

日本医療研究開発機構 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム
(幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム)
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 組織の凹凸を保持した三次元皮膚モデルの構築と評価指標の確立
(英 語) Development and evaluation of bioengineered 3D skin equivalent

研究開発実施期間: 令和 3 年 6 月 1 日～令和 6 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 佐田 亜衣子
(英 語) Aiko Sada

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 国立大学法人熊本大学国際先端医学研究機構 クロスアポイントメント教授 佐田 亜衣子 (現・国立大学法人九州大学生体防御医学研究所 教授)

(英 語) International Research Center for Medical Sciences (IRCMS), Kumamoto University (Current: Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University)

II 研究開発の概要

1. 研究開発の背景と目的

1980年代、ヒト表皮幹細胞の体外培養と自家移植による熱傷治療が成功して以来、皮膚に関する再生医療は大きく発展してきた。一方、臨床的な有用性が示されているのは、皮膚の「表皮」の再建にとどまり、結合組織も含めた複雑な皮膚の構造を再現することは困難である。研究開発代表者・佐田は、皮膚の表皮—真皮の境界にある凹凸構造が不均一な表皮幹細胞集団の局在と関連することを見出した。しかし、現在の皮膚モデルは凹凸構造が付与されておらず、*in vitro* モデルの確立と、表皮幹細胞の不均一性を評価する指標の確立が急務であった。

本研究は、立体組織としての皮膚再生に向け、*in vitro* 皮膚モデルの構築と、機能的評価指標の確立を目指すことを目標とする。皮膚凹凸構造を、表皮幹細胞の不均一性という新たな視点で捉え、マイクロパターンゲルを用いた *in vitro* 皮膚モデルの開発と幹細胞不均一性を評価する指標の確立を目的とする。研究開発項目1では、皮膚の凹凸構造を模倣したマイクロパターンゲルを足場として用い、*in vitro* で皮膚組織を構築する力学的条件を検証する。魚コラーゲンを材料とするマイクロパターンゲルの開発により、安価、安全性、強度、感染症リスク軽減し、全層移植に適した皮膚モデルを開発することをねらいとする。さらに、不均一な表皮幹細胞を制御するニッチ因子や細胞自律的因子を同定することで、*in vitro* 培養下での幹細胞能力の低下を抑制し、より安定した再生医療を実現する基盤を構築する。研究開発項目2では、ラマン分光法を用いた測定と解析により、皮膚モデルにおける凹凸構造と幹細胞不均一性を規定する評価指標を確立する。

2. 研究開発の成果

研究開発項目1：凹凸構造を模倣したマイクロパターンゲルを足場とする皮膚モデルの開発

本研究では、皮膚の凹凸構造を模倣したマイクロパターンゲルを足場として用い、*in vitro* で皮膚組織を構築するための培養条件の検討を行い、分化・重層化の誘導ができる条件を確立することに成功した。具体的な方法としては、研究開発協力者・泉健次（新潟大学）との連携のもと、魚うろこ由来コラーゲンゲルを材料とした足場材に凹凸構造を転写し、表皮—真皮の境界部に位置する凹凸構造を模倣したマイクロパターンゲルを作成した。マイクロパターンゲル上にヒト初代培養表皮幹細胞（ケラチノサイト）を播種し、低カルシウム濃度で表皮幹細胞の増殖を促した後、高カルシウムおよび気相液相界面培養により、表皮の分化・重層化を誘導した。コントロールとして、平坦なゲルを足場として使用し、同様の条件で培養を行なった。マイクロパターンゲルを用いた本培養系は、ヒト口腔ケラチノサイトにおいて培養実績があったが、同様のプロトコルを使用した培養は、ヒト皮膚ケラチノサイトにおいては上手くいかず、ゲルと上皮が剥離する問題が生じた。培養条件の改良により、安定的に表皮構造が形成され、ゲル上に保持される三次元培養条件を確立した。

作製した皮膚モデルは、凍結包埋後、切片を作製し、分裂頻度の異なる表皮幹細胞マーカーや細胞外マトリクス、表皮系譜のマーカーを用い、ヒト皮膚組織との比較解析を行った。その結果、コラーゲンゲルに凹凸構造を付与することで、表皮の厚みが有意に増加し、形態的にヒト皮膚と類似した三次元構造を *in vitro* で誘導することができた。マイクロパターン皮膚モデルでは、基底膜形成や表皮幹細胞の分化・重層化、および表皮幹細胞で見られる分裂パターンが誘導される可能性を見出した。

一方、マイクロパターンゲル皮膚モデルにおいて、表皮幹細胞の増殖・分化は誘導されているものの、表皮幹細胞の不均一性誘導が上手くいっていない可能性が示唆された。そのため、表皮幹細胞の不均一性を制御する因子を明らかにするため、増殖因子の添加、細胞密度の変更、コート材として使用する細胞外マトリクスの検討、RNA-seq データによる *Slc1a3* の上流解析を行った。増殖因子については、主要なシグナル経路のリガンドとしてはたらくリコンビナントタンパク質をヒト初代培養表皮幹細胞に添加し、RT-qPCR によって表皮幹細胞マーカーの発現を指標としてスクリーニングを行なった。以上の解析より、ヒト表皮幹細胞において、不均一な幹細胞集団の誘導にはたらくシグナル経路を同定した。

研究開発項目 2：ラマン分光法を用いた皮膚モデル評価指標の確立

研究開発分担者・杉山との連携により、ヒト皮膚組織を用いたラマン測定を行った。ラマン分光法とは、可視～近赤外域の光をサンプルに照射し、組織や細胞内に存在する生体分子に固有の分子振動をラマン散乱光として検出することで、分子構造や成分を推定することが可能な光学的手法である。低侵襲かつ無標識に生体分子の情報を取得できる特徴から、再生医療の分野においても品質評価法としての活用が期待されている。本研究では、ヒト皮膚組織の凍結切片を用いたラマン測定を行い、皮膚における異なる細胞層を分けるラマンスペクトルマーカーを同定した。その後、高解像度のラマン測定データを取得し、凹凸の上下でラマンマーカースペクトル成分が異なることを主成分分析（PCA）解析によって明らかにした。さらに、多変量スペクトル分解（MCR）を用いた解析を行うことで、高頻度分裂表皮幹細胞が位置する凹凸の下側で特異的に存在するスペクトル成分を見出した。最終的には、凹凸の上下で差のあるラマンスペクトル成分として3種類のスペクトルを同定し、そのうち1つは、実際の皮膚組織の画像上で凹凸の上下でシグナルの差をラベルフリーで可視化することに成功した。

3. 研究開発の意義

本研究開発で取り組んだマイクロパターンゲル皮膚モデルは、ヒト皮膚の真皮と表皮の接合部存在する上皮脚と呼ばれる特徴的な凹凸構造から発想を得たもので、この構造を *in vitro* で再現することでより生体に近い皮膚が構築できるのではないかという仮説のもと研究開発を進めた。本研究では、足場材に凹凸構造を付与することでより厚い表皮構造が誘導され、表皮幹細胞の分裂・分化パターンを再現できる系を構築した。これは皮膚の凹凸構造の機能的重要性を示唆するものであり、表皮幹細胞の不均一性制御に関する新たな知見を提供する。

現在、臨床応用が進んでいる培養表皮シートを用いた移植において、真皮成分が存在しない場合には、術後の皮膚再建は満足いく結果が得られておらず、治療の適応範囲も限られている。現在、凹凸構造を持った材料として死体皮膚から採取・保存された無細胞ヒト真皮（アロダーム）の使用が試みられているが、高価かつ貴重といった課題がある。研究開発協力者・泉が独自に開発したマイクロパターンゲルは、生体で見られる凹凸構造を人工的にデザインした足場材料で、培養口腔粘膜の再生医療応用の目的で研究開発が進められてきた。本研究開発では、マイクロパターンゲルを用いた皮膚モデルの開発に成功し、移植医療のみならず創薬や化粧品開発のプラットフォームとして利用価値が高い。

表皮幹細胞の分裂不均一性を制御するメカニズムの解明は、不均一性が破綻する皮膚老化や皮膚疾患に対する新たな治療開発への発展が見込まれる。特に、凹凸構造という表面形状や剛性といった機械物性が、表皮幹細胞の性質を変化させ、皮膚組織の最終的な形態構造を決めている可能性を示唆し、それを介入ポイントとすることで新しい分子標的の同定が期待される。

Research background and Aims

Since the successful treatment of burns by *in vitro* culture and autologous transplantation of human epidermal stem cells in the 1980s, regenerative medicine of the skin has made significant progress. However, their clinical application has been limited mainly in the reconstruction of the skin epidermis, and it is difficult to reproduce the complex structure of the functional skin, including its connective tissue. Principal investigator, Dr. Sada found that the undulating structure at the epidermal-dermal boundary of the skin is associated with the localization of a heterogeneous epidermal stem cell population. However, current *in vitro* skin models do not mimic an uneven structure, and there was a need to establish a 3D culture model and parameters to evaluate the heterogeneity of epidermal stem cells. The aim of this study is to establish an *in vitro* skin model and a functional evaluation marker for skin as a three-dimensional tissue: Aim 1: To develop micro-patterned gels that mimic the skin's undulating structure and are used as scaffolds to provide the

mechanical conditions for building skin tissue *in vitro*. Furthermore, by identifying factors that regulate heterogeneous epidermal stem cells, the project will establish a basis for more stable regenerative medicine by reducing the decline in stem cell capacity under *in vitro* culture conditions. Aim 2: To identify the biomarkers that define the undulating structure and stem cell heterogeneity in skin models through antibody staining and measurement using Raman spectroscopy.

Results and Discussion

Aim 1: Development of a skin model using a micro-patterned gel scaffold that mimics the undulating structure of skin

In this study, we investigated culture conditions for constructing skin tissue *in vitro* using a micro-patterned gel that mimics the undulating structure of skin, and succeeded in establishing conditions that can induce differentiation and multilayer formation. Primary cultured human epidermal stem cells (keratinocytes) were seeded onto the micro-patterned gels, followed by high calcium and air-liquid interface to induce epidermal differentiation and stratification. As a control, flat gels were used as scaffolds and cultured under similar conditions. Although this culture system using micro-patterned gels have reported with human oral keratinocytes, similar protocols did not work well with human skin keratinocytes, and gel and epithelial detachment was a problem. By improving the culture conditions, three-dimensional culture conditions were established under which stable epidermal structures were formed and retained on the gel.

Skin models were freeze-embedded, sections were prepared and analyzed in comparison with human skin tissue using epidermal stem cell markers with different cell division frequencies, extracellular matrix, and epidermal lineage markers. The results showed that the thickness of the epidermis was significantly increased by an undulating structure to the collagen gel, inducing a three-dimensional structure morphologically similar to human skin *in vitro*. The micropatterned skin model was also found to be able to induce basement membrane formation, epidermal stem cell differentiation and stratification, and the mitotic pattern seen in epidermal stem cells.

Aim 2: Establishment of a skin model evaluation index using Raman spectroscopy

In collaboration Dr. Sugiyama, Raman measurements were carried out on human skin tissue. Raman spectroscopy is an optical technique that can estimate the structure and composition of biomolecules in tissues and cells. It is expected to be utilized as a quality assessment method in the field of regenerative medicine due to its feature of being able to acquire information on biomolecules in a minimally invasive and labeled-free manner. In this study, Raman measurements were performed on unfixed frozen sections of human skin tissue to identify Raman spectral markers that separate different cell layers of the skin. Subsequently, high-resolution Raman measurement data were acquired and subjected to principal component analysis (PCA) analysis, which revealed that the spectral components of the Raman markers differed top and bottom of the tissue undulation. Further analysis revealed abundant spectral components at the bottom of undulation, where epidermal stem cells with a high frequency of divisions were present. Finally, three spectral components were identified as Raman spectral components with differences top and bottom of the undulation, one of which successfully visualized the signal differences of them in a label-free manner on an image of human skin tissue.

Future perspective

The micropatterned gel skin model we worked on in this R&D was inspired by the characteristic undulating structure called the rete ridges that exist at the junction of the dermis and epidermis of human skin. In this study, a thicker epidermal structure was induced by adding an undulating structure to the scaffold material, and a system was constructed that could reproduce the division and differentiation patterns of epidermal stem cells. This suggests the functional importance of undulating skin structures and provides new insights into the regulation of epidermal stem cell heterogeneity. The skin model using micro-patterned gel developed in this study is highly valuable not only for transplantation medicine, but also as a platform for drug discovery and cosmetics development.