

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：基礎研究 (C)
研究期間：2007～2009
課題番号：19500407
研究課題名 (和文) 熱傷瘢痕と巨大色素性母斑の治療に用いる自家培養真皮の開発
研究課題名 (英文) Development of autologous cultured dermal substitute for treatment of burn scar and giant nevus
研究代表者 黒柳 能光 (KUROYANAGI YOSHIMITSU)
北里大学・医療衛生学部・教授
研究者番号：80170140

研究成果の概要 (和文)：小児の重症熱傷の治療後に生じる瘢痕 (引きつり) は成長に伴い機能障害を引き起こす。また、小児の巨大色素性母斑 (真皮組織中の色素沈着) は社会への順応において精神的な障害を引き起こす。そこで、これらの皮膚疾患に対する新しい治療法を可能にする新規の自家培養真皮の研究開発を行った。研究期間に行った研究項目は下記のとおりである。1) 自家培養真皮の冷凍保存条件を詳細に検討し、凍結保存・解凍操作に耐えうる最適なマトリックスを開発した。2) 凍結保存・解凍後の自家培養真皮中の線維芽細胞の生存率および産生される種々の細胞成長因子を測定した。解凍後も血管新生に重要な血管内皮成長因子 (VEGF)、肝細胞成長因子 (HGF)、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) の産生能力が保持されることを明らかにした。3) 自家培養真皮の臨床応用において、自家培養真皮を適用した上に保護材として上皮成長因子 (EGF) 含有ヒアルロン酸スポンジを開発した。培養系の実験で、EGF が培養真皮中の線維芽細胞に作用して、VEGF と HGF の産生量を顕著に高めることを明らかにした。自家培養真皮と EGF 含有ヒアルロン酸スポンジの併用により、線維芽細胞の能力を最大限に発揮できる治療法の可能性が確認できた。

研究成果の概要 (英文)：Severe burn scar in children results in the undesirable functional disturbance. Giant nevus in children results in the mental disturbance. This study was aimed to develop the autologous cultured dermal substitute (auto-CDS) for the treatment of these skin diseases. The results in this study proved the following evidences. 1) The cryopreservation for auto-CDS was investigated in detail. The suitable matrix for auto-CDS that is able to keep the physical properties was developed. 2) The cryopreserved and thawed CDS is able to maintain the potency to produce various growth factors including VEGF, HGF, and bFGF that are essential for angiogenesis. 3) As well as developing auto-CDS, the proper covering material for auto-CDS was developed. This covering material is composed of a hyaluronic acid spongy sheet containing EGF. The results in culture system revealed that EGF released from covering material functions to stimulate fibroblasts in auto-CDS, and thereby fibroblasts can release more amounts of VEGF and HGF. The use of auto-CDS in conjunction with the EGF-incorporated covering material is able to provide a successful treatment for severe burn scar and giant nevus in children.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：培養真皮・線維芽細胞・ヒアルロン酸・コラーゲン・熱傷瘢痕・色素性母斑

1. 研究開始当初の背景

平成12～16年度厚生労働科学再生医療ミレニアムプロジェクトとして北里大学医療衛生学部人工皮膚研究開発センターで製造した同種培養真皮を全国31の医療機関に搬送して臨床研究を展開した。これまでに404症例の報告があり、92%の症例において優れた結果が得られた。緊急性を要する広範囲重症熱傷あるいは高齢者の難治性皮膚潰瘍の治療を考えた場合は、患者自身の皮膚由来の細胞をフラスコで培養して作成する自家培養皮膚代替物では実践的な医療は成立しない。予め製造して凍結保存した同種培養真皮により実践的な医療が成立する。一方、緊急性を要しない熱傷瘢痕や巨大色素性母斑の治療を考えた場合は、自家培養表皮あるいは自家培養真皮により実践的な医療が成立する。

2. 研究の目的

本研究では、自家培養真皮の実用化に向けた基盤を構築する。小児の重症熱傷の治療後に生じる瘢痕（引きつり）は成長に伴い機能障害を引き起こす。また、小児の巨大色素性母斑（真皮組織中の色素沈着）は社会への順応において精神的な障害を引き起こす。そこで、これらの皮膚疾患に対する新しい治療法

を可能にする新規の自家培養真皮の開発を行う。具体的には、マトリックスの最適な構造設計と最適な生体内分解速度の決定、線維芽細胞の最適播種密度と線維芽細胞が産生する各種細胞成長因子の定量、さらには、予備臨床研究により移植床形成の組織学的な観察を行う。

3. 研究の方法

- ① 自家培養真皮のマトリックスの設計
- ② 線維芽細胞の最適播種密度の解明
- ③ 小児皮膚由来の線維芽細胞の凍結・解凍後の細胞活性の規格の設定
- ④ 無胸腺ラットを用いた動物実験による自家培養真皮の評価
- ⑤ 自家培養真皮の凍結保存および解凍後の性能評価
- ⑥ 無胸腺ラットを用いた動物実験による自家培養真皮の評価
- ⑦ 自家培養真皮の凍結保存および解凍後の性能評価

4. 研究成果

- 1) 分子間架橋の導入により、マトリックスの構造を保持すると同時に速やかに分子レベルになって創傷治癒を促進し、かつ瘢痕形成を抑制する作用を最大限に発現する最適

条件を解明した。2) 自家培養真皮の臨床応用において、一定の規格内で細胞活性を保持していることは安全性の基準となるため重要である。年齢、性別、皮膚採取部位と線維芽細胞のサイトカイン産生量の関連性を調べた。実際には、各患者の皮膚由来線維芽細胞から作成した培養真皮が産生する VEGF の産生量を定量する。患者数 6 名について関連性を解明した。

3) 自家培養真皮は手術日に合わせて作成する。しかしながら、小児の場合、発熱等で直前になって手術日の変更が生じる場合が多い。これに対処するため、自家培養真皮の冷凍保存条件の検討を行った。凍結保存・解凍操作に耐えうるマトリックスの最適設計を行った。

4) 凍結保存・解凍後の自家培養真皮中の線維芽細胞の生存率および産生される種々の細胞成長因子を調べた。解凍後も血管新生に重要な血管内皮成長因子(VEGF)、肝細胞成長因子(HGF)、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)の産生能力が保持されることを明らかにした。5) 自家培養真皮の臨床応用において、自家培養真皮を適用した上に保護材として軟膏塗布ガーゼを使用する。軟膏塗布ガーゼに代わる新規の被覆材として上皮成長因子(EGF)含有ヒアルロン酸スポンジを開発した。培養系の実験で、EGF が培養真皮中の線維芽細胞に作用して、VEGF と HGF の産生量を顕著に高めることを明らかにした。自家培養真皮と EGF 含有ヒアルロン酸スポンジの併用により、線維芽細胞の能力を最大限に発揮できる治療法の可能性が確認できた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件 全て査読有り)

1. Mizuno H, Shimamoto M, Koike S, Hyakusoku H, Miyamoto M, Kuroyanagi Y: Therapeutic angiogenesis by autologous bone marrow cell implantation

inconjunction with allogeneic cultured dermal substitute for intractable ulcers in critical limb ischemia. *Ann. Plast. Reconstr.*, in press.

2. Hayama Y, Ueda K, Kuroyanagi Y: Optimum preservation for autologous cultured dermal substitutes. *Ann. Plast. Reconstr.* in press.

3. Natsuga K, Sawamura D, Goto M, Homma E, Goto Y, Aoyagi S, Akiyama M, Kuroyanagi Y, Shimizu H: Clinical response of obstinate skin ulcers in recessive dystrophic bullosa patients to allogeneic cultured dermal substitute treatment. *Acta Dermato-Venereologica.* in press.

4. Matsumoto Y, Kuroyanagi Y: Development of wound dressing composed of hyaluronic acid sponge containing epidermal growth factor. *J. Biomater. Sci.*, in press

5. Matsumoto Y, Kuroyanagi Y: Design of a matrix for cultured dermal substitute suitable for simultaneous transplantation with auto-skin graft: evaluation in animal test. *J Biomater. Sci.*, in press.

6. Kurokawa N, Ueda K, Kuroyanagi Y: Improvement of the maxillary bonegrowth suppression in the cleft palate operation with cultured dermal substitute; animal experiment and patient reports in preliminary clinical application. *J. Plast, Reconstr. & Aesthetic Surg*, 63: 456-458, 2010.

7. Matsumoto Y, Arai K, Momose H, Kuroyanagi Y: Development of a wound dressing composed of a hyaluronic acid sponge containing arginine. *J. Biomater. Sci*, 20: 993-1004, 2009.

8. Toyozawa S, Yamamoto Y, Nishide T,

Kishioka A, Kanazawa N, Matsumoto Y, Kuroyanagi Y, Furukawa F: Case report; A case of pyoderma gangrenosum with intractable leg ulcers treated by allogeneic cultured dermal substitutes. *Dermatology Online Journal*, 14(11):17, 2008.

9. 永山裕子、山上慎二、黒柳能光：培養皮膚の開発；角化細胞と線維芽細胞の生化学的作用の解析。熱傷, 34:245-254, 2008.

10. Hashimoto A, Kuroyanagi Y: Standardization for mass production of allogeneic cultured dermal substitute by measuring the amount of VEGF, bFGF, HGF, TGF- β , and IL-8. *J. Artif. Organs*. 11: 225-231. 2008.

11. Yamada N, Uchinuma E, Matsumoto Y, Kuroyanagi Y: Comparative evaluation of re-epithelialization promoted by fresh or cryopreserved cultured dermal substitute. *J. Artif. Organs*, 11:221-224, 2008.

12. Kurokawa N, Ueda K, Tsuji M, Kuroyanagi Y: Application of cultured dermal substitute for amelioration of maxillary bone growth suppression after cleft operation in rats, *J. Artif. Organs*, 11: 216-220, 2008.

13. Yamada N, Uchinuma E, Kuroyanagi Y: Clinical trial of allogeneic cultured dermal substitute for intractable skin ulcers of the lower leg. *J. Artif. Organs*, 11: 100-103, 2008

14. Murata M, Okuda K, Momose M, Kubo K, Kuroyanagi Y, Wolff LF, Yoshie H: Root Coverage With Cultured Gingival Dermal Substitute Composed of Gingival Fibroblast and Matrix: A Case series. *Int. J. Periodontics Restorative Dent*, 28:

461-467, 2008.

[学会発表] (計 36 件)

1) 山田泰正 他 2：凍結・解凍後の培養真皮のサイトカイン産生能および操作性の評価。第 9 回日本再生医療学会 (平成 22 年 3 月 18 日～19 日、広島)

2) 近藤慎也 他 4：ヒアルロン酸とコラーゲンを基材とした EGF 含有創傷被覆材の開発：動物実験評価。第 9 回日本再生医療学会 (平成 22 年 3 月 18 日～19 日、広島)

3) 松本靖広 他 1：ヒアルロン酸を基材としたアルギニンおよび EGF 含有創傷被覆材の開発：糖尿病マウスを用いた動物実験評価。第 9 回日本再生医療学会 (平成 22 年 3 月 18 日～19 日、広島)

4) 松田優子 他 2：線維芽細胞の血管新生促進因子産生能を高める EGF 及び bFGF の効果。第 9 回日本再生医療学会 (平成 22 年 3 月 18 日～19 日、広島)

5) 飯島英美 他 2：コラーゲンゲル内における線維芽細胞のサイトカイン産生能に及ぼす細胞凝集効果。第 9 回日本再生医療学会 (平成 22 年 3 月 18 日～19 日、広島)

6) 近藤慎也 他 3：ヒアルロン酸とコラーゲンを基材とした上皮成長因子含有創傷被覆材の動物実験評価。第 39 回日本創傷治癒学会 (平成 21 年 12 月 8 日～9 日、東京)

7) 于あかね 他 3：線維芽細胞の血管新生促進因子産生促進に及ぼす EGF と bFGF の比較。第 39 回日本創傷治癒学会 (平成 21 年 12 月 8 日～9 日、東京)

8) 松本靖広 他 1：EGF およびアルギニン含有ヒアルロン酸創傷被覆材の開発。第 31 回日本バイオマテリアル学会大会 (平成 21 年 11 月 16 日～17 日、京都)

9) 松田優子 他 2：bFGF および EGF の適用による真皮モデル内の線維芽細胞の血管新生因子産生能促進効果。第 31 回日本バイオマ

テリアル学会大会 (平成 21 年 11 月 16 日～17 日、京都)

10) 近藤慎也 他 2 : ヒアルロン酸とコラーゲンを基材とした上皮成長因子含有創傷被覆材の開発。第 31 回日本バイオマテリアル学会大会 (平成 21 年 11 月 16 日～17 日、京都)

11) 鈴木健太 他 1 : 自家培養真皮の凍結・解凍後のサイトカイン産生能の評価。第 47 回日本人工臓器学会大会 (平成 21 年 11 月 12 日～14 日、新潟)

12) 鈴木龍介 他 2 : ヒアルロン酸とコラーゲンを基材とした上皮成長因子含有創傷被覆材の開発。第 47 回日本人工臓器学会大会 (平成 21 年 11 月 12 日～14 日、新潟)

13) 松本靖広 他 2 : ヒアルロン酸を基材としたアルギニンおよび EGF 含有創傷被覆材の糖尿病マウスにおける創傷治癒促進効果。第 18 回日本形成外科学会基礎学術集会 (平成 21 年 10 月 1 日～2 日、東京)

14) 中野幹人 他 2 : 上皮成長因子含有ヒアルロン酸創傷被覆材の開発: 糖尿病マウスを用いた動物実験評価。第 11 回日本褥瘡学会 (平成 21 年 9 月 4 日～5 日、大阪)

15) Suzuki K 他 2 : Evaluation of Cytokine Production from Cryopreserved Autologous Cultured Dermal Substitute. TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE 2ND WORLD CONGRESS (平成 21 年 8 月 31 日～9 月 3 日、Seoul, Korea)

16) Kuroyanagi Y 他 1 : Effect of Epidermal Growth Factor on Fibroblast Proliferation and Cytokine Production. TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE 2ND WORLD CONGRESS (平成 21 年 8 月 31 日～9 月 3 日、Seoul, Korea)

17) Matsumoto Y 他 1 : Development of Wound Dressing Composed of Hyaluronic Acid

Sponge Containing Arginine and Epidermal Growth Factor. TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE 2ND WORLD CONGRESS (平成 21 年 8 月 31 日～9 月 3 日、Seoul, Korea)

18) 鈴木龍介 他 2 : ヒアルロン酸とコラーゲンを基材とした創傷被覆材の開発。第 38 回医用高分子シンポジウム (平成 21 年 7 月 27 日～28 日、東京)

19) 松本靖広 他 2 : アルギニン含有ヒアルロン酸創傷被覆材の糖尿病マウスにおける創傷治癒促進効果。第 35 回日本熱傷学会 (平成 21 年 6 月 4 日～5 日、東京)

20) 山田真太郎 他 1 : 培養真皮と EGF 含有ヒアルロン酸被覆材の併用による創傷治癒促進効果。第 8 回日本再生医療学会 (平成 21 年 3 月 5 日～6 日、東京)

21) 松本靖広 他 2 : ヒアルロン酸を基材とした創傷被覆材の開発と糖尿病性動物実験における創傷治癒促進効果の評価。第 8 回日本再生医療学会 (平成 21 年 3 月 5 日～6 日、東京)

22) 鈴木健太 他 2 : 自家培養真皮の凍結・解凍後のサイトカイン産生能の評価。第 8 回日本再生医療学会 (平成 21 年 3 月 5 日～6 日、東京)

23) 鈴木健太 他 2 : 自家培養真皮の凍結・解凍後のサイトカイン産生能の評価。第 38 回日本創傷治癒学会 (平成 20 年 12 月 6 日、東京)

24) 山田真太郎 他 1 : 線維芽細胞の増殖およびサイトカイン産生能に及ぼす EGF の効果。第 38 回日本創傷治癒学会 (平成 20 年 12 月 6 日、東京)

25) 黒柳能光 : ヒト細胞を用いた皮膚再生医療の現状と展望 (シンポジウム講演)。第 35 回日本低温医学学会 (平成 20 年 11 月 23 日、東京)

26) 松本靖広 他 1 : ヒアルロン酸を基材と

した EGF 含有創傷被覆材の設計と評価。第 10 回日本褥瘡学会学術集会（平成 20 年 8 月 30 日、神戸）

27) 松本靖広 他 2 : EGF 含有ヒアルロン酸スポンジからなる創傷被覆材の開発。第 37 回医用高分子シンポジウム（平成 20 年 7 月 28 日～29 日、東京）

28) 中野幹人 他 2 : EGF 含有ヒアルロン酸スポンジからなる創傷被覆材の開発。第 29 回日本炎症・再生医学会（平成 20 年 7 月 9 日、東京）

29) 山田真太郎 他 1 : EGF による線維芽細胞の増殖および VEGF 産生量促進効果。第 29 回日本炎症・再生医学会（平成 20 年 7 月 9 日、東京）

30) 松本靖広 他 2 : ヒアルロン酸とコラーゲンをマトリックスとした自家培養真皮の動物実験評価。第 7 回日本再生医療学会（平成 20 年 3 月 13 日～14 日、名古屋）

31) 松本靖広 他 3 : ヒアルロン酸スポンジを基材とした EGF 含有創傷被覆材の動物実験評価。第 7 回日本再生医療学会（平成 20 年 3 月 13 日～14 日、名古屋）

32) 中野幹人 他 2 : EGF 含有ヒアルロン酸スポンジからなる創傷被覆材の開発。第 37 回日本創傷治癒学会（平成 19 年 12 月 6 日～7 日、横浜）

33) 松本靖広 他 2 : 自家皮膚移植との同時移植を可能にする自家培養真皮のマトリックスの設計と評価。第 37 回日本創傷治癒学会（平成 19 年 12 月 6 日～7 日、横浜）

34) 山田真太郎 他 2 : 上皮成長因子の線維芽細胞増殖促進効果。第 37 回日本創傷治癒学会（平成 19 年 12 月 6 日～7 日、横浜）

35) 黒柳能光 : 培養真皮を用いた皮膚再生医療の治療効果（教育講演）。第 35 回日本救急医学会総会・学術集会（平成 19 年 10 月 16 日～18 日、大阪）

36) 永山裕子 他 2 : 培養皮膚の開発 : 角化細胞と線維芽細胞の生化学的相互作用の解析。第 33 回日本熱傷学会総会・学術集会（平成 19 年 6 月 7 日～8 日、金沢）

[図書]（計 8 件）

1) 黒柳能光 : [巻頭言] 再生医療の科学的な進歩と実用化への道程、再生医療（日本再生医療学会雑誌）、9(1):15, 2010.

2) 黒柳能光 : 材料の科学と工学、特集号「医用・生体材料の開発動向と生体適合性」；生体材料・細胞・細胞成長因子を基盤とする再生医療。日本材料学会編集、46(6):1-5, 2009.

3) 黒柳能光 : 特集、肌と高分子；人工皮膚。高分子 58: 897-900, 2009.

4) 黒柳能光 : 患者までとどいている再生誘導治療、培養真皮、株式会社メディカルドウ、246-250, 2008.

5) 黒柳能光 : 進みつつける細胞移植治療の実際（下巻）、成熟細胞：皮膚、株式会社メディカルドウ、143-146, 2008.

6) 黒柳能光 : 皮膚再生医療の現状と展望、新医療、152-155, 2008.

7) 黒柳能光 : iPS 細胞への期待；皮膚科領域から、日本再生医療学会雑誌、7: 180-182. 2008.

8) 黒柳能光 : [巻頭言] 再生医療を支える細胞とバイオマテリアル、バイオマテリアル（日本バイオマテリアル学会誌）、26: 3-4, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者 黒柳 能光

(KUROYANAGI YOSHIMITSU)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号 : 80170140