

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592293

研究課題名（和文）

皮膚三次元培養組織による慢性皮膚潰瘍再上皮化の実験的研究

研究課題名（英文）

Experimental study of chronic skin ulcer re-epithelization by organotypic culture

研究代表者

鈴木 康俊（SUZUKI YASUTOSHI）

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20325963

研究成果の概要（和文）：

三次元培養皮膚モデル、創傷治癒モデルを用い、正常皮膚と慢性潰瘍部の線維芽細胞真皮モデル上での表皮層形成、および再上皮化の相違の検討を試みた。慢性潰瘍部の細胞は増殖能が乏しく、表皮層形成、再上皮が共に不十分であった。代用に継代培養を重ねた線維芽細胞を用いた系、およびヒドロコルチゾンを投与した系を用いた。真皮モデルでは、収縮、硬度が抑制され、皮膚モデル、創傷治癒モデルでは表皮層形成が抑制された。

研究成果の概要（英文）：

Using a three-dimensional skin culture model and a wound healing model, we tried to review difference in epithelium formation and re-epithelizaion process on skin equivalent model consist of fibroblasts which were obtained from normal skin and chronic ulcer. Fibroblasts obtained from chronic ulcer showed poor proliferative capacity, and both epithelium formation and re-epithelizaion process were insufficient. We used a substitute system that we use multiple passaged fibroblasts or hydrocortisone containing culture medium. In a skin equivalent model, the contraction process and the hardness were inhibited. And in a skin culture model and wound healing model, epithelium formation and re-epithelizaion process were restrained.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：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：細胞・組織、創傷治癒

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚の創傷治癒には、多くの細胞の細胞間相互作用や増殖因子などが複雑に関与しており、その仕組みについては、未だ明らかにされていないことが多い。創傷治癒を実験的に研究するにあたり、生体組織の複雑な機構を、どのように反映した形で実験系に簡略化するかが大きなポイントであると考えられる。

われわれは実験材料として、ヒト皮膚より採取した表皮角化細胞を、線維芽細胞をコラーゲンゲルマトリックス内に組み込んだ上で培養することで、*in vitro* で皮膚類似の構造を再現する皮膚モデル（皮膚三次元培養組織）を用いた実験系を用いている。この皮膚三次元培養組織を用いて、現在までレチノイン酸による皮膚の脱メラニン色素に関するメカニズム、爪固有ケラチン産生に及ぼす爪床部線維芽細胞の機能などを今までに明らかにした。

今日臨床的に大きな問題となっている褥瘡などの慢性潰瘍は、創傷治癒機転の異常のために起こる病態と考えられている。近年その治療成績は向上しているが、しかし一方で“難治性潰瘍”と称される治療抵抗性の症例に難渋することも少なくない。

われわれは、現在治療効果をみている薬物を、皮膚モデルすなわち *in vitro* での実験系で用いることより、慢性皮膚潰瘍の創傷治癒機構（再上皮化）の解析の足がかりとするための研究を企画した。

## 2. 研究の目的

本研究では皮膚三次元培養組織による創傷治癒モデルを用い、細胞増殖因子の発現・反応の違いに焦点を当て、正常皮膚と慢性潰瘍部における再上皮化の相違を検討することを目的とした。

具体的には、慢性潰瘍の治療で臨床的に用

いられている線維芽増殖因子 (bFGF) およびサイクリック AMP 製剤、創傷治癒を抑制するステロイド、表皮角化細胞の増殖促進作用および線維芽細胞増殖抑制が既知である TGF- $\beta$ 、およびその TGF- $\beta$  のレセプターインヒビターでの実験を計画した。

## 3. 研究の方法

- (1) 慢性潰瘍部の線維芽細胞を用いて、皮膚モデル、創傷治癒モデルを作成する。
- (2) モデルの組織学検討をする。(表皮層の分化マーカー発現、DNA 合成率 (BrdU 取込))
- (3) 既知の増殖因子、薬剤の投与による、表皮層形成の変化を検討する。
- (4) 上記(1)慢性潰瘍部の線維芽細胞の増殖が不良のため、代用として、培養の継代を重ねた線維芽細胞および、創傷治癒遅延の一因であるヒドロコルチゾン存在下において、(2)、(3)を検討する。

## 4. 研究成果

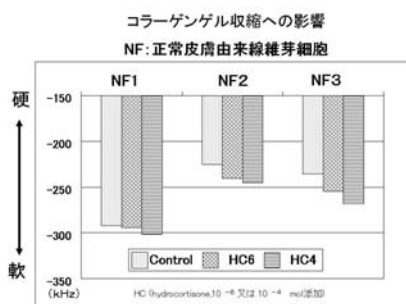
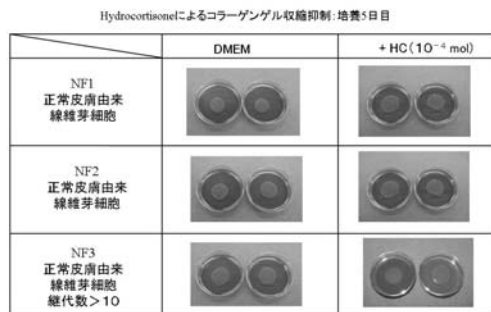
- (1) 正常線維芽細胞による創傷治癒モデルでは、幅 4mm に表皮欠損部を作製したところ、約 3 日で 1-2 層の未分化な表皮層が再生した後、重層化・分化をし、約 7 日で欠損部作製前と同様の重層化した扁平上皮層が再生された。免疫染色により、基底層・基底上層・顆粒層・角化層に特有の分化マーカーの発現を確認した。

- (2) 慢性潰瘍部から採取した線維芽細胞では、細胞自体の増殖能が乏しかった。

慢性潰瘍部線維芽細胞による皮膚モデルでの、表皮層の形成・再上皮化の検討をした。慢性潰瘍部の線維芽細胞は、細胞自体の増殖能が乏しく、同細胞を用いた皮膚モデルでは表皮層の形成が十分ではなかった。正常線維芽細胞では、約 7 日間で 7-8 層の扁平上皮層

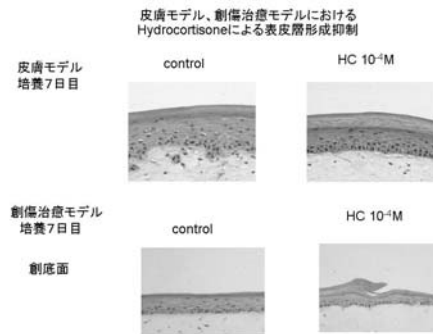
を形成するが、慢性潰瘍部の線維芽細胞では培養日数を長くしても、形成される扁平上皮層は厚くならなかった。また創傷治癒モデルでは、表皮層の再上皮化ができなかった。欠損部を作製した辺縁からの表皮細胞の遊走・増殖が抑制された。培養日数を長くしても、正常線維芽細胞モデルのような再表皮化は見られなかった。皮膚のモデルとして用いることができなかった。

(3) (2) の代用として、慢性潰瘍を生じやすい老化した皮膚を想定し、継代培養を重ねた線維芽細胞による皮膚モデルを作製した。線維芽細胞とコラーゲンマトリックスからなる真皮モデルでは、マトリックスの収縮が抑制された。同様のコラーゲンの収縮は、創傷治癒の遅延の一因となる、ヒドロコルチゾン投与で見られた。また収縮したコラーゲンの硬度も、抑制された。



(4) 慢性潰瘍の一因となるヒドロコルチ

ゾンを投与して、皮膚モデル、創傷治癒モデルを作成した。両者ともに、形成された表皮層は菲薄化していた。ヒドロコルチゾンの表皮層形成抑制を、安定して再活性化する因子(濃度)を決めるには至らなかった。



## 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4件)

1. 遊離筋肉移植手術による顔面神経麻痺再建手術後のfollow upと後療法. 鈴木康俊, 朝戸裕貴, 波利井清紀, 多久嶋亮彦, 岡崎 睦, 上田和毅. 日本マイクロ会誌、査読有、24: 258-266, 2011.

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjsrm/24/3/24\\_3\\_258/article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjsrm/24/3/24_3_258/article)

2. 頭部採皮創に対するハイドロジェル製創傷被覆材の有用性. 野村紘史, 朝戸裕貴, 鈴木康俊, 梅川浩平, 田村亮介, 渡邊未来子, 水口 敬. 創傷、査読有、2: 160-164, 2011.

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjsrm/24/3/24\\_3\\_258/article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjsrm/24/3/24_3_258/article)

3. 顔面神経麻痺患者に対する眼瞼形成術. 鈴木康俊, 朝戸裕貴. Facial N Res Jpn、査読有、30: 4-6, 2010.

4. 皮膚硬度計による癍痕動態の追跡. 舘下亨, 上田和毅, 梶川明義, 廣瀬太郎, 鈴木康俊. 日シミュレーション外会誌、査読有、17 : 1-5, 2009.

[学会発表] (計9件)

1. 小耳症におけるドレッシング. 朝戸裕貴, 鈴木康俊, 加地展之, 三苦葉子. 第3回日本創傷外科学会, 2011, 7. 札幌, 当科における小耳症ドレッシング法の実際パネルディスカッション
2. リンパ管静脈吻合術における取り組み. 鈴木康俊, 朝戸裕貴. 第36回日本外科学系連合学会, 2011, 6. 浦安, リンパ浮腫に対する予防と治療の最前線 シンポジウム
3. 臨床に役立つ日本の形成外科基礎研究戦略 形成外科臨床医にとっての基礎研究 展開戦略について. 朝戸裕貴, 鈴木康俊. 第19回日本形成外科学会基礎学術集会, 2010, 9. 横浜, シンポジウム
4. 顔面神経麻痺に対する整容改善手術 (治療) 顔面神経麻痺患者に対する眼瞼形成術. 鈴木康俊, 朝戸裕貴. 第33回日本顔面神経研究会, 2010, 5. 福岡, パネルディスカッション
5. 培養内皮膚モデルの再考察. 鈴木康俊, 吉村浩太郎, 岡崎 睦. 第95回日本形成外科学会関西支部学術集会, 2010, 7. 11. 大阪
6. 小耳症における耳介挙上と外耳道形成合同手術後の頭部脱毛に対するわれわれの工夫. 渡邊未来子, 朝戸裕貴, 鈴木康俊, 加我君孝, 竹腰英樹, 加地展之, 三苦葉

子, 尾野村麻以, 田村亮介. 第15回形成外科手術手技研究会, 2010, 2. 長崎, 主題 私のこだわりの方法, パネルディスカッション

7. Suzuki Y, Asato H, Fukuda N, Mizuguchi K, Nomura H, Umekawa K, Oki M, Kurabayashi T, End-to Side Lymphaticovenous Anastomosis for Lymphedema of Extremities. The 10<sup>th</sup> Congress of the International Confederation for Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery Asian Pacific Section, 2009, 10. Tokyo
8. Asato H, Suzuki Y, Takushima A, Harii K, Okazaki M: Divided latissimus dorsi transplantation for reanimation of paralyzed face. The 10<sup>th</sup> Congress of the International Confederation for Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery Asian Pacific Section, 2009, 10. Tokyo
9. Suzuki Y, Asato H, Fukuda N, Oki M, Umekawa K, Wound Infection on the Middle of the Back Treated Using a Free Flap with Recipient Vessels from the Abdomen. The 5<sup>th</sup> World Society Reconstructive Microsurgery, 2009, 6. Okinwa

[図書] (計3件)

1. 薄筋皮弁・薄筋弁. 鈴木康俊, 朝戸裕貴. 形成外科診療プラクティス 皮弁外科・マイクロサージャリーの実際, 百束比古編, 92-95, 文光堂, 東京, 2010.

2. ケロイド・肥厚性癬痕の治療効果判定における皮膚高度測定の有用性. 鈴木康俊, 朝戸裕貴, 上田和毅. 第 14 回ケロイド・肥厚性癬痕研究会記録集 86-92, メディカルトリビューン, 2009.
3. 皮膚高度計による癬痕動態の追跡. 舘下亨, 上田和毅, 梶川明義, 鈴木康俊. 第 14 回ケロイド・肥厚性癬痕研究会記録集 79-85, メディカルトリビューン, 2009.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鈴木 康俊 (SUZUKI YASUTOSHI)  
獨協医科大学・医学部・準教授  
研究者番号：20325963

##### (2) 研究分担者

朝戸 裕貴 (ASATO HIROTAKA)  
獨協医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20222581