

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03847

研究課題名(和文) 潰瘍面からの新規上皮化による皮膚潰瘍治療法の開発

研究課題名(英文) Development of treatment for cutaneous ulcers via de novo epithelialization

研究代表者

栗田 昌和 (Kurita, Masakazu)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20424111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、広範囲熱傷、難治性潰瘍を含むあらゆる種類の皮膚潰瘍に対して、面積によらず、潰瘍面全体に同時多発的な上皮化を与える革新的な治療法となりえる「皮膚潰瘍に存在する間葉系細胞から上皮細胞への細胞系譜の転換を介して、潰瘍面から直接的に上皮化、創傷の閉鎖をはかる皮膚潰瘍治療法」の効率、安全性向上、産業化への糸口を図ることを目的に新規アデノ随伴ウイルスベクターの開発、意図しない非特異的遺伝子発現を減らすためのキャリアの開発、皮膚付属器の同時再生を可能とするための技術開発を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、皮膚潰瘍面に存在する間葉系細胞から皮膚付属器を有する皮膚の新生を惹起する方法が開発されたほか、皮膚潰瘍面の間葉系細胞、表皮組織に対して最適化された新規AAVカプシド、非特異的な遺伝子導入を削減しうる新しいAAVキャリアが開発された。これらの成果は、潰瘍面積によらず上皮化を与える新しい皮膚潰瘍の治療法開発、組織胎児化による複合的組織再生法の開発など、次世代の局所的組織再生法開発の礎となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The project has achieved the development of novel adeno-associated virus vectors, AAV carriers to reduce unintended nonspecific gene expression, and technology to enable simultaneous regeneration of skin appendages, with the aim of improving the efficiency and safety, and providing a clue to its industrialization of innovative therapies which enables de novo epithelialization from cutaneous ulcer via direct reprogramming of wound mesenchymal cells.

研究分野：形成外科学

キーワード：皮膚潰瘍 毛髪再生 皮膚付属器再生 遺伝子治療 アデノ随伴ウイルスベクター DDS 治療開発 再生医療

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

申請者は、潰瘍局所の間葉系細胞からケラチノサイトへ直接転換を惹起することができれば革新的な皮膚潰瘍治療法となりうると考え、「マウス背部の潰瘍面にアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を用いてケラチノサイトに特異的な転写因子を遺伝子導入することによって、潰瘍面に存在する間葉系細胞から上皮細胞への細胞系譜の直接転換を図り、潰瘍面から新規に正常表皮同様のバリア機能を有する重層扁平上皮組織を誘導する方法」を開発してきた(文献、特許番号:第6654323号、米国特許第11,041,146)。本技術は、致死的な広範囲熱傷症例、難治性潰瘍を含むあらゆる種類の皮膚潰瘍に対して、面積によらず、潰瘍面全体に同時多発的な上皮化与える革新的な治療法となりえる可能性をもつ一方で、遺伝子導入および、生体内での細胞系譜の直接転換の誘導に伴うリスクなど産業化の観点から、まだ最適化の余地があった。

2. 研究の目的

本研究では、効率、安全性の観点から、本技術に特化した遺伝子導入方法を開発すること、より産業的に臨床応用に値する技術を開発すること、を目的とした。

3. 研究の方法

1) ポリシストロニックベクター配列の最適化

同定されていたリプログラミング因子のうち、重要性が高いと考えられる3因子を選択肢、これをポリシストロニックベクターとした6パターンについて、間葉系細胞から上皮系細胞への転換効率を検討した。

2) 皮膚付属器誘導能をもった細胞のリプログラミング因子同定のための実験モデルの確立

従来行われる皮膚再構成実験を再現するためのシリコンチャンパーを作成することを目的として、3Dプリンターを用いて作成する鋳型の最適化を進めた。

3) 皮膚付属器のついた皮膚を誘導するための上皮系細胞リプログラミング因子の同定

最適化された皮膚再構成実験系において、新生児マウス皮膚由来細胞については、上皮系細胞と間葉系細胞をそれぞれ独立して培養の上、共移植することで皮膚付属器が再構成可能であることに着目し、成体マウス皮下脂肪組織由来間葉系細胞に遺伝子導入することによって誘導可能で、新生児マウス皮膚由来間葉系細胞と共移植することによって皮膚付属器の再構成が可能で、上皮系細胞へのリプログラミング因子の同定を進めた。

4) 皮膚付属器のついた皮膚を誘導するための間葉系細胞リプログラミング因子の同定

皮膚付属器誘導能をもつことが明らかとなったDGTM*L*-iSEPsと共移植して付属器の再構成を与える間葉系細胞を誘導するリプログラミング因子を同定するために、20の候補因子をピックアップし、それぞれの因子を遺伝子導入した際の毛乳頭マーカーの検討を進めた。当該所見を参考に候補因子を組み合わせて共移植実験による検討を進めた。

5) 誘導細胞の追跡による付属器への contribution の確認

誘導された3細胞、および移植床マウスをそれぞれGFPによってラベルして共移植実験することによって、それぞれの細胞の付属器に対する contribution を調べた。

6) 皮膚潰瘍面の間葉系細胞に対して最適化された指向性を有する AAV の開発

AAVDJをバックボーンとしたヘパリン結合部位のランダム化により作成したAAVDJペプチドディスプレイライブラリを用いてマウス背部の皮膚潰瘍面をモデルとして*In vivo* biopanningを進め、定方向進化法を用いて新規AAVを開発した。

7) 生体内リプログラミングにおける皮膚付属器再生実験

隔離皮膚潰瘍面を実験モデルとして、AAVを用いた上皮系因子、間葉系因子の生体内遺伝子導入による皮膚付属器のついた皮膚の新規発生可能性について検討した。

8) 表皮細胞に対して最適化された AAV の開発

既存のバックボーン、既存のペプチドバリエーション配列をハイブリッドすることによって表皮細胞、表皮組織に対して高い特異性をもった新規AAVの開発を進めた。

9) 皮膚潰瘍面に対して高い局所特異性をもった遺伝子導入を可能とするキャリアの開発

AAVを用いた臨床治療において、治療対象として想定していない部位における意図しない作

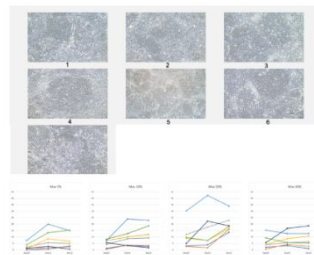
用によって治験が中断されるケースなどが続いたことから、局所特異性の向上を目的とした DDS 開発を進めた。Tetra-PEG によって構成される PEG ハイドロゲル、PEG スポンジ、PEG スライムを用意し、動物モデルにおける検討を行った。

4. 研究成果

1) ポリシストロニックベクターの最適化

2A ペプチドを用いたポリシストロニックベクターを用いて、6 パターンについて検討を行ったところ、特定の配列が優れた転換効率を示していた（右図、福寿、未発表）。

本研究以前の期間に行った別因子セットについての結果と一致するプブもあったことから、当該知見を生かした配列を用いて mRNA によるリプログラミング実現を進める方針とした。

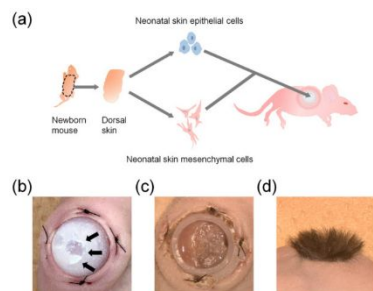


2) 3D プリンターによるシリコンチャンバー作成用鋳型と、皮膚再構成実験系の最適化

既存技術を発展し、より産業的に臨床応用に値する技術とするために、皮膚付属器誘導能をもった細胞のリプログラミング因子同定を目して、従来行われる胎児、新生児皮膚由来細胞による皮膚付属器再構成実験の再現に取り組んだ。

入手の困難なシリコンチャンバーを簡便かつ安価な方法で自作するための鋳型をデザインし 3D プリンターによって印刷し、作成方法を最適化した。更に、移植前の細胞培養条件について最適化を進め、一連の方法についてこれを報告した。

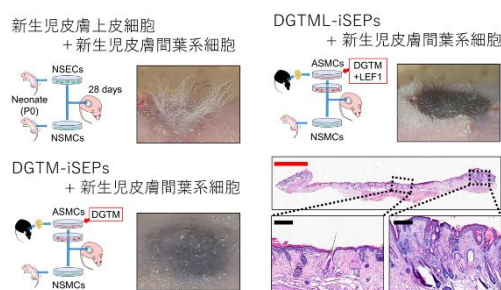
（右図、文献 より引用）



3) 皮膚付属器のついた皮膚を誘導するための上皮性細胞リプログラミング因子の同定

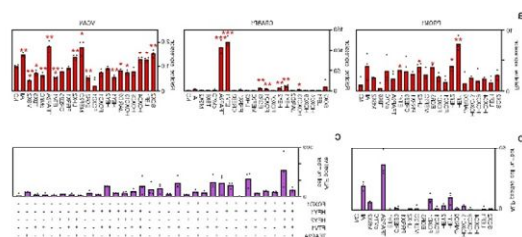
新生児マウス皮膚由来細胞については、上皮系細胞と間葉系細胞をそれぞれ独立して培養の上、共移植することで皮膚付属器の再構成を得られた。上皮系細胞を報告していた(文献)、DGTML 因子 (*DNP63A*, *GRHL2*, *TFAP2A*, *cMYC*) によって誘導した細胞 (iSEPs) としたところ付属器の再構成を認めなかったが、検討の末、胎児性因子である *LEF1* を加えた細胞 DGTML-iSEPs としたところ豊富な付属器の再構成を得た。

（右図、Preprint 文献 より改変引用）



4) 皮膚付属器のついた皮膚を誘導するための間葉系細胞リプログラミング因子の同定

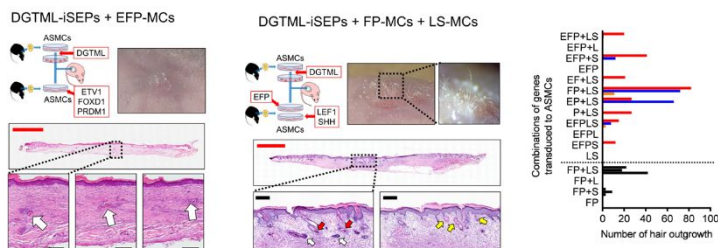
20 の皮膚付属器誘導能をもった間葉系細胞候補因子、それぞれを遺伝子導入した際の毛乳頭マーカー *PRDM1*, *CRABP1*, *VCAN* 発現の変化をリアルタイム PCR で定量し、有望と考えられた因子を組み合わせる遺伝子導入した際のアルカリフォスファターゼ発現を調べた。（右図、Preprint 文献 より改変引用）



マーカー発現を参考にしながら DGTML-iSEPs との共移植による皮膚付属器再構成の検討を進め、DGTML-iSEPs に *ETV1*, *FOXD1*, *PRDM1* を遺伝子導入した細胞を移植した部位の皮下に毛包様構造を認めた。胎児性皮膚ニッシュを再現することを目的として *LEF1*, *SHH* を遺伝子導入した細胞を第 3 の細胞として加えたところ発毛を得た。

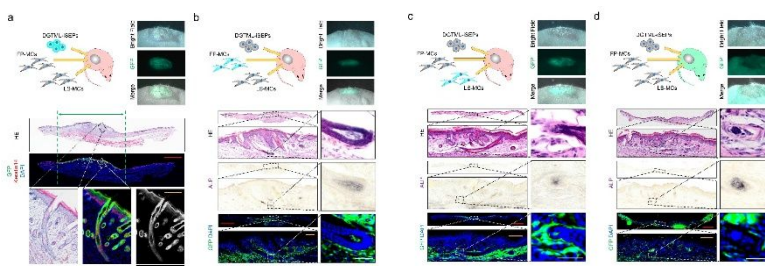
発毛を含めた皮膚付属器の再生に十分な因子が同定されたことから、因子を減らして実験を行い、必要因子の最適化を進めた。

（右図、Preprint 文献 より改変引用）



5) 誘導細胞の追跡による付属器への contribution の確認

GFP ラベリングによる追跡実験の結果、DGTML-iSEPs は付属器の全上皮成分を、FP-MCs、LS-MCs はアルカリフォスファターゼ陽性の毛乳頭部位に位置する細胞を構成することが明らかとなった。(右図、Preprint 文献より改変引用)

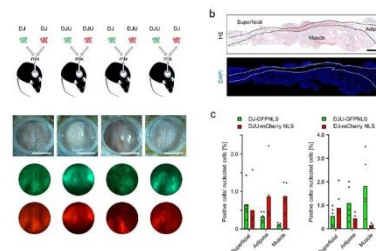


6) 皮膚潰瘍面の間葉系細胞に対して最適化された指向性を有する AAV の開発

定方向進化法によって、皮膚潰瘍面、特に深層の細胞に対して既存の AAV を遙かに上回る遺伝子導入効率をもった新規 AAV が開発された。

既存カプシドに対する有意性の確認のために、GFP、RFP それぞれを発現する AAV をマウス皮膚潰瘍面に対して共感染し、実体顕微鏡および組織学的所見 (AI による定量化を導入) によって可及的の高い精度で確認を進めた。

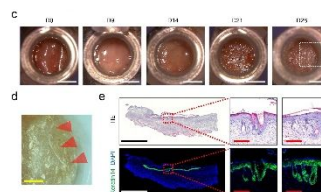
(右図、Preprint 文献より引用)



7) 生体内リプログラミングにおける皮膚付属器再生実験

新規同定した誘導因子群、新規開発した AAV カプシドを用いることによって、周囲皮膚より隔離されたマウス背部皮膚潰瘍面に、発毛、毛包、脂腺を有する皮膚組織を誘導することに成功した。

(右図、Preprint 文献より引用)



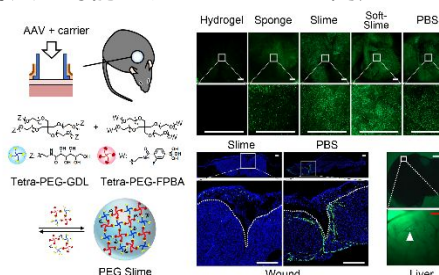
8) 表皮細胞に対して最適化された AAV の開発

既存のバックボーン、既存のペプチドバリエーション配列をハイブリッドすることによって表皮細胞、表皮組織に対して高い特異性をもった新規 AAV が開発された。

9) 皮膚潰瘍面に対して高い局所特異性をもった遺伝子導入を可能とするキャリアの開発

PEG 高分子化合物の中でも、その溶解性・放出性に留意してデザインされた PEG スライムをキャリアとして用いることによって皮膚潰瘍面浅層に高い部位特異性をもって遺伝子導入が可能であることを明らかとした (右図、文献より改変引用)。

さらに、同分子量の異なる PEG の皮下皮膚領域における代謝の仔細を調べ、デザイン上の観点での留意点を明らかにした (文献)。



文献

Kurita M et al. In vivo reprogramming of wound-resident cells generates skin epithelial tissue. *Nature*. 2018;561:243-247. doi: 10.1038/s41586-018-0477-4.

Du Z et al. Optimized 3D-printed template design for production of silicone skin chambers. *J Dermatol Sci*. 2022;105:55-57. doi: 10.1016/j.jdermsci.2021.11.006.

Moriwaki et al. In vivo reprogramming of wound-resident cells generates skin with hair. *bioRxiv* 2023.03.05.531138; doi: <https://doi.org/10.1101/2023.03.05.531138>

Kato et al. In situ-formable, dynamic crosslinked poly(ethylene glycol) carrier for localized adeno-associated virus infection and reduced off-target effects. *Commun Biol*. 2023;6(1):508. doi: 10.1038/s42003-023-04851-w.

Ishikawa et al. Molecular Weight-Dependent Diffusion, Biodistribution, and Clearance Behavior of Tetra-Armed Poly(ethylene glycol) Subcutaneously Injected into the Back of Mice. *ACS Macro Lett*. 2023;12(4):510-517. doi: 10.1021/acsmacrolett.3c00044.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Du Z, Shen Q, Mito D, Kato M, Okazaki M, Kurita M.	4. 巻 105
2. 論文標題 Optimized 3D-printed template design for production of silicone skin chambers.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science.	6. 最初と最後の頁 55-57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2021.11.006.	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 栗田昌和、加藤基、岡崎睦	4. 巻 274
2. 論文標題 細胞リプログラミングによる潰瘍面からの新規上皮化 高齢化社会における皮膚潰瘍治療のブレークスルーを目指して	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1071-1074
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 -

1. 著者名 森脇 裕太, 栗田 昌和, 岡崎 睦	4. 巻 11
2. 論文標題 生体内ダイレクトリプログラミングによる皮膚再生	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 879-883
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 -

1. 著者名 Kato M, Ishikawa S, Shen Q, Du Z, Katashima T, Naito M, Numahata T, Okazaki M, Sakai T, Kurita M.	4. 巻 6
2. 論文標題 In situ-formable, dynamic crosslinked poly(ethylene glycol) carrier for localized adeno-associated virus infection and reduced off-target effects.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 508
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-023-04851-w.	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 Ishikawa S, Kato M, Si J, Chenyu L, Kimura K, Katashima T, Naito M, Kurita M, Sakai T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Molecular Weight-Dependent Diffusion, Biodistribution, and Clearance Behavior of Tetra-Armed Poly(ethylene glycol) Subcutaneously Injected into the Back of Mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Macro Letters	6. 最初と最後の頁 510-517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmacrolett.3c00044.	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 -

[学会発表] 計22件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 栗田昌和
2. 発表標題 組織胎児化による複合的組織再生法の開発
3. 学会等名 新潟大学皮膚科特別セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 沼畑岳央、加藤基、Shen Qi、Du Zening、森脇裕太、栗田昌和、岡崎睦
2. 発表標題 皮膚潰瘍面に最適化した新規アデノ随伴ウイルスベクターの組織指向性の検討
3. 学会等名 第30回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗田昌和
2. 発表標題 組織胎児化による欠損組織再生法の開発
3. 学会等名 ムーンショット目標7キックオフシンポジウム「健康不安なく100歳まで」 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤基、石川昇平、沼畑岳央、Shen Qi、Du Zening、片島拓弥、酒井崇匡、栗田昌和、岡崎睦
2. 発表標題 ポリエチレングリコールを担体とした、潰瘍面浅層への限局的なアデノ随伴ウイルス遺伝子導入法の開発
3. 学会等名 第30回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Du Zening, Shen Qi, Mito Daisuke, Motoi Kato, Masakazu Kurita, Mutsumi Okazaki
2. 発表標題 Optimized 3D printed templates design for skin chamber production
3. 学会等名 第30回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福岡容子、石川昇平、Shen Qi、Du Zening、片島拓弥、酒井崇匡、栗田昌和、岡崎睦
2. 発表標題 Polyethyleneglycol (PEG)を用いたマウス耳介血腫モデルの確立
3. 学会等名 第30回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗田昌和
2. 発表標題 組織胎児化による複合的組織再生法の開発
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗田昌和、加藤基、岡崎睦
2. 発表標題 組織胎児化による皮膚再生法の開発
3. 学会等名 第19回再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李可心、栗田昌和、岡崎睦
2. 発表標題 2. 重層扁平上皮形成能を有する細胞への新規リプログラミング因子の同定
3. 学会等名 第29回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗田昌和、加藤基、沼畑岳央、岡崎睦
2. 発表標題 創傷治癒の促進を目的とした遺伝子治療法の開発
3. 学会等名 第50回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗田昌和
2. 発表標題 局所的な組織胎児化による皮膚潰瘍治療法の開発
3. 学会等名 美と健康のフロンティアサイエンスフォーラム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗田昌和
2. 発表標題 組織胎児化による複合的組織再生法の開発
3. 学会等名 新潟大学皮膚科特別セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗田昌和
2. 発表標題 組織胎児化による欠損組織再生法の開発
3. 学会等名 ムーンショット目標7キックオフシンポジウム「健康不安なく100歳まで」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗田昌和
2. 発表標題 組織胎児化による複合的組織再生法の開発
3. 学会等名 令和3年度 AMED 再生・細胞医療・遺伝子治療研究開発交流会プレナリーセッション（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗田昌和
2. 発表標題 組織胎児化による複合的組織再生法の開発
3. 学会等名 The 95 Scienc-0me
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗田昌和
2. 発表標題 組織胎児化による複合的組織再生法の開発
3. 学会等名 第31回日本形成外科学会基礎学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤基、石川昇平、片島拓弥、酒井崇匡、栗田昌和、岡崎睦
2. 発表標題 皮下投与された高分子化合物の分子量依存的な生体内分布解析
3. 学会等名 第31回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shen Q、Du Z、森脇裕太、栗田昌和、岡崎睦、鈴木啓一郎
2. 発表標題 表皮組織に最適化された新規AAVカプシドの開発
3. 学会等名 第31回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森脇裕太、栗田昌和、岡崎睦
2. 発表標題 ヒト免疫組織化学染色によるマウス皮下組織内ヒト細胞検出法最適化
3. 学会等名 第31回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗田昌和
2. 発表標題 組織胎児化による複合的組織再生法の開発
3. 学会等名 第15回岡山創傷治癒研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masakazu Kurita
2. 発表標題 Development of Method for Generation of Skin with Appendages via Tissue Embryonization
3. 学会等名 ISID2023 Tokyo Satellite Symposium: International Symposium on Skin Stem Cell Dynamics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masakazu Kurita
2. 発表標題 Development of Method for Generation of Skin with Appendages via Tissue Embryonization
3. 学会等名 The 15th Japan-Korea Congress of Plastic and Reconstructive Surgery (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 皮膚付属器誘導能を有する細胞、及びその製造方法	発明者 栗田昌和	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/15867	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 皮膚付属器誘導能を有する細胞、及びその製造方法	発明者 栗田昌和	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-85915	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 アデノ随伴ウイルスベクターおよび付属器をもった皮膚組織を誘導する方法	発明者 栗田昌和、加藤基、 沈琪、平林祐介、菅 翔吾	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、US63/415320	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	金山 幸司 (Kanayama Koji) (40612601)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	
研究分担者	岡崎 睦 (Okazaki Mutsumi) (50311618)	東京大学・医学部附属病院・教授 (12601)	

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
---------	---------