

令和元年11月28日現在

機関番号：82406

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07373

研究課題名(和文) 光学的相互作用を活用した三次元培養皮膚の高品質化および品質評価に関する研究

研究課題名(英文) Quality improvement and evaluation of a 3-dimensional cultured skin model by light-tissue interactions

研究代表者

角井 泰之(Tsunoi, Yasuyuki)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・防衛医学研究センター 生体情報・治療システム研究部門・助教)

研究者番号：30806451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血管構造を持つ三次元培養皮膚モデルを移植医療に応用するために、光学的相互作用を用いた同培養皮膚のバイアビリティ向上と血管構築の評価技術について検討を行った。培養中の皮膚に近赤外LED光を照射した結果、組織中のアデノシン三リン酸の量が増加し、死細胞数が減少する傾向が認められた。一方、光音響法を用いることで、吸収標識した培養皮膚中の血管の深さ分布をin situで測定できることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、移植用の同種皮膚(他人の皮膚)は慢性的にドナーが不足している状況であり、また市販の人工皮膚は耐感染性に問題がある。申請者らの三次元培養皮膚はヒト培養細胞を用いた大量生産が可能であり、また血管系を含むことから移植後の高い耐感染能が期待できるため、新たな移植皮膚として有用性が高いと考えられる。本研究で検討した同培養皮膚の高品質化と品質評価のための光技術は、質の高い移植皮膚を安定的に供給するために必要不可欠な要素技術であり、今後の臨床応用への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：For practical application of the 3-dimensional cultured skin model containing vascular networks to skin grafting, we demonstrated improvement of viability of the cultured tissue and validity of the assessment of vascular network construction on the basis of light-tissue interactions. Irradiation of the 3D skin model with near-infrared LED light caused an increase in the amount of adenosine triphosphate and a decrease in the number of dead cells in the tissue. Photoacoustic measurement enabled depth profiling of the vasculature labeled with an absorption marker in the skin model in situ.

研究分野：医用生体光学

キーワード：三次元培養皮膚 血管 光音響法 Photobiomodulation アデノシン三リン酸 組織バイアビリティ  
移植 再生医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、組織およびその機能の再生を目的とした医療技術への期待が高まる中、いかに立体的な組織の構築や再生を得るかが重要課題となっている。大阪大学の松崎らは、ヒト培養細胞を用いて、組織の新陳代謝に不可欠な脈管系を含む三次元組織を足場材料なしで作製する技術の開発に成功した[1]。皮膚移植では、移植後早期の血流再開が感染防御と生着に重要であることから、我々はこの培養技術によって作られる血管構造を有する三次元皮膚モデルが新しい移植皮膚として有用であると考えた。しかしこれまでの研究の過程で、移植応用の実現に向けて克服すべき課題が明らかになった。

第一の課題は、組織の成長のための培地成分や酸素などの供給の制約により、培養中の三次元皮膚のバイアビリティが低下することである。そこで、培養組織にエネルギーを供給する手段として、光生体調節作用 (photobiomodulation, PBM) の応用を検討した。これまでに、細胞や組織に特定波長の低強度光を照射することにより、ミトコンドリアの電子伝達反応が促進され、生体内のエネルギー源となる ATP (アデノシン三リン酸) の産出量が増加することが報告されている [2,3]。

第二の課題は、培養中の三次元皮膚の品質、特に血管系の構築の状況を *in situ* (その場) で非破壊的に検査する方法がないことである。従来用いられている共焦点顕微鏡は測定深度が ~ 数 100  $\mu\text{m}$  であり、ヒト皮膚全層 (厚さ数 mm) の検査は難しい。そこで、光音響法の応用を検討した。光音響法は、吸収体が短パルス光を吸収して発生する熱弾性波 (光音響波) を検出することで、組織中の同吸収体の深さ分布を比較的深部まで測定できる手法である [4]。

### 2. 研究の目的

本研究では、PBM を応用することにより三次元培養皮膚のバイアビリティを向上できないか検討を行った。PBM の適用により培養皮膚に対して得られる効果、そして適切な光照射条件について検討を行った。

また、光音響法を用いることで三次元培養皮膚中の血管構築を *in situ* で評価できないか検討した。光音響法による血管の測定は、*in vivo* においては光吸収体としてヘモグロビンを利用するのが一般的であるが、培養皮膚中には血液がなく、また血管には選択的に励起可能な光吸収体も存在しない。そこで、まず培養皮膚の血管を吸収標識するための方法について検討を行った。そして、培養期間中の複数のタイムポイントにおいて血管の分布の測定を試みた。

### 3. 研究の方法

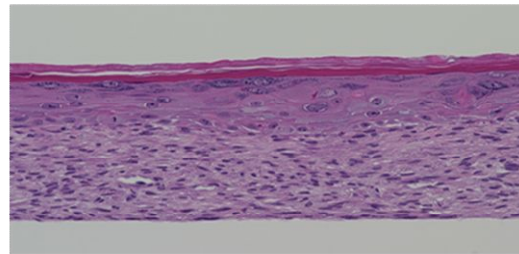
#### (1) PBM によるバイアビリティの向上

正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) を細胞外マトリックス (フィブロネクチンとゼラチン) でコーティングし、これに正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を NHDF  $1 \times 10^5$  個あた

り  $1 \times 10^3$  個の割合で混合し、トランスメンブレン型培養ウェル (直径 6.5 mm) に NHDF を 1 層あたり  $1 \times 10^5$  個として 20 層分播種した。翌日、正常ヒト表皮角化細胞 (ケラチノサイト, KC) を  $6 \times 10^5$  個播種することで表皮を積層した。さらにその翌日より KC を気液界面に晒すことで分化の誘導を開始し、7 日間培養することで血管構造を持つ表皮真皮一体型の三次元皮膚モデルを作製した (図 1)。

分化誘導開始 5 日後、ミトコンドリアの電子伝達を制御する末端酵素のシトクロム c オキシダーゼの光吸収ピークに合わせた中心波長 660 nm または 830 nm の発光ダイオード (LED) 光を培養皮膚の真皮側から照射した ( $15 \text{ mW}/\text{cm}^2$ , 50 秒間)。2 日後にルシフェラーゼ発光反応に基づく組織含有 ATP 量の測定を行い、非照射群と比較した。また、組織中の生細胞と死細胞をそれぞれ Calcein-AM とヨウ化プロピジウム (Propidium Iodide, PI) で染色し、その分布を蛍光顕微鏡で観察した。

(a)



100  $\mu\text{m}$

(b)

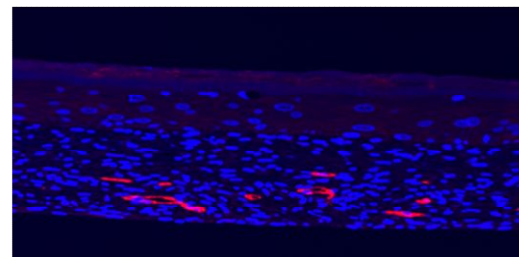


図 1 NHDF の積層数を 20 層とした三次元培養皮膚の (a) H&E 染色画像と (b) 免疫染色画像 (赤と青の蛍光はそれぞれ血管内皮と核を示す)。

#### (2) 光音響法による血管構築の評価

上述したとおり、培養皮膚中の血管には選択的に励起可能な光吸収体が存在しないため、本研究では CD31 抗体 (一次抗体) と吸収標識抗体 (二次抗体) を用いて血管内皮細胞を標識することとした。光音響信号の取得には、これまでに我々が開発した音響学的分解能光音響測定システムを用いた [5,6]。同システムでは、光音響波の検出センサー (超音波トランスデューサー) の前面に配置された音響レンズにより、同レンズの焦点位置で

発生した光音響波のみを検出することができる。これにより、深さ数 mm までの組織を数 10  $\mu\text{m}$  ~ 数 100  $\mu\text{m}$  の空間分解能で測定可能であり、ラット皮膚やマウス皮下腫瘍などの微小血管を *in vivo* で可視化した実績がある [5,6]。

NHDF の積層数を 20 層とした上記三次元培養皮膚モデルを対象に、分化誘導開始 1, 5, 9 日後に血管の吸収標識を行い、光パラメトリック発振器を用いて標識の吸収ピークに合わせた波長のパルス光 (パルス幅 9 ns) で光音響波を励起した。光音響信号を取得した後、培養皮膚をホルマリンで固定し、パラフィン包埋組織標本を再び CD31 抗体で免疫染色して血管の深さ分布を顕微鏡観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) PBM によるバイアビリティの向上

分化誘導期間中、とりわけ真皮層において時間経過とともに死細胞数が増加することが明らかになった。その防止策として PBM を適用した結果、波長 830 nm の光を照射した群で、その後の ATP 量が有意に増大した (図 2)。これは、波長 830 nm の光がミトコンドリアの光受容体を刺激し、電子伝達 (ATP 産生) を促進したことに起因するものと考えられる。波長 660 nm の光照射群でも非光照射群よりも ATP 量は多かったものの、有意差は認められなかった。その理由として、波長 830 nm の方が 660 nm よりも組織の散乱係数が小さく、830 nm 光の方が培養皮膚の全層に届きやすく、より高い効果が得られた可能性が考えられる。また、培養皮膚中の生細胞と死細胞の分布を顕微鏡で観察した結果、830 nm 光の照射により真皮層における死細胞の密度が減少していたことがわかった (図 3)。PBM によりエネルギー源となる ATP の量が増加したことにより、細胞死が抑制されたと考えられる。

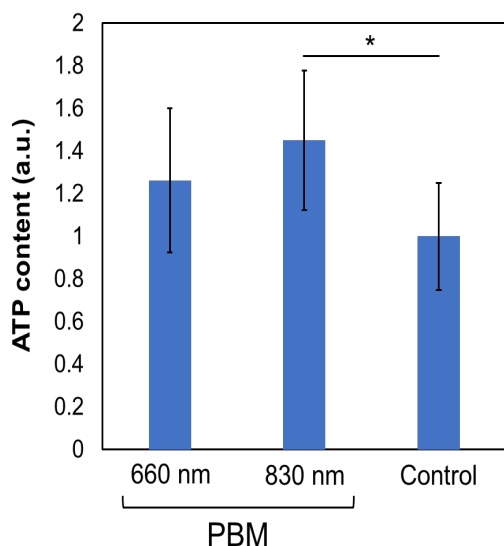


図 2 三次元培養皮膚の含有 ATP 量 (分化誘導開始 7 日後)。660 nm 光照射, 830 nm 光照射, 非光照射の比較。

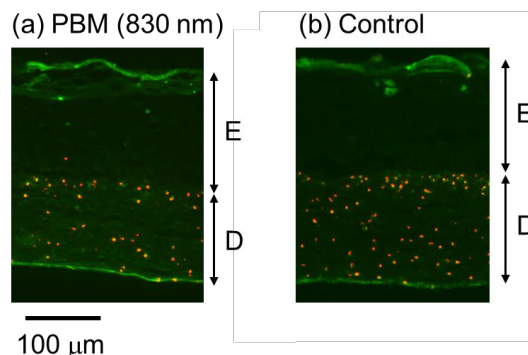


図 3 (a)830 nm 光照射群と (b)非光照射群の組織中の生細胞・死細胞の分布 (分化誘導開始 7 日後)。緑と赤の蛍光がそれぞれ生細胞と死細胞を示す。E は表皮層, D は真皮層を意味する。

さらに本研究の過程で、PBM 適用により角質層の厚みが増大することが示唆された。角質は表皮角化細胞の最終分化形態であるため、この結果は PBM 適用により同細胞の分化が促進された可能性を示し、PBM は迅速な移植皮膚の提供 (ドナー不足の解消) に貢献し得る。今後さらなる検討が必要である。

以上より、830 nm 光を用いた PBM の適用により、三次元培養皮膚のバイアビリティを向上できることが示された。上述したとおり、PBM による効果は光照射でミトコンドリアの電子伝達反応が促進されることを起点として得られると考えられている。そのため、本手法は皮膚に限らず様々な種類の培養組織に対して有効であると考えられる。また、培養組織に対して比較的弱い光を照射するのみで効果が得られることから、高い実用性が期待できる。

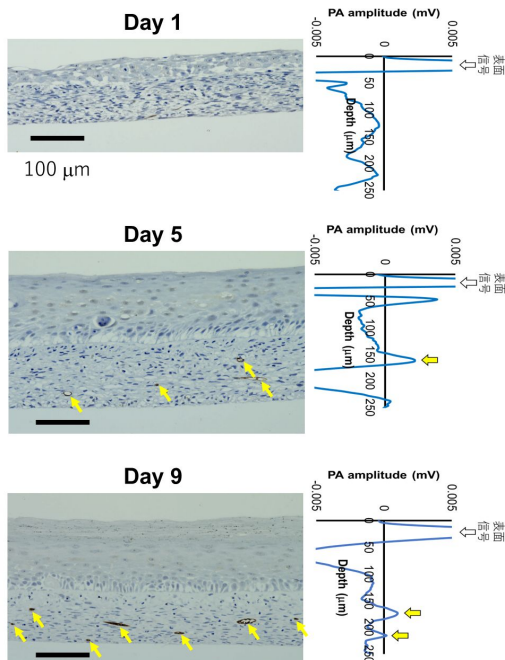
##### (2) 光音響法による血管構築の評価

金属ナノ粒子 (金ナノ粒子または銀ナノ粒子) ないし蛍光色素 (Alexa Fluor 555 または IRDye 800) で標識された抗体に対して、それぞれの吸収ピークに合わせた波長のパルス光を照射し、光音響波の発生効率を比較した。その結果、Alexa Fluor 555 標識抗体 (吸収ピーク波長 553 nm) で最も振幅の大きな光音響信号が得られた。そのため、これを三次元培養皮膚中の血管の吸収標識抗体 (二次抗体) として採用した。

培養中の三次元皮膚の光音響測定の結果、分化誘導開始 5 日後および 9 日後において光音響信号が検出され、その深さは組織標本で観察された血管の深さに対応していた (図 4a)。すなわち、時間経過に伴い培養皮膚中に構築された血管を検出できたものと考えられる。一方、HUVEC を用いずに培養した三次元皮膚 (血管構造を持たない培養皮膚) では、このような光音響信号が観測されなかった (図 4b)。以上より、三次元培養皮膚中の血管を抗体で吸収標識することで、光音響法によりその深さ分布を *in situ* で測定できることが示された。しかし横方向の分布については、組織標本より血管が数  $\mu\text{m}$  ~ 数 10  $\mu\text{m}$

の間隔で近接する場合、これらを分離して検出することは困難であった。より高い空間分解能が得られる光学的分解能光音響測定法（励起光を集束することで光音響波の発生領域を制限する方式）を用いることで、観測深度は制限されるが、培養皮膚中の血管の三次元分布を測定できると考えられる。

### (a) +HUVEC



### (b) -HUVEC

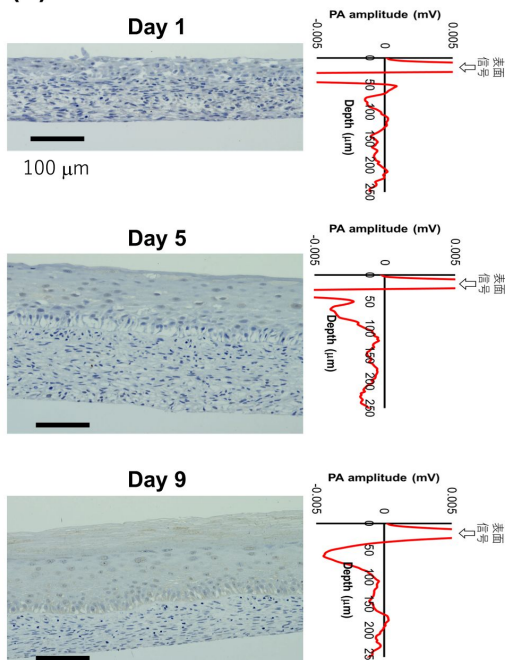


図4 分化誘導開始1, 5, 9日後の培養皮膚のCD31免疫染色画像と対応する光音響信号の波形。免疫染色画像中の茶褐色（黄色矢印）はCD31陽性を示す。光音響信号の正圧のピーク（黄色矢印）は、これら血管の深さ分布を反映していると考えられる。

### <引用文献>

[1] M. Matsusaki *et al.*, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 74, 2014.  
 [2] T. I. Karu *et al.*, *Lasers Surg. Med.*, 36, 2005.  
 [3] P. A. Lapchak *et al.*, *Brain Res.*, 1306, 2010.  
 [4] L. V. Wang *et al.*, *Science*, 335, 2012.  
 [5] Y. Tsunoi *et al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 53, 2014.  
 [6] Y. Tsunoi *et al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 54, 2015.

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Y. Tsunoi, K. Yoshimi, R. Watanabe, N. Kumai, M. Terakawa, S. Sato, Quality improvement of acoustic-resolution photoacoustic imaging of skin vasculature based on practical synthetic-aperture focusing and bandpass filtering, *Japanese Journal of Applied Physics*, 57(12), 127001/1-6, 2018. 査読有  
 T. Ida, H. Iwazaki, T. Omuro, Y. Kawaguchi, Y. Tsunoi, S. Kawauchi, S. Sato, Lensless high-resolution photoacoustic imaging scanner for in vivo skin imaging, *Optical Review*, 25(1), pp. 33-39, 2018. 査読有  
 角井泰之, 川内聡子, 寺川光洋, 佐藤俊一, 短パルス光の音響的および機械的作用に基づいた薬剤輸送セラノスティックス, *レーザー研究*, 第45巻, 第11号, pp. 709-713, 2017年. 査読有  
 角井泰之, 佐藤俊一, 光音響イメージング法の研究動向, *オプトニュース*, 第12巻, 第4号, pp. 12-17, 2017年. 査読無  
 佐藤俊一, 角井泰之, 川内聡子, 齋藤大蔵, 光音響イメージング法の外傷学分野における応用, *防衛医科大学校雑誌*, 第42巻, 第3号, pp. 105-118, 2017年. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

発表者: 角井泰之, 音響学的分解能光音響イメージングにおける開口合成と周波数処理の検討, 第58回日本生体医工学会大会, 2019年.  
 発表者: 宮崎裕美, 血管網を有する三次元培養皮膚の構築と再生医療への応用, 第27回日本熱傷学会関東地方会, 2019年.  
 発表者: 宮崎裕美, 血管網を有する複合型三次元人工皮膚の構築と再生医療への応用, 第27回日本形成外科学会基礎学術集会, 2018年.  
 発表者: 宮崎裕美, 血管構造を備えた次世代型人工皮膚の開発, 第44回日本熱傷学会総会・学術集会, 2018年.  
 発表者: 佐藤俊一, 外傷学分野における光音響イメージング法の活用, 第15回

医用分光学会，2017年。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角井 泰之 (TSUNOI, Yasuyuki)  
防衛医科大学校・防衛医学研究センター  
生体情報・治療システム研究部門・助教  
研究者番号：30806451