

iPS細胞由来顔面部真皮幹細胞誘導法の開発

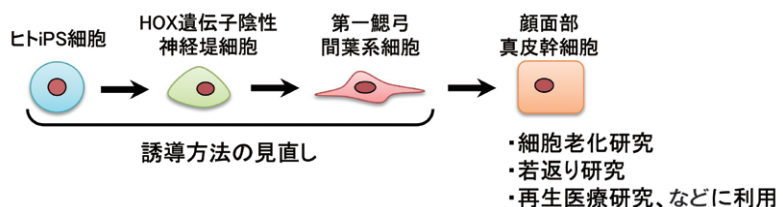
京都大学iPS細胞研究所 池谷 真

1. 緒言

肌は「表皮層」「真皮層」「皮下組織」の3層で構成されている。中でも「真皮層」は肌の質感に直接関与する重要な層である。真皮層を構成するコラーゲンやエラスチンといった線維群は若い肌に弾力やハリを与え、またヒアルロン酸が水分を保つことで肌に潤いを与える。一方で、加齢や紫外線などの肌ダメージによってこれらの構成成分が失われると、肌にシワやタルミが生じ、顔貌全体の印象が大きく「老化」にシフトする。したがって、真皮層の研究はコスメトロジー領域の最重要研究テーマの一つであるといえる。

真皮層を構成する主な細胞は「皮膚線維芽細胞」であり、この細胞がコラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸などを産生する。そして、皮膚線維芽細胞のもととなるのが「真皮幹細胞」である。真皮幹細胞は皮膚に存在し、間葉系幹細胞と類似の表面抗原マーカーを保持する細胞である。ただ、生体内に存在する数が非常に少ないため、研究用材料として大量に生体から採取してくることは容易ではない。

この課題に対し、万能細胞であるiPS細胞から真皮幹細胞を大量に作成し、研究に使用することは、1つの解決策となりうる¹⁻³⁾。iPS細胞は発生過程の初期に出現する胚盤葉上層に相当すると考えられている。そのため、iPS細胞から目的細胞を誘導する方法を開発する際に、特に重要となるのが、発生学上の分化経路（細胞系譜）である。これまでの研究から、顔面部と体幹部（四肢を含む）は発生学的起源が異なり、顔面部は神経堤細胞を、体幹部（と四肢）は中胚葉細胞を経由することが知られている⁴⁾。コスメトロジー領域において、顔面部皮膚の研究が特に重要な意義を持つことを鑑み、本研究ではiPS細胞から一旦神経堤細胞を誘導し、次に真皮幹細胞の特徴を持つ間葉系幹細胞を誘導し、そこからさらに皮膚線維芽細胞を誘導するという三段階の誘導法を開発を計画した（図1）。



■ 図1 本研究の概念図。HOX遺伝子陰性神経堤細胞、第一鰓弓間葉細胞、顔面真皮幹細胞という三段階の段階的誘導法の確立を目指した。

我々はこれまでの研究で、三段階のうちの第一段階である「iPS細胞から神経堤細胞誘導法」を、すでに確立済であった⁵⁾。しかし、この方法はiPS細胞の株間による誘導効率のばらつきが大きく、一部の株では全く誘導されないという課題があった。そこで、本研究ではiPS細胞から神経堤細胞への誘導方法を根本的に見直し、株間による神経堤細胞への誘導効率にばらつきのない誘導方法の確立、および神経堤細胞から顔面部真皮幹細胞の起源の1つである第一鰓弓間葉系細胞への誘導方法の確立、および第一鰓弓間葉系細胞の証明としてパターンニング因子に対する反応性の確認と顎骨への分化誘導を行った。以下にその方法と結果を示す。

2. 方法

2.1. ヒトiPS細胞からのHOX遺伝子陰性神経堤細胞の3次元誘導

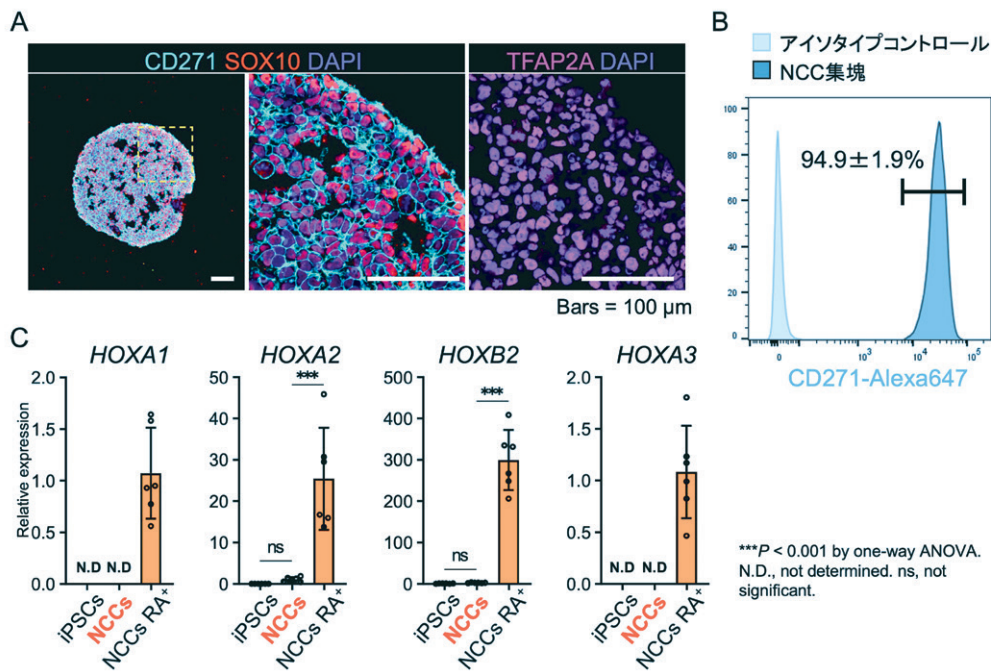
フィーダーフリーかつゼノフリー条件で維持培養したヒトiPS細胞株(1231A3)を培養皿から剥離し、1日間、ROCK阻害剤Y-27632を添加した培地中で96ウェルVボトム超低接着プレートを用いて3次元凝集体を形成した。神経外胚葉の混入を抑制するため、凝集体をBMP4とTGF- β 阻害剤SB431542で1日間前処理した後、SB431542とGSK3 β 阻害剤CHIR99021を添加して3日間振盪培養を行った。評価には、神経堤細胞マーカーであるSOX10、CD271(NGFR/p75NTR)、TFAP2Aの抗体染色解析、CD271のフローサイトメトリー解析、qPCRによる遺伝子発現解析、RNAシーケンシングによる経時的な発現変動解析、ならびに末梢神経細胞、メラノプラスト、間葉系幹細胞への分化能にて評価を行った。なお、同プロトコルは、初期細胞密度とBMP4濃度を最適化することで複数の細胞株において適用可能であった。

2.2. HOX遺伝子陰性神経堤細胞凝集体からの第一鰓弓間葉系細胞への誘導

胚発生における第一鰓弓間葉系細胞のパターンニングに参与するシグナル因子(FGF8、エンドセリン-1(EDN1)、BMP4)の効果を検証するため、HOX遺伝子陰性神経堤細胞凝集体を以下の3条件((1) FGF8単独、(2) FGF8 + EDN1、(3) FGF8 + EDN1 + BMP4(FEDB条件))で処理した。FGF8は第一鰓弓間葉系細胞の生存・増殖を促進する因子として、EDN1は下顎隆起特異的に分泌されるDLX5/HAND2遺伝子の活性化因子として、BMP4は遠位領域形成促進因子として選択した。比較対照として、EDN1シグナル阻害実験としてエンドセリン受容体A型(EDNRA)アンタゴニストBQ-123をFGF8と併用(FQ条件)した。抗体染色解析とqPCR/RNAシーケンシングによる遺伝子発現解析を実施し、第一鰓弓間葉系細胞、中でも下顎特異的のマーカー(DLX5、HAND2、GSC)および非特異的のマーカー(SOX10、POU3F3)の発現動態を評価した。

2.3. 第一鰓弓間葉系細胞を用いた後期領域パターン形成の再現

第一鰓弓間葉系細胞凝集体を96ウェルU底超低接着プレートに移し、遠位キャップ構造誘導群(BMP4^{high}、EDN1、FGF2^{low}条件)と近位口腔構造誘導群(FGF8、SAG、BQ-123、LDN条件)の2系統に分けて培養した。遠位キャップ構造誘導ではBMP4濃度依存性を検証し、近位口腔構造誘導ではShhシグナル作動薬SAGに加え、EDN1阻害剤BQ-123とBMP阻害剤LDN193189を併用した。歯原性分化能評価のため、近位口腔構造誘導体をFGF8・SHH・CHIR・ACTIVIN-A(FSCA条件)で処理し、免疫染色、qPCR、RNA-seq、GO解析によりマーカー発現を網羅的に評価した。



■ 図2 HOX遺伝子陰性神経堤細胞の誘導。A. 誘導5日目の凝集体の切片の抗体遺伝子像。Bar: 100 μ m。
B. CD271によるフローサイトメトリー解析。C. qPCRによるHOX遺伝子群の発現解析。

2.4. 3次元培養系を用いた*in vitro*顎骨様オルガノイドの作製

顎骨様オルガノイドの作製を以下の手順で行った。超低接着性96ウェルVボトムプレートを用いて細胞凝集体を浮遊培養し、骨分化誘導培地(ゼノフリー条件)で38日間培養した。培養過程では、振盪培養による栄養供給の最適化と、BMP4、FGF2、EDN1などの誘導因子の濃度勾配を制御することで、膜性骨化様式を再現した。評価系として、アルカリフォスファターゼ活性測定、qPCR解析(SP7、PHEX、SOSTなどの骨関連マーカー)、RNAシーケンシングを実施し、時間経過に伴う分化段階をモニタリングした。組織学的解析には、脱灰処理後のアザン染色による骨基質可視化と、骨基質マーカー(COL1、OPN、OCN)による抗体染色を組み合わせた。

3. 結果

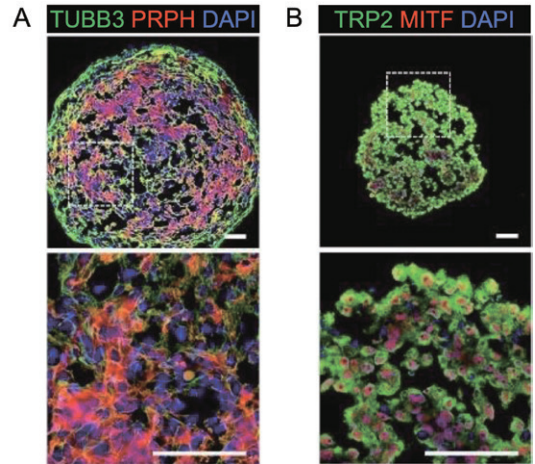
3.1. HOX遺伝子陰性神経堤細胞の高効率誘導と特性解析

本研究では、iPS細胞からの顔面部真皮幹細胞への誘導を目的とし、最初にヒトiPS細胞からHOX遺伝子陰性神経堤細胞を効率的に誘導する3次元培養系を確立した。本3次元培養系により、抗体染色では、SOX10陽性、CD271陽性、TFAP2A陽性の多数の細胞が確認され(図2A)、フローサイトメトリー解析では、CD271強陽性の細胞が94.9 \pm 1.9%という高い純度で誘導された(図2B)。また、未分化iPS細胞(OCT3/4+)や神経外胚葉(PAX6+)の混入は極めて少ないことも確認された。qPCR解析では、これまでに確立していた2次元培養系と同等のレベルで神経堤

細胞マーカー(SOX10、NGFR、TFAP2A、RHOB、PAX3)を5日目の凝集体が発現しており、多能性マーカーPOU5F1(OCT3/4)の発現が低下していることが示された。また、神経堤細胞凝集体の前後軸方向の特性を評価するため、後方化を誘導するレチノイン酸(RA)で処理した凝集体を陽性対照として調製し、qPCR解析によるHOX遺伝子発現解析を行ったところ、RA処理群と比較して、非RA処理群ではHOXA1、HOXA2、HOXB2、HOXA3の発現が有意に低いことが確認された(図2C)。また、RNAシーケンシングでは、iPS細胞(0日目)から神経板境界細胞を経て神経堤細胞(5日目)へと段階的に移行する過程が明らかとなった。さらに、誘導した神経堤細胞は末梢神経細胞(TUBB3/PRPH陽性; 図3A)、メラノblast(TRP2/MITF陽性; 図3B)、および間葉系幹細胞(CD73/CD105陽性)へと分化可能であり、多分化能を保持していることが確認された。これらの結果から、本研究で確立した3次元培養系が、HOX遺伝子陰性の神経堤細胞を高純度かつ高効率で誘導する有効な手法であることが実証された。

3.2. 第一鰓弓間葉系細胞の空間的パターンニング 再現とEDN1シグナルの機能的検証

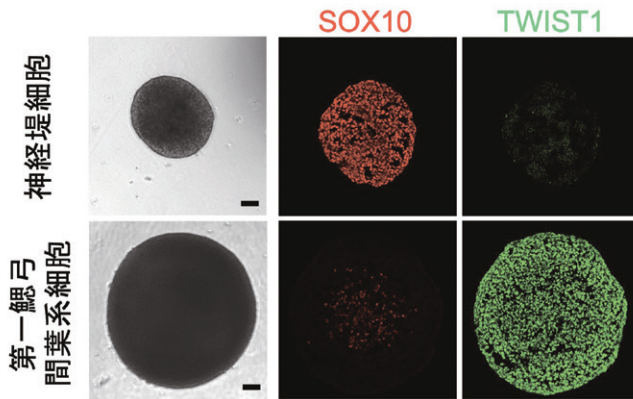
次に、HOX遺伝子陰性神経堤細胞凝集体からの第一鰓弓間葉系細胞誘導プロトコルを開発した。まず、FGF8単独処理では神経堤細胞マーカーSOX10の発現低下と間葉系マーカー(TWIST1、PRRX1)の発現誘導が確認され、間葉系への初期分化が促進された。FGF8とEDN1の併用により、第一鰓弓間葉系細胞マーカー(DLX1、DLX2)と第一鰓弓(特に下顎)間葉系特異的マーカー(DLX5、DLX3、GSC)が協調的に発現し、さらにBMP4添加(FEDB条件)で遠位マーカーHAND2が強く誘導された。RNAシーケンシング解析では、



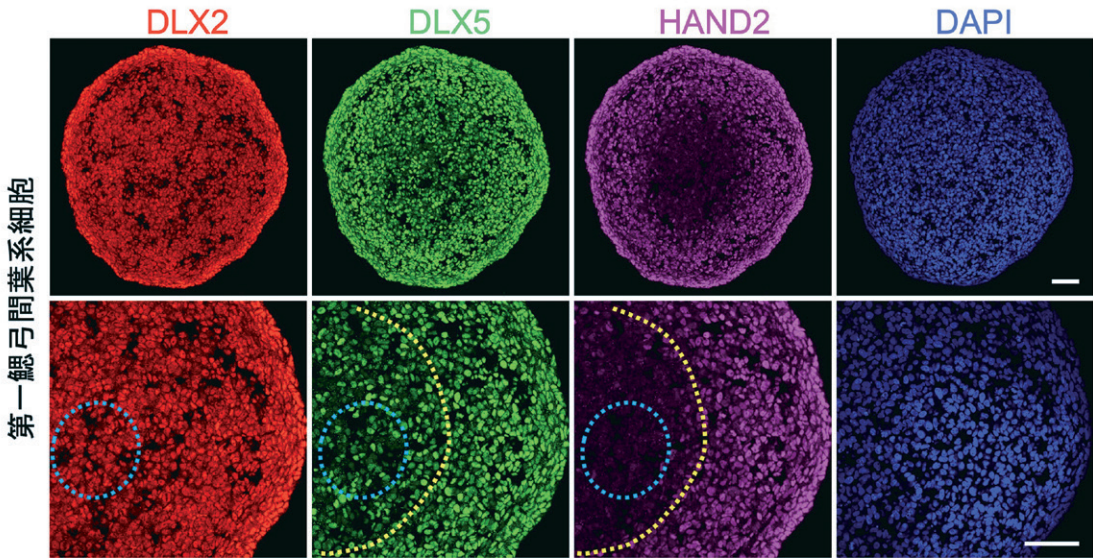
■ 図3 誘導した神経堤細胞の分化能の検証。A. 神経誘導後の神経マーカー(TUBB3、PRPH)の発現。B. 色素細胞誘導後のメラノblastマーカー(TRP2、MITF)の発現。Bar: 100 μm。

神経系・メラノサイト系マーカーの発現が抑制され、HOX遺伝子群の低発現が維持されることで顔面部特異性が確保された。

上述の遺伝子発現は免疫染色でも確認された。FEDB処理によりSOX10の発現は減少し、TWIST1の発現は上昇した(図4)。また、凝集体は3層構造を示していることが分かった(図5)。中心部にDLX2単独陽性細胞、中間層にDLX2/DLX5二重陽性細胞、表層にDLX2/DLX5/HAND2三重陽性細胞が分布し、第一鰓弓(特に下顎)間葉系細胞の近位-遠位軸パターンを忠実に再現した。一方、EDNRA阻害(FQ条件)では上顎間葉系細胞マーカー(POU3F3、CYP26A1)の発現が増加し、下顎間葉系細胞マーカー発現はFEDB条件の30%以下に抑制された。この結果は、EDN1シグナルが下顎/上顎外間充織の運命決定に決定的な役割を果たすことを示唆している。



■ 図4 第一鰓弓間葉系細胞への分化誘導。誘導5日目の神経堤細胞で発現する神経堤細胞マーカーSOX10は誘導9日目の第一鰓弓間葉細胞で減少し、間葉系マーカーのTWIST1は上昇する。Bar: 100 μ m。



青破線、DLX2単陽性領域
黄破線、DLX2/DLX5二重陽性領域

■ 図5 第一鰓弓葉系細胞のパターニング解析。誘導9日目の第一鰓弓間葉系細胞では、中心部にDLX2単独陽性細胞、中間層にDLX2/DLX5二重陽性細胞、表層にDLX2/DLX5/HAND2三重陽性細胞が分布する。これは、第一鰓弓(特に下顎)間葉系細胞の近位-遠位軸パターンと類似性がある。Bar: 100 μ m。

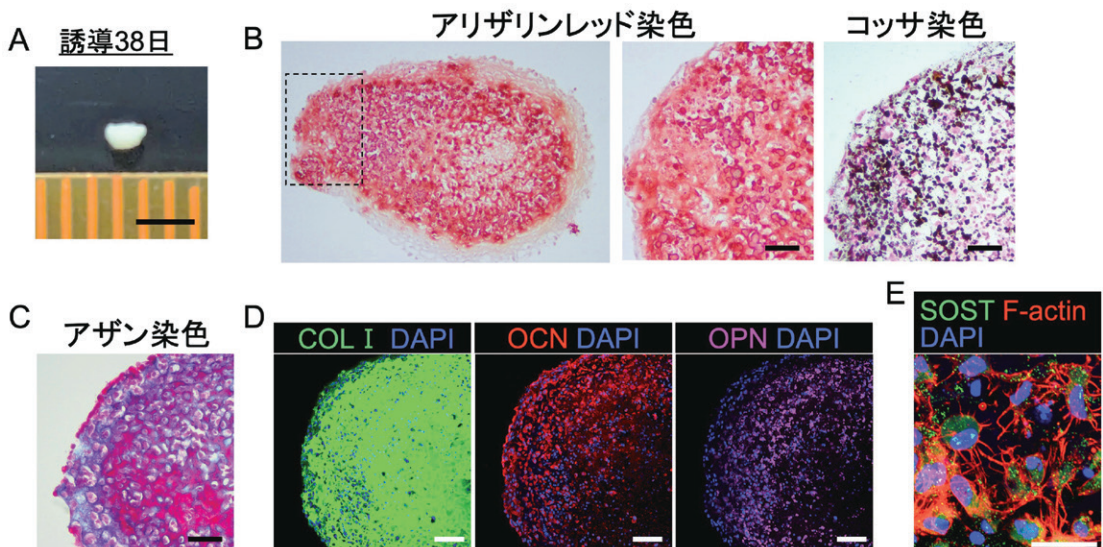
3.3. 第一鰓弓間葉系細胞の領域特異的パターンニングと歯原性分化能

さらに、発生後期の第一鰓弓(特に下顎)間葉系細胞における領域特異的パターンニングを再現するため、上皮シグナル因子を組み合わせた培養系を構築した。遠位キャップ構造誘導群では、BMP4高濃度処理によりHAND1が顕著に発現上昇し、HAND2、GATA3、DKK1などの遠位構造マーカーが協調的に発現した。抗体染色では凝集体の外側にHAND1陽性細胞が分布し、DLX5発現が減少するというマウス胚でのパターンが再現された。一方、近位口腔構造誘導群ではFOXF1、GLI1、PITX1などの口腔マーカーが誘導され、FGF8/SAG処理にEDN1/BMP阻害を加えることで発現がさらに増強された。両構造体のマーカー発現は相互排他的であり、RNA-seq解析でもこの傾向が確認された。歯原性分化評価では、FSCA処理によりTFAP2B、LHX6、

PAX9などの歯間充織マーカーが誘導され、GO解析で「歯質形成」関連遺伝子が有意に濃縮された。これらの結果は、第一鰓弓(特に下顎)間葉系細胞が胚性下顎骨と同様の空間的パターンニングを示し、歯原性分化能を保持することを実証している。

3.4. 第一鰓弓間葉系細胞を用いた*in vitro*顎骨様オルガノイドの作製

最後に、iPS細胞由来の第一鰓弓間葉系細胞を基盤とした顎骨様オルガノイド作製プロトコルを開発した。3次元培養により得られた凝集体は、38日間の培養後、直径1.0-1.5mmの白色構造体を形成し(図6A)、組織学的解析では、アリザリンレッド染色、コッサ染色陽性の石灰化組織(図6B)と、アザン染色陽性の骨様組織が観察され(図6C)、骨基質マーカーであるCOL1、OPN、OCNが基質中に豊富に分布していた



■ 図6 *in vitro*顎骨様オルガノイドの作成。A. 誘導38日後の外観。B. 切片のアリザニン染色およびコッサ染色。C. 切片のアザン染色。D. 切片のCOL1、OCN、OPNの抗体染色の像。E. SOST、F-actinの抗体染色。Bar: A, 2mm、B-D, 100 μ m、E, 25 μ m。

(図6D)。さらにSOST陽性成熟骨細胞がFアクチン陽性の3次元樹状突起ネットワークを形成していることも観察された(図6E)。また、中心部に散在するアルシアンブルー陽性の未熟軟骨はCOLX陰性であり、膜内骨化が主要な形成機序であることが示唆された。遠位キャップ構造誘導体は近位口腔構造誘導体に比べ顕著な骨形成能を示し、この特性は複数のiPS細胞クローンで再現された。これらの結果は、第一鰓弓間葉系細胞凝集体から発生学的に忠実な顎骨様オルガノイドを作製可能であることを実証している。

4. 考察およびまとめ

本研究では、iPS細胞から顔面部真皮幹細胞を誘導するために、その発生起源となるHOX遺伝子陰性神経堤細胞および第一鰓弓間葉系細胞への新しい誘導方法を開発した。この方法はこれまでの方法と異なり、複数の株で高効率に神経堤細胞を誘導することが可能であった。また、パターンニング因子を調整することで領域特異的な間葉系細胞の誘導に成功し、さらに3次元樹状突起ネットワークを持つ顎骨様オルガノイドの作成にも成功した。

次の課題として、第一鰓弓間葉系細胞から顔面部真皮幹細胞への誘導法の確立が必要である。我々は、予備的実験ではあるが、皮膚線維芽細胞のマーカーを発現し、炎症刺激に応じて皮膚線維芽細胞特有の細胞外マトリクスの発現を上昇するような細胞が間葉系幹細胞から誘導されることを確認している。間葉系細胞と皮膚線維芽細胞の間には顔面部真皮幹細胞が存在すると考えられるため、今後はまず誘導された皮膚線維芽細胞の特性を解析し、その誘導過程を詳細に解析することで、顔面部真皮幹細胞の誘導法を確立することを目指す。

従来、真皮幹細胞は生体内に極めて少数しか存

在せず、採取に侵襲を伴うため研究利用には多くの制限が存在する。本手法によりiPS細胞から大量の顔面部真皮幹細胞を非侵襲的に調製可能となった場合、コスメトロジー研究に画期的な進展をもたらすことが期待される。一例として、真皮幹細胞の再生能を大規模な*in vitro*評価系で検証可能となった場合、新規薬剤の開発効率は飛躍的に向上する。本研究では動物成分を含まないゼノフリー培養系を構築しているため、血清などの不確定な成分を排除した実験系を構築できることも大きなメリットと考えられる。またこの点は、細胞移植療法を検討する上でも重要である。さらに別の例としては、iPS細胞バンクの遺伝的多様性(人種・性別・年齢)を活用することで、肌質の個人差に応じた「パーソナライズドコスメトロジー」研究も将来的に可能となる。また、紫外線応答遺伝子の多型を持つ個体群の細胞を比較することで日焼け耐性メカニズムを解明する研究や、あるいは口唇裂患者由来iPS細胞を用いることで真皮-上皮相互作用の異常機序を分子レベルで解明する研究などに活用できる可能性がある。

謝辞

本研究を力強く推進した本池総太博士に深謝いたします。また、ご支援いただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より感謝申し上げます。本成果は2025年4月30日に国際科学誌「*Nature Biomedical Engineering*」に受理されました。

参考文献・他

- 1) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25; 126 (4): 663-76.
- 2) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30; 131 (5): 861-72.
- 3) Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007 Dec 21; 318(5858): 1917-20.
- 4) Driskell RR, Watt FM. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends Cell Biol*. 2015 Feb; 25 (2): 92-9.
- 5) Kamiya D, Takenaka-Ninagawa N, Motoike S, Kajiji M, Akaboshi T, Zhao C, Shibata M, Senda S, Toyooka Y, Sakurai H, Kurihara H, Ikeya M*. Induction of functional xeno-free MSCs from human iPSCs via a neural crest cell lineage. *NPJ Regen Med*. 2022 Sep 15; 7(1): 47.

Title : Development of a method for induction of iPS cell-derived cranial dermal stem cells

Author : Makoto IKEYA
Center for iPS Cell Research and Application (CiRA),
Kyoto University

Abstract : The dermal layer's structural integrity, maintained by collagen/elastin networks produced by dermal fibroblasts, is fundamental to skin youthfulness. However, the rarity of dermal stem cells and ethical challenges in obtaining facial-specific samples from healthy donors have severely constrained anti-aging research. This study bridges these gaps through an innovative integration of developmental biology and stem cell technology. Building upon recent advances in neural crest cells (NCCs) induction from iPSCs, we established a robust protocol to generate craniofacial-specific mesenchymal cells from human iPSCs via NCCs. Our xeno-free 3D induction system achieves the induction of HOX-negative (craniofacial) NCCs highly efficiently, overcoming the variability and line-dependency of conventional 2D methods. These cells faithfully recapitulate patterning of mandibular arch through EDN1-dependent mechanisms, forming spatially organized structures with distal DLX2+/DLX5+/HAND2+ domains and proximal DLX2-/DLX5-/HAND2-domains. The resulting maxillary organoids demonstrate physiologically relevant features including intramembranous ossification and functional SOST+ osteocyte networks by day 38.

This research creates new opportunities to develop targeted anti-aging interventions. The cells serve as ideal substrates for testing next-generation compounds, from small-molecule to biologics addressing fibroblast senescence. Furthermore, the platform's adaptability allows future incorporation of epitheli-

al components to model complete skin organoids, potentially revolutionizing both cosmetic safety testing and regenerative therapies for craniofacial reconstruction.

※本論文は、(公財)コーセーコスメトロジー研究財団の公益事業として執筆されたものであり、論文掲載にあたり同財団のご承諾を得ております。また、財団HPでも無償公開しています。
<https://www.kose-cosmetology.or.jp/>