

## 樹状細胞を含む三次元培養ヒト皮膚モデルの構築とその皮膚感作性試験への応用

内野 正,<sup>\*,a</sup> 竹澤俊明,<sup>b</sup> 五十嵐良明,<sup>a</sup> 徳永裕司<sup>a</sup>**Construction of Three-dimensional Human Skin Model Involving Dendritic Cells and Its Application to Skin Sensitization Test**Tadashi UCHINO,<sup>\*,a</sup> Toshiaki TAKEZAWA,<sup>b</sup> Yoshiaki IKARASHI,<sup>a</sup> and Hiroshi TOKUNAGA<sup>a</sup><sup>a</sup>National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan, and<sup>b</sup>National Institute of Agrobiological Sciences, 2 Ikenodai Tsukuba City 305-0901, Japan

(Received August 1, 2007)

Recently, to study an *in vitro* evaluation method of skin irritation and acute toxicity, many three-dimensional human skin models consisting of normal human keratinocytes and fibroblasts have been used. However, these skin models did not have any dendritic cells so were difficult to apply to an *in vitro* skin sensitization test. On the other hand, a single cell-culture model using normal human dendritic cells was recently studied for an *in vitro* evaluation method of immune-sensitizing compounds. However, these models have various problems: 1) the life span of dendritic cells is short (within 1 week) and 2) it is difficult to apply water-insoluble samples to these models. To study an alternative to animal testing using immune-sensitizing compounds, we therefore constructed a three-dimensional human skin model consisting of three different cells, dendritic cells (keratinocytes, and fibroblasts) then exposed immune-sensitizing compounds and non-sensitizers to the new skin model for 1 h and investigated the effect of these compounds on cytokine release and expression of CD86. Due to immune-sensitizing compounds, the new skin model significantly released cytokine and significantly expressed CD86. On the other hand, non-sensitizers did not induce IL-1 $\alpha$ , IL-2, and IL-4 release and expression of CD86. These results suggest that the new skin model is suitable for study as an alternative to animal testing using immune-sensitizing compounds.

**Key words**—three-dimensional human skin model; skin sensitization; dendritic cell; CD86

**1. はじめに**

皮膚は全身を覆う器官であり、化学物質や紫外線等様々な刺激に曝されている。これに対し、角層による防御作用、樹状細胞等による免疫反応等により皮膚のホメオスタシスが保たれている。近年化粧品や医薬部外品に使用される生活関連化学物質の増加等によりアレルギー性皮膚炎等の皮膚ホメオスタシス破壊が原因と思われる疾患が増加の傾向にある。これらの化学物質の皮膚アレルギー性を評価する指標の1つに皮膚感作性試験法が挙げられるが、これまでは生活関連化学物質の皮膚感作性の評価法としては動物を使用したものがほとんどであった。しかし、動物愛護の観点から動物を用いない *in vitro* 代

替法開発が急務となっている。近年、皮膚の一次刺激性や急性毒性の *in vitro* 評価法として、正常ヒト線維芽細胞及びヒト表皮角化細胞からなる様々な3次元培養ヒト皮膚モデルが開発され、広く用いられている。<sup>1-3)</sup>しかし、上記の *in vitro* 皮膚モデルは樹状細胞等の免疫担当細胞を含まないため、皮膚感作性の *in vitro* 評価法としては、適用が困難であった。一方、最近皮膚感作性の *in vitro* モデルとして検討されている免疫担当細胞を単層培養したモデル<sup>4,5)</sup>では、免疫担当細胞の寿命が短い、非水溶性の物質の適用が困難である等の問題があり Local lympho node assay (LLNA)<sup>6)</sup>等の *in vivo* 法と相関性のある適切な *in vitro* 代替法を確立するまでに至っていない。そこでこれらの問題を解決するために筆者らが開発した、樹状細胞、角化細胞、線維芽細胞からなる3次元培養ヒト皮膚モデル (KDF-skin) の構築法及び皮膚感作性の *in vitro* 評価法<sup>7)</sup>への応用について述べる。

<sup>a</sup>国立医薬品食品衛生研究所 (〒158-8501 世田谷区上用賀 1-18-1), <sup>b</sup>独農業生物資源研究所 (〒305-0901 つくば市池の台 2)

\*e-mail: uchino@nihs.go.jp

本総説は、日本薬学会第127年会シンポジウム S45 で発表したものを中心に記述したものである。

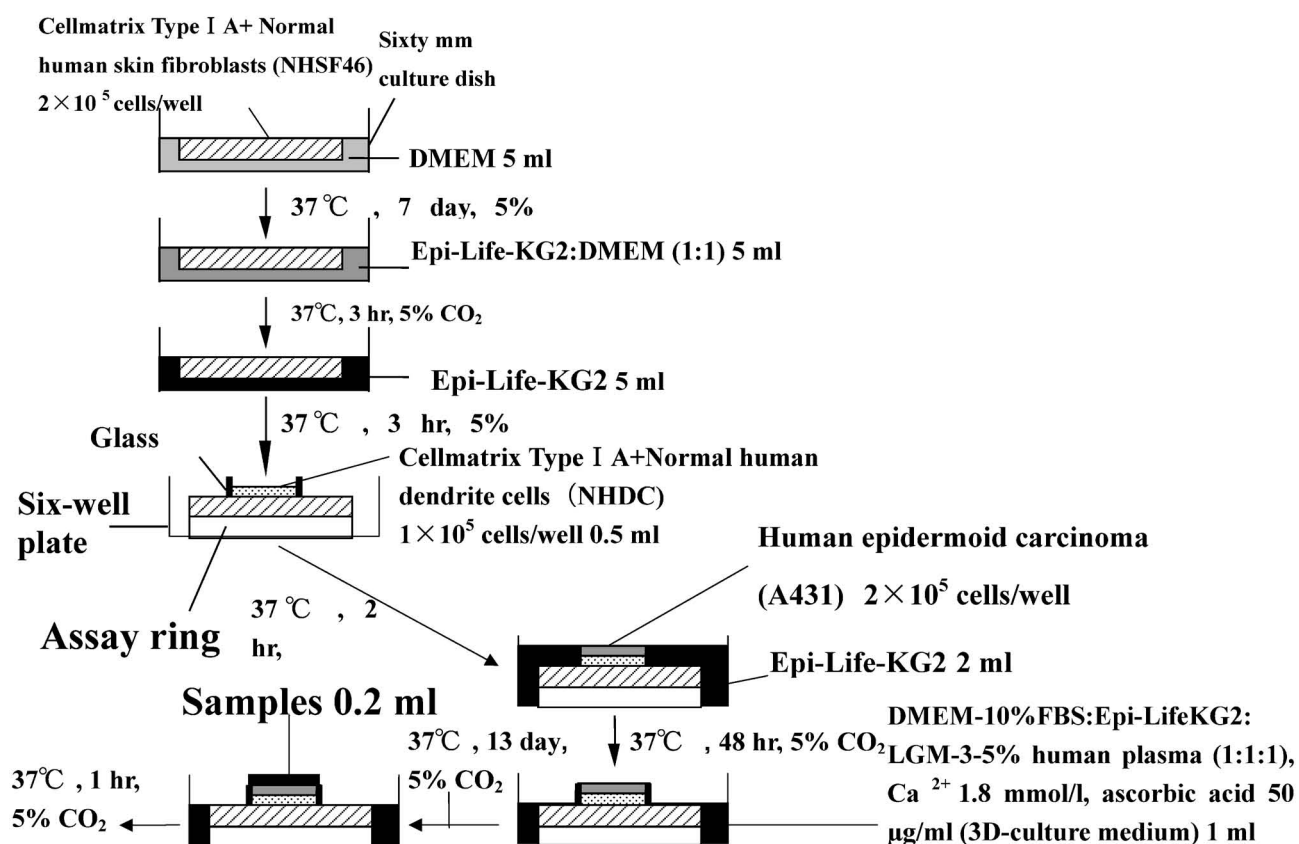


Fig. 1. Construction of KDF-Skin

## 2. KDF-skin の構築法

1980年代初頭、コラーゲンゲル内に真皮由来線維芽細胞を3次的に包埋培養し、ゲル収縮を誘導して真皮様組織を再構築する培養技術が確立され、さらに角化細胞を播種して皮膚モデル表面を空気に曝し、高濃度のカルシウムを含む培地で分化させて2種類の細胞を含む皮膚モデルが作製された。<sup>8,9)</sup> さらにその後正常ヒト表皮角化細胞と正常ヒトメラノサイトからなる皮膚モデル<sup>10-12)</sup>や正常ヒト皮膚線維芽細胞と臍帯静脈血管内皮細胞から構成されるモデル<sup>13-15)</sup>などが開発され、皮膚一次刺激性試験、メラニン生成試験や、血管新生試験等に使用されている。しかしこれらはいずれも免疫担当細胞の1つである樹状細胞を含まないものであった。

そこで筆者らは2002年頃から、まず正常ヒト線維芽細胞(NHSF46:理研 cell bankより購入)及び角化細胞様の cell line 化された細胞であるヒト類上皮がん細胞(A431細胞:理研 cell bankより購入)の、2種類の細胞を含む皮膚モデルをベースとし、これに正常ヒト樹状細胞(NHDC)を組み込んだ

モデルの開発に着手した。当初はNHDCをNHSF46を播種したコラーゲンゲルの上に播種し、培養を試みたがNHDCの接着性が弱く(半付着性)、ゲル上にうまく定着しなかった。このためFig. 1に示すようにNHSF46をコラーゲンゲル内に播種し、7日間培養後、NHSF46をアッセイリングの上に乗せ、培地に分散したNHDCとコラーゲンの混合物をコラーゲンゲル表面に置いたガラスリング内に播種した。このようにNHDCをコラーゲンゲル内に播種することにより樹状細胞を皮膚モデル内に組み込むことに成功した。NHDCを播種したコラーゲンをゲル化させたのち、培地に懸濁した



内野 正

国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部主任研究官。1966年横浜市生まれ。1989年千葉大学薬学部卒業。1991年千葉大学大学院薬学研究院博士前期課程修了。国立医薬品食品衛生研究所有機化学部研究員。1994年環境衛生化学部研究員。2002年環境衛生化学部主任研究官。千葉大学大学院にて博士号(薬学)を修得。

A431 細胞をガラスリング内に播種した。<sup>7,16)</sup> 1 日培養後、線維芽細胞、樹状細胞、角化細胞用の培地を等量混合しかつ高濃度のカルシウムを含む培地（3次元培養用培地）を 2 ml 添加し、翌日培地の量を 1 ml にして皮膚モデル表面を空気に曝しながら 14 日間培養し、組織を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定し、細胞断面を HE 染色及び CD86 免疫染色した。Figure. 2 に KDF-skin の写真を示す。外側の白い円がアッセイリング、内側のピンク色の部分が NHSF46 を播種したコラーゲングェル、その内側の透明なリングがガラスリングとなっており、その内側に NHDC と A431 細胞を播種したコラーゲングェルがある。次に皮膚モデル表面を空気に曝してから 3-14 日後の皮膚モデルの断面を HE 染色及び CD86 免疫染色し、観察したところ、<sup>16)</sup> Fig. 3 に示すように次第に角化細胞層が厚くなり、培養 7 日目までは角層の形成が認められないが、培養 11 日目には角化細胞層が 10 層程度になり、2 層程度と薄いものの、角層の形成も認められた (Fig. 3(c))。14 日後も角化細胞層及び角層の層数は変化しなかった (Fig. 3(e))。一方、線維芽細胞層は特に変化が認められなかった (Fig. 3(d))。また培養 3 日目

では CD86 発現強度は弱かったが、7 日目に最も強くなり (Fig. 4(b))、11 日目にはやや弱まるが (Fig. 4(c))、14 日後もネガティブコントロールと比較すると明らかに差が見られる程度の発現が見られた (Fig. 4(d), (e))。NHDC を単層培養した時の寿命は約一週間であるが、Furue ら<sup>17)</sup> はランゲルハンス細胞を表皮角化細胞と共培養すると表皮角化細胞から産生されたサイトカインによりランゲルハンス細胞の寿命が伸びると報告しており、本皮膚モデルでは A431 細胞から産生された IL-1 $\alpha$  などのサイトカインにより NHDC が活性化され、寿命が伸びたのではないかと推察される。

これらの結果から今回構築した皮膚モデルは少なくとも培養 11-14 日目にかけて皮膚感作性物質の評価に適用できる可能性が示唆された。

### 3. 皮膚感作性の *in vitro* 評価法への応用

皮膚感作性物質とは「皮膚への接触によりアレルギー反応を誘発する物質」<sup>18)</sup> であり、Fig. 5 に示すように、皮膚に感作性物質が暴露されると、表皮角化細胞より IL-1 $\alpha$ , 2, 4 などのサイトカインが分泌されて樹状細胞が活性化され、細胞膜表面に存在する抗原の CD86 が発現する。<sup>19)</sup> このようにして活性

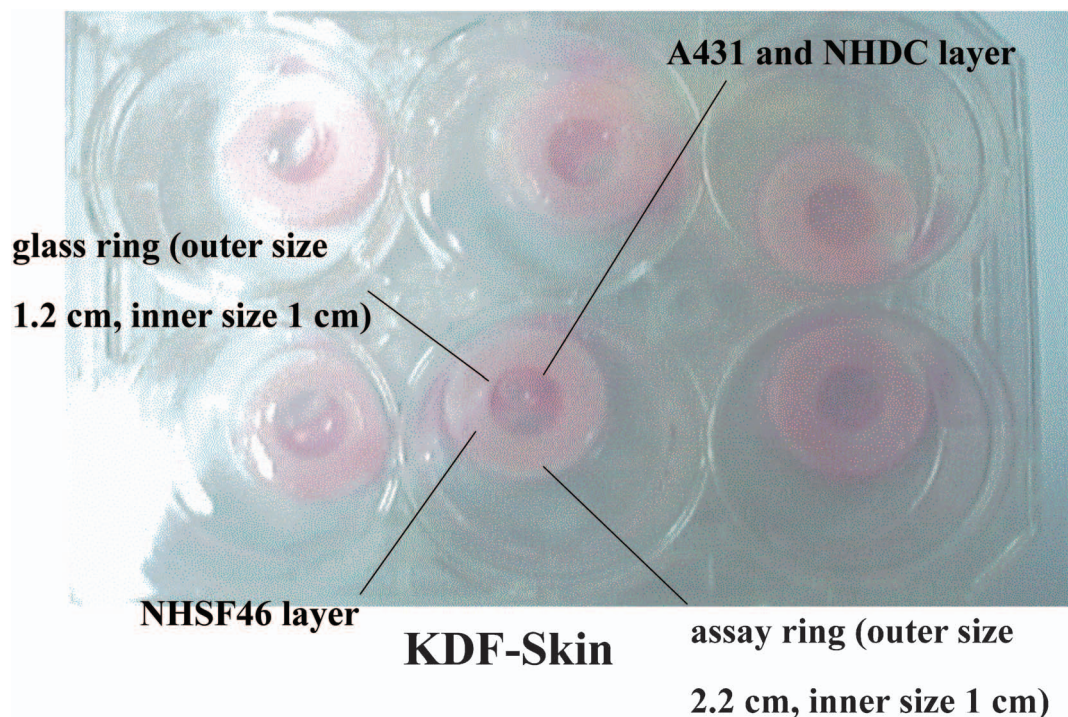


Fig. 2. Photograph of the KDF-Skin  
KDF-Skin surface was just exposed by air.

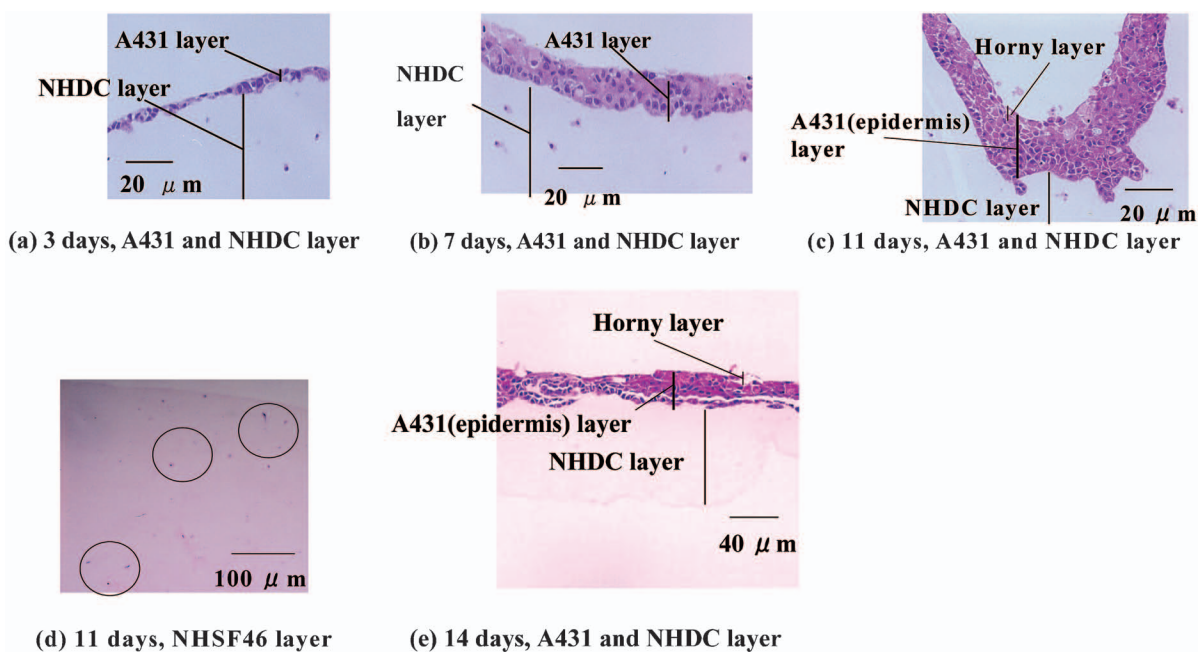


Fig. 3. Histological Cross-section of KDF-Skin after Staining with Hematoxylin and Eosin  
 Skin model was incubated for 3 days (a), 7 days (b), 11 days ((c) and (d)), or 14 days (e).

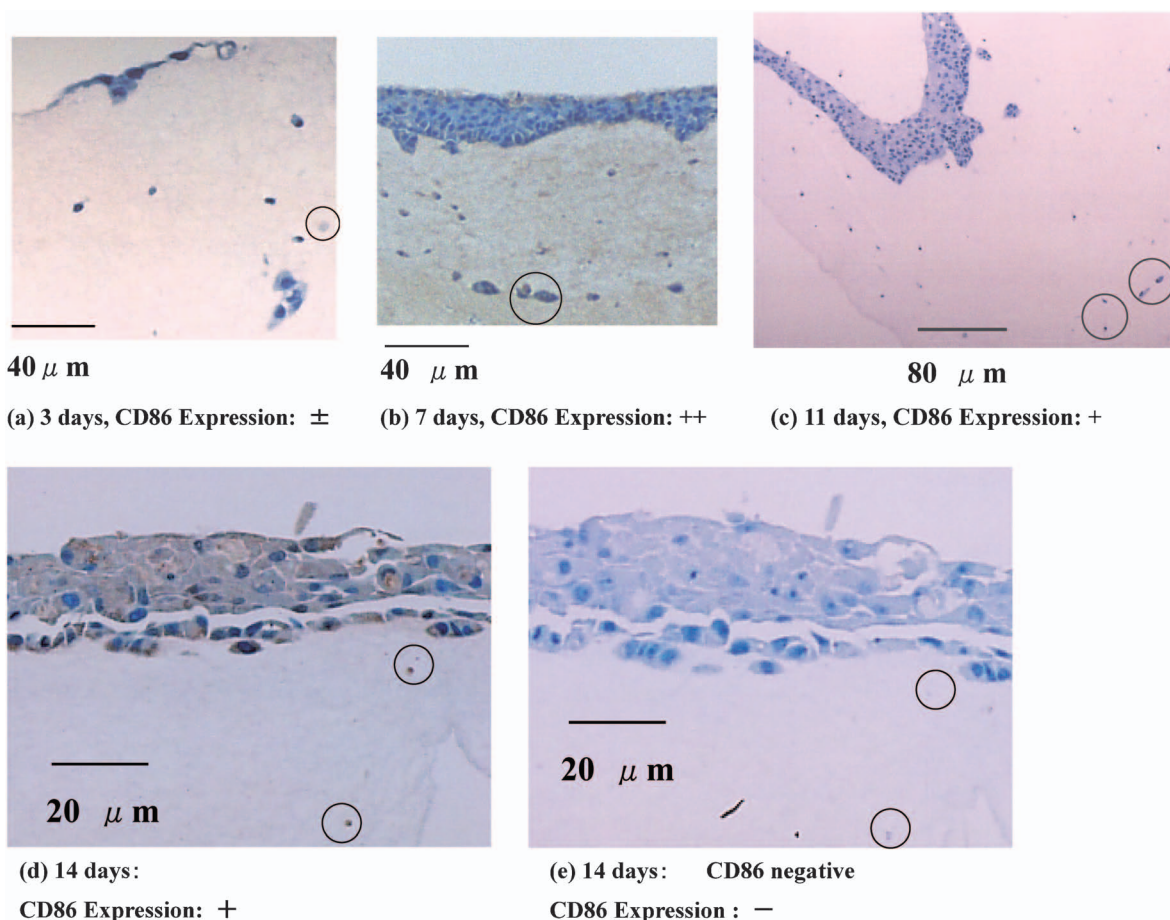


Fig. 4. Histological Cross-section of KDF-Skin Immunostaining with CD86  
 Skin model was incubated for 3 days (a), 7 days (b), 11 days (c), or 14 days ((d) and (e)). CD86 immunostaining: --=blue, ±=gray, +=light brown, +++=brown, +++=dark brown.

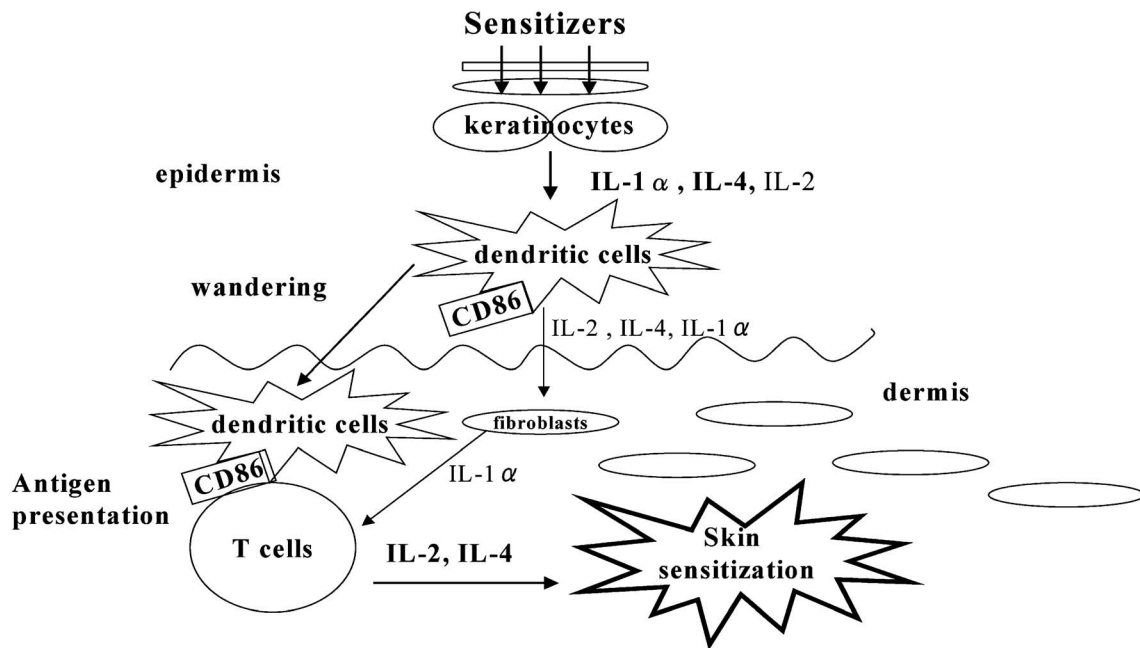


Fig. 5. Effect of Sensitizers on the Human Skin Cells

Table 1. Effect of Sensitizers and Non-sensitizers on CD86 Expression and Cytokine Release from KDF-Skin

|                            | CD86 expression | IL-1 $\alpha$ conc. (% of control) | IL-2 conc. (% of control) | IL-4 conc. (% of control) | LLNA <sup>6,19,20</sup> |
|----------------------------|-----------------|------------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Control                    | +               | 100                                | 100                       | 100                       | Class 5                 |
| DNCB 2 mmol/l              | ++              | 394                                | 497                       | 345                       | Class 1                 |
| DNFB 0.5 mmol/l            | ++              | 95                                 | 253                       | 100                       | Class 1                 |
| CoCl <sub>2</sub> 1 mmol/l | + - ++          | 104                                | 117                       | 197                       | Class 2                 |
| NiSO <sub>4</sub> 5 mmol/l | + - ++          | 129                                | 100                       | 201                       | False negative          |
| Cinnamaldehyde 5 mmol/l    | + - ++          | 128                                | 134                       | 131                       | Class 2                 |
| Diethanolamine 100 mmol/l  | + - ++          | —                                  | —                         | —                         | Class 4                 |
| SDS 1 mmol/l               | +               | 63                                 | 61                        | 110                       | False positive          |
| DMSO 13 mmol/l             | +               | 106                                | 100                       | 98                        | Class 5                 |
| Tween 20 10 mmol/l         | +               | 72                                 | 72                        | 75                        | —                       |
| Tween 80 5 mmol/l          | +               | 83                                 | 102                       | 115                       | Class 5                 |

The color of CD86 staining: —=blue, +=light brown, + - ++=brown, ++=dark brown.

化した樹状細胞は遊走し、T細胞に抗原を提示する。するとT細胞からIL-2, 4などのサイトカインが分泌され、皮膚感受性が誘導される。また活性化した樹状細胞はIL-4などのサイトカインを分泌して線維芽細胞を活性化し、IL-1 $\alpha$ を分泌させてT細胞を活性化させる。これらの知見から、上述のように構築された皮膚モデルの皮膚感受性の*in vitro*評価法への応用に当たり、評価指標として、感受性物質暴露後の初期段階の反応であるCD86発現とサイトカイン(IL-1 $\alpha$ , 2, 4)放出を選択した。そしてKDF-skinの皮膚感受性の*in vitro*評価法適用の妥

当性を検討するために、皮膚モデルに皮膚感受性物質及び非感受性物質を1時間暴露し、24時間後にCD86発現及び培地中のIL-1 $\alpha$ , 2, 4放出量への影響を検討した。DNCB, DNFB, シンナムアルデヒドなどの皮膚感受性物質はコントロールよりも強いCD86発現及びIL-1 $\alpha$ , 2, 4放出量の有意な増加を示したが、SDSやDMSOなどの非感受性物質は有意な増加を示さなかった(Table 1)。さらに*in vivo*評価法であるLLNAの文献データ<sup>6,20,21</sup>と比較すると、一致する傾向を示した(Table 1)。これらの結果から、開発した皮膚モデルは皮膚感受性の動

物実験代替法に適用できる可能性が示唆された。

#### 4. 今後の課題

今後の課題として、この皮膚モデルには 1) 構築に要する期間が約 3 週間と長い、2) ケラチノサイトに正常細胞を用いていないために角層の分化が不十分である、3) 評価指標の CD86 発現が定性的である、などの改善されるべき点がある。現在これらの点を改善すべくコラーゲンビトリゲル薄膜を培養担体とした新たな皮膚モデルについて研究中である。

#### REFERENCES

- 1) Bell E., Parenteau N., Gay R., Nolte C., Kemp P., Bilbo P., Ekstein B., Johnson E., *Toxicol. in Vitro*, **5**, 591–596 (1991).
- 2) Rheins A. L., Edwards M. S., Miyo O., Donnelly A. T., *Toxicol. in Vitro*, **8**, 1007–1014 (1994).
- 3) Morota K., Morikawa N., Morita S., Kojima H., Konishi H., *Tissue Cult. Res. Commun.*, **17**, 87–93 (1998).
- 4) De Smedt A. C. A., Van Den Heuven R. L., Berneman N. Z., Schoeters G. E. R., *Toxicol. in Vitro*, **15**, 319–325 (2001).
- 5) Yoshida Y., Sakaguchi H., Ito Y., Okuda M., Suzuki H., *Toxicol. in Vitro*, **17**, 221–228 (2003).
- 6) NIH, NIH Publication No. 99-4494 (1999).
- 7) Uchino T., Tokunaga H., Published patent application, 2006-333763 (2006).
- 8) Bell E., Ehrlich H. P., Buttle D. J., Nakatsuji T., *Science*, **211**, 1052–1054 (1981).
- 9) Takezawa T., *Biosci. Ind.*, **62**, 375–380 (2004).
- 10) Gibbs S., Murli S., De Boer G., Mulder A., Mommaas A. M., Ponc M., *Pigment Cell Res.*, **13**, 458–466 (2000).
- 11) Duval C., Régnier M., Schmidt R., *Pigment Cell Res.*, **14**, 348–355 (2001).
- 12) Takeyama R., Takekoshi S., Nagata H., Osamura R.Y., Kawana S., *J. Mol. Histol.*, **35**, 157–165 (2004).
- 13) Oehler M. K., Bicknell R., *Br. J. Cancer*, **82**, 749–752 (2001).
- 14) Igarashi T., Miyake K., Kato K., Watanabe A., Ishizaki M., Ohara K., Shimada T., *Gene Ther.*, **10**, 219–226 (2003).
- 15) Oak J., Nakagawa K., Oikawa S., Miyazawa T., *FEBS Lett.*, **555**, 419–423 (2003).
- 16) Uchino T., Tokunaga H., Ikarashi Y., *J. Cosmet. Chem. Jpn.*, **41**, (2007) accepted.
- 17) Furue M., Uchi H., Nakahara T., Moroi Y., *J. Jpn. Cosmet. Sci. Soc.*, **28**, 183–186 (2004).
- 18) Japan Advanced Information Center of Safety and Health:  
<[http://www.jaish.gr.jp/user/anzen/kag/kag\\_yogo03.html](http://www.jaish.gr.jp/user/anzen/kag/kag_yogo03.html)>, Japan Advanced Information Center of Safety and Health Web, 31 August, 2007.
- 19) Yanagihara Y., *Igakuno-Ayumi*, **176**, 167–170 (1996).
- 20) Basketter D. A., Balikie L., Dearman R. J., Kimber I., Ryan C. A., Gerberick G. F., Harvey P., Evans P., White I. R., Rycroft R. J., *Contact Dermatitis*, **42**, 344–348 (2000).
- 21) Ryan C. A., Cruse L. W., Skinner R. A., Dearman R. J., Kimber I., Gerberick G. F., *Food Chem. Toxicol.*, **40**, 1719–1725 (2002).