

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592107

研究課題名(和文) ヒト免疫細胞を組み込んだハイブリッド型人工皮膚モデルを用いた
創傷治癒の研究研究課題名(英文) Researches for wound healing using a hybrid type artificial skin
model retrofitted with human immune cells

研究代表者

加王 文祥 (KAO BUNSHO)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：10327893

研究成果の概要(和文)：

【目的】免疫細胞を導入したヒト皮膚モデルを使用することにより、実際の皮膚における創傷治癒過程をさらに詳細にシミュレーションする。

【方法】Bellらの手法に準じて人工皮膚モデル検体を作製して行った。単球は採取した血液からLIMPHOPLEP™tube(コスモ・バイオ社)を用いて採取し、検体作製過程で人工皮膚モデル検体に導入した。人工皮膚モデル内での単球のマクロファージへの分化を抗ヒトマクロファージ抗原モノクロナール抗体AM-3Kで免疫組織化学染色を行い確認した。実験群(単球を加えた検体)、対照群1(単球を含まない検体)に対してCO₂レーザーを照射し人工的な創傷モデルを作製した。また、対照群2(単球を加えたがレーザー照射を行わなかった検体)とも比較した。各群をH-E染色、免疫組織化学染色(MCP-1, HAM56)し組織学的検討を加え定性を行った。HAM56により標識されたマクロファージ数を計測し χ^2 独立性検定を行い定量した。

【結果】H-E染色では照射1日目より角化層形成を認め、5日目にほぼ上皮化が完了した。しかし対照群2では5日目でも上皮化は乏しかった。次にHAM56染色では受傷後、活性化マクロファージの数が増え、創傷部のマクロファージだけでなく全体的に活性化していた。MCP-1染色では、照射1日目は角化細胞由来と思われるMCP-1を表皮層内に認め、日数経過でマクロファージ由来と思われるMCP-1を表皮・真皮境界部に認めた。対照群2では、表皮内に認め、境界部には認めなかった。対照群1では全経過においてMCP-1は認められなかった。

【考察】単球を導入した人工皮膚モデルでは、従来の人工皮膚モデルに比べ上皮化が早い可能性が示された。マクロファージは損傷を受けた付近だけでなく、その周辺全体も活性化し創傷治癒に貢献していることが示され、創傷が存在しなければMCP-1を放出しないことが分かった。マクロファージは、創傷治癒機転において活性化、再活性化を繰り返すことが推察された。また角化細胞およびマクロファージが各々放出したと考えられるMCP-1が創傷治癒に関わっていることが確認されたが、その放出の仕方、時期も異なることから各々創傷治癒において異なる機序を有していることが示唆された。本研究において開発した新しい人工皮膚モデルは、従来の人工皮膚モデルと比較し特に炎症性変化の再現可能性を示しており、より生理的な環境を再現させたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：

This study investigated the behavior of macrophages in the wound healing process in human skin using a new artificial skin model with macrophages. The experimental group (the artificial skin model with human monocyte) and control group 1 (without monocyte) were irradiated with a CO₂ laser, and these were compared with control group 2 (no laser irradiation with monocyte). Tissue samples were collected for 7 days after laser irradiation and the degree of tissue damage and the process of regeneration were evaluated using hematoxylin-eosin and immunohistochemical staining.

The monocytes changed to macrophages in the samples. The number of macrophages increased and the size was larger after laser irradiation in the experimental group from the third day and reached a peak on the fifth day. The macrophages were activated both in the irradiated area and in the whole sample. MCP-1, a chemokine

produced by inflammatory reactions, was identified in the epidermal layer from the keratinocytes and the dermal epidermal border region. These results suggest that MCP-1 from macrophages induced an acceleration of the re-epithelization in the epidermis, while also inducing wound healing.

In conclusion, this new artificial skin model with macrophages demonstrated increased tissue interactions, especially in inflammatory reactions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：再生医療

科研費の分科・細目：医歯薬学・形成外科学

キーワード：移植・再生医療、再生医学、ヒト皮膚モデル、培養皮膚

1. 研究開始当初の背景

今までのヒト皮膚の創傷治癒研究ではラットや豚の皮膚がよく使われてきたが、近年の動物愛護意識の高まりにより動物実験には各種の制限が加えられるようになった。また実際の患者の皮膚を使う場合には通常顔面や腹部の除皺術の際に得られる余剰切除皮膚を用いるが、同時に多くの均一な皮膚を必要とする研究に用いることはできない。さらにヒト由来試料ではその提供者、家族等の関係者の人権及び利益の保護の取り扱いについて十分に配慮する必要がある、分量の試料が得られなくなりつつあるのが実情である。これらの状況により最近では人工皮膚を用いた毒性試験や皮膚創傷治癒研究が一般化してきた。

2. 研究の目的

免疫細胞を導入したヒト皮膚モデルを使用することにより、実際の皮膚における創傷治癒過程をさらに詳細にシミュレーションする。

(1)免疫細胞を導入したヒト皮膚モデルでの創傷治癒過程の評価方法を確立する。

免疫細胞を含むヒト皮膚モデルにレーザーにより創傷を作製して実際の皮膚における創傷治癒過程をシミュレーションしたときの評価方法を確立する。

各種創傷治癒因子を付加して創傷治癒反応の変化を調べる。

(1)の過程において培養液中に各種創傷治癒

因子を付加して創傷治癒反応の変化を調べる。

3. 研究の方法

(1)免疫細胞を含むヒト皮膚モデルを作製する。

①新生児由来のヒト線維芽細胞、マクロファージとブタ皮膚由来のタイプIコラーゲンを混合して24穴プレートに入れる。インキュベーター内で37℃、CO₂濃度5%にて24時間培養してコラーゲンの固化を待ち真皮層を作製する。

②①で作製した人工真皮の上に新生児由来のヒト角化細胞を培養液中に懸濁させプレート内の固化した真皮層上に播種して表皮層を作製しヒト皮膚モデルとする。

③このヒト皮膚モデルを培養液と空気の境界に引き上げ表面を空気にさらしながら(以下気相液相境界培養法)、同様の環境にてさらに4-5日間培養を続け、表皮層の重層化と角化を待つ以下の実験に供用する。

(2)ヒト皮膚モデルで創傷治癒過程を調べる。

(1)で作製したヒト皮膚モデルにレーザーを照射して創傷を作製したのち、通常気相液相境界培養法の培養液内に単核細胞を懸濁させ真皮層からの浸潤により持続的にヒト単核細胞を付加して培養を継続する。決められた時点で標本をハーベストして以下の評価を行う。

①光学顕微鏡による組織構造の精査
ホルマリン固定しパラフィンに包埋した標本の組織構造の精査ならびに細胞の個数、形態の観察を行う。

②免疫組織化学染色による精査
標本に対して各種モノクローナル抗体による免疫組織化学染色を行い作製各段階および培養中の各種コラーゲンの産生分布や基底膜の形成、維持、表皮角化細胞の遊走、増殖、分化を調べる。

③細胞数および産生コラーゲンの定量
標本内の細胞数をMTTアッセイ法にて、各種コラーゲン量をELISAキットにて定量し経時的な変化を調べる。

④遺伝子発現の精査
創傷時に発現が認められる各種増殖因子(VEGF, FGF-2, HGF, PDGF)の標本からの分泌を定量PCR法、RT-PCR法を用いて調べる。

4. 研究成果

(1)HE染色

レーザー照射前では豊富な細胞外マトリックスと規則正しい配列の角化細胞と角質が認められた。レーザー照射直後では、真皮上層までの損傷が確認され、照射部の表皮脱落、表皮壊死、炭化、凝固変性、空胞変性像が認められた。レーザー照射後1日目では照射部の脱落、壊死表皮が減少し、一部角化層形成が認められた。3日目では照射部周囲の角化細胞の分裂が確認された。照射部に3~4層ほどの角化層および基底層が構築されていた。5日目では一部薄い角化層を認めるが、ほぼ上皮化が完了した。7日目では5日目よりも表皮層が厚くなり、照射前とほぼ同じ状態となった。

(2)AM-3K染色

全体的に茶染した細胞を認め、単球のマクロファージへの分化が確認された。

(3)MCP-1染色

レーザー照射前では特に染色部分は認められなかった。レーザー照射直後では表皮外層が薄く染色された。レーザー照射後1日目では、損傷部創縁の表皮層内に一部染色されているのが認められた。3日目では、1日目より染色度合いが強くなり、損傷部創縁の表皮外層、表皮内、表皮真皮境界部に認められたが、真皮内には認められなかった。5日目では創傷治癒された表皮外層が薄く染色された。また、表皮真皮境界部における染色範囲の拡大傾向を認めた。7日目では表皮外層は染色されず、表皮真皮境界部から表皮内にかけて染色されていた。対照群1では照射前・1・3・5・7日目においてMCP-1は認められなかった。対照群2では5日目のみ表皮内に認められた。

(4)HAM56

レーザー照射前では真皮内に散在する茶染したマクロファージが確認された。レーザー照射直後ではマクロファージが損傷部位に認めるようになった。茶色に濃染する核および淡茶色に染まった周囲間質をともなったマクロファージが疎らに認められるようになった。レーザー照射後1日目ではマクロファージは表皮内にも認められた。また、マクロファージの形態が楕円形に変化しサイズもやや大きくなり、細胞質は均一に染色されていた。さらに一部のマクロファージは周辺に淡茶色の染まりを呈していた。3日目では表皮真皮境界部にマクロファージが多く認められた。染色の度合いには変化は認めなかった。5日目では、まばらに色素脱失を起し染色度合いが低下したマクロファージが組織全体を占めていた。7日目では再び細胞質全体が均一に染色されたマクロファージが認められるようになった。一部、脱落表皮にマクロファージを認めた。細長い形状のマクロファージも認められた。対照群1では、茶色に染色されたマクロファージが散在していたが、実験群に比べて数も少なく、サイズも小さかった。また、日数経過によりマクロファージの形態変化は認めなかった。

(5)HAM56で標識されたマクロファージ数の計測

実験群で、マクロファージ数は照射後1日目、3日目と増加し、5日目に最大数に達し7日目に減少傾向を認めていた。

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7件)

① Fractional CO₂ レーザー照射後人工皮膚モデルの組織再生に関する基礎研究、寺瀬佳苗、加王文祥、塚原真吾、藤田幸代、保阪善昭
日本形成外科学会会誌、査読有、30(8)、391-402, (2010)

② 創傷治癒におけるヒトプラセンタの影響-人工皮膚を用いて-
藤田幸代、加王文祥、網倉良安、横山真理子、保阪善昭
日本形成外科学会会誌、査読有、30(6)、277-288, (2010)

③ 人工皮膚モデルを用いたマクロファージの創傷治癒過程における動態可視化の試み、塚原真吾、加王文祥、寺瀬佳苗、藤田幸代、保阪善昭
昭和医学会雑誌、査読有、70(2)、164-173, (2010)

- ④ Construction of Synthetic Dermis and Skin Based on a Self-Assembled Peptide Hydrogel Scaffold

Bunsho Kao, Koichi Kadomatsu, Yoshiaki Hosaka

Tissue Engineering Part A. 査読有, 15(9), 2385-2396, (2009)

- ⑤ リセルを用いた癬痕の治療、加王文祥、門松香一

PEPARS、査読有、35, 15-24, (2009)

- ⑥ ペプチドハイドロゲルを用いた 3 次元モデル人工真皮の作成

冨塚陽介、加王文祥、網倉良安、本田衣麗、保阪善昭

昭和医学会誌、査読有、68(1), 36-43, (2008)

- ⑦ 自家表皮細胞浮遊液による表皮細胞移植を用いた刺青除去・熱傷・白斑治療とその長期経過

加王文祥、門松香一、清水祐紀、保阪善昭
日本美容外科学会会報、査読有、30(4), 187-197, (2008)

[学会発表] (計 16 件)

- ① 加王文祥、Functionalized scaffold (機能的担体)による細胞の遊走、増殖、接着、分化への影響、第 19 回日本形成外科学会基礎学術集会、2010 年 9 月 17 日、横浜市

- ② 加王文祥、アンコア照射後の経時的創傷治癒過程の基礎研究と癬痕に対する臨床応用、第 109 回日本皮膚科学会総会、2010 年 4 月 16 日、大阪市

- ③ 加王文祥、アンコア照射後の経時的創傷治癒過程の基礎研究と癬痕に対する臨床応用、第 53 回日本形成外科学会学術集会、2010 年 4 月 9 日、金沢市

- ④ 加王文祥、Functionalized scaffold (機能的担体)による細胞の遊走、増殖、接着、分化への影響、第 18 回日本形成外科学会基礎学術集会、2009 年 10 月 2 日、東京都千代田区

- ⑤ 加王文祥、ヒトプラセンタ抽出液による組織再生修復に関する検討、第 18 回日本形成外科学会基礎学術集会、2009 年 10 月 1 日、東京都千代田区

- ⑥ 塚原真吾、人工皮膚モデルを用いたマクロファージの創傷治癒過程における動態可視化の試み、第 18 回日本形成外科学会基礎学術集会、2009 年 10 月 1 日、東京都千代

田区

- ⑦ 加王文祥、創傷治癒研究におけるヒト皮膚細胞を用いた人工皮膚モデルの有用性と問題点の検討、第 18 回日本形成外科学会基礎学術集会、2009 年 10 月 1 日、東京都千代田区

- ⑧ 加王文祥、機能を持つペプチド配列を付加したペプチドハイドロゲルを担体として用いた培養真皮、培養皮膚の作製、第 17 回日本形成外科学会基礎学術集会、2008 年 10 月 2 日、東京都新宿区

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：人工皮膚の製造方法

発明者：加王文祥、保阪善昭、飯嶋歩

権利者：昭和大学

種類：特許

番号：特願 2009-42560

出願年月日：

国内外の別：国内

名称：人工皮膚の製造方法であって、

(A) 真皮線維芽細胞を、繊維構造を有するペプチドハイドロゲルに混合したものを固化することにより真皮層を形成する工程と、

(B) 上記工程 (A) で得られた真皮層の上に表皮角化細胞を播種し培養することにより表皮層を形成する工程を含む、方法。

発明者：加王文祥、保阪善昭、飯嶋歩

権利者：昭和大学

種類：特許

番号：特願 2008-49337

出願年月日：

国内外の別：国内、国外

○取得状況 (計◇件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

加王 文祥 (KAO BUNSHO)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：10327893

(2)研究分担者

保阪 善昭 (HOSAKA YOSHIAKI)

昭和大学・医学部・名誉教授

研究者番号：20053978

(3)連携研究者

()

研究者番号：