

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：82406

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21912

研究課題名（和文）脈管系および付属器を有する革新的皮膚代用品の創生

研究課題名（英文）Fabrication of innovative skin substitutes with vascular systems and appendages

研究代表者

宮崎 裕美（Miyazaki, Hiromi）

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 医療工学研究部門・講師

研究者番号：30531636

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：細胞外マトリクス成分を細胞表面に薄膜形成することによって細胞の自己組織化を促す培養法を用いて、微小血管内皮細胞とリンパ管内皮細胞を共培養し作製したヒト培養皮膚は、移植後の生着が良好であることが示された。一方で本培養系は、汗腺構造体の構築に必要な微小環境を再現していない可能性があり、今後更なる検証が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

毛細血管やリンパ管の脈管系や汗腺を含有した移植用のヒト培養皮膚を構築することができれば、皮膚の再生医療のみならず、医薬品候補化合物などの安全性や薬物動態など信頼性が高い評価デバイスの実現にもつながることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this research, human vascularized 3D skin was constructed by cell accumulation technique via coating with extracellular matrix components on the cell surface. Cultured human skin produced by co-culturing microvascular endothelial cells and lymphatic endothelial cells has shown good engraftment after transplantation. On the other hand, this culture system may not recapitulate the microenvironment necessary for forming sweat gland structures, and further verification is needed.

研究分野：細胞工学

キーワード：再生医療 三次元培養皮膚 脈管構造 移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

表皮と真皮からなる比較的単純な構造の皮膚は、早くから再生医療分野の研究対象とされてきた。しかし、重症熱傷や高齢者に頻発する褥瘡など難治性潰瘍の治療に用いられている皮膚代替物は、皮膚バリア機能が十分に発揮されず細菌感染に弱いなど、臨床上の課題は多い。また、体表の保護や体温調節など恒常性維持に重要な役割を果たす付属器が再生皮膚において欠失していることは、機能および整容の両面に大きな影響を及ぼす。現在、再生医療等製品には、毛細血管やリンパ管などの脈管系のみならず、皮膚器官に特徴的な汗腺や毛包などの付属器は当然ながら備わっていない。また、皮膚付属器を再生させる研究はいくつか報告されているが、表皮や真皮の構築はなく毛包や汗腺など単体のスフェロイドであり、これを宿主の全層皮膚欠損創ではなく真皮や皮下へ移植し評価されたものである。正常皮膚に類似した培養ヒト皮膚の構築が困難とされてきたのは、微小環境の構築が鍵であるからに他ならない。

協力研究員である大阪大学の明石らは、培養細胞の表面を細胞間の接着や機能を制御している細胞外マトリックス成分で被覆することによって、複数種類の細胞から構成される三次元組織構造体の構築法を考案し(Adv Mater 2011)、世界に先駆けて構造体内部に緻密かつ広範囲に血管やリンパ管網を形成させることに成功した(Microscopy 2014; J Biomed Mater Res A 2015)。さらに研究代表者は、血管網を備えた表皮/真皮一体型の複合型培養皮膚を構築し、マウス皮膚欠損モデルにおいて移植早期から培養皮膚内部へ十分な血流が確保され、良好な皮膚再建に成功した(Sci Rep 2019)。この構築した複合型ヒト培養皮膚には、微小環境の主要因である細胞外マトリックスや種々の生理活性物質を分泌する線維芽細胞や角化細胞が培養期間中存分に存在するため細胞間相互作用が促進され、脈管構造や付属器の形成に対し優位に働く可能性が期待されると考え、本研究の構想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者らが考案した三次元組織構築法を基盤技術とし、複数種類のヒト由来細胞を組み合わせ、血管やリンパ管などの脈管系、さらには付属器等をもち合わせた正常に近い、よりリアルな革新的ヒト皮膚の創生に向けて基盤を構築することである。

現在、様々な皮膚代替物が治療に用いられているが、国内外において上市されている再生医療等製品は培養表皮または培養真皮であり、本当の意味での培養皮膚は米国等において開発された同種複合型培養皮膚以外に実用化はされていない。培養皮膚等を用いた治療は重症熱傷の救命治療に革新をもたらしたが、血管構造を持たないため、局所での血流が再開するまでに時間を要し、移植片へ栄養が行き渡らず表皮も脱落することが多く、皮膚バリア機能が発揮されず細菌感染に対して弱い。治療効果を高めるためには、血管構築を促進させることが大きな課題とされている。また、近年の創の治療では早期の上皮化や良好な生着にとどまらず、機能的にも整容的にもいかに回復再生させるかが大きなテーマとなってきた全層の皮膚欠損の場合、汗腺や毛包は再生することができないため、発汗など重要な機能が失われる。そのため、移植によって再生された皮膚に付属器が欠失していることは、機能および整容の両面に大きな影響を及ぼす。現在までに、皮膚機能が不可逆的に損なわれた患者に利用することができる効果的な治療法はない。したがって、表皮と真皮一体型だけでなく、脈管系(血管やリンパ管)や付属器を含む機能的な皮膚を構築することが可能となれば、皮膚再生治療の新たな道を拓き得ることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 脈管系や付属器を備えたヒト培養皮膚の構築

毛細血管網や毛細リンパ管網を有する培養皮膚を作製し、さらにエクリン汗腺を含有させたヒト培養皮膚の構築を試みた。正常なヒト皮膚由来線維芽細胞の表面に細胞外マトリックス成分であるフィブロネクチンとゼラチンを交互に積層し、微小血管内皮細胞およびリンパ管内皮細胞をセルカルチャーインサートに播種し、24時間後に表皮角化細胞および汗腺幹細胞を積層した。その後、気液界面にて5日間培養を行い、ヒト培養皮膚を作製した。

(2) ヒト培養皮膚のマウスへの移植

作製したヒト培養皮膚を免疫不全マウスの背部に作製した全層皮膚欠損創へ移植し、経過観察を行なった。移植2週間後に皮膚組織を採取し病理組織学的解析により培養皮膚の生着を評価した。

4. 研究成果

(1) 脈管系や付属器を備えたヒト培養皮膚の構築

線維芽細胞、微小血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞および表皮角化細胞を共培養し作製した培養皮膚は、真皮様組織と表皮層が均一に形成されており、真皮様組織には毛細血管とリンパ管がそれぞれ独自にネットワーク構造を構築していることが観察された(図1A, B)。

一方、汗腺幹細胞を含めた共培養系では、一部真皮内に向かって表皮が浸潤していたが、管腔構造の形成は確認できなかった。細胞外マトリックス成分を用いることによって、表皮と真皮様組

織が一体となった培養皮膚を構築することはできるが、汗腺幹細胞による構造体の構築を促す微小環境は再現できていない可能性が考えられた。近年、汗腺が構築されるために必要な因子が複数報告されていることから、これらの因子による微小環境を整え、汗腺構造体が構築できるか今後検討が必要である。

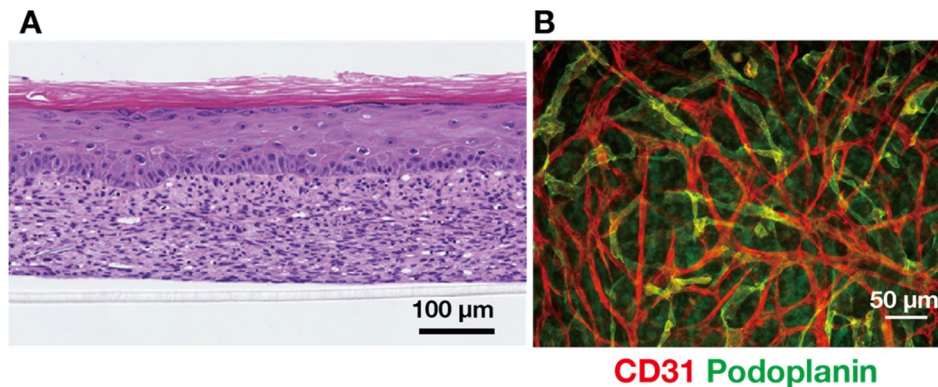


図1 作製した培養皮膚 (A) HE 染色像 (B) 毛細血管網とリンパ管網を有する真皮様組織

(2) ヒト培養皮膚のマウスへの移植

免疫不全マウスの背部に作製した全層皮膚欠損創に毛細血管およびリンパ管の脈管構造を含有した培養皮膚を移植したところ、ドナー由来の毛細血管とレシピエントの血管が融合し培養皮膚に血液が供給されていることが示された。また、リンパ管網には血液が流入することなく、レシピエントのリンパ管と融合している可能性が示された。in vitro では汗腺構造体を形成することができていないが、現在、汗腺幹細胞を含む培養皮膚を移植し長期経過を観察中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hata Y, Miyazaki H, Ishihara M, Nakamura S.	4. 巻 14
2. 論文標題 Recent Progress on Heparin-Protamine Particles for Biomedical Application.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Polymers	6. 最初と最後の頁 932
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/polym14050932	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 Tsuno Yasuyuki, Miyazaki Hiromi, Kawauchi Satoko, Akagi Takami, Akashi Mitsuru, Saitoh Daizoh, Sato Shunichi	4. 巻 98
2. 論文標題 Viability Improvement of Three Dimensional Human Skin Substitutes by Photobiomodulation during Cultivation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Photochemistry and Photobiology	6. 最初と最後の頁 1464 ~ 1470
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/php.13642	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 Akagi Takami, Yamada Tomomi, Miyazaki Hiromi, Taguchi Hiroyuki, Ikeda Hidefumi, Katoh Masakazu, Mura Simona, Couvreur Patrick, Chetprayoon Paninee, Maniratanachote Rawiwan, Yoshida Hiroaki, Ajiro Hiroharu, Hashimoto Koji, Ashikaga Takao, Kojima Hajime, Akashi Mitsuru	4. 巻 43
2. 論文標題 Validation study for in vitro skin irritation test using reconstructed human skin equivalents constructed by layer by layer cell coating technology	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Applied Toxicology	6. 最初と最後の頁 874 ~ 886
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jat.4431	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 Tsuno Yasuyuki, Takayama Izumi, Kondo Naonari, Nagano Yo, Miyazaki Hiromi, Kawauchi Satoko, Akashi Mitsuru, Saitoh Daizoh, Terakawa Mitsuhiro, Sato Shunichi	4. 巻 29
2. 論文標題 Cultivation and Transplantation of Three-Dimensional Skins with Laser-Processed Biodegradable Membranes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part A	6. 最初と最後の頁 344 ~ 353
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ten.TEA.2022.0208	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 角井泰之, 宮崎裕美, 赤木隆美, 明石満, 齋藤大蔵, 佐藤俊一
2. 発表標題 光生体調節作用 (photobiomodulation) を用いたヒト3次元培養皮膚のバイアビリティー向上
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Miyazaki H, Tsunoi Y, Akagi T, Sato S, Akashi M, Saitoh D.
2. 発表標題 Evaluation of pre-vascularized 3D skin substitutes in full-thickness skin defects
3. 学会等名 The 13th Asia Pacific Burn Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsunoi Y, Miyazaki H, Akagi T, Saitoh D, Akashi M, Sato S.
2. 発表標題 Viability improvement of three-dimensional cultured skin substitutes by photobiomodulation
3. 学会等名 17th Medical Biodefense conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎裕美, 角井泰之, 赤木隆美, 明石満, 佐藤俊一, 齋藤大蔵
2. 発表標題 パネルディスカッション熱傷基礎研究の現状と実用化に向けて 血管網を持つ複合型培養皮膚による皮膚再生
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 古川雅俊, 角井泰之, 大倉津矢子, 宮崎裕美, 赤木隆美, 齋藤大蔵, 明石満, 佐藤俊一, 西館泉
2. 発表標題 光生体調節作用を用いたヒト3次元培養全層皮膚の表皮分化促進の検討
3. 学会等名 日本生体医工学会関東支部 若手研究者発表会2020
4. 発表年 2020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
研究分担者	角井 泰之 (Tsuno Yasuyuki) (30806451)	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 (82406)	
研究分担者	佐藤 俊一 (Sato Shunichi) (90502906)	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・教授 (82406)	
研究分担者	齋藤 大蔵 (Saitoh Daizoh) (90531632)	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 外傷研究部門・教授 (82406)	

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