

令和 3 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09479

研究課題名（和文）乾燥同種培養表皮の基礎研究 利便性の高い皮膚再生医療を目指して

研究課題名（英文）Clinical development of dried human cultured epidermis

研究代表者

坂本 道治（Sakamoto, Michiharu）

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：40445044

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：乾燥同種培養表皮の製造方法を決定し、物理学的特性・作用機序・有効性について検討した。これらの結果から、乾燥同種培養表皮はヒト表皮細胞から成る膜構造が維持され、生理食塩水で含水したのちは、乾燥前と同等の性質を有することが確認された。生細胞をまったく含まないが、成長因子などの生理活性物質を含有し、創表面に密着して被覆することにより、表皮細胞の増殖・伸展を促進するものと考えられた。熱傷創や皮膚潰瘍に対する新しい治療法として期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

広範囲熱傷の治療法として自家培養表皮が使用されているが、製造に長期間を要することや医療コストが非常に高額になるなどの問題点がある。同種培養表皮はドナーの細胞を用いて作製した培養表皮であり、これを乾燥して使用することで必要な時にすぐに使用できる、比較的安価な再生医療が実現できる。本研究において乾燥同種培養表皮の製造法やその特性が明らかとなり、動物モデルにおける安全性と有効性が示されたことで、製品化につながる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：Manufacturing method of dried allogeneic cultured epidermis (dCE) was settled and morphological and mechanical properties, mode of action and safety and efficacy were evaluated. The results elucidated that the membrane structure of dCEs was not disrupted and dCEs maintain their morphological features after dehydrate procedure. dCEs promote wound healing by releasing several growth factors and extracellular matrixes that stimulate the activity of the recipient's cells at the application site, and the membrane structure of the CE contributes to creating a comfortable environment for recipient cells in the wound bed to proliferate and migrate. Dried CE is a promising material to treat burn wounds and skin ulcers.

研究分野：形成外科学

キーワード：培養表皮 熱傷 皮膚潰瘍 再生医療 成長因子 被覆材 同種細胞移植

1．研究開始当初の背景

広範囲熱傷は、全身管理法の進歩などに伴いその救命率は改善傾向にはあるものの、未だ死亡率が高い損傷である。また、高齢化に伴って糖尿病性足潰瘍などの難治性潰瘍症例は増加の一途をたどっている。一般の創傷被覆材では治療が困難なこれらの創傷における皮膚再生を促す治療として、皮膚組織由来の細胞（表皮細胞や線維芽細胞）を含有した材料を用いる再生医療が期待されているが、自家細胞を用いた再生医療は製品の製造に長期間を要することや、オーダーメイド治療となるため医療コストが非常に高額になるなどの問題点がある。

同種培養表皮は、ドナーの表皮細胞を培養して作製した細胞シートであり、その有効性については古くから報告されている。移植された同種培養表皮はレシピエントの免疫力のため永久的な生着はしないが、一時的に創を被覆し、成長因子などのさまざまな生理活性物質を分泌することにより、創の治癒を促進するため、利便性の高い再生医療として期待される。しかし、未知の感染症伝播の可能性や、生細胞を含有するため保存期間が短く、保管に厳密な管理を要するなどの欠点があり、現在我が国においては臨床応用されていない。

そこで、この同種培養表皮を脱水乾燥したもの（乾燥同種培養表皮）であれば、常温で長期間の保存が可能となり必要時にすぐに使用することができ、また生細胞を維持する必要がないため、滅菌処理を行うことができる。この乾燥ヒト培養表皮を実用化できれば、まさに理想的な手軽に使用できる細胞治療が実現できる。しかし、乾燥した同種培養表皮の有効性に関しては、凍結乾燥しても表皮の構造は保たれること、表皮細胞が産生した生理活性物質が放出されることにより創傷治癒を促進することがすでに報告されているものの、乾燥同種培養表皮の詳細な製造方法や、その有効性のメカニズム、どの程度の創傷治癒促進効果があるかなどについては調べられていない。

2．研究の目的

本研究では、皮膚再生医療を目的とした乾燥同種培養表皮の実用化を目指し、その製造法・特性・有効性について明らかにする。乾燥同種培養表皮の作製方法（細胞培養法・脱水乾燥法・保管方法など）を確定し、その作製した乾燥同種培養表皮の性状・物性・組織学的特性について詳細に検討する。乾燥同種培養表皮に含まれる生理活性物質の種類と量を測定し、これが表皮細胞や線維芽細胞の増殖・遊走に与える影響を調べることで、その有効性のメカニズムを明らかにする。動物実験モデルを用いて、安全性および有効性を確認する。

3．研究の方法

(1)乾燥同種培養表皮の作製

培養表皮の膜構造や細胞に含まれる生理活性物質の性質を保ったまま乾燥する方法として、凍結乾燥や有機溶媒を用いた化学脱水などが考えられる。凍結乾燥には、上記の方法で作製した培養表皮を凍結保存したあと、凍結乾燥器 VD-250R で凍結乾燥する。化学乾燥を行うには、アルコールを用いる方法やアセトンを用いる方法があり、これらの培養方法・乾燥方法の組み合わせにより製品の形状が変化するため、最適な組み合わせについて検討する。

(2)乾燥ヒト培養表皮の物性評価・組織学的評価・生理活性物質の測定

創面に用いるにあたって十分な強度を持ち鑷子で取り扱えるかなど用手的な評価を行うとともに、作製した乾燥同種培養表皮をホルマリン固定し、HE 染色標本作製し、細胞の形態・厚さなどの構造を確認する。基底膜蛋白の免疫染色標本作製し、基底膜構造が保たれているかを評価する。また、電子顕微鏡（TEM・SEM）によって観察することにより、表面構造および基底膜が維持されているかを確認する。作製した乾燥同種培養表皮の弾性および破断強力を島津製作

所 universal testing machine により測定する。

(3)有効性のメカニズムの推定

乾燥同種培養表皮は、生細胞を含まないためその創傷治癒促進効果は、表皮細胞の膜構造自体や、含まれる成長因子などの生理活性物質によるものと考えられる。このため、乾燥同種培養表皮を創面に貼付した場合に放出されるサイトカイン量を測定し、有効性のメカニズムの推定を行う。作製した乾燥同種培養表皮の抽出液に含まれる各種成長因子をサイトカインアレイで網羅的に測定する。

上記の抽出液を、表皮細胞を培養したシャーレに添加することで、細胞増殖速度を調べ、有効性のメカニズムの推定を行う。

(4)動物モデルを用いた有効性評価

乾燥同種培養表皮の創傷治癒促進効果を確認するために、動物創傷モデルを用いて創傷治癒促進効果を評価する。難治性潰瘍モデルとして、糖尿病マウスに作製した皮膚全層欠損モデルを用いる。

4．研究成果

(1) 乾燥同種培養表皮の作製

凍結乾燥、風乾、有機溶剤（エタノール・イソプロパノール・アセトン）による脱水処理によって乾燥同種培養表皮を作製し、強度・柔軟性・ハンドリング性能・毒性試験・製造に要する時間などについて比較した結果、風乾による乾燥処理が適切と判断した。以後の実験には、この製造方法により作製した乾燥同種培養表皮を用いた。



(2) 乾燥ヒト培養表皮の物性評価・組織学的評価・生理活性物質の測定

生理食塩水で含水させた乾燥同種培養表皮は、HE 染色標本および電子顕微鏡像において表皮細胞から成る膜構造に損傷は見られず、乾燥前のものと比較して IV 型コラーゲン・ラミニンの免疫染色標本において観察される基底膜構造に大きな変化を認めなかった。引張試験の結果、含水後の乾燥同種培養表皮は、乾燥前のものと比較して破断強力・弾性率に大きな変化を認めなかった。

(3) 乾燥同種培養表皮の抽出液に含まれる各種成長因子をサイトカインアレイで測定した結果、乾燥同種培養表皮には EGF, bFGF, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-8, MMP-1, MMP-9, PDGF-BB, TGF- β , TNF- α , VEGF が含まれていることが確認された。またこの抽出液をヒト表皮細胞に添加すると、細胞増殖が促進することが確認された。

(4) 動物モデルを用いた有効性評価

糖尿病マウスに作製した皮膚欠損創に乾燥ヒト培養表皮を貼付すると、上皮化を促進し創の縮小を早めた。採取した組織を電子顕微鏡で確認することにより、移植した乾燥培養表皮は創面に隙間なく密着していることが確認された。異常な免疫学的拒絶反応や細菌感染は見られなかった。

乾燥同種培養表皮の製造方法を決定し、物理学的特性・作用機序・有効性について検討した。これらの結果から、乾燥同種培養表皮はヒト表皮細胞から成る膜構造が維持され、生理食塩水で含水したのちは、乾燥前と同等の性質を有することが確認された。生細胞をまったく含まないが、

成長因子などの生理活性物質を含有し、創表面に密着して被覆することにより、recipient の表皮細胞の増殖・伸展を促進するものと考えられた。動物実験モデルにおける安全性・有効性が確認できたことから、臨床応用実現に向けて治験への準備を進める方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakamoto M, Ogino S, Shimizu Y, Inoie M, Lee S, Yamanaka H, Tsuge I, Saito S, Morimoto N.	4. 巻 15(8)
2. 論文標題 Human cultured epidermis accelerates wound healing regardless of its viability in a diabetic mouse model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0237985
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0237985. eCollection 2020.	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 該当する

1. 著者名 坂本道治	4. 巻 274(11)
2. 論文標題 【形成外科の最前線】同種細胞を用いた皮膚再生	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1075-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 坂本道治	4. 巻 163
2. 論文標題 【人工真皮・培養表皮 どう使う、どう生かす】培養表皮の展開 同種培養表皮の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PEPARS	6. 最初と最後の頁 35-42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂本道治, 齊藤晋, 森本尚樹	
2. 発表標題 皮膚再生を促進する乾燥同種培養表皮の開発	
3. 学会等名 第63回日本形成外科学会総会・学術集会	
4. 発表年 2020年	

1．発表者名 坂本道治，仲野孝史，皆木康子，清水義博，井家益和，齊藤晋，森本尚樹
2．発表標題 乾燥同種培養表皮の開発 臨床研究から治験へ
3．学会等名 第46回日本熱傷学会総会・学術集会
4．発表年 2020年

1．発表者名 坂本道治，仲野孝史，山中浩気，齊藤晋，野田和男，清水義博，井家益和，森本尚樹
2．発表標題 乾燥同種培養表皮の非臨床研究としての安全性・有効性評価
3．学会等名 第29回日本形成外科学会基礎学術集会
4．発表年 2020年

1．発表者名 坂本道治，皆木康子，長井美樹，澤良木詠一，片山泰博，山中浩気，勝部元紀，津下到，野田和男，齊藤晋，森本尚樹
2．発表標題 乾燥同種培養表皮の安全性評価を目的としたFirst in human臨床研究
3．学会等名 第126回関西形成外科学会学術集会
4．発表年 2020年

1．発表者名 坂本道治，皆木康子，清水義博，井家益和，野田和男，勝部元紀，津下到，齊藤晋，大鶴繁，森本尚樹
2．発表標題 皮膚欠損創を対象とした乾燥同種培養表皮First in human臨床研究
3．学会等名 第50回日本創傷治癒学会
4．発表年 2020年

1．発表者名 坂本道治，仲野孝史，齊藤晋，清水義博，井家益和，森本尚樹
2．発表標題 乾燥同種培養表皮による潰瘍治療
3．学会等名 第12回日本創傷外科学会総会・学術集会
4．発表年 2020年

1．発表者名 坂本道治、荻野秀一、小池薫、森本尚樹
2．発表標題 糖尿病マウス皮膚欠損創モデルにおけるヒト乾燥培養表皮の創傷治癒促進効果
3．学会等名 第45回日本熱傷学会総会学術集会
4．発表年 2019年

1．発表者名 坂本道治
2．発表標題 乾燥同種培養表皮の開発
3．学会等名 第123回関西形成外科学会学術集会
4．発表年 2019年

1．発表者名 坂本道治，森本尚樹，井家益和，篠原力，鈴木茂彦
2．発表標題 自家培養表皮を補完する同種培養表皮　－明日の皮膚再生医療－
3．学会等名 第61回　日本形成外科学会総会・学術集会
4．発表年 2018年

1．発表者名 坂本道治，森本尚樹，井家益和
2．発表標題 培養表皮を用いた治療の現状と未来 同種培養表皮が日常診療に使用できる世界へ
3．学会等名 第27回 日本形成外科学会基礎学術集会
4．発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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

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
---------	---------