

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24390399

研究課題名(和文)細胞成長因子保持型人工真皮を用いた細胞治療および細胞誘導治療

研究課題名(英文)The cell therapy and cell recruit using artificial dermis that can sustain the release of growth factors

研究代表者

森本 尚樹 (MORIMOTO, Naoki)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40378641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、既存人工真皮を改良し、強力な血管新生作用、細胞誘導・増殖能を有するbFGF(塩基性線維芽細胞増殖因子)を静電的に吸着し、10日間程度徐放可能な全く新しい概念の新規人工真皮を開発した。bFGFと新規人工真皮の併用療法を行うと、人工真皮内への血管新生が促進され、血流が不十分な難治性潰瘍症例でも感染を抑えることが可能であり、線維芽細胞を播種した培養真皮と同様に以下の様な良好な組織再生が得られる。本研究では、この新規人工真皮がbFGF以外にも多血小板血漿を保持・徐放可能であること、脂肪由来幹細胞を併用すれば脂肪が形成されることを証明し、組織再生分野で使用可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：We have developed a novel artificial dermis, collagen/gelatin sponge (CGS), which is capable of sustained release of basic fibroblast growth factor (bFGF) for more than 10 days. CGS impregnated with bFGF accelerate capillary formation and promote wound healing process of chronic skin ulcers such as diabetic ulcers of pressure ulcers. In this study, we showed that CGS could sustain the release of PRP (Platelet rich plasma). In addition, CGS could be used for the scaffold for adipose tissue formation in combination with adipose tissue derived stem cells.

研究分野：形成外科学

キーワード：人工真皮 細胞成長因子 徐放

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らが開発した コラーゲンスポンジとシリコン膜からなる二層性人工真皮は 1996 年に製品化され、今日では皮膚全層欠損に対する標準治療となっている。このコラーゲンスポンジは、組織再生を行う際に、足場 ( Scaffold ) として最もよく使用される材料の一つである。我々もこの足場と培養細胞を用いた組織再生研究を一貫して行っており、複合型培養皮膚、培養真皮、脂肪など皮膚軟部組織の再生が可能であることを報告してきた。特に、患者血清を用いて自家線維芽細胞細胞を培養、播種した自家培養真皮は、京都大学病院で糖尿病性潰瘍患者を対象とした臨床試験を実施し有効性と安全性を確認している。しかしながら、細胞を用いた治療には、問題点も多く、期待されている程には臨床応用が進んでいない。理由は、第一に母床から移植組織に血流が得られるまでの 5 ~ 7 日間程度は感染に弱く、移植細胞も壊死しやすく、結果として治療効果が不十分であること、第二に、培養に要する時間、培養施設、高いコスト、安全性の担保など培養操作自体の問題が考えられる。これらの問題点を解決するため、我々は既存人工真皮を改良し、強力な血管新生作用、細胞誘導・増殖能を有する bFGF ( 塩基性線維芽細胞増殖因子、フィブラスプレー® ) を静電的に吸着し、10 日間程度徐放可能な全く新しい概念の新規人工真皮を開発した。bFGF と新規人工真皮の併用療法を行うと、人工真皮内への血管新生が促進され、血流が不十分な難治性潰瘍症例でも感染を抑えることが可能であり、線維芽細胞を播種した培養真皮と同様に以下の様な良好な組織再生が得られることを今までに確認している。

### 2. 研究の目的

本研究では、上記の背景および新規人工真皮の製品化を踏まえ、新規人工真皮を足場として用いた新しい組織再生方法を開発、臨床応用することを目的とする。新規人工真皮は、bFGF 以外の正電荷物質も吸着、徐放可能であることを我々は確認している。創傷治癒過程初期に動員される細胞成長因子は、bFGF を始め、PDGF ( 血小板由来細胞増殖因子 )、TGF- $\beta$  ( 形質転換増殖因子 )、EGF ( 上皮細胞増殖因子 ) などがある。bFGF 以外の成長因子は主に血小板由来である。計算上、新規人工真皮は生体内よりも高濃度の bFGF および他の細胞成長因子を吸着することが可能である。bFGF と血小板由来成長因子を適切な濃度で新規人工真皮に吸着、移植すると、移植部位に創傷治癒環境を再現することが可能であり、細胞増殖能に加え、生体の種々の細胞を呼び込む細胞誘導効果も期待できる。本研究では、細胞の接着、生存に影響を与えない細胞成長因子濃度を検討し、成長因子を吸着した新規人工真皮への効率的な細胞播種方法も検討する。次に、細胞を播種した新規

人工真皮を生体内に移植し、組織形成 ( 真皮、脂肪、軟骨 ) の検討を行う。また、細胞を用いない、新規人工真皮と細胞成長因子のみで組織再生を行う、細胞誘導治療の可能性について検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 新規人工真皮への成長因子含浸濃度の検討

新規人工真皮に含浸、播種する細胞成長因子と細胞の適切な濃度、方法を検討する。

新規人工真皮への bFGF および血小板由来細胞成長因子含浸条件の検討

新規人工真皮は酸性ゼラチンを 10% 含有しており、正電荷である bFGF を 50  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> まで静電的に吸着、保持、徐放可能であることを我々は確認している。また、血小板由来の細胞成長因子も吸着可能であることを確認している。本研究では、bFGF は製剤 ( フィブラスプレー® ) を用いる。血小板由来成長因子としては濃厚血小板製剤より血小板を活性化させ得られる細胞増殖因子である PL ( Platelet lysate、血小板分解産物 ) あるいはボランティアから採取した PRP ( 濃厚血小板血漿 ) を用いる。我々は PL、PRP に含まれる細胞増殖因子を 5 倍程度まで濃縮する方法を確立している。bFGF は 50  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> まで、血小板由来成長因子も最高濃度まで新規人工真皮に含浸させ、吸着可能な濃度、同時に放出されることを確認する。具体的には、細胞成長因子を吸着させた人工真皮をコラゲナーゼで分解、ELISA 法で放出される成長因子を測定する。

#### 新規人工真皮へ成長因子含浸後の細胞播種、接着率、増殖率の検討

新規人工真皮へ細胞を播種、培養を行い、細胞の接着率、増殖率を検討する。細胞はヒト脂肪由来間質細胞を用いる。その後、bFGF および血小板由来細胞成長因子を含浸した新規人工真皮への細胞播種、培養を行い比較する。基材内の細胞数は MTT 法で計測する。bFGF は脂肪分化を促進するとされており、細胞成長因子が脂肪由来間質細胞の分化に与える影響を検討する。

#### (2) 細胞成長因子含浸新規人工真皮と細胞治療 ( 培養真皮 ) の比較

##### 培養表皮の母床としての検討

我々はこれまでに皮膚線維芽細胞を播種、培養した人工真皮 ( 培養真皮 ) 上に表皮細胞が生着し、重層化することを確認している。新規人工真皮に bFGF あるいは血小板由来細胞成長因子を含浸させ、培養表皮を移植し、培養真皮と同様に生着するかどうか、ヌードマウスを用いて検討する。この際、含浸させる細胞成長因子の濃度も検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) 新規人工真皮への成長因子含浸濃度の検討

新規人工真皮への bFGF および血小板由来

細胞成長因子含浸条件の検討: PL を用いて検討を行なった。PL の主要成分である PDGF-BB(血小板由来細胞増殖因子)、TGF- $\beta$  (形質転換増殖因子)を本人工真皮が保持・吸着し、分解と共に徐放することを *in vitro* で確認した。また、マウスに作成した全層皮膚欠損創を用いて本人工真皮と5倍程度まで濃縮した PL の併用効果の検討を行った。直径 8mm の皮膚欠損創を作成し、ここに 1,2,3,4 倍濃縮 PL を含浸し移植した。評価は創面積の縮小、新生上皮距離、新生血管を評価した。この結果、2 倍から 3 倍程度に濃縮した PL を用いる場合が最も創傷治癒が促進されること、4 倍に濃縮した場合必ずしも創傷治癒が促進されないという結果を得た。

新規人工真皮へ成長因子含浸後の細胞播種、接着率、増殖率の検討: 脂肪再生の検討では、手術時の余剰脂肪より患者の同意を得て採取、培養したヒト脂肪組織由来幹細胞を本人工真皮に bFGF を含浸後播種、ヌードマウス背部皮下に移植した。移植半年で成熟脂肪組織が形成されることを確認したが、最も脂肪が形成された bFGF の含浸濃度は  $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$  であり、真皮様組織形成に効果的であった  $7\sim 14\mu\text{g}/\text{cm}^2$  よりも低濃度であった。また、bFGF 含浸による細胞接着への影響は認められなかった。bFGF でなく PL を用いた場合は、脂肪が形成されず、PL は脂肪再生には適していないことが確認された。

(2) 細胞成長因子含浸新規人工真皮と細胞治療(培養真皮)の比較

新規人工真皮に bFGF あるいは血小板由来細胞成長因子を含浸させ、培養表皮を移植し、培養真皮と同様に生着するかどうか、ヌードマウスを用いて検討した。種々の濃度を検討したが、培養表皮の生着は確認できなかった。

また、これ以外にも、本人工真皮と同等の保持効果のあるゼラチンハイドロゲルシートを用いて PRP との併用により臨床研究を実施し、有害事象は生じない、ことを示した。しかし、有効性については症例数が足りていないため、証明できなかった。また、肝細胞増殖因子(HGF)が人工真皮に保持され、分解と共に徐放されること、HGF と bFGF の同時徐放が可能であることを初期検討で確認した。また、動物実験で、GGs と EGF, bFGF の徐放効果と創傷治癒促進効果を検討し、これを証明した。また、本人工真皮から、肝細胞増殖因子(HGF)が人工真皮に保持され、分解と共に徐放されること、HGF と bFGF の同時徐放が可能であり、マウス創傷に用いた場合、HGF と bFGF 併用群で上皮化と肉芽組織形成が促進されることを確認した。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

Morimoto N, Kakudo N, Ogura T, Hara T, Matsui M, Yamamoto M, Tabata Y, Kusumoto K. Easy-to-Use Preservation and Application of Platelet-Rich Plasma in Combination Wound Therapy With a Gelatin Sheet and Freeze-Dried Platelet-Rich Plasma: A Case Report. *Eplasty*. 2016 Aug 5;16:e22. 査読有  
Ogino S, Morimoto N, Sakamoto M, Jinno C, Taira T, Suzuki S. Efficacy of gelatin gel sheets sustaining epidermal growth factor for murine skin defects. *J Surg Res*. 2016 Apr;201(2):446-54. doi: 10.1016/j.jss.2015.11.045. 査読有  
Sakamoto M, Morimoto N, Ogino S, Jinno C, Taira T, Suzuki S. Efficacy of gelatin gel sheets in sustaining the release of basic fibroblast growth factor for murine skin defects. *J Surg Res*. 2016 Apr;201(2):378-87. doi: 10.1016/j.jss.2015.11.045. 査読有  
Jinno C, Morimoto N, Ito R, Sakamoto M, Ogino S, Taira T, Suzuki S. A Comparison of Conventional Collagen Sponge and Collagen-Gelatin Sponge in Wound Healing. *Biomed Res Int*. 2016;2016:4567146. doi: 10.1155/2016/4567146. 査読有  
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*. 2015 Mar;18(1):64-71. doi: 10.1007/s10047-014-0795-8. 査読有  
Ito R, Morimoto N, Liem PH, Nakamura Y, Kawai K, Taira T, Tsuji W, Toi M, Suzuki S. Adipogenesis using human adipose tissue-derived stromal cells combined with a collagen/gelatin sponge sustaining release of basic fibroblast growth factor. *J Tissue Eng Regen Med*. 2014 Dec;8(12):1000-8. doi: 10.1002/term.1611. 査読有  
森本尚樹, 楠本健司, 鈴木茂彦, 人工真皮貼付後に形成される真皮様組織部の血流評価、熱傷, 2013, 39 巻, P22-29, 査読有  
Ito R, Morimoto N, Pham LH, Taira T, Kawai K, Suzuki S. Efficacy of the controlled release of concentrated platelet lysate from a collagen/gelatin scaffold for dermis-like tissue regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2013 Jun;19(11-12):1398-405. doi:

10.1089/ten.TEA.2012.0375. 査読有  
Kanda N, Morimoto N, Takemoto S,  
Ayvazyan AA, Kawai K, Sakamoto Y,  
Taira T, Suzuki S. Efficacy of novel  
collagen/gelatin scaffold with  
sustained release of basic fibroblast  
growth factor for dermis-like tissue  
regeneration. Ann Plast Surg. 2012  
Nov;69(5):569-74. doi:  
10.1097/SAP.0b013e318222832f. 査読  
有

〔学会発表〕(計 20 件)

森本尚樹、覚道奈津子、小倉常敬、原朋也、山本雅哉、田畑泰彦、楠本健司、PRP とゼラチンシートの併用療法による難治性皮膚潰瘍治療、第 6 回 DDS 再生医療研究会、2016 年 12 月 17 日、ANA クラウンプラザホテル神戸(兵庫県神戸市)  
Naoki Morimoto, Natsuko Kakudo, Rina Koseki, Tsunekata Ogura, Tomoya Hara, Kenji Kusumoto, Easy-to-use preservation and application of platelet-rich plasma; the combination wound therapy with a gelatin sheet and freeze-dried platelet-rich plasma, The 5th World Congress of the World Union of Wound Healing Societies, 2016.9.25~29. フィレンツェ(イタリア)

荻野秀一、森本尚樹、坂本道治、神野千鶴、平岡良、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 同時徐放による創傷治癒促進効果と瘢痕形成抑制効果の検討、第 8 回日本創傷外科学会総会・学術集会、2016 年 7 月 21 日~22 日、ホテルメトロポリタン池袋(東京都)

森本尚樹、楠本健司、鈴木茂彦、細胞成長因子とマトリックスを用いた皮膚の再生医療、第 29 回日本医学会総会、2015 年 4 月 11 日~13 日、京都国際会議場(京都府京都市)

森本尚樹、楠本健司、鈴木茂彦、bFGF 保持徐放可能な新規人工真皮の開発、第 58 回日本形成外科学会総会学術集会、2015 年 4 月 8 日~10 日、ウエスティン都ホテル(京都府京都市)

荻野秀一、森本尚樹、坂本道治、神野千鶴、河合勝也、鈴木茂彦、ゼラチンゲルシートの EGF 保持機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~22 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

小倉常敬、森本尚樹、覚道奈津子、原朋也、楠本健司、フリーズドライ Platelet-Rich Plasma による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~22 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

小倉常敬、森本尚樹、覚道奈津子、楠本健司、フリーズドライ技術を用いた長期保存 Platelet-Rich Plasma が有する創傷治癒促進効果の検討、第 44 回日本創傷治癒学会、2014 年 12 月 2 日~3 日、ホテルメトロポリタン仙台(宮城県仙台市)

坂本道治、森本尚樹、荻野秀一、神野千鶴、河合勝也、鈴木茂彦、マウス皮膚全層欠損創における bFGF 徐放性ゼラチンゲルシートの創傷治癒促進効果、第 44 回日本創傷治癒学会、2014 年 12 月 2 日~3 日、ホテルメトロポリタン仙台(宮城県仙台市)

森本尚樹、Priscilla Valentin Notodihardjo、覚道奈津子、小倉常敬、原朋也、松井誠、田畑泰彦、楠本健司、PRP とゼラチンシートの併用療法による難治性皮膚潰瘍に対する臨床試験、第 4 回 DDS 再生医療研究会、2014 年 12 月 06 日、日本歯科大学生命歯学部 100 周年記念館(東京都)

小倉常敬、森本尚樹、覚道奈津子、楠本健司、フリーズドライ技術を用いた Platelet-Rich Plasma の新規調整法による創傷治癒促進効果の検討、第 6 回日本創傷外科学会総会・学術集会、2014 年 7 月 24 日~25 日、かがわ国際会議場(香川県高松市)

N. Morimoto, K. Kusumoto, Novel Collagen/Gelatin Scaffold with Sustained Release of Basic Fibroblast Growth Factor: Basic structure and Clinical trial, Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society EU Meeting -2014, 2014 年 6 月 10 日~13 日、ジェノバ(イタリア)

森本尚樹、bFGF 保持型人工真皮の応用、第 13 回日本再生医療学会、2014 年 3 月 4 日~6 日、国立京都国際会館(京都府京都市)

森本尚樹、細胞成長因子保持機能を持つ新規人工真皮の応用、DDS 徐放化再生医療研究会、2013 年 11 月 23 日、ソラシティカンファレンスセンター(東京都)

Naoki Morimoto, Novel Collagen/Gelatin Scaffold with Sustained Release of Basic Fibroblast Growth Factor: Clinical trial for skin ulcers, The 15th European Burns Association Congress, 2013 年 8 月 28 日~31 日、ウィーン(オーストリア)

森本尚樹、人工真皮を用いた創傷治療、第 5 回日本創傷外科学会、2013 年 7 月 12 日、ホテルグランピア京都(京都府京都市)

森本尚樹、自家培養真皮及び bFGF 徐放性人工真皮の血流評価、第 56 回日本形成外科学会総会学術集会、2013 年 4 月 3

日～5日、京王プラザホテル（東京都）  
森本尚樹、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）徐放性基材を用いた脂肪再生の検討、  
第21回日本形成外科学会基礎学術集会、  
2012年10月4日～5日、ホテルリステル猪苗代（福島県猪苗代町）

Naoki Morimoto、Simultaneous culturing of a bilayered dermal substitute with adipose tissue-derived stromal cells、The 16<sup>th</sup> Congress of the International Society for Burn Injuries、2012年9月9日～13日、エジンバラ（イギリス）

森本尚樹、脂肪由来幹細胞と塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）徐放性基材を用いた脂肪再生、第11回日本再生医療学会総会、2012年6月12日～14日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

#### 〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：徐放性組織再生材料  
発明者：鈴木茂彦，森本尚樹，筏義人，平嗣良  
権利者：京都大学、ゲンゼ株式会社  
種類：特許  
番号：出願番号：2012-174270  
出願年月日：2012年8月6日  
国内外の別：国内

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

森本尚樹（MORIMOTO, Naoki）  
関西医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：40378641

##### (2) 研究分担者

鈴木茂彦（SUZUKI, Shigehiko）  
京都大学・医学研究科・教授  
研究者番号：30187728

河合勝也（KAWAI, Katsuya）

京都大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：90273458

益岡弘（MASUOKA, Hiromu）

京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：00600496

##### (4) 研究協力者

平嗣良（TAIRA, Tsuguyoshi）  
ゲンゼ株式会社 QOL 研究所  
井家益和（INOIE, Masukazu）  
（株）ジャパンティッシュエンジニアリング