

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08603

研究課題名（和文）ミズクラゲに由来する皮膚再生促進因子の解明と優れた皮膚再生医療への応用

研究課題名（英文）The elucidation of a skin regeneration factor coming from jellyfish (*Aurelia aurita*) and application to superior skin regenerative medicine

研究代表者

住吉 秀明 (SUMIYOSHI, Hideaki)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：60343357

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：我々は新素材であるミズクラゲコラーゲンが再上皮化と細胞生着を促進し、皮膚再生を速めることを発見した。これは人工構造体を用いる再生医療の予後を著しく改善できる可能性を持つ。本プロジェクト研究ではミズクラゲの再上皮化促進機構の機構解析と外用薬としての応用開発、細胞生着によって良い組織再構築を果たす人工構造体の開発、以上2件を到達目標にした。は特許化を目指す有力な創薬候補成分を分離し、は新規人工埋込みグラフト材として特許化を果たした。本課題のマイルストーンは達成された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在最先端の幹細胞を用いた再生医療の課題点の一つは、コストが高くなること、施行例が限られることであるが、マトリックスベースの再生医療は、より安価で且つ数多くの事例に対応することができる。本技術は細胞の人工マトリックスへの動員を強化し、これまで対応出来なかった事例に応用の幅を広げることが可能とする。例えば、糖尿病による難治性皮膚潰瘍や褥瘡など再生能力の衰えた患者に対する人工真皮治療は、患者細胞の生着不全のため適用が難しい症例であったが、ここに有効的な一般治療として普及させることができれば高齢化、飽食化で増えてくる治療件数に対応し、患者の健康寿命の延長と医療費の削減の両面に波及効果を見込める。

研究成果の概要（英文）： We found that moon jellyfish collagen, a novel biomaterial, accelerates re-epithelialization and cell engraftment and results to promote the skin regeneration. This fact has the potential to significantly improve the prognosis of regenerative medicine using artificial materials. In this research project, we aimed to study of the re-epithelialization accelerating components in jellyfish collagen and develop its external application, and develop an artificial material that achieves better tissue reconstruction by cell engraftment. As a result, in theme , we achieved the separation of promising drug candidate components for aiming a patent. In theme , we have obtained a patent as a novel artificial implant graft material. The milestone of this research project has been achieved.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミズクラゲコラーゲン 皮膚再生医療 再上皮化 医療応用 ナノテクノロジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでの研究で人工構造材に添加することでECM形成や細胞の遊走に働きかける機能成分の探索を行ない、2つの成果を得た。1つは**ミズクラゲコラーゲンが人工真皮の表皮再生と肉芽組織構築を促進すること**、もう1つはフィルム状構造体では表皮再生、スポンジ状構造体では肉芽形成に対する促進効果が得られ、**人工物の構造によって再生促進効果が異なること**である。人工真皮をフィルム/スポンジハイブリッド構造に加工すると再上皮化と肉芽形成の両方を同時に促進できる人工真皮モデルをつくることができた。**これにより再生促進成分+人工ECMの立体構築によって再生組織をデザインできる可能性が示された。**人工真皮をはじめとする人工グラフト材を用いた再生医療では、宿主細胞の進入と生着、再構築組織の形成が長年の課題である。本研究課題では**ミズクラゲによる再生促進効果の機序を解明し、その促進効果を応用して生体の立体構造を再現出来る足場加工技術と組み合わせることで自力で自然に治癒する人工マテリアルの実現を目指す。**

2. 研究の目的

コラーゲンを素材とする人工真皮は最も成功した人工臓器であり、広く臨床で用いられている。しかし人工真皮上では再上皮化がおこり難く、後に自己表皮の移植を必要とする。人工細胞外マトリックスを充填する再生医療は宿主細胞の速やかな生着を課題とし、特に上皮の形成は体液の喪失や感染症を防止して患者の予後とQOLを左右する重要な課題である。我々はミズクラゲコラーゲンの成分が人工マテリアル上でレシピエント細胞の遊走を活性化し、再上皮化と肉芽形成を同時に促して自己組織化による自然な治癒を速やかに実現できることを発見した。**本申請は①ミズクラゲコラーゲン成分のもつ再生促進作用の分子基盤の解明と、汎用的な再生促進剤として応用開発すること。②この再生促進作用を発展させ、コスメトロジーの観点からも満足できる綺麗な創傷回復をもたらす再生医療を開拓すること。**これらの実践を目的とする。

3. 研究の方法

実験計画の2件の研究方針についてそれぞれを分けて記載する。

(1) ミズクラゲの再上皮化促進機構の機構解析と外用薬としての応用開発

2018～2019年度：

(1)-①. 上皮化促進機構の解明：再上皮化評価法の開発。再生促進作用の数値化と統計処理。

(1)-②. 外用薬投与方法の確立：ミズクラゲコラーゲン外用プロトコールの開発

2020年度：

(1)-③. 外用薬投与方法の評価：bFGF製剤と再生能の比較。糖尿病モデル上での評価。

(1)-④. 成分分離の検討：分解物のHPLC部分精製画分の作製。外用投与試験。

(2) 細胞生着によって良い組織再構築を果たす人工マテリアル素材の開発

2018～2019年度：

(2)-①. 新構造コラーゲンスポンジの開発：凍結乾燥工程の試行。走査電子顕微鏡の解析。

(2)-②. 新構造コラーゲンスポンジの移植試験：創傷モデルマウスで3週間の長期経過観察。

2020年度：

(2)-③. 既製品との比較試験：市販品(2社)との比較によって優位性の評価。特許出願。

4. 研究成果

(1) ミズクラゲの再上皮化促進機構の機構解析と外用薬としての応用開発：

(1)-①. 上皮化促進機構の解明：

図 1 にミズクラゲコラーゲンによる上皮化促進効果の特徴を示す。ミズクラゲコラーゲンは薄くて長い距離を伸長させる上皮組織の形態変化をもたらす。特に伸長表皮の前線は keratin 5 (基底層マーカー)陽性の基底細胞層と claudin-1 (密着結合マーカー)陽性のバリア機能を有する角質様細胞層のわずか2層から成る。

これはミズクラゲ成分の添加時に特徴的にみられる。この薄い表皮形成は一時的で、創傷部分を表皮が覆い、バリアが完成した後、有棘層、顆粒層、角化層が分化し正常な表皮の階層構造が回復する。

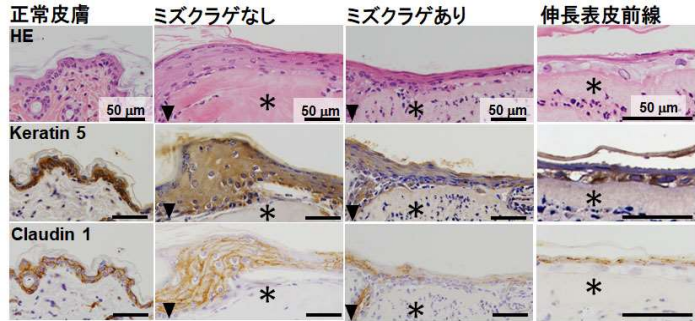


図1 ミズクラゲコラーゲンによる表皮伸長効果の特徴 *：人工真皮

図2に皮膚再生促進作用の定量化法を示す。左上4枚の写真はミズクラゲ成分の有無と経過日数(3日、6日)が異なる人工真皮移植片をギムザ染色したもので、表皮伸長部が青く染色される。白矢頭は伸長前線を示す。上皮化部分の面積を計測し各創傷閉鎖率をまとめたものがグラフAである。下段の2枚のHE染色写真は人工真皮移植部分の中央部横断面である。

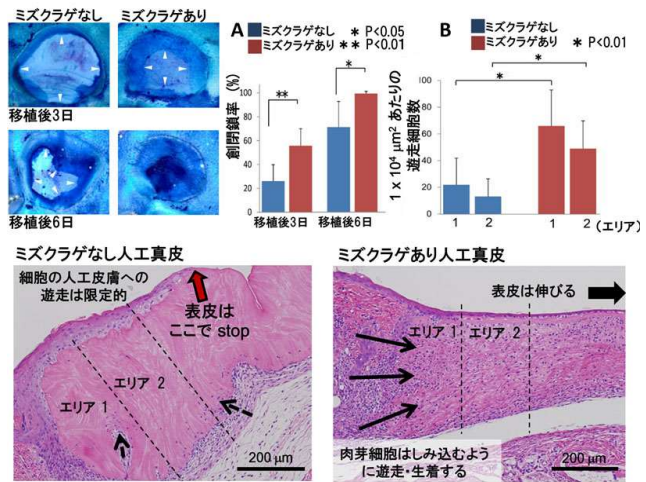


図2 再生促進作用の数値化と評価法の確立

エリア1は人工真皮縁部200 μm、エリア2は更に内側200 μmの領域である。進入・生着した細胞数を計測し単位面積あたり細胞数をまとめたものがグラフBである。これらの計測法により、上皮化の比率と人工真皮内の肉芽形成が正確に評価できる様になった。双方ともミズクラゲ添加群(赤)で高い数値を示し、統計的に有意であった。

(1)-②. 外用薬投与方法の確立：

ミズクラゲコラーゲンを熱変成処理した溶液を「外用薬」として移植後の人工真皮に処方した実験を示す。生理的食塩水を陰性対照(a)、ミズクラゲ溶液(b)、同容量のミズクラゲコラーゲン複合人工真皮を比較対照(c)として創傷閉鎖率を比較した。その結果を図3に示す。ミズクラゲコラーゲンを外用薬とすると複合人工真皮とした事例より低容量で効果を発揮できることがわかった。

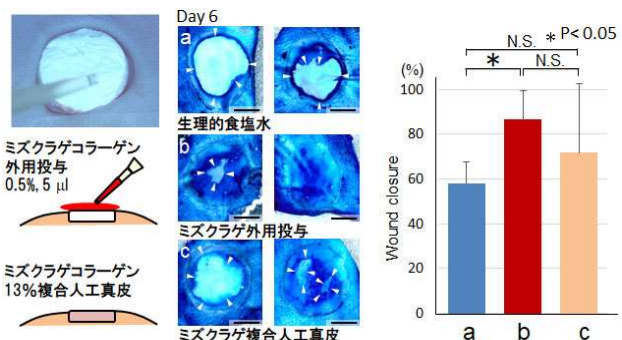


図3 クラゲコラーゲン外用投与方法の確立

(1)-③. 外用薬投与法の評価：

ミズクラゲコラーゲンが再生促進薬として人工真皮治療に対し使用されることを前提に、実際に再生促進薬として使用されている b-FGF 製剤と比較した実験を行なった。その結果を図 4 に示す。陰性対照 (a)、ミズクラゲ溶液 (b)、b-FGF 製剤 (c) に対しミズクラゲコラーゲンは再生促進作用の優位性を示した。

ここで、b-FGF 製剤は陰性対照に対しても効果が認められなかったが、b-FGF は線維芽細胞を活性化することで、まず肉芽形成を促進する薬剤であり、肉芽形成が成されないと表皮が

再生しないのは、従来の再生医療のセオリー通りである。肉芽形成より早く表皮を再生させる促進薬は従来に無いもので、ミズクラゲ由来再生促進薬のユニークな特性を示している。

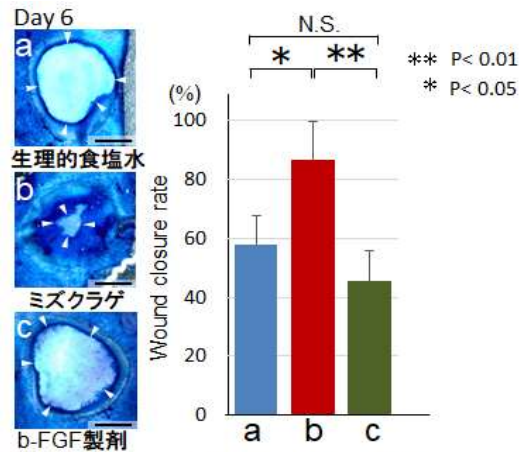


図4 皮膚再生促進薬としての評価

(1)-④. 成分分離の検討：

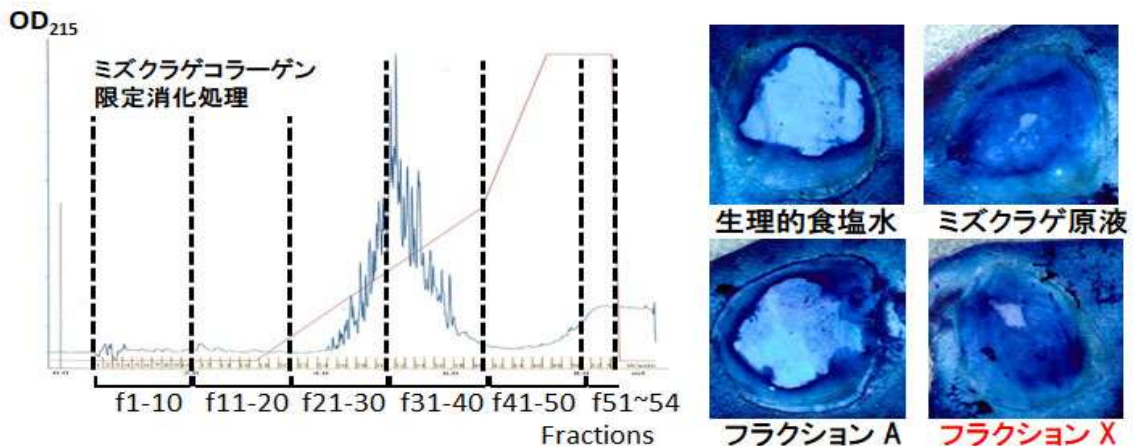


図5 HPLC精製による薬効成分分離実験

ミズクラゲコラーゲンを限定分解加水分解酵素で断片化し、HPLCによりフラグメントを分離した。図 5 の左図に溶出パターンを示す。分離したフラクシオンをグループ別にまとめて、生理的食塩水に溶解し、外用薬モデルにて創傷閉鎖率を解析した結果、再生促進成分を含むフラクシオンを認めた。この事実は、ミズクラゲコラーゲンの表皮形成促進成分は低分子に由来し、分離精製によって薬剤化することができることを意味する。低分子化は異種生物タンパク質であるクラゲコラーゲンによる、抗原性、炎症惹起などの有害事象の懸念を解決することができる。

(2) 細胞生着によって良い組織再構築を果たす人工マテリアル素材の開発

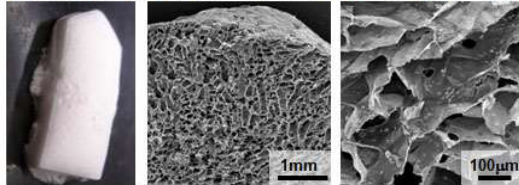
この実験テーマは早期実用化を目的とし、医療レベル使用が認められている既知の原材料(ウシ・ブタ由来 I 型アテロコラーゲン)のみを用いている。

(2)-①. 新構造コラーゲンスポンジの開発：

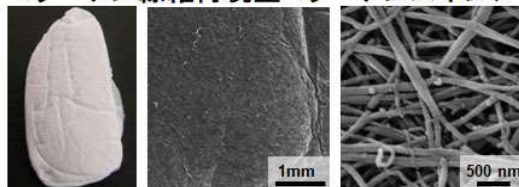
凍結乾燥法によるコラーゲンスポンジの製造法には 2 通りの方法が存在し、一つは従来の人工真皮に広く使われる単純凍結乾燥によるもので多孔質(ハニカム構造)のコラーゲン

スポンジとなる。もう一つは t-ブチルアルコールに溶媒置換後に凍結乾燥する方法により製造するコラーゲン線維再現型コラーゲンスポンジである。多孔質コラーゲンスポンジは機械的強度に優れ、架橋の導入により生分解耐性にすることができるが、宿主細胞の進入と生着性に劣る。線維再現型コラーゲンスポンジは液体の浸透性と宿主細胞の進入と生着に優れるが、架橋導入ができず生分解性である。我々は両者を組み合わせ、双方の長所を満足させる新しい人工マテリアルを完成した。その構造は架橋導入した多孔質コラーゲンスポンジの内腔に線維再現型コラーゲンを充填する構造となっており、超微細構造を図 6 に示す。

従来型多孔質コラーゲンスポンジ(ハニカム構造)



コラーゲン線維再現型コラーゲンスポンジ



芯材

- ・ 機械的に強い
- ・ 架橋の導入が可能



基礎材

- ・ 自然に近い構造
- ・ 液性浸透が速い
- ・ 細胞生着が良い

両者の長所を融合

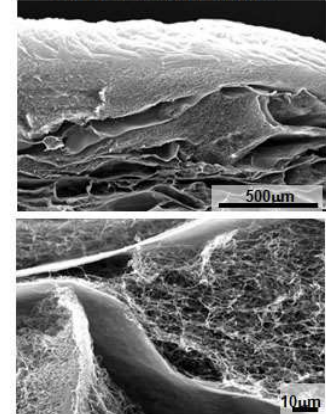
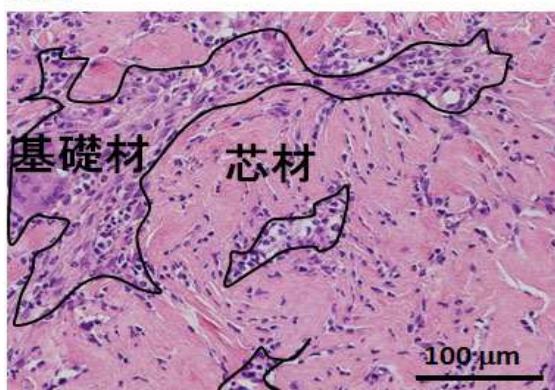


図6 異なる凍結乾燥法の組み合わせによる新構造コラーゲンスポンジ

(2)-②. 新構造コラーゲンスポンジの移植試験：

図 7 に新型人工真皮を用いた、実際の移植実験の結果を示す。移植後 3 週間後の組織像の HE 染色標本に示される通り、基礎材の部分由来する肉芽組織と芯材に由来する人工コラーゲンが理想的に混合され、真皮に似た組織像を再現している。CD31 染色によって肉芽組織を中心として人工真皮内に豊富な血管網が形成されている事が示されている。

HE



CD31 (血管内皮)

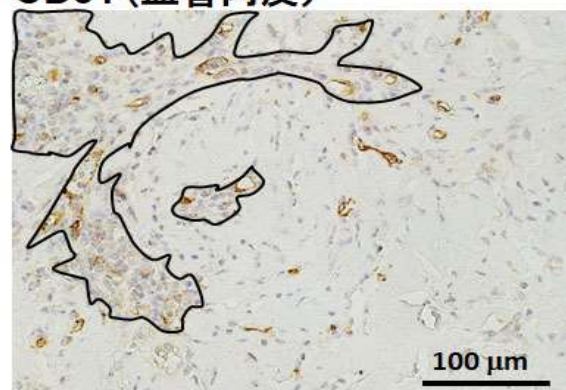


図7 新型人工真皮における組織再構築と血管形成

- ① これまでの実験により、ミズクラゲコラーゲンの持つユニークな再上皮化促進成分から新規医薬品の開発を実現できる研究シーズを確立した。
- ② これまでの実験により、既成原材料を用いて理想的な組織再構築を果たす新型人工真皮を開発した。これは特許出願を果たし（特願 2020-162634）実用的な研究シーズを確立した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sumiyoshi H, Nakao S, Endo H, Yanagawa T, Nakano Y, Okamura Y, Kawaguchi AT, Inagaki Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 A novel composite biomaterial made of jellyfish and porcine collagens accelerates dermal wound healing by enhancing re-epithelization and granulation tissue formation in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advances in Wound Care	6. 最初と最後の頁 295-311
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/wound.2019.1014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Imai J, Yahata T, Ichikawa H, Ibrahim AA, Yazawa M, Sumiyoshi H, Inagaki Y, Matsushima M, Suzuki T, Mine T, Ando K, Miyata T, Hozumi K.	4. 巻 18
2. 論文標題 Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 attenuates against intestinal fibrosis in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Intestinal Research	6. 最初と最後の頁 219-228
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5217/ir.2019.00037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakano Y, Kamiya A, Sumiyoshi H, Tsuruya K, Kagawa T, Inagaki Y.	4. 巻 71
2. 論文標題 A novel deactivation factor of fibrogenic hepatic stellate cells induces regression of liver fibrosis in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 1437-1452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/hep.30965	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yanagawa T, Sumiyoshi H, Higashi K, Nakao S, Higashiyama R, Fukumitsu H, Minakawa K, Chiba Y, Suzuki Y, Sumida K, Saito K, Kamiya A, Inagaki Y.	4. 巻 37
2. 論文標題 Identification of a Novel Bone Marrow Cell-Derived Accelerator of Fibrotic Liver Regeneration Through Mobilization of Hepatic Progenitor Cells in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 89-101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/stem.2916.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 住吉秀明、中尾祥絵、安田純平、相馬俊輔、柳川享世、葛巻 徹、稲垣 豊
2. 発表標題 宿主細胞の生着により理想的な自己組織化を果たす新型人の開発の開発
3. 学会等名 第20回日本再生学会学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 住吉秀明、久保田朋子、安田純平、松木勇樹、名取龍生、中尾祥絵、柳川享世、岡村陽介、葛巻 徹、稲垣 豊
2. 発表標題 欠損皮膚の再上皮化に対するクラゲコラーゲンの効果と外用薬としての有用性の検討
3. 学会等名 第52回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 住吉秀明、久保田朋子、安田純平、松木勇樹、名取龍生、中尾祥絵、遠藤 整、柳川享世、岡村陽介、川口 章、稲垣 豊
2. 発表標題 上皮再生促進効果をもつミズクラゲコラーゲンをを用いた人工真皮の開発
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 住吉秀明、久保田朋子、名取龍生、中尾祥絵、安田純平、柳川享世、葛巻 徹、稲垣 豊
2. 発表標題 皮膚再生促進作用を有するミズクラゲコラーゲンの外用薬としての発展応用
3. 学会等名 第19回日本再生学会学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 住吉秀明、岡村陽介、川口 章、稲垣 豊
2. 発表標題 A novel biomaterial containing moon jellyfish collagen accelerates dermal wound healing
3. 学会等名 日中フェア&フォーラム in CHINA 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 住吉秀明、中尾祥絵、柳川享世、中野泰博、岡村陽介、川口 章、遠藤 整、稲垣 豊
2. 発表標題 ミズクラゲ成分の表皮角化細胞に対する生物学的効果の検証
3. 学会等名 第51回日本結合組織学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 住吉秀明、中尾祥絵、柳川享世、中野泰博、岡村陽介、川口 章、遠藤 整、稲垣 豊
2. 発表標題 ミズクラゲコラーゲン成分の表皮角化細胞に対する生物学的効果の検証
3. 学会等名 第50回 日本結合組織学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 住吉秀明、岡村陽介
2. 発表標題 クラゲコラーゲンを用いた皮膚再生を促進する人工真皮
3. 学会等名 イノベーションジャパン2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 住吉秀明、遠藤 整、中尾祥絵、柳川享世、中野泰博、稲垣 豊
2. 発表標題 ミズクラゲコラーゲン成分により促進される再生上皮の形態と機能特性
3. 学会等名 第18回 日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 組織充填材	発明者 住吉秀明、稲垣 豊	権利者 学校法人東海大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-162634	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	遠藤 整 (ENDO Hitoshi) (10550551)	東海大学・医学部・講師 (32644)	動物実験モデルの構築・ 移植実験効果確認と評価。
研究分担者	岡村 陽介 (OKAMURA Yosuke) (40365408)	東海大学・工学部・教授 (32644)	生体物質によるナノシート作製と加工・ 人工基底膜構造体および、薬剤徐放性担体の作製開発。

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------