

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19592072  
 研究課題名（和文）  
 培養真皮、複合型培養皮膚の臨床応用に向けた基礎的研究  
 研究課題名（英文）  
 Fundamental research for clinical application of cultured dermis and skin  
 研究代表者  
 森本 尚樹 (MORIMOTO NAOKI)  
 京都大学・医学研究科・助教  
 研究者番号：40378641

## 研究成果の概要：

本研究では、コラーゲンスポンジとシリコーン膜からなる二層性人工真皮を足場材料として用い、自己血清を用いた自家線維芽細胞および培養真皮の培養方法を確立し、安全性の確認も行った。本培養法を用いて作製した自家培養真皮を使用する臨床試験「自家培養真皮を用いた糖尿病性潰瘍に対する創床形成療法の安全性と臨床効果の検討」を京都大学医の倫理委員会の許可を得て開始した。今後 2 年間にわたって自家培養真皮の安全性と有効性を評価する予定である

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：培養真皮、複合型培養皮膚、臨床応用

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、コラーゲンスポンジとシリコーン膜からなる二層性人工真皮（ペルナック®）を開発、臨床使用してきた。この二層性人工真皮を皮膚全層欠損創に貼付すると、これを足場として皮膚線維芽細胞、毛細血管が侵入し、数週間で真皮様組織が形成される。Ⅲ度熱傷、外傷性皮膚欠損、腫瘍や母斑切除後の皮膚欠損などすでに多くの症例に臨床応用され、形成外科領域での標準治療となっている。この二層性人工真皮を細胞培養の足

場として用い、真皮の主要構成細胞である線維芽細胞を播種した培養真皮、線維芽細胞と皮膚表皮細胞を播種培養した複合型培養皮膚（培養皮膚）の作製方法も確立し、報告してきた。

培養真皮、培養皮膚は海外において製品化されているものもあるが、本邦では製品化されているものはなく、各研究施設での症例報告がある程度であった。また、通常培養家庭で動物由来成分が用いられており、新規の医療材料として使用するには問題となってい

た。このため、本研究において、動物由来成分を含まない、臨床使用可能な培養方法の検討を行った。

## 2. 研究の目的

培養真皮と複合型培養皮膚のそれぞれについて述べる。

### (1) 培養真皮

通常、線維芽細胞の培養ではウシ血清 (FBS) を添加した培地を用いている。しかし、臨床応用する際にはウシ血清は使用できない。無血清線維芽細胞増殖培地 (HFDM-1, 機能性ペプチド研究所) が市販されているが、少量の血清を添加しないと数回以上の継代培養ができない。我々はこの培地に 2% 成人ヒト血清 (HS) を添加すると、真皮より線維芽細胞を培養できることを確認している。本研究では同程度の濃度の自己血清を用いて自家線維芽細胞を培養できることを確認する。また、自家培養真皮を作製し、この培養真皮がウシ血清を用いて作製した培養真皮と同等であるか評価する。また、動物 (白色家兎) に自家培養真皮を移植し、半年以上経過観察する。

### (2) 複合型培養皮膚

患者の皮膚、自己血清を用いて、動物血清、動物由来成分を用いずに自家培養真皮、自家複合型培養皮膚を作製する方法を確立させる。表皮細胞は無血清培地が市販されているが、動物由来成分を含まない完全合成培地を用いて培養する。また、コラーゲンコートした培養用シャーレ、フラスコを用いているが、動物由来でない接着因子を用いたものを使用する。自家血清添加線維芽細胞増殖培地、表皮細胞無血清培地を用いて培養皮膚の培養を行い、ウシ血清を用いたものと表皮形成、基底膜形成を比較する。

尚、基材 (足場材料) としては、医療材料であるベルナックを用いる。ベルナックのコラーゲンスポンジはブタ腱由来であるが、10年以上の臨床使用で未知の感染症の報告はなく、安全な材料であると考えている。

## 3. 研究の方法

培養真皮と複合型培養皮膚のそれぞれについて述べる。

### (1) 培養真皮

① 手術の際に余剰となった皮膚及び同意を得て採取した患者自己血清を用いて線維芽細胞の培養を行う (explant法)。培地は2%

自己血清添加HFDM-1培地と10%FBS添加DMEM培地、10%HS添加DMEM培地を用い、10継代まで行う。10継代までの各培地での細胞増殖速度を比較する。また、第3継代、第10継代細胞で、RT-PCR法を用いてtype I collagen, Type III collagenの発現を比較する。

② 2%自己血清添加HFDM-1培地、10%FBS添加MEM培地を用いてコラーゲンスポンジ (ペルナック\*) に自家線維芽細胞を $1.0 \times 10^5$  cell/cm<sup>2</sup>播種し、2週間培養する。コラーゲンスポンジ内での細胞増殖、培地中の細胞増殖因子 (VEGF, TGF $\beta$ ) を測定する。

③ 2%自己血清添加HFDM-1培地を用いて作製した培養真皮を免疫不全マウス (ヌードマウス) 背部皮下に埋入する。6ヵ月後に形態を観察、組織を採取する。細胞の残存の確認、腫瘍発生の有無を検討する。まず検体数3で行い、必要により検体数を増加させる。

### (2) 複合型培養皮膚

① 手術時に余剰となった皮膚より、ディスペーセ、コラーゲナーゼ処理を行い表皮角化細胞を採取する。これを市販無血清表皮細胞培地 (Epilife) を用いて培養する。

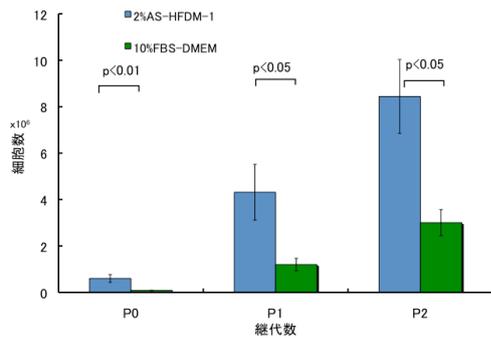
② 複合型培養皮膚の作製は、10%FBS添加DMEM培地を用いた気液界面培養法で行っていた。このFBS添加培地の代わりに2%HS添加HFDM-1培地を用いて培養皮膚が作製可能かどうか検討する。2週間培養を行い、組織切片で表皮形成を評価する。

## 4. 研究成果

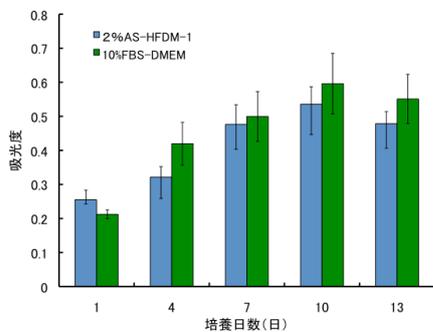
### (1) 培養真皮

① 2%自己血清添加 HFDM-1 培地と 10%FBS 添加 DMEM 培地で細胞増殖を比較した。下の図に示すように作線維芽細胞の増殖は、2%自己血清添加 HFDM-1 培地の方が、第二継代までは有意に早かった。

また、RT-PCR 法を用いて type I collagen, Type III collagen の発現もそれぞれの細胞で確認した。



② 2%自己血清添加HFDM-1培地、10%FBS添加DMEM培地を用いて培養した場合、コラーゲンスポンジ内での細胞増殖（下図）培地中の細胞増殖因子（VEGF, TGF $\beta$ ）に有意差はなかった。

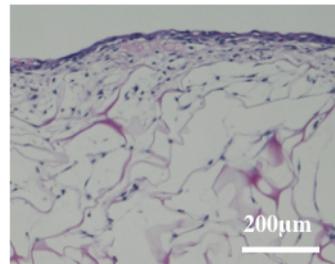


③ 2%自己血清添加HFDM-1培地を用いて作製した培養真皮を免疫不全マウス（ヌードマウス）背部皮下に埋入する。6ヵ月後に形態を観察、組織を採取した。腫瘍の発生は見られなかった。組織切片でも細胞異形は認められなかった。

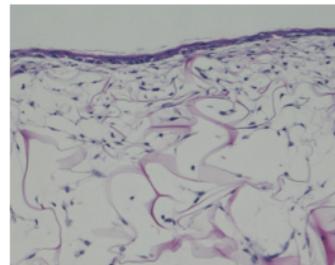
本培養法を用いて作製した自家培養真皮を使用する、臨床試験「自家培養真皮を用いた糖尿病性潰瘍に対する創床形成療法の安全性と臨床効果の検討」の概要書、試験計画書を作成し、京都大学医の倫理委員会の許可を得て、本年度より開始した。今後2年間にわたって自家培養真皮の安全性と有効性を評価する予定である。

## (2) 複合型培養皮膚

複合型培養皮膚の作製は、10%FBS添加DMEM培地を用いた気液界面培養法で行っていた。このFBS添加培地の代わりに2%HS添加HFDM-1培地を用いて培養皮膚が作製可能かどうか検討した。2週間培養を行い、表皮の重層化にFBS添加培地の代わりに2%HS添加HFDM-1培地に明らかな差は認められなかった。



10%FBS 添加 DMEM 培地で培養した複合型培養皮膚（ヘマトキシリンエオジン染色）



2%HS 添加 HFDM-1 培地で培養した複合型培養皮膚（ヘマトキシリンエオジン染色）

## 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5件）

- ① N. Morimoto, S. Takemoto, T. Kawazoe, S. Suzuki, K. Tomihata, T. Taira. In vivo culturing of a bilayered dermal substitute with adipo-stromal cells. J Surg Res. 146(2); 246-53, 2008、査読有
- ② 森本尚樹、武本啓、鈴木茂彦。人工真皮による創傷治療。形成外科. 51巻;263-266、査読有
- ③ 森本尚樹、鈴木茂彦。皮膚細胞を用いた治療。遺伝子医学別冊進みつづける細胞移植治療の実際. 下巻; 39-41、2008、査読無、

- ④ Y. Tsuji-Saso, T. Kawazoe, N. Morimoto, Y. Tabata, T. Taira, K. Tomihata, A Utani, S. Suzuki A. Incorporation of basic fibroblast growth factor into preconfluent cultured skin substitute to accelerate neovascularisation and skin reconstruction after transplantation. Scand J Plast Reconst Surg Hand Surg. 41 (5); 228-35, 2007、査読有
- ⑤ 森本尚樹, 鈴木茂彦. 良性肉芽形成に関する新知見. 形成外科, 50 (6); 645-651, 2007、査読有

[学会発表] (計7件)

- ① 森本尚樹, 武本啓, 神田則和, 鈴木茂彦. 自家培養真皮の正式認可を目指しての問題点の解決及び臨床試験プロトコル作成. 第17回日本形成外科学会基礎学術集会. 2008.10.2. 東京
- ② MORIMOTO N, Tkemoto S, Kanda N, Suzuki S. Preparation of fibroblasts-seeded collagen sponges using animal product-free media. The 14th Congress of the International Society for Burn Injuries. 2008. 9. 8. Montreal
- ③ 森本尚樹, 武本啓, 神田則和, 鈴木茂彦. 自家培養真皮作製方法の検討. 第34回日本熱傷学会総会. 2008. 6. 28. 名古屋
- ④ 森本尚樹, 武本啓, 川添剛, 富畑賢司, 平嗣良, 鈴木茂彦. 自家培養真皮臨床応用への取り組み. 第7回日本再生医療学会総会. 2008. 3. 14 名古屋
- ⑤ Morimoto N, Takemoto S, Kanda N, Tomihata K, Taira T, Kitagawa T, Suzuki S, Preparation of fibroblasts-seeded collagen sponges using animal product-freemedia. TERMIS-AP, 2007. 12. 4. Tokyo
- ⑥ 森本尚樹, 武本啓, 神田則和, 富畑賢司, 平嗣良, 北川達也, 鈴木茂彦. 低血清培地を用いた複合型培養皮膚作製. 第10回日本組織工学会. 2007. 11. 9 京都
- ⑦ 森本尚樹, 武本啓, 神田則和, 富畑賢司, 平嗣良, 北川達也, 鈴木茂彦. 自己血清を用いた線維芽細胞培養法の検討. 第16回日本形成外科学会基礎学術集会. 2007. 10. 11. 神戸

[図書] (計1件)

森本尚樹, 鈴木茂彦, 他. 口と歯の事典. 朝倉書店. 2008. 436項 (404-408)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森本尚樹 (MORIMOTO NAOKI)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：40378641

### (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  
野瀬謙介 (NOSE KENSUKE)  
京都大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：80379057

### (3) 連携研究者