

【要約】

Establishment of a new three-dimensional
human epidermal model reconstructed from
plucked hair follicle-derived keratinocytes

(抜去毛包由来角化細胞を用いた
新しい3次元ヒト表皮モデルの樹立)

千葉大学大学院医学薬学府
先端生命科学専攻
(主任：松江弘之教授)
中野 倫代

【はじめに】

数 10 年前より多くのヒト 3 次元 (3D) 表皮モデルが確立されており、これらの 3D 表皮モデルは新規化学物質の皮膚刺激性の評価など、さまざまな *in vitro* の研究に用いられてきた。近年、世界的に動物実験が禁止や制限の方向に拡大していることに伴い、動物実験の代替法としての 3D 表皮モデルの需要は高まっている。現在、複数の 3D 表皮モデルが市販されているが、これらのモデルは角化細胞が採取された個体の背景が不明であり、個体差の評価はできない。

3D 表皮モデルで個体差を研究するためには、ドナーごとに採取した角化細胞を用いて 3D 表皮を作成する必要があるが、そのためには皮膚の切除などの侵襲を加える必要がある。したがって、我々は抜去毛包という低侵襲的かつ簡便な方法で新しい 3D 表皮モデルの作成を行なった。

【方法と結果】

抜去毛包由来角化細胞の初代培養

外毛根鞘を付す毛包を頭皮より抜去し、約 14 日間、低 Ca^{2+} 濃度の CnT-07 培地で角化細胞の初代培養を行った。毛包由来角化細胞は、2 日から 7 日の培養で角化細胞の初期遊出を認め、10 日から 14 日で敷石状の外観を呈した。約 14 日で継代し、3 から 4 継代の角化細胞を 3D 表皮の作成に用いた。

抜去毛包由来角化細胞を用いた 3D 表皮の再構築

毛包由来角化細胞を入れた 0.4 μ m 透過性インサートの上方を空気にさらし、インサートの下部に高 Ca²⁺濃度の CnT-02-3DP 培地を入れて 14 日間培養した。毛包由来角化細胞を用いた 3D 表皮は培養 7 日目に 1 層の表皮、14 日目に基底層、有棘層、顆粒層、角層を含む重層化した表皮を認め、正常表皮と類似した形態を示した。

皮膚由来 3D 表皮と毛包由来 3D 表皮の形態的比較

同一のドナーから得た、培養 14 日目の皮膚由来 3D 表皮と毛包由来 3D 表皮の形態を HE 染色で比較した。いずれも角層を伴う重層化した表皮を認め、類似した形態を示した。また、免疫染色で分化マーカーの発現を比較し、両者とも表皮の分化に伴って、基底層にケラチン 14、ケラチン 5、有棘層にケラチン 10、ケラチン 1、顆粒層から角層にフィラグリンが発現し、正常表皮と類似した分化を示した。

皮膚由来 3D 表皮と毛包由来 3D 表皮の遺伝子発現の比較

皮膚由来および毛包由来 3D 表皮と平面培養の 2D 角化細胞の RNA を抽出し、マイクロアレイ (41000 プローブ) で遺伝子発現を検討した。その結果、皮膚由来と毛包由来 2D 角化細胞の遺伝子発現に強い相関 ($R^2=0.984$) が見られた。同様に両者の 3D 表皮でも遺伝子発現に強い相関 ($R^2=0.975$) が見られた。しかし、2D と 3D の

比較では、皮膚由来、毛包由来のいずれにおいても 3D で 5 倍以上発現が上昇している遺伝子が 963 遺伝子と 1013 遺伝子で明らかに多く、それらは表皮終末分化に関わる遺伝子だった。

皮膚由来 3D 表皮と毛包由来 3D 表皮の機能的比較

3D 表皮モデルを用いた *in vitro* の皮膚刺激試験は、新規化学物質の皮膚刺激性の評価法として経済協力開発機構 (OECD) で承認され、動物実験の代替法として用いられている。したがって、我々は、毛包由来 3D 表皮の機能的な評価を行うため、“42 bis”プロトコールに従って皮膚刺激試験を施行した。毛包由来 3D 表皮の対照として、市販の皮膚由来 3D 表皮 EPI-200 (MatTek) を使用した。被験物質は ECVAM Performance Standards に従い、刺激性物質 (α -terpineol、heptanal)、非刺激性物質 (2-propanol、dipropylene glycol)、陽性対照 (5%SDS) と陰性対照 (PBS) を選択した。3 名の異なるドナーから得た毛包由来 3D 表皮と EPI-200 を被験物質で 42 分間刺激し、25 回 PBS で洗浄した後に、42 時間 37°C で後培養を行い、MTT アッセイで生細胞率を測定した。いずれの 3D 表皮でも非刺激性物質への暴露で 50% 超、刺激性物質への暴露で 50% 以下の生細胞率を認め、毛包由来 3D 表皮と皮膚由来のモデルは類似した結果を示した。以上より、毛包由来 3D 表皮は機能的にも従来のモデルと類似していた。

【考察】

3D 表皮モデルは動物実験の代替法として新規化学物質の皮膚刺激試験に広く用いられている。現在、我々は市販の 3D 表皮と皮膚由来角化細胞より再構築した 3D 表皮の両方を研究目的で使用可能である。しかし、市販の 3D 表皮は供給が比較的安定であるが、角化細胞が採取された個体の背景が不明であるという欠点がある。一方、皮膚由来の角化細胞より再構築した 3D 表皮では、角化細胞の起源は明らかだが、角化細胞を得るために皮膚の切除という侵襲を加えなければならない。

抜去毛包由来角化細胞を用いた 3D 表皮の再構築は、Limat らにより最初に報告され、皮膚潰瘍の治療などに応用されてきた。しかし、その方法では、線維芽細胞の栄養細胞層やウシ胎児血清を使用したり、3D 表皮の再構築と角化細胞の初代培養の両方で細胞培養インサートを使用したりする必要があった。我々の方法は、従来の方法と比較し、より安全で、より簡便で低侵襲であるという利点があった。また、形態的、遺伝的、機能的に従来のモデルと類似していた。

我々の方法は、皮膚の切除を要さず、容易に複数の検体を収集することが可能である。そのため、表皮バリア機能障害（アトピー性皮膚炎など）や遺伝性角化異常症の解析、一次刺激性皮膚炎の個体差などを個別に検討できると考えた。したがって、我々の方法は、皮膚生物学のみならず美容の分野でも有用な新しい手段となると考えた。