

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390409

研究課題名(和文) 機能性人工真皮の開発及び難治性皮膚疾患への応用

研究課題名(英文) Development of functional artificial dermis and application to intractable skin disease

研究代表者

河合 勝也 (Kawai, Katsuya)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90273458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：人工真皮は、皮膚全層欠損創に移植することで皮膚の真皮層を再生する人工材料である。しかし、難治性潰瘍では創傷治癒が遷延する。そこで我々は細胞増殖因子の徐放可能な機能的人工真皮(Collagen/Gelatin sponge: CGS)を開発した。CGSに静電的に結合した塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)および肝細胞増殖因子(HGF)のデュアル徐放による創傷治癒効果の検討を行った。bFGFとHGFをCGSに併用することで、肉芽組織形成促進および上皮化促進、さらに血管新生効果が確認された。

研究成果の概要(英文)：Artificial dermis is an artificial material to play the dermis layer of the skin by transplantation on the full-thickness skin defect. However, the wound healing is prolonged in the intractable ulcer. Therefore we have developed a functional artificial dermis, which can be sustained release of cell growth factor (Collagen/Gelatin sponge: CGS). We examined the effect of wound healing with dual sustained release of basic fibroblast growth factor (bFGF) and hepatocyte growth factor (HGF) bounded electrostatically to the CGS. By the combination of bFGF and HGF with CGS, granulation tissue formation and epithelialization accelerated, further angiogenic effect has been observed.

研究分野：形成外科

キーワード：人工真皮 細胞増殖因子 難治性皮膚疾患

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 人工真皮は、コラーゲンから成るスポンジ構造をした人工材料であり、皮膚全層欠損創に移植すると周囲組織から線維芽細胞や毛細血管が侵入し、コラーゲンを合成して皮膚の真皮層を再生する。

(2) 難治性潰瘍では創傷治癒が遅延するため、人工真皮を移植しても感染により融解するリスクがあり使用し難い。そのため、現状として難治性潰瘍の治療は難渋している。

(3) 創傷治癒は、様々な細胞(角化細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、マクロファージ、血小板など)が連携し働くことにより制御されており、その複雑な過程は、サイトカインなどのシグナルにより調整されている。すなわち、創傷治癒を促進させるには、この過程を再現することが重要であり、そのために細胞成長因子を徐放することが必要と考えている。

## 2. 研究の目的

(1) 我々は人工真皮にゼラチンを含有した機能的人工真皮 (Collagen/Gelatin sponge: CGS) を開発した。ゼラチンを用いることにより CGS に投与した細胞増殖因子 (サイトカイン) が静電的に結合するため徐放が可能となり、サイトカイン療法を行うことができると考える。

(2) 創傷治癒に働く細胞増殖因子は多数存在し、それぞれが正電荷あるいは負電荷に帯電している。CGS は 10%のゼラチン (等電点 5.0) を含有したコラーゲンスポンジであるため、正電荷を持つ細胞増殖因子であれば CGS との静電的結合が可能であると考えられる。今までに等電点 9.6 の正電荷を持つ線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の徐放が可能であり、創傷治癒促進効果が得られることを証明し

てきた<sup>1,2)</sup>。

(3) 肝細胞増殖因子(HGF)は、肝臓、腎臓、肺などでの血管新生、抗線維化、抗炎症作用をもつ等電点 8.2 を持つ細胞成長因子であり、皮膚欠損創でも創傷治癒促進効果が報告されている。本研究では CGS から HGF が徐放されることを確認する。さらに HGF および bFGF デュアル徐放が可能であることを確認する。CGS からの HGF および bFGF デュアル徐放による創傷治癒に与える効果を評価することにより、難治性潰瘍に対する新しい治療法としての可能性を追求することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(!) in vitro 実験 : CGS の溶解速度と放出された HGF および bFGF 量を測定する。

材料作成 : CGS (1.5 × 1.0cm) に以下の 2 群の溶液を含浸した。

HGF 溶液単独群 (HGF 10 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>)

混合溶液群 (HGF 10 $\mu$ g/cm<sup>2</sup> + bFGF 7 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>)

実験方法 : 2 群の CGS を PBS に浸漬 (24 時間) する。その後コラゲナーゼ溶液に浸漬 (24 時間) し、その間、合計 10 回 CGS と溶液を採取し、HGF および bFGF の定量を行う。

測定方法 : 以下の 2 項目について評価を行う。

CGS 溶解量 (%) : CGS の凍結乾燥で重量を測定する。

HGF および bFGF 放出量 (%) : ELISA 法で測定する。

放出された HGF、bFGF 積算値を、それぞれの 100% とした。

(2) in vivo 実験 : 動物を用いて、HGF および bFGF デュアル徐放での創傷治癒効果を検討する。

材料作成 : CGS (直径 8 mm) に以下の 5 群の溶液を含浸させた。

生理食塩水(NSS 群)

HGF 単独溶液

HGF 10 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>(HGF-L 群)

HGF 50 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>(HGF-H 群)

bFGF 単独溶液

bFGF 7 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>(bFGF 群)

混合溶液

HGF10 $\mu$ g/cm<sup>2</sup> + bFGF7 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>(HGF+bFGF 群)

実験方法：C57BL マウスの背部に作成した直径 8 mm 全層皮膚欠損創に 5 群の材料を貼付した。

評価項目：以下の 4 項目につき計測を行う。

残存創面積 (肉眼写真)術後 1, 2, 3 週

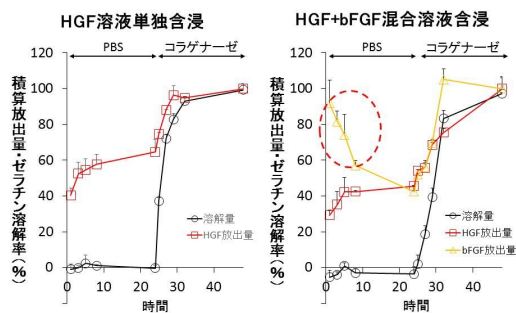
新生上皮の長さ (HE 染色)術後 1, 2 週

真皮様組織の断面積 (AZAN 染色)術後 2, 3 週

新生血管 ( SMA 免疫染色)術後 2 週

#### 4. 研究成果

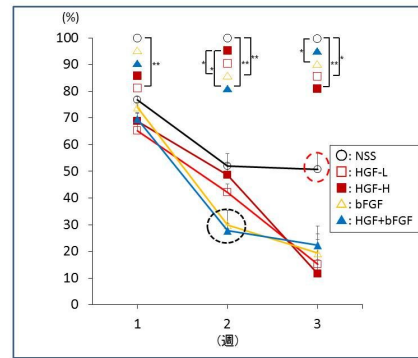
(1) CGS から静電的に吸着されていた HGF および bFGF は、HGF 単独でも、また HGF および bFGF デュアル徐放が可能であることが確認された。



(2) HGF と CGS を併用することで上皮形成、肉芽形成が促進され、bFGF と HGF を CGS に併用することで更なる血管新生効果が確認された。

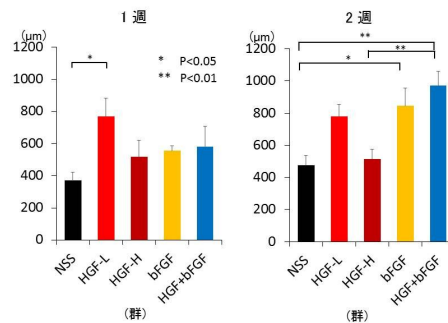
残存創面積について

HGF+bFGF 群は早期に創面積の縮小がみられ、HGF 徐放による有効性が考えられた。



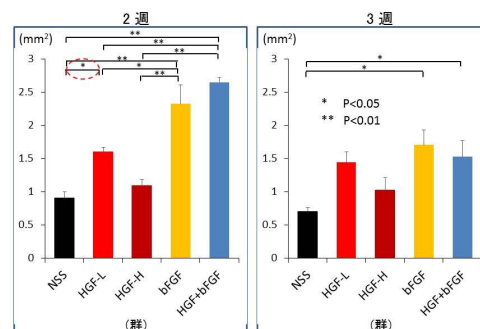
新生上皮の長さについて

HGF+bFGF 群は NSS 群および HGF-H 群に比し、有意に上皮化の促進がみられた。HGF および bFGF 両者の徐放による効果が考えられた。



真皮様組織の断面積について

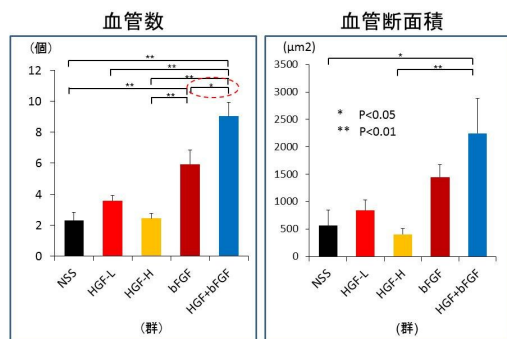
HGF+bFGF 群は全ての群に比し、有意に真皮様組織形成の促進がみられた。HGF および bFGF 両者の徐放による効果があり、特に創傷治癒早期に有効であると考えられた。



新生血管について

真皮様組織形成同様、HGF+bFGF 群は全ての群に比し、有意に血管新生がみられた。HGF および bFGF デュアル徐放による効果があり、

特に早期に有効であると考えられた。



以上の実験結果から、HGF+bFGF 群で bFGF 群より、血管新生促進効果が確認された。より良い創傷治癒を得るには瘢痕拘縮抑制は重要である。肉芽形成（真皮様組織）が拘縮形成を防ぐと言われており、血管新生が肉芽形成促進につながるといえる。すなわち、CGS に HGF+bFGF 併用することは、創傷治癒の質的改善に有利である。また血管系の構築に優れていることから感染に対する抵抗性が得られるため、難治性潰瘍の治療に有効であることが示唆された。

1)Kanda, N., et al., Ann Plast Surg, 2012. 69(5): p. 569-74.

2)Takemoto, S., et al., Tissue Eng Part A, 2008. 14(10): p. 1629-38.

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 7 件)

荻野秀一 森本尚樹 坂本道治 神野千鶴 坂元悠紀 河合勝也 鈴木茂彦, コラーゲン/ゼラチンスポンジの HGF 単独、bFGF 同時徐放能と創傷治癒促進効果の検討, 第 15 回日本再生医療学会総会, 2016 年 3 月 19 日, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

荻野秀一 森本尚樹 中村陽子 坂本道治 神野千鶴 伊藤蘭 坂元悠紀 平嗣良 河合勝也 田畑泰彦 鈴木茂彦, 生体吸収材料を用いた bFGF とその

他サイトカインの dual 徐放効果の検討, 第 45 回日本創傷治癒学会 イノベーションセミナー, 2015 年 12 月 1 日, JP タワー ホール&カンファレンス (東京都千代田区)

荻野秀一 森本尚樹 坂本道治 神野千鶴 坂元悠紀 河合勝也 鈴木茂彦, コラーゲン/ゼラチンスポンジの HGF 単独、bFGF 同時徐放能と創傷治癒促進効果の検討, 第 5 回 DDS 再生医療研究会, 2015 年 11 月 28 日, 梅田ガクトホール (大阪府大阪市)

荻野秀一 森本尚樹 坂本道治 神野千鶴 河合勝也 鈴木茂彦, コラーゲン/ゼラチンスポンジからの HGF 単独、bFGF 同時徐放の検討, 第 24 回日本形成外科学会基礎学術集会, 2015 年 10 月 8 日, 岩手県民会館 (岩手県盛岡市)

荻野秀一 森本尚樹 坂本道治 神野千鶴 河合勝也 鈴木茂彦, コラーゲン/ゼラチンスポンジよりの HGF と bFGF 同時保持・徐放の検討, 第 7 回創傷外科学会, 2015 年 7 月 25 日, 東京ドームホテル (東京都文京区)

荻野秀一 森本尚樹 坂本道治 神野千鶴 河合勝也 鈴木茂彦, ゼラチンゲルシートの EGF 保持性能と創傷治癒促進効果の検討, 第 14 回日本再生医療学会総会, 2015 年 3 月 20 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

荻野秀一 森本尚樹 坂本道治 神野千鶴 中村陽子 河合勝也 鈴木茂彦, EGF 含有ゼラチンゲルの保持徐放能と創傷治癒に与える影響の検討, 第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会, 2014 年 10 月 9 日, キッセイ文化ホール (長野県松本市)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

河合 勝也 (KAWAI, KATSUYA)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：90273458

(2)研究分担者

鈴木 茂彦 (SUZUKI, SHIGEHICO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：30187728

森本 尚樹 (MORIMOTO, NAOKI)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：40378641