

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20684

研究課題名(和文) 三次元培養皮膚の光照射による分化の制御とそれに伴う分光学的特性変化に関する研究

研究課題名(英文) Control of the differentiation of three-dimensional cultured skins by light illumination and investigation of the changes of their spectral characteristics during cultivation

研究代表者

角井 泰之(Tsunoi, Yasuyuki)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・防衛医学研究センター 生体情報・治療システム研究部門・助教)

研究者番号：30806451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：血管構造を持つ三次元培養皮膚は、移植後に速やかな血流の再開が得られ、新しい移植皮膚として有望である。本研究では、光学技術を応用し、同培養皮膚の実用化に向けた課題を解決するための検討を行った。一つ目に、光生体調節作用を用いることにより、表皮の分化を制御し、バリア機能の獲得に必要な培養時間を短縮できる可能性が示された。二つ目に、拡散反射分光法を用いることにより、表皮の分化の状態を非破壊的に評価できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、本邦の移植皮膚の貯蔵量は、慢性的なドナー不足により極めて限定的である。また既存の人工皮膚や培養皮膚には感染を生じやすい欠点がある。我々が提案する血管構造を持つ三次元培養皮膚は、感染に対する高い耐性が期待される皮膚モデルである。今後、本研究結果を製造に活かすことにより、迅速かつ安定した皮膚の供給が可能になり、上記ドナー不足の解消に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Three-dimensional (3D) cultured skin containing vascular networks has a high tolerance to infection after grafting due to early adhesion. However, it takes long time to induce differentiation of epidermal keratinocytes for forming a stratum corneum, which is responsible for skin barrier functions. In this study, we demonstrated that photobiomodulation can promote differentiation of the epidermal keratinocytes and hence improve barrier functions of the 3D cultured skins. We also demonstrated that diffuse reflectance spectroscopy is useful to evaluate the state of epidermal differentiation of the 3D skins nondestructively in situ.

研究分野：医用光学

キーワード：三次元培養皮膚 皮膚移植 再生医療 表皮 細胞分化 光生体調節作用 photobiomodulation 拡散反射分光

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々の身体を覆う皮膚は、体内の水分量や体温の調整、様々な外部刺激や病原体からの保護（バリア）など、生命の維持に不可欠な役割を担っている。そのため、重症外傷などにより皮膚が広範囲かつ不可逆的な損傷を受けた場合には、移植による治療（植皮）が必要である。しかし現在、本邦の移植皮膚（凍結保存された皮膚）の貯蔵量は、慢性的なドナー不足により極めて限定的である。また、人工皮膚や培養皮膚も移植に用いられているが、そのほとんどが血管構造を持たないため、移植後の血流（栄養や酸素などの運搬）の再開が遅く、感染に弱いという欠点がある。そこで我々は、大阪大学の明石・松崎らが開発した血管構造を持つ三次元培養皮膚<sup>1)</sup>に着目し、共同研究を開始した。同培養皮膚をマウスの皮膚全層欠損創に移植する実験を行った結果、期待したとおり、移植後早期に血流の再開が得られることが確認された<sup>2)</sup>。一方で、臨床応用に向けた課題も明らかになった。第一に、皮膚のバリア機能を担う表皮の角質層が形成されるまでに約1週間の分化誘導期間が必要であり、三次元培養皮膚を迅速に作製することが困難なことである。第二に、表皮の分化の状態を培養中に *in situ*（その場）で評価する手段が存在しないことである。本研究では光学技術を基盤として、これら課題を解決するための方法について検討を行った。

### 2. 研究の目的

#### (1) 光生体調節作用による分化の制御

三次元培養皮膚のバリア機能は、表皮の分化により得られるため、その速度を制御することで培養期間を短縮できると考え、光生体調節作用（**photobiomodulation, PBM**）を応用した。PBMは、生体に低強度の光を照射し細胞内の光受容体に吸収させることにより、様々な活性化反応を誘起する方法である。重要な例として、ミトコンドリアの電子伝達系の末端酵素であるシトクロム c オキシダーゼは、可視から近赤外領域に複数の吸収ピーク波長を持ち、これら波長の光により電子伝達反応が促進され、アデノシン三リン酸（ATP）や活性酸素種（ROS）などの産生量が増大することが知られている<sup>3)</sup>。ROSは細胞のシグナル伝達を仲介し、表皮の分化に影響を与えることから<sup>4)</sup>、本研究ではPBMにより三次元培養皮膚の表皮の分化を制御できないか検討を行った。

#### (2) 拡散反射分光法による分化の *in situ* 評価

これまで、三次元培養皮膚の表皮の分化は組織学検査（破壊検査）により評価を行ってきたが、細胞の分化の速度は培養の環境や操作などのわずかな違いによってばらつきが生じやすいため、*in situ*（その場）で非破壊的に評価できる技術の確立が求められている。本研究では、組織を構成する細胞や分子の状態を波長依存的な吸収・散乱特性に基づいて解析可能な拡散反射分光法を用いて、表皮の分化の状態を評価できないか検討を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 光生体調節作用による分化の制御

正常ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF）の表面を接着性タンパク質（フィブロネクチンとゼラチン）により被覆し、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）とともにセルカルチャーインサートに播種し、真皮層を構築した。翌日、その上に正常ヒト表皮角化細胞（NHEK）を播種し、表皮層を構築した。さらにその翌日から表皮を気液界面に晒すことで分化誘導を開始し、5日間培養して三次元皮膚を作製した。

分化誘導開始直後より、インサートの底面側（培養皮膚の真皮側）から上記シトクロム c オキシダーゼの吸収波長に合わせた中心波長 823 nm の LED 光（25 mW/cm<sup>2</sup>）を 400 秒（10 J/cm<sup>2</sup>）、2000 秒（50 J/cm<sup>2</sup>）または 4000 秒（100 J/cm<sup>2</sup>）照射した。この PBM を 24 時間毎に適用した。培養終了後、表皮の分化マーカータンパク質であるフィラグリンの発現を免疫組織化学染色法と ELISA（Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay）法を用いて評価した。また、表皮の分化により得られるバリア機能について、細胞間の結合が強固になることにより生じる経上皮電気抵抗（TEER）を計測して評価した。これらの結果について、PBM 非適用の培養皮膚（コントロール群）と比較した。

#### (2) 拡散反射分光法による分化の *in situ* 評価

三次元培養皮膚の表面（表皮側）に光ファイバー対を接触させ、送光用のファイバーにハロゲンランプ光を導光し、培養皮膚に照射した。そして組織を伝搬した光（拡散反射光）を受光用のファイバーで検出し、その強度を近赤外分光器で計測した。この計測を分化誘導開始直後（Day0）から 7 日後（Day7）まで経時的に行い、拡散反射率とその時間変化の波長依存性について評価を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 光生体調節作用による分化の制御

フィラグリンの免疫組織化学染色画像を図 1 に示す。フィラグリンの発現を示す蛍光の面積を比較した結果、すべての PBM 適用群で非適用群 (コントロール群) よりも増大しており、照射フルエンスが高いほど発現が増える傾向が確認された。ELISA 法により発現量を定量評価した結果、100 J/cm<sup>2</sup> 照射群に含まれるフィラグリンはコントロール群の約 1.5 倍多く、これら 2 群の間には統計学的な有意差が認められた。フィラグリンは角質層でケラチン繊維と結合・凝集し、角質層を強固にすることが知られているため、その発現量の増大はバリア機能の向上に寄与することが期待される。次に、培養皮膚のバリア機能を示す TEER を計測した結果を図 2 に示す。PBM 適用群はコントロール群に対し有意に高い値を示した。以上の結果から、三次元皮膚の培養中に PBM を適用することにより、表皮の分化を促進でき、バリア機能の獲得に必要な時間を短縮できる可能性が示された。PBM は、無菌環境での培養が必要な三次元皮膚に非接触で適用できる利点がある上、安価で大面積照射可能な LED パネルを使用できることから、高い実用性が期待される。今後、本成果をもとに、大面積かつ多数の三次元培養皮膚に PBM を適用するための LED が内蔵された培養装置の開発を行う予定である。

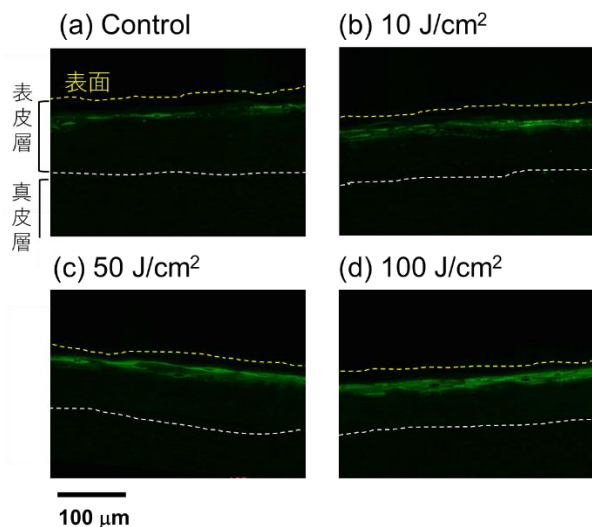


図 1 フィラグリンの免疫組織化学染色画像

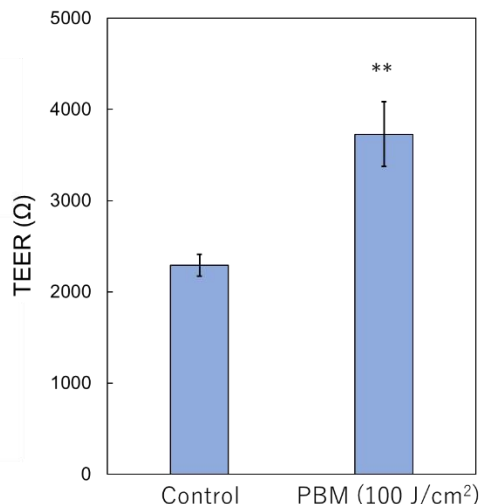


図 2 バリア機能を示す経上皮電気抵抗値

##### (2) 拡散反射分光法による分化の in situ 評価

代表的な 3 波長の拡散反射率の時間変化を図 3 に示す。1100 nm は組織に主要な吸収体がなく散乱が支配的な波長、1204 nm は脂質の吸収が大きな波長、1440 nm は水の吸収が大きな波長である。いずれの時点においても、拡散反射率は 1100 nm、1204 nm、1440 nm の順に高く、各波長における脂質や水による吸収の大きさを反映していると考えられる。時間変化に着目すると、Day0 から Day1 にかけてはいずれの波長も一過的に減少したが、その後は波長依存的な上昇が見られた。まず、1100 nm では Day1 から Day5 に顕著な上昇が認められたが、その後さらに急激に上昇した。各時点で一部の培養皮膚を組織学検査 (破壊検査) した結果 (図 4) によれば、表皮角化細胞は Day1 から Day5 にかけて浅部へ遊走しながら顆粒化し、Day5 以降は脱核して角質層を形成していた。したがって、上記の拡散反射率の時間変化は、同細胞の形態変化による散乱強度の上昇に起因すると考えられる。また、1204 nm の拡散反射率も 1100 nm と同じように変化したが、時間とともに 1100 nm との差は大きくなり続けた。これは、角質層に含まれる細胞間脂質による吸収の影響であると考えられる。一方、1440 nm の拡散反射率は、水による吸収の影響で常に低い値を示したが、Day5 以降に僅かな上昇が認められた。これは、疎水的な角質層の形成により水の吸収が減少し、散乱成分が増大したためと考察される。以上より、三次元培養皮膚の拡散反射光を解析することにより、表皮の分化の状態を非破壊評価できる可能性が示された。

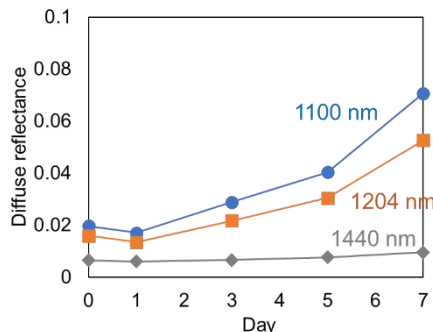


図 3 拡散反射率の時間変化

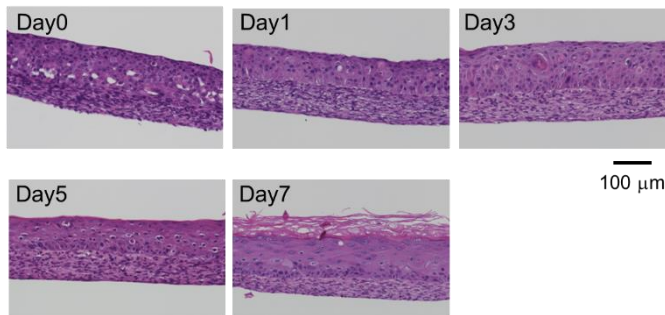


図 4 三次元培養皮膚の形態変化

<引用文献>

- 1) M. Matsusaki et al., J. Biomed. Mater. Res. A 103, 3386-3396 (2015).
- 2) H. Miyazaki et al., Sci. Rep. 9, 7797 (2019).
- 3) T. I. Karu et al., Lasers Surg. Med. 36, 307-314 (2005).
- 4) R. B. Hamanaka et al., Sci. Signal. 6, ra8 (2013).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyazaki Hiromi, Tsunoi Yasuyuki, Akagi Takami, Sato Shunichi, Akashi Mitsuru, Saitoh Daizoh	4. 巻 9
2. 論文標題 A novel strategy to engineer pre-vascularized 3-dimensional skin substitutes to achieve efficient, functional engraftment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7797/1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-44113-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tsunoi Yasuyuki, Miyazaki Hiromi, Kawauchi Satoko, Akagi Takami, Akashi Mitsuru, Saitoh Daizoh, Sato Shunichi	4. 巻
2. 論文標題 Viability Improvement of Three Dimensional Human Skin Substitutes by Photobiomodulation during Cultivation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Photochemistry and Photobiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/php.13642	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 角井泰之	4. 巻 485
2. 論文標題 Photobiomodulation（光生体調節作用）を用いた移植用3次元培養皮膚の品質制御	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 OPTORONICS	6. 最初と最後の頁 74-77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 宮崎裕美, 角井泰之, 赤木隆美, 佐藤俊一, 明石満, 齋藤大蔵
2. 発表標題 血管網を持つ複合型培養皮膚による皮膚再生
3. 学会等名 第46回日本熱傷学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古川雅俊, 角井泰之, 大倉津矢子, 宮崎裕美, 赤木隆美, 齋藤大蔵, 明石満, 佐藤俊一, 西館泉
2. 発表標題 光生体調節作用を用いたヒト3次元培養全層皮膚の表皮分化促進の検討
3. 学会等名 日本生体医工学会関東支部 若手研究者発表会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎裕美, 角井泰之, 赤木隆美, 明石満, 佐藤俊一, 齋藤大蔵
2. 発表標題 高機能性ヒト移植用皮膚の開発研究
3. 学会等名 第28回日本熱傷学会関東地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miyazaki Hiromi, Tsunoi Yasuyuki, Akagi Takami, Sato Shunichi, Akashi Mitsuru, Saitoh Daizoh
2. 発表標題 A novel strategy to engineer pre-vascularized 3-dimensional skin substitutes to achieve efficient, functional engraftment
3. 学会等名 The 8th Meeting of the International Federation for Artificial Organs (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuyuki Tsunoi, Hiromi Miyazaki, Takami Akagi, Daizoh Saitoh, Mitsuru Akashi, Shunichi Sato
2. 発表標題 Viability improvement of three-dimensional cultured skin substitutes by photobiomodulation
3. 学会等名 17th Medical Biodefense conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiromi Miyazaki, Yasuyuki Tsunoi, Takami Akagi, Shunichi Sato, Mitsuru Akashi, Daizoh Saitoh
2. 発表標題 Evaluation of pre-vascularized 3D skin substitutes in full-thickness skin defects
3. 学会等名 The 13th Asia Pacific Burn Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角井泰之, 古川雅俊, 宮崎裕美, 赤木隆美, 齋藤大蔵, 西館泉, 明石満, 佐藤俊一
2. 発表標題 Photobiomodulation (光生体調節作用)を用いた3次元培養皮膚の品質制御
3. 学会等名 Optics & Photonics Japan 2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 細胞培養装置	発明者 角井泰之、佐藤俊一、宮崎裕美、齋藤大蔵、赤木隆美、明	権利者 防衛装備庁長官
産業財産権の種類、番号 特許、第6956340号	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------