた再構成表皮については、他のものと比べ、やや整然とした表皮組織層(図1)の構造が観察される傾向にあった(図4)。この点は、ヒト皮膚三次元モデル作製における生体の摸倣膜の選択性の観点に興味深い考察を与える。さらに、両面培養系(図4:Double-Sided実験データの各カラム)または共培養系(図4:Separate実験データの各カラム)で示した、HNDFまたはhASCsとの共培養実験において、コラーゲンビトリゲル®膜上で培養されたHPEKからなる再構成表皮にのみ、controlに比べ、より厚く豊潤に、さらに表皮組織も整然と形成されていることが観察された(図4:各HE染色像のカラム)。そのうえ、コラーゲンビトリゲル®膜を用いて両面培養を行った再構成表皮の基底層において、増殖マーカーであるp63の免疫蛍光染色を実施したところ、コントロールと比較してp63陽性細胞の数はHNDFまたはhASCsのいずれにおいても増加していた(図4: Double-Sided実験データのp63

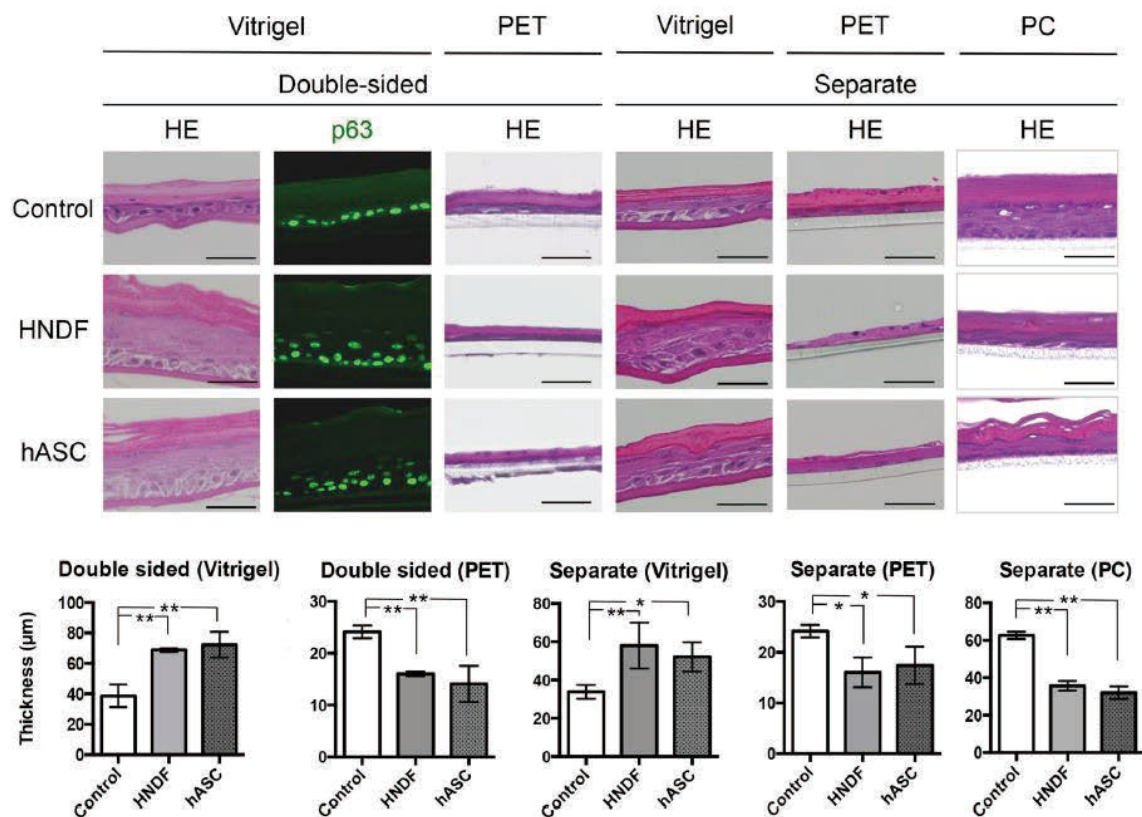


図4:コラーゲンビトリゲル® (関東化学株式会社製ad-MED Vitrigel® 2:Vitrigel®)、ポリエチレンテレフタレート (PET)、およびポリカーボネート (PC)インサートを用いた共培養系で再構成されたヒト人工表皮の比較 インサート表面にヒト表皮細胞 (HPEK)を配置し、ヒト線維芽細胞 (HNDF)またはヒト脂肪由来幹細胞 (hASCs)をインサート裏面に配置した両面培養 (Double-sided)、もしくは培養プレート底面での共培養 (Separate)にて14日間培養した。HPEKのみ(共培養なし)から再構成されたヒト人工表皮を対照とした。これらヒト人工表皮について、ヘマトキシリンおよびエオシン (HE)染色による組織評価、ならびにp63 (緑色)に対する免疫染色による組織評価を行った。グラフは、複数回の独立した実験から得られた統計学的データ、および皮膚の表皮全体の厚さの平均±SD値をマイクロメートル単位で表す。** P < 0.01、*P < 0.05。スケールバー:50 μm。

免疫染色カラム)。これらのデータは、HNDFもしくはhASCsを播種したコラーゲンビトリゲル®膜との両面培養組織と融合したHPEK、ならびにコラーゲンビトリゲル®膜に隣接したHPEKは、生体の作用に近似した正の影響が与えられ得る可能性があることを示している。つまりは、コラーゲンビトリゲル®膜とHPEKの隣接の条件は、コラーゲンビトリゲル®膜内の貫通孔の構造をも加味すると、近接する皮膚組織構成細胞(HNDFもしくはhASCs)・その細胞群を包含する組織間の作用に重要な働きを担うこと、ならびに、これらの細胞のいずれからでも放出されている因子の作用を受け入れるにも有用であることを示している。これに対し、PET膜またはPC膜インサートを用いた共培養ではHPEKに際だった影響が観察されなかったため、共培養や両面培養の影響が十分には活かされていないことが示唆される結果となった。

これらの知見は、ヒト皮膚評価モデルを構築するうえで、ヒト皮膚組織を構成する細胞の性状およびその配置や状態、ならびに組織(層)間連絡の理解を深めたいへん重要な知見である。今回、共培養系を構築する際に用いたセルカルチャーインサートは、細胞の接着性や浸潤性などを測る器材として活用出来ることは広く知られている。その一方で各種のセルカルチャーインサートを用いた共培養・両面培養システムは、種々の細胞を評価するのみならず細胞間での情報連絡を評価する系としても有効に活用できるものと考ええる。とりわけ今回取り扱ったコラーゲンビトリゲル®膜は、細胞が分泌する液性因子や細胞が産生するExtracellular matrix(ECM)に類する素材として考えられるため、これに隣接する細胞もしくは組織間の性質や性状を、おそらくより生体にミミック(生体に近い状態に組織科学的に近似均整化)するための至適な器材のひとつとして有効と考えられる。

いているため、さらなる改善と改良が求められる。その指針のひとつに、ヒト脂肪由来幹細胞(hASCs)の活用がある。先述のとおり、一部のhASCs亜集団の性状はHNDFと類似しつつ、HNDF中にも終末分化が可能な間葉系幹細胞が混入していることから、HNDFの中にもhASCsが存在しているものと考えられる(図2)。実際、真皮にもhASCsが局在しているとの報告もある^{6,7)}。これらの事実は、真皮層ならびに皮下組織の相互作用を取り込むうえで、有効な論拠のひとつと考えられる。さらに、hASCsはさまざまな増殖因子を分泌しており、皮膚のハリや弾力に必須であるコラーゲンを、自発的に産生する能力も有する⁸⁾。事実、図3、4の実験結果からも、hASCsにはHNDFに劣らない、再構成表皮豊潤化の作用が備わっていることが伺える。実際、この性質を応用しTrottierらは、より分化誘導を行った脂肪細胞を真皮代替品として使用し、ヒト皮膚三次元組織の作製にも成功している⁹⁾。さらに筆者らがこれまでに開発した、低酸素培養法により生体内環境に近似した状況において作製したhASCsを用いることで¹⁰⁾、より実質的な真皮層および皮下組織の構築も可能となる。この方法は現在もアップデートを重ねており、現状ではよりコラーゲン産生能を亢進するhASCsの亜集団も分取・維持もしくは作製が可能である。このようなhASCsの亜集団、HNDF、およびそれぞれの細胞から産生されるコラーゲンをヒト皮膚三次元モデルの原料とした「細胞の組織内での自己再構成を誘発する疑似真皮層の作製」は、より実質的なヒト皮膚モデルの作成のためにたいへん有用な概念のひとつと考えられる。さらに、密性結合組織である真皮の環境のうち、コラーゲンやエラスチンおよび基質等の結合性や配座も、できる限り生体に近い状態で付設することが望ましい。この観点については、後述するプリンティング技法などを用いた物理的な配座方法の検討や、組織包埋前の化学的架橋処理による部分的なECM体を形成することが有効と思われる。

人工真皮層の作製事例

06

現在までのヒト皮膚評価モデルを俯瞰すると、生体内の真皮層を大雑把に模倣したヒト皮膚三次元評価モデルは未成熟な状態であり、実用的なレベルでの表皮-真皮層の相互作用の探索や評価系構築のためにもより成熟したモデルの登場が待たれる状況にある。先例では、これまでにコラーゲンゲルで包埋したヒト線維芽細胞(HNDF)を疑似真皮層とし、その表面で気相-液相培養したヒト表皮細胞(HPEK)を疑似表皮層として構築した形態のヒト皮膚三次元組織が報告され、利用も始まっている⁵⁾。確かに、本法はシンプルな構造体としての疑似人工真皮層を有し、これまでより人工皮膚組織を長く維持できるなど画期的なものである。本稿でも述べてきたように、ヒト皮膚組織の構成要素をシンプルに分解・再構成して理解し、疑似真皮層を整然と作製することが評価系の組織構築ではとても重要な要因となる。その意味合いにおいて、この疑似真皮層の作製は一定のブレークスルーを得たものと捉えられる。しかしながら、コラーゲンゲルで構成された環境内にHNDFをどのように配置すべきか、疑似真皮層内のHNDFの自由度や疑似真皮層下部からの影響などの要因を欠

ヒト初代皮膚構成細胞の特性を最大限に利用したヒト皮膚三次元モデル開発の試み

07

筆者らもこれまでにヒト脂肪由来幹細胞(hASCs)を真皮代替品、hASCsより分化誘導した脂肪細胞を皮下組織代替品としたヒト皮膚三次元モデルのプロトタイプを作製している。このヒト皮膚三次元モデルに向かうまでの過程で、再構築した表皮層の厚みの制御や豊潤化などが誘導できるようになるなど、成果やノウハウも蓄積されてきている。基本的にhASCsは、多数の終末分化細胞(種)への分化能を有することに加え、様々な成長因子やサイトカイン、細胞外小胞(EVs: Extracellular Vesicles)をも分泌していることから、ヒト皮膚三次元モデルにおいて血管や免疫細胞などの導入を誘引するなど、広義のtrophic効果(組織修復、健常化、保護作用)も期待できる。我々の研究室でも検証を重ねているところではあるが、hASCsのパラクライン効果によってヒト皮膚三次元モデルプロトタイプを構成する細胞(層)への血管誘導作用も一部観察されている。しかしながらこれまでのプ

ロタイプは、本稿で述べてきた「細胞の種類・ソース、細胞の位置・配置、組織(層)間の連絡」を再現性良く満たす状態には届いておらず、技術的にいくつかのハードルが存在していた。とりわけ「細胞の位置・配置の制御」は際だった問題であった。この問題を解決するため、近年に活用の幅が広がっている3Dバイオプリンティング技術の活用を検討した。

開発段階であるため、作製工程の詳細説明は割愛させていただくが、筆者らがヒト皮膚三次元モデル開発の技術革新を図っているシステムの概略を示す(図5)。本稿で示してきたヒト初代皮膚細胞や、ヒト皮下組織に含まれるいわゆるhASCs、および、さらにhASCsより高解像度の幹細胞亜集団(ヒト脂肪由来間葉系間質細胞の純種により近似した細胞集団)、ならびにそれらの産生する生体因子を主たる素材(種類や量もバイオプリンティング用インクの配合成分としてもたいへん有用)を選択している。

さらに、前項で示したコラーゲンビトリゲル[®]膜ならびにオプショニング(いずれも関東化学株式会社製)を技術として活用した両面培養システム、ならびに生体由来ECMを適切に配合したバイオインク(含:模擬的な間充組織液としての用途)等の新規素材の開発、かつこれらを統合してアセンブルできる3Dバイオプリンティング技術を統合して、「細胞の種類・ソース、細胞の位置・配置、組織(層)間の連絡」の概念を反映したヒト皮膚三次元モデルの作製・醸成段階に入っている。ここから作出されるヒト皮膚三次元モデルは、一部の細胞(群)は分化誘導を行う必要があるが、ほとんどは細胞の分化の有する分化方向性や能動的移動・

配座といった自己再構成を促せるように計算・配置された数理的なCADデザインモデルから創出された画期的なシステムとなっている(未発表データ、特許出願準備中)。この新タイプのヒト皮膚三次元モデルは、表皮層、真皮層、皮下組織を携えたモデルであることから、これまでのモデルよりヒト生体の皮膚に近似した組織体である点が長所である。また、このヒト皮膚三次元モデルのキーとなる構成細胞に予め時間空間的な自由度を与えることで、本来の細胞性状を拘束しない、いわゆるエンドジナスな細胞の挙動を観察・評価することが可能な面でも非常に興味深い、全く稀有な新世代のヒト皮膚三次元モデルといえよう。一方で、精度の高い再現性等、いくつかの課題も抱えている。現在、それを解決する科学的なアイデアを試行錯誤し、徐々に開発の懸念や構築時間軸等の律速も解消され始めてきている。この概念を有した三次元モデルは二次元モデルでは図りし得ない有用性をもつことが期待できる。

例えば、皮膚のバリア機能や水分保持量などについて評価研究を行うためには、ケラチノサイトなどを用いた二次元培養系では、生体に近似したデータは得られにくい。二次元培養系から得たデータの有用性を確認するためにも、より生体に近似したヒト皮膚三次元モデルは非常に有用である。さらに、美白機能成分の評価系として、このヒト皮膚三次元モデルに機能性細胞体の一種であるメラノサイトを表皮層へ組み込むことにより、実際の皮膚のようにメラニン色素を持ったヒト皮膚三次元モデルを作製できる可能性がある。実際、我々の研究室において、hASCsを神経堤細胞へ分化させたのちメラノサイトへと比較的短時間にて分化

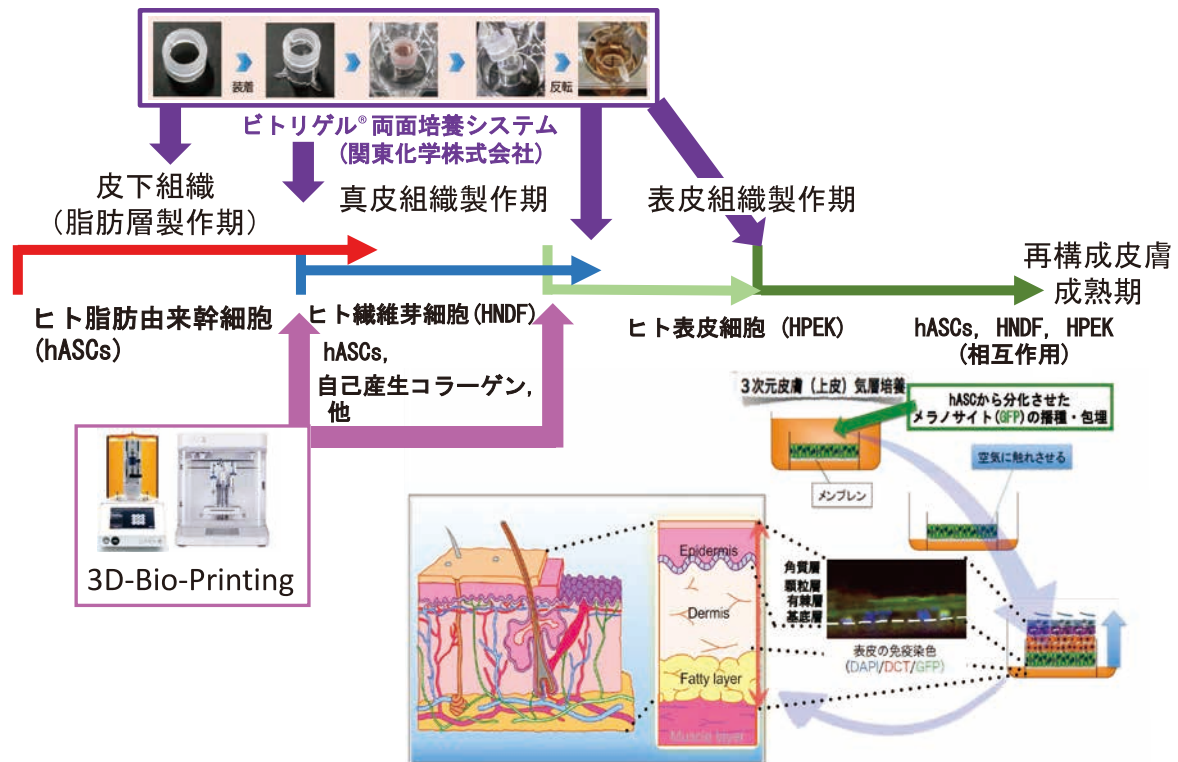


図5 ヒト初代皮膚構成細胞種を用いたヒト皮膚三次元モデルの開発スキーム

誘導を完了できる新しいメラノサイト作製プロトコルの開発にも成功している(特許出願準備中)。この方法によりヒト皮膚の組織学的種類および個人単位でのメラノサイトの作製も可能となる。このように、特異的なヒト皮膚三次元モデルを精確に活用することにより、動物実験の3Rs(Reduction:削減、Refinement:苦痛軽減、Replacement:代替法利用)遵守の全てに通底するReplacementに与する、まさに実験動物に頼らない、ヒト皮膚科学における新領域vivo研究の推進が為し得られるものと感じる。その先、または併行して可能な実用化研究の面からも、このヒト皮膚三次元モデルは、精度の高い解析に適する、より効果的な薬剤の創製やドラッグリポジショニング・スクリーニングは勿論のこと、機能性香粧品の開発や安全性・安定性評価にも革新を与えるものと思われる。

おわりに

08

本項の冒頭において機能的な皮膚評価のみならず、皮膚科学および皮膚科学関連分野の進展を阻害している、「機能的な研究開発基材としてのヒト皮膚三次元モデルの不在」という問題が生じていることを記した。この問題を根本的に解決すべく、筆者らがどのようにして、ヒト皮膚モデルを構築しているかを示した。ヒト皮膚評価モデルを構築する上で、皮膚構成細胞の種類やソースの理解と選択、選択した皮膚構成細胞の組織内における局在・位置・配置、細胞間または組織(層)間の連絡という3要素を、どのように理解し目的にあった評価系に資する「ヒト皮膚三次元評価モデルの作製につなげるか」について論じてきた。そのためには、シンプルな評価系から理解し、そこから得た知見を高次元のモデルへと連結させていくことの重要性を示した。さらに従来の方法に捉われず、その時々において利用可能な既存技術や製品を、積極的に評価モデルへと取り込んでいくことの有効性も実証した。そのうえヒト皮膚評価モデルの機能性をあげるために、機能性細胞等をヒト皮膚三次元モデルへ組み込むといった、評価目的にかなったヒト皮膚三次元評価モデルへアップデートする有用性も提案した。このような試みはすべて、皮膚科学・幹細胞生物学の基礎的な積み重ねから論理的に思考試作されるものであり、その結果のフィードバックこそが「ヒト皮膚三次元評価モデル作製の展望」となる。例えば、筆者らが探求をつづける「真のヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の同定とそのオントロジー(存在論)」や「皮膚に存在する幹細胞の同定」など、未到の研究領域にアクセスする真摯な基礎研究から徐々に紡ぎ出される事実は、常にヒト皮膚三次元評価モデル作製に応用されている。この未同定な細胞を明らかにし、皮膚・皮下組織の構築にフィードバックすることは実に象徴的な例証に思える。日進月歩で進捗する皮膚科学や幹細胞に係る研究成果は枚挙に暇がない。これらをより統合的に理解すると同時に、それら独自の観点や切り口から「新次元のヒト皮膚評価モデルの創製」を期待する。しかしながらその時間を切り取った時点で、目的に対し有効に機能するので

あれば、本稿で示した内容物が一助となることを期待する。今後も歩み続ければ近い将来、実用化のステージへとあがり序論で述べたような多分野において、裾野広く有効活用されることを期待している。

参考文献

1. Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Haruki Isshi, Shin Ishihara, Hanayuki Okura, Akihiro Ichinose, Toshiyuki Ozawa, Akifumi Matsuyama, and Takao Hayakawa. Role of Notch Signaling in the Maintenance of Human Mesenchymal Stem Cells Under Hypoxic Conditions. *Stem Cells Dev.* 2014, 23, 18, 2211-2224.
2. Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Toshiyuki Ozawa, Daisuke Tsuruta, Taro Iguchi, Satoshi Tamada, Tatsuya Nakatani, Koichi Nakagawa, and Takao Hayakawa. Notch Signaling Enhances Stemness by Regulating Metabolic Pathways Through Modifying p53, NF- κ B, and HIF-1 α . *Stem Cells Dev.* 2018, 27, 13, 935-947.
3. Mariko Moriyama, Shunya Sahara, Kaori Zaiki, Ayumi Ueno, Koichi Nakaoji, Kazuhiko Hamada, Toshiyuki Ozawa, Daisuke Tsuruta, Takao Hayakawa, and Hiroyuki Moriyama. Adipose-derived stromal/stem cells improve epidermal homeostasis. *Sci Rep.* 2019, 9, 18371.
4. Toshiaki Takezawa, Katsuyuki Ozaki, Aya Nitani, Chiayuki Takabayashi, and Tadashi Shimo-Oka. Collagen Vitrigel: A Novel Scaffold That Can Facilitate a Three-Dimensional Culture for Reconstructing Organoids. *Cell Transplant.* 2004, 13, 463-473.
5. Satoshi Kano, Hiroaki Todo, Kenichi Sugie, Hidenori Fujimoto, Keiichi Nakada, Yoshihiro Tokudome, Fumie Hashimoto, Kenji Sugibayashi. Utilization of Reconstructed Cultured Human Skin Models as an Alternative Skin for Permeation Studies of Chemical Compounds. *AATEX.* 2010, 15, 2, 61-70.
6. Shohei Wakao, Masaaki Kitada, Yasumasa Kuroda, Taeko Shigemoto, Dai Matsuse, Hideo Akashi, Yukihiro Tanimura, Kenichiro Tsuchiyama, Tomohiko Kikuchi, Makoto Goda, Tatsutoshi Nakahata, Yoshinori Fujiyoshi, and Mari Dezawa. Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011, 108, 24, 9875-9880.
7. Haruyo Yamanishi, Shigeyoshi Fujiwara, and Tsutomu Soma. Perivascular localization of dermal stem cells in human scalp. *Exp. Dermatol.* 2011, 21, 70-80.
8. Mélanie Vermette, Valérie Trottier, Vincent Ménard, Lucie Saint-Pierre, Alphonse Roy and Julie Fradette. Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials.* 2007, 28, 18, 2850-2860.
9. Valérie Trottier, Guillaume Marceau-Fortier, Lucie Germain, Caroline Vincent and Julie Fradette. IFATS Collection: Using Human Adipose-Derived Stem/Stromal Cells for the Production of New Skin Substitutes. *Stem Cells.* 2008, 26, 10, 2713-2723.
10. 森山 博由, 森山 麻里子, 早川 堯夫, 松山 晃文, 脂肪組織由来体性幹細胞の製造方法. 特許 第 6209377 号, 優先日 20120711.