

明 細 書

発明の名称：皮膚付属器官を有する全層皮膚の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、皮膚付属器官を有する全層皮膚を製造する方法、および、製造された皮膚付属器官を有する全層皮膚に関する。

背景技術

[0002] 化粧品の開発や、皮膚に対する医薬品の開発においては、マウスやラット等を用いた薬理試験／安全性試験が行われる。しかし、近年、動物福祉の観点から、動物実験の代替法の開発が世界的に求められている。

[0003] 動物実験の代替法としては、培養細胞を用いた代替試験法や、動物の表皮や真皮を模した細胞シートを用いた代替試験法が開発されているが、これらの代替皮膚は、動物の皮膚が有する皮膚付属器官（例えば、毛包、爪、皮脂腺、汗腺、乳腺等）を含まない。皮膚付属器官を有しない代替皮膚は、皮脂や汗等の分泌がないため皮膚のバリア機能に乏しく、生体に近い試験結果を得ることは難しかった。また、皮膚付属器官を有しない代替皮膚では、化粧品や医薬品の皮膚付属器官自体に対する影響についての試験結果を得ることもできなかった。

[0004] 皮膚付属器官を有する人工皮膚を製造する方法としては、例えば、脂肪由来幹細胞、表皮ケラチノサイト、および、繊維芽細胞をヌードマウス等の皮膚切除部位において共培養する方法が試みられている（特許文献１）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献１：特開２００９－１１５８８

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 例えば上記の特許文献１に記載のような方法では、部分的に皮膚付属器官は誘導されるものの、誘導された皮膚付属器官はヌードマウスの皮膚と一体

不可分となり、皮膚付属器官を含む、幹細胞由来の全層皮膚（すなわち、少なくとも表皮層、真皮層、皮下組織を含む皮膚組織）を得ることは困難であった。本発明者らは、この技術的課題に着目し、純粹に目的とする個体由来の、皮膚付属器官を有する全層皮膚を効率的に製造する方法を開発することを試みた。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決するために検討を重ねた結果、Wnt経路を活性化させ得る生理活性物質を用いて胚様体を刺激し、足場材料と結合させたうえで動物へ移植することにより、効率的に皮膚付属器官を有する全層皮膚を製造することができることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0008] すなわち、本発明は、皮膚付属器官を有する全層皮膚を製造する方法であって、

前記「皮膚付属器官を有する全層皮膚」は、少なくとも下記（１）～（３）；

- （１）表皮層と真皮層を含む皮膚
- （２）少なくとも１種類の皮膚付属器官
- （３）皮下組織

を含み、

前記方法は、下記ステップ；

（ａ）胚様体を、W n t 経路を活性化させ得る生理活性物質で刺激するステップ、

（ｂ）：下記（Ａ）および（Ｂ）を含む結合体を調製するステップ；

（Ａ）ステップ（ａ）で刺激を行った前記胚様体の全部または一部

（Ｂ）足場材料

（ｃ）：前記ステップ（ｂ）で調製した前記結合体を動物に移植するステップ、および、

（ｄ）：前記動物中において、前記結合体由来の全層皮膚を製造するステップ、

を含むことを特徴とする、方法を提供する。

[0009] また、本発明の一実施態様においては、前記動物が非ヒト動物であることを特徴とする。

[0010] また、本発明の一実施態様においては、前記非ヒト動物が非ヒト免疫不全動物であることを特徴とする。

[0011] また、本発明の一実施態様においては、前記Wnt経路が古典的Wnt経路であることを特徴とする。

[0012] また、本発明の一実施態様においては、前記「Wnt経路を活性化させ得る生理活性物質」が、Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt6、Wnt7b、Wnt8a、Wnt8b、Wnt10b、および、TGF- β からなる群から選択されることを特徴とする。また、前記「Wnt経路を活性化させ得る生理活性物質」は、例えば、Wnt受容体アゴニストであってもよい。

[0013] また、本発明の一実施態様においては、前記胚様体が、iPS細胞またはES細胞から作製された胚様体であることを特徴とする。

[0014] また、本発明の一実施態様においては、前記足場材料が、コラーゲンゲルであることを特徴とする。

[0015] また、本発明の一実施態様においては、前記移植が、腎皮膜下への移植であることを特徴とする。

[0016] 本発明の別の実施態様では、上記のいずれかの方法によって製造される、皮膚付属器官を有する全層皮膚を提供する。

[0017] 以上の本発明の一又は複数の特徴を任意に組み合わせたものも、本発明に含まれることはいうまでもない。

発明の効果

[0018] 本発明に係る全層皮膚の製造方法によれば、多能性幹細胞由来のテラトーマ内に、高頻度に皮膚付属器官を有する全層皮膚を製造することができる。本発明の方法により製造された全層皮膚は、動物の生体と同様に機能的な皮膚付属器官を有するため、例えば化粧品や医薬品の薬理試験や安全性試験に

好適に用いることができる。また、例えば、様々な個体由来（例えば、人種、肌の色、年齢、性別等の異なる個体由来）の多能性幹細胞を用いて本発明の全層皮膚を製造することにより、化粧品や医薬品のターゲットに応じた、適切な薬理試験や安全性試験を行うことができる。

また、本発明の方法により製造された全層皮膚は、動物の皮膚への移植によって腫瘍を引き起こす危険性が極めて低く、生体への移植にも好適に用いることができる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]図1は、Wnt10b刺激を行った胚様体を生体に移植して形成されたテラトーマのHE染色像を示す。左図は外胚葉性嚢胞毛包を含む皮膚様組織を示し、右図は粘膜様組織を示す。

[図2]図2Aは、本発明の一実施形態である、様々な器官を内包するテラトーマの形成方法の模式図を示す。iPS細胞より胚様体を形成して、コラーゲンゲル内において三次元的配置した後に、成体内へ移植してテラトーマを形成した。またWnt10b刺激は胚様体形成7日目より24時間行い、その後三次元配置を行った。図2Bは、テラトーマ内に形成された各種器官の分類を示す。a～dの各図は、それぞれa：皮膚様組織、b：粘膜様組織、c：移行上皮よりなる嚢胞組織、およびd：内胚葉性上皮よりなる嚢胞組織の典型的組織像を示す。図中の各記号は、Cyst：嚢胞腔、Epi：上皮組織、Der：真皮組織、Ad：脂肪組織、LP：粘膜固有層、SM：平滑筋組織をそれぞれ示す。cの嚢胞上皮組織は扁平重層上皮（*）と杯細胞（矢印）を含む単層円柱上皮より構成される。図2Cは、Wnt10b刺激を行った胚様体由来のテラトーマに誘導される器官の頻度（Dark bar）と、Wnt10b刺激を行わない胚様体由来のテラトーマに誘導される器官の頻度（Light bar）を比較したグラフである。図2Dは、Wnt10b刺激を行った胚様体由来のテラトーマ1gあたりに誘導される毛包形成数（Dark bar）と、Wnt10b刺激を行わない胚様体由来のテラトーマ1gあたりに誘導される毛包形成数（Light bar）を比較

したグラフである。

[図3]図3は、Wnt10b刺激を行った胚様体由来のテラトーマに誘導された分泌腺様構造の組織像を示す。左図はHE染色像、中央の図は抗アミラーゼ抗体による免疫染色像、右図は抗Eカドヘリン抗体による免疫染色像を示す。図中の矢印は腺房様組織における細胞質内の顆粒状のアミラーゼを示す。図中の点線の範囲が腺房組織の範囲を示し、図中の「D」は、近接した導管様構造を示す。

[図4]図4は、iPS誘導毛包を含む全層皮膚をヌードマウスに移植した後の経過を示した写真である。iPS細胞より誘導された毛包を含む皮膚様嚢胞を分離して、20本程度の毛包を含む全層皮膚として切り分けてヌードマウス背部皮膚へ移植し、移植後の毛幹成長を経時的に観察した。写真は3カ所に移植した毛包を含む全層皮膚より成長した毛幹の追跡例を示す。

[図5]図5は、iPS誘導毛包由来の毛の毛周期を解析した図を示す。iPS細胞より誘導された毛包の毛幹成長を経時的に観察した。成長毛の毛穴を識別して、第1から第3毛周期までの、毛成長期間および毛成長休止および脱毛期間の日数を計測した。追跡毛の最大成長期における拡大写真より毛種（Zigzag毛、Awl/Guard毛、および体毛の形態的な定義により識別できない毛は「体毛定義外」と記述）を判別した。黒丸は毛幹が成長している期間の日数を示し、白丸は毛成長停止および脱毛している期間の日数を示す。

[図6]図6は、iPS誘導毛包の移植部位から発達した組織に対する、Y染色体を標識した蛍光in situ hybridization (FISH)の結果を示す。「FISH」と記載された図は、ヌードマウスへ移植した組織の全域と周辺の宿主皮膚のY染色体FISHの弱拡大像を示す。「DIC」と記載された図は、FISHで示した組織の微分干渉像であり、矢印はメラニン色素を含むiPS誘導毛を示す。FISHの弱拡大像において組織領域を白四角により示し、a-dに拡大写真を示す。図中の白色ドットがFISHによって検出されたY染色体である。

[図7]図7は、i P S誘導毛包の移植部位から発達した組織において、幹細胞ニッチが再現されていることを示した免疫染色像である。図7 aおよび図7 bは、毛包上皮幹細胞マーカーである抗C K 1 5抗体と抗C D 3 4抗体による二重免疫染色像を示す。図7 aはi P S誘導毛包を含む全層皮膚移植部位の弱拡大像であり、点線で囲まれた範囲が移植組織を示す。図7 aの白四角で囲んだ範囲の拡大像を図7 bで示す。図7 bの矢印は、抗C K 1 5抗体と抗C D 3 4抗体により共染色された毛包外毛根鞘を示す。図7 cと図7 dは皮脂腺前駆細胞マーカーであるL r i g 1および上皮幹細胞マーカーであるC K 1 5に対する免疫染色像を示す。図7 c中の点線の範囲が移植組織を表す。図7 cの白四角により囲まれた範囲の拡大写真を図7 dで示し、L r i g 1陽性細胞を矢印、C K 1 5陽性細胞を矢尻で示す。図中、S Gは皮脂腺を表す。図7 eは、抗L g r 6抗体を用いた免疫染色像を示す。L g r 6は皮脂腺付着部付近の外毛根鞘（矢印）に発現している。図7 fは、抗L g r 5抗体を用いた免疫染色像を示す。L g r 5は成長期毛包の可変領域において発現を認め、特に毛母領域付近の上皮細胞（矢印）において強く発現している。

[図8]図8は、i P S誘導毛包の移植部位から発達した組織において、i P S誘導毛包が立毛筋および神経と接続していることを示した図である。i P S由来の毛包を含む全層皮膚をヌードマウス背部へ移植して、i P S細胞由来毛包が第3回目の成長期となった時点で組織を採取して、100 μ m厚の組織切片を作製した。平滑筋マーカーであるカルポニンおよび神経繊維マーカーであるニューロフィラメントH（N F - H）を認識する抗体による蛍光免疫染色像（図8 a）、および同一切片の透過光による実体顕微鏡像（図8 b）をそれぞれ示す。実体顕微鏡像により毛包内にメラニン色素を有する毛幹が見られた毛包（図8 b，黒矢印）はi P S細胞由来であることを示す。弱拡大像の白四角の範囲中、宿主毛包（図8 c，H o s t）およびi P S細胞由来の毛包を含む領域（図8 d，i P S 1および図8 e，i P S 2）を拡大したものを、c - eで示す。それぞれの毛包に接続する、カルポニン陽性の

立毛筋（白矢印）およびNF-H陽性の神経繊維（白矢尻）を示す。

発明を実施するための形態

[0020] 本発明において、「多能性幹細胞」とは、生体のあらゆる細胞に分化できる分化万能性と、分化増殖を経ても分化万能性を維持できる自己複製能を合わせもつ細胞をいい、例えば、ES細胞やiPS細胞が挙げられる。

[0021] 本発明において、「ES細胞 (Embryonic Stem cells)」とは、動物の発生初期段階である胚盤胞期の胚の一部に属する内部細胞塊より作られる幹細胞株のことをいい、非常に多くの細胞に分化できる分化万能性と、分裂増殖を経ても分化万能性を維持できる自己複製能を持つ。

[0022] 本発明において用いることのできるES細胞の由来は特に限定されず、あらゆる動物の内部細胞塊由来のES細胞を用いることができる。例えば、ES細胞の由来として、ヒト、マウス、ラット、ブタ、サルの内部細胞塊由来のES細胞を用いることができる。

[0023] 本発明において、「iPS細胞 (induced Pluripotent Stem cells)」とは、体細胞へ、例えば数種類の遺伝子および／または薬剤を導入することにより、ES細胞のように非常に多くの細胞に分化できる分化万能性と、分裂増殖を経ても分化万能性を維持できる自己複製能を持たせた細胞をいう。

[0024] 本発明において用いることのできるiPS細胞の由来は特に限定されず、あらゆる動物由来のiPS細胞を用いることができる。例えば、iPS細胞の由来として、ヒト、マウス、ラット、ブタ、サル由来のiPS細胞を用いることができる。また、本発明において用いることのできるiPS細胞の由来となる体細胞も特に限定されず、あらゆる組織由来の細胞から誘導されたiPS細胞を用いることができる。さらに、本発明において用いることのできるiPS細胞の誘導方法も特に限定されず、体細胞からiPS細胞を誘導することができる方法であれば、どのような方法を用いて誘導されたiPS細胞でも用いることができる。

[0025] 本発明において、多能性幹細胞を分化させずに培養する方法は特に限定さ

れず、当業者が公知の培養環境や培地、またはそれに準ずる培養環境や培地を適宜選択することができる。例えば、多能性幹細胞を培養するためのフィーダー細胞としては、マウス胎仔線維芽細胞（MEF）を用いることができる。また、多能性幹細胞を培養するための培地としては、一般的に多能性幹細胞の培養に用いられる培地を用いることができ、その組成については特に限定されない。

[0026] 本発明において、「テラトーマ」とは、二胚葉性あるいは三胚葉性の成分を有する、高分化な胚細胞性腫瘍であり、奇形種ともいう。本発明における「テラトーマ」には、多能性幹細胞を生体に移植した場合に発生し得る、組織学的に奇形種に似た構造物も含む。テラトーマは生体内において自然発生することがあるが、多能性幹細胞を動物に移植することによって人工的に発生させることもできる。

[0027] 本発明において、動物に細胞を移植する部位は特に限定されないが、例えば、動物の腎皮膜下、皮下、精巣に移植することができる。

[0028] 本発明において、動物に細胞を移植する方法は特に限定されないが、例えば、マウスの腎皮膜下へ移植する場合は、腎臓皮膜に2～3mmの切開を入れ、腎臓皮膜と腎臓実質を剥離し、その間に細胞を移植することができる。

[0029] 本発明において、多能性幹細胞を移植された動物にテラトーマが形成されていることの確認方法は特に限定されないが、例えば、移植から3～4週間後で開腹し、外観での腫瘍の形成を目視することで確認することができる。好ましくは、腫瘍を組織学的に解析することにより、テラトーマの特徴である三胚葉性の組織形成を確認することができる。

[0030] 本発明において、「全層皮膚」とは、少なくとも下記の（１）～（３）を含む層状の組織構造をいう。

- （１）表皮層と真皮層を含む皮膚
- （２）少なくとも１種類の皮膚付属器官
- （３）皮下組織

[0031] 本明細書において、「皮膚付属器官」とは、限定はされないが、皮膚を構

成する表皮層と上皮組織を介して接続し、且つ、固有の機能を有する、角質器官と外分泌腺を意味する。本明細書における皮膚付属器官は、例えば毛包、爪、皮脂腺、汗腺、乳腺等、皮膚に分布する器官を意味するが、これらに限定されない。

[0032] 本明細書において、「皮下組織」とは、皮膚および皮膚付属器官を支持し、それらと他の器官系を結合する組織であり、例えば皮下脂肪組織、平滑筋組織より構成される皮筋層、膠原繊維や弾性繊維より構成される結合組織が含まれるが、これに限定されない。

[0033] 本発明において、「器官原基」とは、生体において、発生段階が進むと特定の器官に発生することが決定づけられた胚の領域または胚の構造をいい、単に「原基」と呼ばれることもある。生体におけるほぼ全ての器官は、胎児期の発生プログラムによって上皮系幹細胞と間葉系幹細胞から誘導された器官原基から発生し、所定の位置、所定の数に発達する。

[0034] 本発明において、テラトーマ内に目的の全層皮膚が形成されていることの確認方法は特に限定されないが、例えば、テラトーマを切開し、外観から皮膚付属器官（例えば、毛包、爪、皮脂腺、汗腺、乳腺）を有する全層皮膚と思われる構造物を探すことで確認することができる。好ましくは、テラトーマの組織切片を作製し、組織構造から所定の器官であることを確認することができる。より詳細に確認する場合は、各器官で発現する遺伝子が適切な部位で発現していることを *in situ hybridization* 法によって解析することができる。

[0035] 本発明において、「胚様体」とは、ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞を浮遊培養した際に形成される細胞塊をいう。胚様体は、胚様の形態をとることがあり、様々な組織から構成されることがある。本発明において用いることのできる胚様体の作成方法は特に限定されないが、例えば、多能性幹細胞を低接着性プレートに播種する方法、多能性幹細胞の細胞懸濁液の液滴を吊るすことによるハンギングドロップ法、多能性幹細胞の培養皿を振盪させながら浮遊培養する方法を用いることができる。

[0036] 例えば、iPS細胞を低接着性プレートに播種する方法で胚様体を作製する場合には、iPS細胞を1500cells~10000cells/200μl/well、より好ましくは、2000cells~4000cells/200μl/wellで96穴低接着性プレートに播種し、培養することにより、胚様体を作製することができる。播種する細胞が1500cells/200μl/wellより少ないと胚様体が適切に形成されない恐れがあり、10000cells/200μl/wellより多いと胚様体内部で栄養不足による壊死が起こる恐れがある。

[0037] また、本発明において用いられる胚様体が、浮遊培養開始から何日目のものであるかは特に限定されないが、例えば、浮遊培養開始から5~9日目のものを好適に用いることができる。

[0038] 本発明において、胚様体を移植に用いる場合、胚様体の全部または一部を移植に用いることができる。胚様体をそのまま移植に用いることもできるし、胚様体の一部のみを移植に用いることもできる。胚様体の一部のみを移植に用いる場合には、胚様体の表層組織を用いることが好ましい。胚様体の表層は上皮系の細胞で構成されていることから、胚様体の表層組織を移植に用いることにより、より効率的にテラトーマ内に全層皮膚を製造することができる。

[0039] 本発明において、胚様体から表層組織のみを分離する方法は、特に限定されない。例えば、実体顕微鏡下での注射器によるマイクロサージェリーで、胚様体の表層組織を物理的に採取することができる。

[0040] 本発明において、「足場材料」とは、その材料上あるいは材料内で細胞と材料が接することにより、細胞の接着、増殖、分化、活性化、移動、遊走、形態変化など様々な細胞機能を発現、促進されるような材料全般を指し、多能性幹細胞を移植する際に好適なものであれば、特に限定されない。例えば、足場材料としてコラーゲンゲルを用いることができ、好ましくは、I型コラーゲンゲル、III型コラーゲンゲル、IV型コラーゲンゲル、マトリゲルを用いることができる。多能性幹細胞を足場材料に内包させたうえで移植すること

により、移植した組織において多能性幹細胞が散逸することを防ぎ、組織が生着するための足場となることで、より効率的にテラトーマ内に全層皮膚を製造することができる。また、多能性幹細胞を足場材料に内包させたうえで移植することにより、胚様体をコラーゲンゲル内に所望の立体的配置を保ったまま移植することができる。コラーゲンゲル内において、それぞれの胚様体の表層組織どうしが接した状態で移植を行うことにより、より効率的にテラトーマ内に全層皮膚を製造することができる。

[0041] 本発明において、「胚様体の全部または一部」と足場材料を含む結合体を作製する方法は特に限定されない。生体外において「胚様体の全部または一部」と足場材料を結合させてから移植に用いてもよく、はじめに生体内に足場材料を導入し、そこに「胚様体の全部または一部」を注入することで結合させ、移植をおこなってもよい。また、例えば、足場材料としてコラーゲンゲルを用い、胚様体の全部または一部と結合させる場合には、ゾル状のコラーゲンゲルに胚様体を入れ、固化させることによって、コラーゲンゲルと胚様体の全部または一部との結合体を作製することができる。

[0042] 本発明において、「Wnt経路を活性化させ得る生理活性化物質」とは、例えば古典的Wnt経路（ β カテニン経路ともいう）を活性化させ得る生理活性化物質であってよく、非古典的Wnt経路（平面内細胞極性経路；PCP経路、 Ca^{2+} 経路ともいう）を活性化させ得る生理活性化物質であってもよい。古典的Wnt経路を活性化させ得る生理活性化物質としては、例えばWnt 1、Wnt 2、Wnt 2b、Wnt 3、Wnt 3a、Wnt 6、Wnt 7b、Wnt 8a、Wnt 8b、Wnt 10b、および、 $\text{TGF}-\beta$ を例示することができ、非古典的Wnt経路を活性化させ得る生理活性化物質としては、例えばWnt 4、Wnt 5a、Wnt 11が例示できる。Wnt 10bが古典的Wnt経路（ β カテニン経路）を活性化させ得ることは、例えばMaksim V. Plikus et al. (Science 332, 586 (2011))に記載されており、Wnt 1、Wnt 2、Wnt 2b、Wnt 3、Wnt 3a、Wnt 6、Wnt 7b、Wnt 8a、Wnt 8bが古典的Wnt経路（ β カテニン経路）を活性化させ得、Wnt 4、Wnt 5a、Wnt 11が非古典的Wnt経

路を活性化させ得ることは、例えばKemp et al. (Functional Development and Embryology 1(1), 1-13 (2007)) に記載されており、TGF- β がdermal fibroblastにおいて β カテニンの発現を安定化させることは、例えばSato (Acta Derm Venereol 2006; 86: 300-307) に記載されている。

[0043] 本発明において、細胞を移植する動物の種類は特に限定されず、あらゆる動物を移植に用いることができる。好ましくは、非ヒト動物、例えば、ブタ、ウシ、サル、ヒヒ、イヌ、ネコ、ラット、マウスを移植に用いることで、ヒトに細胞を移植する際に生じる倫理面の問題を回避することができる。より好ましくは、非ヒト免疫不全動物を移植に用いることで、生体の免疫機能による拒絶反応を防ぐことができ、効率よくテラトーマを作製することができる。また、非ヒト免疫不全動物を移植に用いることで、非ヒト免疫不全動物の生体内に、他種の動物の細胞由来のテラトーマを作製することができる。例えば、非ヒト免疫不全動物に、ヒト由来の多能性幹細胞を移植することによって、非ヒト免疫不全動物の生体内にヒト細胞由来のテラトーマを作製することができる。

[0044] 本発明において、「免疫不全動物」とは、生体の免疫機能の一部または全部を欠損する動物をいい、欠損する免疫機能の種類は特に限定されないが、生体に移植された他種の動物由来の細胞または組織を排除しないように免疫機能を欠損する動物が好ましい。例えば、免疫不全マウスであれば、SCIDマウス、ヌードマウス、NODマウス、NOD-SCIDマウス、IL-2R γ ノックアウトマウス、RAG2ノックアウトマウス、NOGマウス、RAG2/IL-2R γ ダブルノックアウトマウスを用いることができ、好ましくは、SCIDマウスを用いることができる。また、例えば、免疫不全ラットであれば、SCIDラットを用いることができる。また、例えば、免疫不全ブタであれば、IL-2R γ ノックアウトブタを用いることができる。

[0045] 本発明において、テラトーマから所望の器官を摘出する方法は特に限定されないが、例えば、マイクロサージェリーによって摘出することができる。

- [0046] なお、本明細書において用いられる用語は、特定の実施形態を説明するために用いられるのであり、発明を限定する意図ではない。
- [0047] また、本明細書において用いられる「含む」との用語は、文脈上明らかに異なる理解をすべき場合を除き、記述された事項（部材、ステップ、要素、数字など）が存在することを意図するものであり、それ以外の事項（部材、ステップ、要素、数字など）が存在することを排除しない。
- [0048] 異なる定義が無い限り、ここに用いられるすべての用語（技術用語及び科学用語を含む。）は、本発明が属する技術の当業者によって広く理解されるのと同じ意味を有する。ここに用いられる用語は、異なる定義が明示されていない限り、本明細書及び関連技術分野における意味と整合的な意味を有するものとして解釈されるべきであり、理想化され、又は、過度に形式的な意味において解釈されるべきではない。
- [0049] 第一の、第二のなどの用語が種々の要素を表現するために用いられる場合があるが、これらの要素はそれらの用語によって限定されるべきではないことが理解される。これらの用語は一つの要素を他の要素と区別するためのみに用いられているのであり、例えば、第一の要素を第二の要素と記し、同様に、第二の要素は第一の要素と記すことは、本発明の範囲を逸脱することなく可能である。
- [0050] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、しかしながら、本発明はいろいろな形態により具現化することができ、ここに記載される実施例に限定されるものとして解釈されてはならない。

実施例

[0051] 胚様体を含む結合体の生体内移植による全層皮膚の形成

1. 材料と方法

(1) 実験動物

C. B-17 / l c r - s c i d / s c i d J c l マウスはクレア (T o k y o , J a p a n) にて、s c i d / s c i d h r / h r (S H O) マウスはチャールズリバー (K a n a g a w a , J a p a n) にて購入した

。マウスの管理および操作はNIHの実験動物指針に従った。全ての実験は東京理科大学の実験動物管理委員会の認可の上実施した。

[0052] (2) 細胞培養

マウスiPS細胞(mGF-iPS-3F-3)はマイトマイシンC(Nacalai Tesque)処理したSNLP76.7-4フィーダー細胞と共培養した。培養には、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM without sodium pyruvate; Nacalai Tesque)に、15% fetal bovine serum (Japan Bio Serum)、50 units/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, 2mM L-glutamine, 1×10^{-4} M 2-Mercaptoethanol, 1×10^{-4} M Non-essential amino acids (全てInvitrogen)を加えた培地を用いた。1日毎に培地交換し、継代後2日目にD-PBS(-) (Nacalai Tesque)に、0.25% Trypsin-1mM EDTA (Invitrogen)を加えた溶液を用いて継代培養した。

[0053] SNLP76.7-4フィーダー細胞は0.1%ゼラチン水溶液で37℃, 2時間以上ゼラチンコートしたディッシュ上で培養した。培養には、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM without sodium pyruvate; Nacalai Tesque)に、7% fetal bovine serum, 50 units/mL penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, 2mM L-glutamine (全てInvitrogen)を加えた培地を用いた。前記培地にマイトマイシンCを終濃度12 μ g/mlになるよう添加し、SNLP76.7-4フィーダー細胞を37℃, 2時間15分反応させることにより、SNLP76.7-4フィーダー細胞のマイトマイシン処理を行った。その後、反応させた細胞を 2.5×10^4 cells/cm²でゼラチンコートディッシュに播種した。マイトマ

イシン処理後24時間以上培養したものをiPS細胞との共培養用のフィーダー細胞として用いた。

[0054] (3) 胚様体の作製

iPS細胞をフィーダー細胞ごと酵素処理により培養皿より剥離し、緩やかなピペティングによりシングルセル化した。セルソーター (FACS Aria III, BD) を用いて、SSCとFSCにより、フィーダー細胞を除去してiPS細胞のみをソーティングした。ソーティングしたiPS細胞を 1.5×10^4 cells/ml となるように、(2) に記載のiPS細胞の培養培地へ再懸濁し、さらに $3,000$ cells/ $200 \mu\text{L}$ /well となるように、96穴低接着性プレート (Lipidure, NOF) へ播種した。

[0055] (4) 胚様体へのWnt10b刺激

(2) および(3)に記載の方法にて低細胞付着性プレートへiPS細胞を播種した後、Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM ; GIBCO) に、10% fetal bovine serum (Japan Bio Serum), 50 units/ml penicillin, $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycinを加えた培地を用いて、7日間の培養を行った。播種後4日目に半量培地交換し、培養7日目に、胚様体の形成を位相差顕微鏡により確認を行い、形態的に異常が無い胚様体に対してWnt10b刺激を行った。 $0.1 \text{ mg}/\text{mL}$ Wnt10b (R&D) in PBSをストックとして、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにiPS細胞用の培地に添加した。胚様体を形成したWellの培地を半量捨てて、Wnt10bを含むiPS細胞用の培地により半量交換した(終濃度 $500 \text{ ng}/\text{mL}$)。CO₂インキュベーター内にて、Wnt10b添加培地中の胚様体を24時間培養した。

[0056] (5) iPS細胞由来の胚様体の移植によるテラトーマの形成

シリコングリースを薄く塗った滅菌プラスチックディッシュ上にて $30 \mu\text{L}$ の冷I型コラーゲンゲル(新田ゼラチン)ドロップを形成し、ゲル形成する

前に手早く32個または48個の胚様体を包含させ、CO₂インキュベーター内にて37℃、10分間インキュベートしてゲル化させた。胚様体を包含したコラーゲンを、1個ずつ麻酔下でC. B-17/lcr-scld/scldJclマウス（7～10週齢）の両腎の腎皮膜下へ移植した。移植後28または30日目にIPS細胞由来の胚様体を移植したマウスを犠牲死させて、テラトーマを摘出した。

[0057] (6) テラトーマ内の嚢胞の組織学的分析

テラトーマ内の嚢胞上皮の解析および誘導された器官の組織学的分析を行うために、摘出したテラトーマの重量を計測してマクロ写真を撮影した後に、当該テラトーマをマイルドホルム10N固定液（Wako）に浸漬して、室温にて一晩固定した。固定したテラトーマ組織は、通法に従ってパラフィン包埋または凍結包埋して、10μm厚の連続切片を作製した。連続切片の全部または一部をマイヤー処方のヘマトキシリンを用いてHE染色して、テラトーマ内嚢胞の組織学的分析を行った。テラトーマ内の毛包形成頻度を解析するために、ブロック表面より3mm厚分を組織化学解析し、正立顕微鏡Axioimager A1（Carl Zeiss）とAxioCAM MRc5（Carl Zeiss）を用いて、形成された毛包の個数をカウントした。連続切片上で毛球部が一番大きくなった毛包のみをカウントした。また、組織像は正立顕微鏡Axioimager A1（Carl Zeiss）とAxioCAM MRc5（Carl Zeiss）で撮影した。

[0058] 2. 結果

(7) 胚様体を含む結合体の生体内移植による全層皮膚および粘膜様組織の形成

(7-1) 胚様体を含む結合体の生体内移植物の組織学的解析

胚様体を含む結合体を生体内に移植して形成されたテラトーマ内の嚢胞について、連続切片のHE染色像を観察して、組織学的な特徴を解析した。その結果、皮膚様嚢胞には皮脂腺を有する毛包が接続しており、皮脂腺の接続

位置を境界として嚢胞上皮方向には線維芽細胞が散在するエオジン好性の真皮層が位置しており、毛球部方向には脂肪組織が分布していた。嚢胞の表皮層は基底細胞層、曲細胞層、顆粒層および角質層が規則的に配置されており、角質層は嚢胞腔内に向けて明瞭な層状に剥離していることから典型的な皮膚表皮組織であることが示された。毛包の開口部より嚢胞内腔に向けて毛幹が成長していることが示された（図1、黒矢印）。皮脂腺と毛包の接続部位は毛包漏斗部または毛穴の開口部であり（図1、左白矢頭）、皮脂が毛穴を介して表皮外層に分泌しうることが示唆された。この構造は天然の皮膚の組織学的特徴と完全に一致しており、嚢胞腔を中心として全層皮膚が誘導されていることが示された。一方、粘膜様嚢胞には毛包などの外胚葉性器官は認められず、やや不明瞭な単層角化上皮層の周囲をルーズな結合組織である粘膜固有層と粘膜下層がとりまき、粘膜下層には平滑筋層と分泌腺様の組織が配置されており、組織学的に粘膜などと同等であることが示された（図1、右）。

[0059] (7-2) 胚様体形成時のWnt10b添加による上皮組織の領域誘導

(3)～(5)に記載の方法により、マウス腎皮膜下に形成したテラトーマ（図2A）の組織切片をHE染色し、形成された嚢胞の上皮組織および周囲の間質組織の組織学的特徴より、皮膚様（扁平重層角化上皮層／真皮層／脂肪または横紋筋）、粘膜様（扁平重層角上皮／粘膜固有層／横紋筋）、移行上皮（扁平重層角化上皮と単層柱状上皮の移行形態）、内胚葉性上皮様（単層柱状上皮／粘膜固有層／横紋筋）に分類して、その構成比率を計測した（図2B）。その結果、Wnt10b刺激を行わなかった胚様体による移植物と比べて、Wnt10b刺激を行った胚様体を移植した場合、内胚葉性上皮様の嚢胞が減少して、皮膚様および粘膜様の頻度が増加した（図2C）。

[0060] (7-3) Wnt10b添加による毛包形成頻度の増加

Wnt10b刺激した胚様体由来のテラトーマ1gあたりに含まれる誘導毛包数（ 285 ± 128 , $n=4$ ）は、Wnt10b未処理群（ 39 ± 21 , $n=8$ ）に比べて有意に増加した（図2D）。また腎皮膜下内への胚様体

移植後28－30日目のテラトーマ内に誘導された毛包より成長した毛幹長を計測したところ、Wnt10b添加群が未処理群に比べて2倍の長さであった。

[0061] (7-4) Wnt10b添加による外分泌腺組織の誘導

Wnt10b刺激を加えた胚様体由来のテラトーマのHE組織解析において、外分泌腺の腺房構造が多数集簇した構造が認められた(図1右)。そこで、唾液腺と膵臓の外分泌腺のみが分泌するアミラーゼに対する抗体を用いて、外分泌腺の腺房類似組織を免疫染色したところ、上皮性細胞マーカーであるEカドヘリン陽性細胞の細胞質において分泌小胞に特有な顆粒状の陽性像が示された。この結果より、Wnt10b刺激により毛包のみならず唾液腺などの外分泌腺が誘導されたことが示唆された(図3)。

[0062] (8) iPS細胞由来毛包および全層皮膚の品質および機能評価

(8-1) iPS誘導毛の皮膚内移植による発毛能

テラトーマ内にて誘導された全層皮膚に含まれる毛包器官が、完全に機能的であり移植可能であるかどうかを調べるために、iPS細胞の生体内移植により誘導された毛包を含む全層皮膚を摘出し、毛群となるように切り分けて、ヌードマウス皮膚内に移植を行った。移植した毛群は、皮膚内移植後7日目に脱毛し、その後14日目に66%(117例中77例)の頻度で発毛することが明らかとなった(図4)。iPS細胞由来毛包および皮膚組織は生体の皮膚内への移植可能な機能を再現することが示された。

[0063] (8-2) iPS誘導毛の毛周期解析

テラトーマ内にて誘導された全層皮膚に含まれる毛包器官が、毛周期を繰り返して永続的に機能するかどうかを調べるために、iPS細胞の生体内移植により誘導された毛包を含む全層皮膚を摘出し、毛群となるように切り分けて、ヌードマウス皮膚内に移植を行った(本明細書においては、本発明の方法によってiPS細胞から誘導された毛包を「iPS誘導毛包」と呼び、iPS誘導毛包の移植によって誘導された毛を、「iPS誘導毛」と呼ぶ)。前記移植を行った群より発毛した毛幹の毛種を判別したところ、体毛に含

まれる *Z i g z a g*, *A w l*、および *G u a r d* 毛を含むことが示された。そこで、毛種ごとに毛幹の成長を第3毛周期まで追跡し、毛幹成長期間と毛幹成長休止および脱毛期間長を分析したところ、成体体毛と同等な周期性を繰り返すことが示された（図5）。これらの結果より *i P S* 誘導毛は、生体の幹細胞ニッチを再現しており、毛周期を永続的に繰り返すことが示唆された。

[0064] (8-3) *i P S* 誘導毛の由来解析

(8-2) に記載の方法で移植した全層皮膚および発毛した毛が *i P S* 細胞由来であることを証明するために、Y染色体を標識し蛍光 *i n s i t u h y b r i d i z a t i o n* (FISH) を行った。本実験で使用している *i P S* 細胞は雄マウス由来の細胞であり、移植先の *B a l b / c n u / n u* マウスは雌マウスのため、核内のY染色体を緑色蛍光色素で標識し、移植物から発生した器官（全層皮膚および発毛した毛包）の由来を解析した。その結果、毛包等の皮膚付属器を含む全層皮膚はY染色体陽性の細胞すなわち、*i P S* 細胞より誘導された細胞で構成されていることが明らかとなった（図6）。また、毛包と連結している上皮層はY染色体陽性であるのに対し、ホストの組織ではY染色体は検出されなかった。

[0065] (8-4) *i P S* 誘導毛のニッチ解析

i P S 細胞より誘導された全層皮膚に含まれる誘導毛が幹細胞ニッチを形成しているかを明らかにするために、上皮幹細胞マーカーである *C D 3 4* と *C K 1 5* で免疫染色を行った。また可変領域方向または、皮脂腺および皮膚表皮へコミットした上皮幹細胞ニッチを再現しているかを明らかにするために、*L g r 5*, *L g r 6*, *L r i g 1* 陽性細胞の挙動を解析した。組織学的に皮脂腺下方の膨隆した外毛根鞘と定義されるバルジ領域は、*C D 3 4* および *C K 1 5* 共陽性の毛包上皮幹細胞が局在する幹細胞ニッチとして機能し、毛包の恒常性を維持するために必要不可欠であるため、これらをマーカーとして *i P S* 誘導毛包を免疫染色により解析した。その結果、*C D 3 4* を赤色、*C K 1 5* を緑色で蛍光標識すると、組織学的に *i P S* 誘導毛包のバルジ領

域に相当する外毛根鞘において黄色く染色された（図7b、矢印）。このことから、CD34, CK15を共発現する上皮幹細胞がバルジ領域に格納されたことが示された。従って、iPS誘導毛は上皮性幹細胞ニッチを構築することが示された。成長期毛包においては、毛包可変部の外毛根鞘細胞と毛母のAuber氏臨界線下方に毛母前駆細胞であるLgr5陽性細胞が分布し、休止期毛包ではLgr5陽性細胞が二次毛芽に局在することが知られている。また、Lgr6およびLrig1陽性細胞はバルジの上部より皮脂腺付着部付近に局在する。iPS誘導毛包の成長期および休止期においても、Lgr5, Lgr6, Lrig1陽性細胞の挙動を解析したところ、Lgr5, Lgr6, Lrig1それぞれ天然毛と同じ部位で発現が確認された（図7）。

[0066] (8-5) iPS誘導毛包と周辺組織との接続

iPS誘導毛包が立毛筋および神経と接続しているかを確かめるために、100 μ m厚切片を作製して、神経繊維マーカーであるニューロフィラメント、平滑筋マーカーであるカルポニン、横紋筋マーカーであるトロポニンに対する抗体を用いた免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で解析した。天然体毛は、バルジ領域にカルポニン陽性である平滑筋からなる立毛筋が接続している。そこへ深部神経叢から伸びた交感神経が立毛筋を取り囲むように配置することで、神経筋接合部を形成し、神経支配を受ける。iPS誘導毛包は有色毛であり、ホスト毛包と識別することができるため、iPS誘導毛包をホスト毛包と識別したうえで神経繊維および立毛筋接続を免疫染色により解析した。その結果、天然体毛と同様に、カルポニン陽性の立毛筋がバルジ領域に接続（図8、矢印）し、そこに神経繊維が接続していた（図8、矢頭）。さらに、毛包と立毛筋の接続だけでなく、サブバルジの上皮に神経-毛包接合部が見られた（図8）。バルジ領域周囲には神経線維の接続が見られ、神経終末端はバルジ領域のORS最外層に分布し、神経-毛包接合部が見られた（図8）。

[0067] (8-6) 単一化iPS細胞およびiPS誘導毛包を含む全層皮膚のヌード

マウス皮下移植による造腫瘍アッセイ

i P S細胞より誘導された全層皮膚の移植が腫瘍形成するかどうかを試験するために、20毛包相当を含む全層皮膚をヌードマウス背部皮膚へ移植して、3ヶ月間にわたり腫瘍細胞の増殖による腫瘍形成を追跡した。比較群として同じ、i P S細胞ラインより単個細胞の状態にしたi P S細胞を作製して、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 cellsずつ皮内へ移植して同一期間追跡した。その結果、単個細胞の移植では、どの細胞数においても腫瘍形成による腫瘍の増大が見られ、移植後20日から40日において腫瘍形成が見られ、移植細胞数に依存して腫瘍形成が早い傾向となった（表1）。それに対して、i P S誘導毛包の移植では、移植後90日までの追跡で腫瘍形成による腫瘍の増大は認められなかった（表1）。

[表1]

表1 . iPS誘導毛包および単一化iPS細胞のヌードマウス皮内移植による造腫瘍性			
移植物	移植条件	腫瘍形成頻度	腫瘍形成日数 (mean $\pm$ se)
単一化iPS細胞	10,000 cells	17% (n=6)	44.0
	100,000 cells	33% (n=6)	34.5 $\pm$ 1.5
	1,000,000 cells	50% (n=6)	20.3 $\pm$ 1.9
iPS誘導毛群	20 HFs相当	ND (n=18)	ND

[0068] 以上の結果から、本発明の方法によれば、効率的に、皮膚付属器官を有する全層皮膚を人工的に製造することができる。また、本発明の方法によって製造された全層皮膚は、移植によって腫瘍を引き起こす危険性が極めて低く、生体への移植を前提とした器官の形成技術としても極めて有望であることが示された。

請求の範囲

- [請求項1] 皮膚付属器官を有する全層皮膚を製造する方法であって、
前記「皮膚付属器官を有する全層皮膚」は、少なくとも下記（１）～（３）；
（１）表皮層と真皮層を含む皮膚
（２）少なくとも１種類の皮膚付属器官
（３）皮下組織
を含み、
前記方法は、下記ステップ；
（ａ）胚様体を、W n t 経路を活性化させ得る生理活性物質で刺激するステップ、
（ｂ）：下記（Ａ）および（Ｂ）を含む結合体を調製するステップ；
（Ａ）ステップ（ａ）で刺激を行った前記胚様体の全部または一部
（Ｂ）足場材料
（ｃ）：前記ステップ（ｂ）で調製した前記結合体を動物に移植するステップ、および、
（ｄ）：前記動物中において、前記結合体由来の全層皮膚を製造するステップ、
を含むことを特徴とする、方法。
- [請求項2] 請求項１に記載の方法であって、
前記動物が非ヒト動物である、
方法。
- [請求項3] 請求項２に記載の方法であって、
前記非ヒト動物が非ヒト免疫不全動物である、
方法。
- [請求項4] 請求項２または３に記載の方法であって、

前記W n t 経路が古典的W n t 経路である、
方法。

[請求項5] 請求項2または3に記載の方法であって、
前記「W n t 経路を活性化させ得る生理活性物質」が、W n t 1、
W n t 2、W n t 2 b、W n t 3、W n t 3 a、W n t 6、W n t 7
b、W n t 8 a、W n t 8 b、W n t 10 b、および、T G F - β か
らなる群から選択される、
方法。

[請求項6] 請求項2または3に記載の方法であって、
前記胚様体が、i P S細胞またはE S細胞から作製された胚様体で
ある、
方法。

[請求項7] 請求項2または3に記載の方法であって、
前記足場材料が、コラーゲンゲルである、
方法。

[請求項8] 請求項2または3に記載の方法であって、
前記移植が、腎皮膜下への移植である、
方法。

[請求項9] 請求項1～8のいずれか1項に記載の方法によって製造される、
皮膚付属器官を有する全層皮膚。