

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592724

研究課題名(和文)電気穿孔法によるサイトカインの経皮、経潰瘍底導入効果についての実験的研究

研究課題名(英文) Experimental study of induction of cytokines through skin and ulcer base using electroporation

研究代表者

楠本 健司 (Kusumoto, Kenji)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：20161630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚や潰瘍底には、分子量の大きい薬剤や物質を皮膚潰瘍底の癒着を透過させない保護機能が備わっている。有効な薬剤や物質を透過できれば、皮膚の創傷治癒や抗加齢を目指すことができる。今回、電気穿孔法(EP法)により、無侵襲でより高分子である20-100kDレベルの増殖因子の透過性を検討した。EP法のヒト皮膚への侵襲、bFGFや複合サイトカインである多血小板血漿(PRP)の導入を検証した。電圧80Vでは、皮膚への軽度の刺激性は生じたが、導入時のみの刺激であり、永続的な損傷なく導入を行うことができた。同条件においてEP法によるサイトカインの皮膚導入効果を上げることを認めたが、今後さらに詳細な検討を要する。

研究成果の概要(英文)：Skin and basis of skin ulcer have protective function not to permeate through them for medications and materials over 20kD molecules in the size. It is aimed to treat skin wounds and aging skin broadly, if medications and materials with larger molecule can be penetrated. In this time, how to penetrate 20-100kD growth factors minimally invasively through the skin and the base of the skin ulcer using electroporation (EP method) is studied. Any invasions in EP method, and permeating bFGF and PRP, which contains various growth factors, were investigated invasions. As comparing in voltages, in 80V light skin stimulation was observed only during induction. No skin and soft tissue damages remained. Cytokines penetrating the skin surface was confirmed, however, more detailed mechanisms will be investigated in the future.

研究分野：形成外科学

キーワード：PRP cytokine electroporation regenerative medicine skin skin ulcer 電圧 パルス

1. 研究開始当初の背景

<皮膚面と潰瘍面>皮膚は元来各種物質の体内侵入に対する強固なバリアーであり、創傷面も特に慢性創傷ではバイオフィルムが存在し、各種物質や薬剤の透過性を著しく減じている。臨床の現場では、一般に軟膏塗布や各種創傷被覆材を用いて ODT 効果をも加え毛根を開く、あるいは湿潤環境をつくるなどの機序で薬効を高める試みが行われている。しかし、その効果はわずかに上がっているものの十分とは言えない。低侵襲あるいは無侵襲で目的とする薬効成分が皮膚あるいは創面を透過することは、創傷治癒や皮膚活性化のために極めて重要であり、潰瘍治療や皮膚活性化においてさらなる将来に薬剤到達 (DDS; drug delivery) の点で極めて有効となる。

<サイトカインの生理的意義>近年生理活性物質、特にサイトカインについての知見が積み重なり、その体内での細胞や組織への作用が明らかとなってきた。これらは生命活動だけでなく、各種外傷、ストレス、加齢など生命活動に危害が加わる変化に対しても対応し、維持、修復、回復に働くように調節されている。これらに適合したサイトカインが、治療を目的とする局所皮膚や潰瘍部分にのみ無侵襲で導入されれば極めて理想的である。

<電気穿孔法 (EP 法; electroporation)>皮膚に一定の電気負荷、立ち上がり電圧 50-80V の指数関数的減衰波、あるいは方形波を瞬発的に (パルス幅 10 μ s-10ms) 負荷すると、角質細胞間脂質や細胞膜にランダムな多数の親水性孔を誘起して開孔して物質の出入りを可能とする

(E. Neumann et al. 1972)。電気刺激を中止すると閉孔し通常の皮膚状態に戻る。本法は細胞への DNA 導入などに用いられているが、サイトカインを含めたその他の詳

細な検討は見られない。

<今回の実験の背景と意義>我々はこれまで骨形成タンパク (BMP; 骨誘導するサイトカイン)、多血小板血漿 (PRP; 複合サイトカイン) の実験研究を続けてきた。結果として骨の誘導、創傷治癒など著明な効果を引き出すことを検証してきた。これらサイトカインを局所で有効に働かせるには、手術的埋入、注入など侵襲的な手法でしか導入できなかった。今回、EP 法の機序から、これを用いることで無侵襲で経皮的あるいは経潰瘍的にサイトカインを目的の箇所への導入を行えることは医療における大きな意義を有することを認識し、これを検証する目的で本実験計画を立てた。

2. 研究の目的

損傷皮膚や慢性創傷や開放創などでは、より短期間に肉芽増生と上皮化、活性化が期待される。創傷治癒過程ではこれを進めるために PDGF、bFGF、TGF- β 、VEGF などのサイトカインが重要な働きを担っており、サイトカインを該当の潰瘍底や周囲皮膚に、より低侵襲、無侵襲で導入できることが理想的である。今回、無侵襲で分子量の大きいサイトカインを導入する可能性を有する電気穿孔法 (electroporation) を応用し、各種サイトカインをラットおよびヒト材料を用いて一定の潰瘍底や皮膚からの皮内、皮下脂肪層への到達とこれによる創傷治癒促進効果について実験的に検討することとした。

3. 研究の方法

概要: 電気穿孔法 (EP 法; electroporation) を用い、サイトカイン (bFGF、PRP(カクテルサイトカイン含有)) のラット皮膚・潰瘍、ヒト皮膚・潰瘍への浸透性を組織学的、生化学的に定性的、定量的に検討する。皮膚・潰瘍への EP 法を用いたサイトカインの導入法

についてのサイトカイン単一、複合での検討を行い、皮膚活性化、潰瘍治療の基盤となることを目指した。

(1) 各サイトカインの濃度条件を設定し、皮膚、実験的潰瘍に導入し検討した。



EP法 (MesoDerm, MICROLAB, Italy) 50V, 1ms でサイトカイン (bFGF, PRP) を用いて導入のパイロットスタディを行った。この導入確認を行い、以下の条件設定を確定した。

電気穿孔機の条件設定：電気負荷条件を立ち上がり電圧 50、80V、方形波パルス幅 100 μ s、1ms、10ms に設定した。

モデルラット作成：ラット (Wistar 雄 200g.) の右背部は正常皮膚 (S) とし、左背部に 20mm 径の皮膚欠損創 (W) を作成し、プラスチック枠で周囲縫合固定して瘢痕拘縮を予防し潰瘍モデルとした。

サイトカインの調整：bFGF, PRP を準備し、それぞれ3濃度条件を設定し、連続1回/日で3日連続EP法を行った。

最終EP法後にラット腹腔内麻酔を行い、同部S領域、W領域を筋膜上で摘出し、生理食塩水で洗浄し、検討対象材料とした。

組織学的検討：切り出し組織を、HE染色、各サイトカイン対応する免疫染色を行いサイトカインの局在を検討した。

(2)

電気穿孔機の条件設定：電気負荷条件を立ち上がり電圧 50、80V、方形波パルス幅 100 μ s、1ms、10ms に設定した。

サイトカインの調整：bFGF, PRP を準備する。

最終EP法後にHS領域、HW領域を摘出

し、生理食塩水で洗浄し、検討対象材料とした。

組織学的検討：切り出し組織を、HE染色、各サイトカイン対応する免疫染色を行い検討した。

4. 研究成果

(1) EP法によるヒト皮膚の無侵襲の検討、bFGF や複合サイトカインである多血小板血漿 (PRP) を用いて検証した。電圧による比較では、80V で、皮膚への軽度の刺激性 (piripiri-sensation) を生じたが、導入時のみの刺激であり、永続的な損傷なく導入を行うことができた。

80V 以下では、刺激感を生じなかったが、導入効率を考慮して今回は80Vを定格とした。

(2) EP法によるサイトカインの導入効果が確認でき、皮膚の肉眼的、スコープによる様相は改善した。ダーマスコピーによってこれを確認した。導入効率の詳細な検討は、今後に残っている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11件)

Notodihardjo PV, Morimoto N, Kakudo N, Matsui M, Sakamoto M, Liem PH, Suzuki K, Tabata Y, Kusumoto K : Gelatin hydrogel impregnated with platelet-rich plasma releasate promotes angiogenesis and wound healing in murine model. J Artif Organs. 18(1):64-71, 2015. 査読あり

Kushida S, Kakudo N, Morimoto N, Hara T, Ogawa T, Mitsui T, Kusumoto K : Platelet and growth factor concentrations in activated platelet-rich plasma: a comparison of seven commercial separation systems. J Artif Organs. 17(2):186-192, 2014. 査読あり

Kakudo N, Morimoto N, Kushida S, Ogawa T, Kusumoto K.: Platelet-rich plasma releasate promotes angiogenesis in vitro and in vivo. Med Mol Morphol. 47(2):83-89, 2014. 査読あり

楠本健司 : 創傷治癒と PRP (多血小板血漿) 療法について 癬痕・ケロイド治療ジャーナル 8:40-42,2014. 査読あり

楠本健司、福田智、三宅ヨシカズ : PRP による美容医療 -PRP 療法によるしわ治療と AGA 治療- 形成外科 56: S144-S148, 2013. 査読あり

楠本健司、福田智、三宅ヨシカズ : シワ治療における多血小板血漿 (PRP) の使い方と合併症への対応 PEPARS 81:27-31, 2013. 査読なし

Kushida S, Kakudo N, Suzuki K, Kusumoto K.: Effects of platelet-rich plasma on proliferation and myofibroblastic differentiation in human dermal fibroblasts. Ann Plast Surg. 71:219-224,2013. 査読あり

楠本健司、福田智、三宅ヨシカズ、覚道奈津子、櫛田哲史 : 多血小板血漿 (PRP) と褥瘡、難治性皮膚潰瘍の治療 日本医事新報 4626:65-68,2012. 査読なし

Natsuko Kakudo, Satoshi Kushida, Tsunetaka Ogura, Tomoya Hara, Kenji Suzuki, Kenji Kusumoto : The use of autologous platelet-rich plasma in the treatment of intractable skin ulcer: A case series. Open Journal of Regenerative Medicine 1(3):29-32,2012. 査読あり

[学会発表](計 18件)

Kenji Kusumoto: Platelet-rich Plasma (PRP) and the Application for Wound Treatment and Antiaging. AESTHETICS 2013 23th Aug 2013. India Habitat Centre, New Delhi, India.

Kenji Kusumoto: New approaches for the use of PRP in chronic wounds. Fourth International Conference Regenerative Surgery 14th Dec 2012. Eurostars Roma Aeterna Hotel, Roma, Italy

Kenji Kusumoto, Kenji Suzuki, Satoshi Fukuda, Natsuko Kakudo, Yoshihito Tanaka, Takashi Sasao, Yoshikazu Miyake, Satoshi Kushida, Priscilla Valentin Notodihardjo, Tsunetaka Ogura: Autologous Platelet-Rich Plasma (PRP) and the application for chronic wounds. the 4th Congress of the World Union of Wound Healing Societies 5th Sep 2012. PACIFICO YOKOHAMA, Yokohama Japan

Kenji Kusumoto: Autologous Platelet-Rich Plasma on wound healing and the practical applications. the 4th Congress of the World Union of Wound Healing Societies 6th Sep 2012. PACIFICO YOKOHAMA, Yokohama Japan

Tsunetaka Ogura, Natsuko Kakudo, Satoshi Kushida, Kenji Suzuki, Kenji Kusumoto Platelet-Rich Plasma promotes healing of mouse skin wounds and increases vascularization. the 4th Congress of the World Union of Wound Healing Societies 5th Sep 2012. PACIFICO YOKOHAMA, Yokohama Japan

Kusumoto K, Suzuki K, Fukuda S, Kakudo N, Tanaka Y, Sasao T, Miyake Y, Kushida S, Priscilla V, Ogura T.: Autologous platelet-rich plasma (PRP) and the application for various wounds and poor conditions. The 11th Japan-Korea Congress of Plastic and Reconstructive Surgery 17th May 2012. Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Japan

Suzuki K, Horio O, Kakudo N, Kuro A, Miyake R, Toki H, Kusumoto K: Therapeutic experience of the burn wound which we used PRP (platelet rich plasma). The 11th Japan-Korea Congress of Plastic and Reconstructive Surgery 17th May 2012. Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Japan

〔図書〕(計 2件)

覚道奈津子、楠本健司 : PRP 療法の基礎原理としわ治療へのメカニズム : 美肌科学の最前線 前田憲寿 編 シーエムシー出版 pp103-109, 2014 東京

福田智、三宅ヨシカズ、楠本健司 : シワ治療における多血小板血漿 (PRP) 療法 : 美肌科学の最前線 前田憲寿 編 シーエムシー出版 pp110-116, 2014 東京

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

楠本健司 (KUSUMOTO, Kenji)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 2 0 1 6 1 6 3 0

(2)研究分担者

覚道奈津子 (KAKUDO, Natsuko)
関西医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 0 0 5 0 9 4 9 0

(3)連携研究者

なし