

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32644
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：21K08651
研究課題名（和文）細胞生着を促進する再生促進薬を用いた人工物埋め込み型新規再生医療技術の開発

研究課題名（英文）Development of new regenerative medicine technology for implantation of artificial dermis using regeneration-promoting drugs that promote cell engraftment.

研究代表者
住吉 秀明（SUMIYOSHI, Hideaki）
東海大学・医学部・准教授

研究者番号：60343357
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本課題はミズクラゲ由来再上皮化促進成分を実用水準に高めることを目的とし、ミズクラゲ由来薬効成分の精製、次世代人工構造体の開発、投薬技術を含めた人工真皮再生医療技術の推進。以上3テーマの研究を行った。は混合体でありながら再上皮化促進活性を持ち、生物学的毒性を持たない低分子ペプチドを得た。では長期的に優れた生着性と生来組織再現能力を有する新型人工真皮を開発し、動物実験によって性能を確認した。ではナノシート技術を用いた薬剤ラッピング技術による徐放性担体を開発し再生促進薬と人工真皮を複合した再生医療のモデルを形成した。特許申請などヒト医療に役立てるための技術移転が次の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミズクラゲ成分の細胞遊走促進作用は申請者による独自の発見である。人工物上に直接上皮を誘引できる薬剤は他に無く、薬効成分を同定できれば画期的な新薬となり得る。現在主流の幹細胞を用いる再生医療はコストと安全性に課題があるが、人工構造体を用いた再生医療は安価で、経過さえ良ければ社会的にも受け入れ易い再生医療となる。難治性皮膚潰瘍や褥瘡など再生能力の衰えた患者に対しての人工真皮を用いる治療は、適用が難しい事例であるが、細胞を効率的に動員し組織を再構成する技術によって適用範囲を広げることが可能となる。高齢化と飽食化で増加するこれらの疾患に対応し、健康寿命の延長と医療費の削減の両面に波及効果を見込める。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this project is to reach the level of clinical application of the re-epithelialization-promoting component derived from Moon jellyfish. Therefore, Purification of medicinal ingredients derived from Moon jellyfish. Development of next-generation artificial dermis. Promotion of artificial dermal regeneration medical technology, including medication. We conducted the above three studies. In , we obtained a low-molecular-weight peptides that have re-epithelialization-promoting activity despite being a mixture and have no biological toxicity. In , we developed a novel artificial dermis that has excellent long-term engraftment and the ability to reproduce natural tissue. In , we developed a sustained-release carrier from drug wrapping technology using nanosheet technology, and constructed a regenerative medicine model that combines medication and artificial dermis. The next challenge is technology transfer for use in human medicine.

研究分野：再生医療

キーワード：表皮伸長促進 創薬 新型人工真皮 再生医療 臨床応用

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

再生医療は「失なった体を取り戻す」医療技術である。体は細胞と細胞外マトリックス (ECM) から出来ており、再生医療は細胞をベースにしたものと ECM をベースにしたものが存在する。人工の構造材を欠損した傷に埋め込む再生医療は実用技術として多くの患者に施行されているが、この治療法は人工構造体に患者の細胞を早く安定生着させることが治療成功の鍵となる。

我々はミズクラゲに上皮化と宿主細胞の定着を促進する成分を見出した。人工の ECM に宿主細胞を素早く動員できるのなら、ECM 構造体を組織再構築に最適化させ ECM ベースの新しい再生医療を形づくるのが可能である。細胞ベースと ECM ベースの再生医療は二者択一でなく相補的な技術であり、糖尿病性皮膚潰瘍など難治性の慢性疾患に立ち向かう武器になるだろう。

2. 研究の目的

我々がミズクラゲから見出した成分は低分子化処理後しても維持されており、薬効成分の同定により抗原性などの有害性を除去した新規上皮化再生促進薬の創薬を目的と出来る。同時に早期の宿主細胞定着を想定して従来品と同じコラーゲンスポンジを主とした、生来の組織を再現できる理想的な新型人工真皮を開発する。本技術は QOL の劇的な改善、成功率の上昇、厳しい症例への応用を可能にする新規再生医療技術として医療応用に耐えられるものを目指す。

3. 研究の方法

このプロジェクト研究を構成する 3 つの研究課題の研究計画方法を以下に示す。

課題 (1) ミズクラゲの上皮再生促進成分の精製と新規再生促進薬の創薬。

- ① ミズクラゲコラーゲンの低分子化処理と HPLC による成分分離、薬効確認。
- ② HPLC 分離画分の SDS-PAGE、TLC、Mass による解析。
- ③ HPLC 分離画分をマウスの上皮化 Bioassay により限定化する。
- ④ HPLC 分離画分のアミノ酸組成解析と画分のペプチド組成の特徴比較。
- ⑤ ミズクラゲゲノム情報からの *in silico* アミノ酸配列情報の推測。
- ⑥ 低分子化ミズクラゲペプチドの抗原性と炎症性のチェック。
- ⑦ HPLC 分離の更なる細分化と濃縮処理、Bioassay により薬効画分の確定。

課題 (2) 生来の組織再現を可能とする新型人工真皮の実用化を推進する。

- ① 無菌的なマウス人工皮膚移植実験、短期 (3 週)、長期 (~10 週) 条件の確立。
- ② 新型人工真皮と従来型人工真皮の短期・長期の生着率の観察と比較。
- ③ 新型人工真皮と従来型人工真皮の短期・長期経過時の組織像の比較。
- ④ 新型人工真皮と従来型人工真皮の物理的特性の検証。

課題 (3) 新型人工真皮に薬の投与技術を組み合わせ、再生医療を加速する。

- ① 生分解性プラスチック (ポリ乳酸) ナノシートを用いた薬剤徐放性担体の開発。
- ② 糖尿病モデルマウスを用いた新型・従来型人工真皮の経過と組織像観察。
- ③ 糖尿病マウスとミズクラゲ実装ナノシート徐放担体を用いた投薬実験。
- ④ 糖尿病マウスとミズクラゲ実装ナノシート徐放担体の創傷治癒速度と組織像の比較。

4. 研究成果

課題 (1) ミズクラゲの上皮再生促進成分の精製と新規再生促進薬の創薬。

ミズクラゲコラーゲンは人工真皮上で表皮伸長を促進する薬理効果があり、我々は *in vivo* で薬理活性を定量的に評価する方法を確立し、薬剤活性を追跡する技術を開発した。

ミズクラゲコラーゲンを低分子化し高速液体クロマトグラフィーで分離しても、活性は損なわれなかった。

これは薬理作用がペプチドに存在することを示している (図1)。

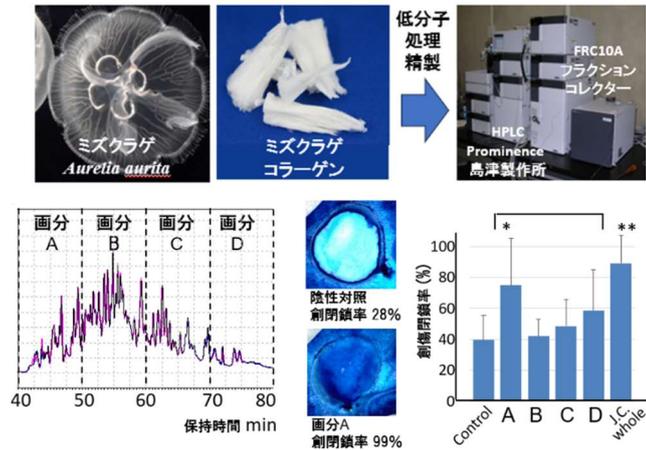


図1 ミズクラゲコラーゲンの低分子化とHPLCによる分離、薬効活性の追跡

低分子化処理し HPLC で精製したミズクラゲコラーゲン画分を C57BLマウスに免疫し、抗体価を ELISA によって測定した。免疫づけの方法は、皮下に2週間隔で3回接種する

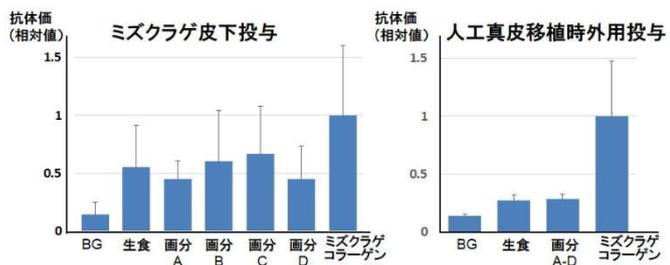


図2 低分子化によるミズクラゲコラーゲン抗原性の低減

外用投与する実用に際した方法を用いた。計測された抗体価の結果を 図2 に示す。いずれも低分子化処理によって、生理的食塩水と同様の抗体価まで低減できた。アレルギー反応のような有害事象のリスクは、ペプチド化により低減できる事が確認された。抗体ビーズによる炎症性サイトカインの測定も行なわれたが、ミズクラゲコラーゲン摂取による炎症性の反応は認められなかった。以上は医薬品としての特許を目指すのに肯定的な結果と考えられた。

保持時間を3分間隔にして画分 A を3分割し、同じ画分を10倍重積して濃縮した。その結果を 図3 に示す。溶出領域はグラフに認められるように精製機会毎にばらつきがあるため、これ以上精製範囲を狭めることが出来ないと考えられた。

この成分を用いて表皮再生効果を調べた結果、薬効成分は画分 A-2 (10) の範囲に存在すると限定された。

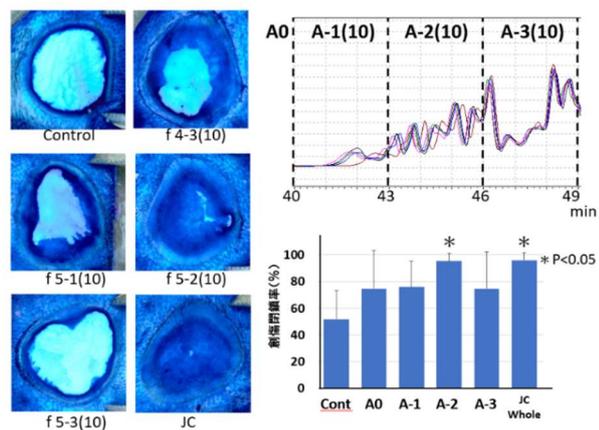


図3 精製と濃縮による再生促進成分の限定

HPLC で精製された画分について低分子用 SDS-PAGE で解析を行なったが、ペプチド断片の大半は SDS-PAGE の解析限界より小さく、溶出画分に含まれる成分の解析は出来なかった。2次元薄層クロマトグラフィー (TLC) を行ない、ペプチドスポットのパターン解析を試みたが濃度と感度が低く、明瞭なパターンを得られなかった (data not shown)。

そこで画分 A~D を塩酸で加水分解し、アミノ酸にまで分解し質量分析によって各画分に含まれるアミノ酸組成を解析することによって画分内のペプチドの持つキャラクターを

ある程度解明した。図4に示す。

ペプチドに含まれる Lys, Arg の量比によりペプチドの平均鎖長が求められた。

画分Aの平均ペプチド鎖長は9.5AA、

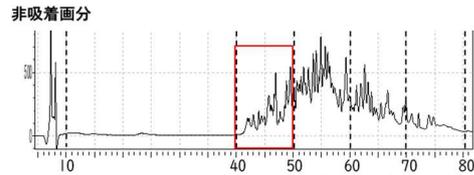
哺乳類には希少な 3-OH Pro を多く含む

ペプチド集団であることがわかった。

ただし、現時点でも画分Aに含まれるペプチドの種類は10種以上と見込まれる。

医薬品水準の特許申請にはあと一歩と

いうところである。医薬部外品での特許申請も視野に入れ、今後の検討とする。

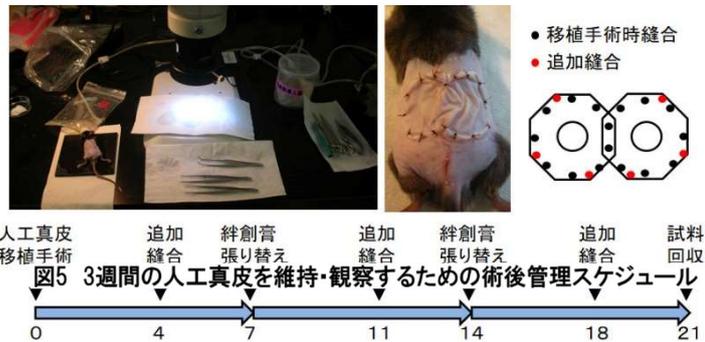


	非吸着画分	画分A	画分B	画分C	画分D	total
総タンパク量	5.2	11.5	37.9	23.1	10.7	88.4(%)
4-Hyp 量	0.68	4.53	22.15	13.98	1.55	(nmol)
3-Hyp 量	0.11	2.28	6.16	2.67	0.82	
3-Hyp/4-Hyp比	14.9	50.4	27.9	18.9	5.2	(%)
Lys/Arg率	31.3	10.5	6.6	5.3	5.9	(%)
平均ペプチド鎖長	3.2	9.5	15.2	18.9	16.9	(AA)

図4 各画分のアミノ酸組成解析による平均ペプチド鎖長比較

課題(2) 生来の組織再現を可能とする新型人工真皮の実用化を推進する。

人工皮膚の生着を観る中長期の実験モデルは課題があった。2週以降で人工皮膚の脱落や化膿によるサンプルの逸失を防止し、糖尿病モデルマウスの実験例を確立すべく形成外科学教室の監督を受けながら中長期の人工皮膚生着実験系のマニュアルを作成し



実際の移植実験で効果を確認した。マウス人工皮膚移植モデルのスキームを図5に示す。

自傷行為から創部を保護する絆創膏は7日毎、3回交換し交換時に写真撮影を行なう。

縫合は9箇所、4日目に3箇所の追加縫合を行なう。このスケジュールにより人工皮膚を3週間以上維持して、長期予後のデータ収集を効果的に行えるようになった。

課題(3) 新型人工真皮に薬の投与技術を組み合わせ、再生医療を加速する。

図6には糖尿病マウスの経過事例を示す。生着率は100%で、従来型(市販品)より優れた生着率を示した。最大の新型人工真皮の特性は経過にあり、移植後短期間のうちに浸出液が吸収され、3週間には人工的な細胞外マトリックスが展開し、宿主の細胞が生着し血管も多数侵入し、生来の真皮を模倣する人工マトリックスの再生組織を実現できることを示した。

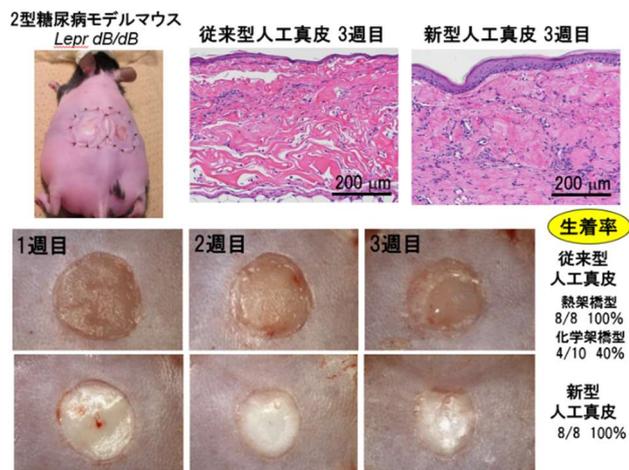


図6 新型人工真皮の糖尿病モデルマウスに対する移植事例

2020年に特許出願した新型人工真皮は2022年に特許開示された(特開2022-55185)。

生分解性高分子であるポリ乳酸(PLA) ナノシートでミズクラゲコラーゲンをラッピングした新規薬剤徐放性担体を創製し、糖尿病モデルマウスを用いた表皮再生能評価を行った。

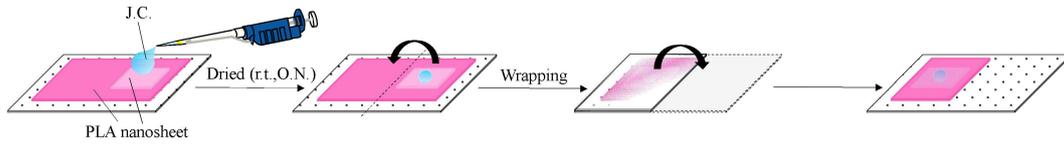


図7 ミズクラゲコラーゲンをナノシート間に担持した徐放性担体の創製法

SiO₂ 基板 (25 × 25 mm², 50 × 50 mm²) 上に、ポリスチレンスルホン酸ナトリウム水溶液 (100 mg/mL) を滴下後、スピコート (4000 rpm, 60 s) して犠牲層とした。続いて、PLA (20 mg/mL) のトルエン溶液を滴下後、スピコート (4000 rpm, 60 s) した。調製した PLA ナノシートを基板ごと水中に浸漬させることで犠牲層を溶解させ、サイズの異なる 2 種類の PLA ナノシートを剥離した。この時、大サイズの PLA ナノシート (38 × 38 mm²) をテフロンメッシュに、小サイズの PLA ナノシート (13 × 13 mm²) を不織布上に回収した。

そこで、PLA ナノシート (13 × 13mm²) 上に小サイズの PLA ナノシートを押圧転写したところ、確実に転写されている様子が見られた (図 7, 図 8 (a))。その際、PLA ナノシートの上にミズクラゲコラーゲン (2.5 mg/mL, 100 μL) を滴下・乾燥後も、ミズクラゲコラーゲンが PLA ナノシートから漏れ出すことなく担持できることも確認した。その後、テフロンメッシュごと PLA ナノシートを折りたたむことで、ナノシートが有している高い接着力によって PLA ナノシート同士が重なり、ミズクラゲコラーゲンが PLA ナノシートの層間へとラッピングされている様子が見られた (図 7, 図 8 (b))。故に、PLA ナノシートによってミズクラゲコラーゲンをラッピングした徐放性担体を創製した。

糖尿病モデルマウスの背部に作成した作製した全層皮膚欠損部位に人工真皮を移植したところ、滲出液を速やかに吸収する様子が見られた。その上部からミズクラゲコラーゲンをラッピングした徐放性担体を創傷部全体が被覆するように貼付した。3 日後あるいは 6 日後に犠牲死

させた後、創傷部位を摘出し固定後、Giemsa 染色と H-E 染色を行った。徐放性担体を貼付していない群では、表皮の再生を示す青色染色領域は創傷部位の辺縁部に留まったのに対し、貼付した群では染色領域が創傷部全域に拡大している様子が見られた (図 9 上段)。表皮閉鎖率は 3 日目からすでに有意に高値を示した。実際、創傷部位の組織切片像 (H-E 染色) から、徐放性担体を貼付しない群では、表皮が厚く短距離しか進展していないのに対し、貼付した群では、表皮が薄く長距離に渡って進展している様子が確認できた (図 9 下段)。従って、J.C. ナノラッピング材を貼るだけで表皮進展促進作用を示し、新規創傷被覆材として使用できる可能性を実証した。

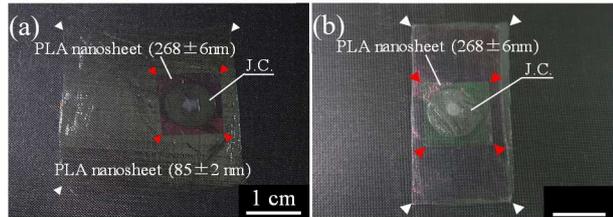


図8 ミズクラゲコラーゲンをナノシート間に担持した徐放性担体の写真。(a) ラッピング前、(b) ラッピング後。

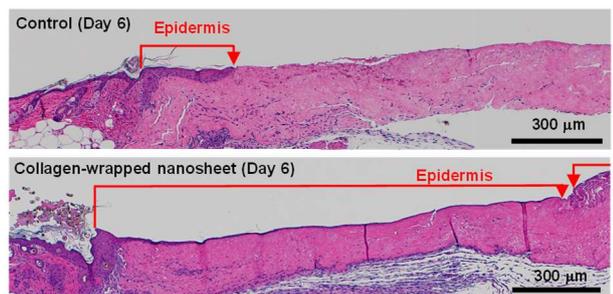
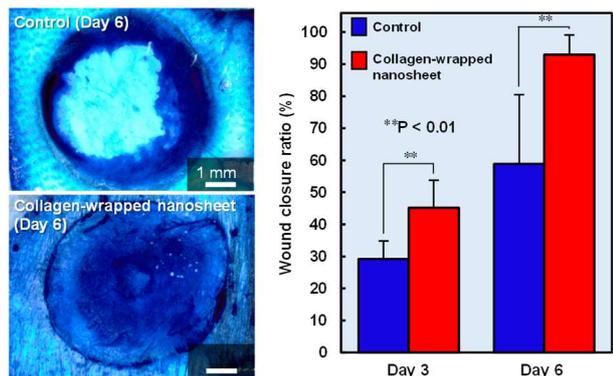


図9 ミズクラゲコラーゲン担持徐放性担体の表皮再生能評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sumiyoshi H, Okamura Y, Kawaguchi AT, Kubota T, Endo H, Yanagawa T, Yasuda J, Matsuki Y, Nakao S, Inagaki Y.	4. 巻 18
2. 論文標題 External administration of moon jellyfish collagen solution accelerates physiological wound healing and improves delayed wound closure in diabetic model mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 223 - 230
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2021.06.008	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 Nakano Y, Nakao S, Sueoka M, Kasahara D, Tanno Y, Sumiyoshi H, Itoh T, Miyajima A, Hozumi K, Inagaki Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Two distinct Notch signals, Delta-like 4/Notch1 and Jagged-1/Notch2, antagonistically regulate chemical hepatocarcinogenesis in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	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） 10.1038/s42003-022-03013-8	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 Shida Y, Endo H, Owada S, Inagaki Y, Sumiyoshi H, Kamiya A, Eto T, Tatemichi M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Branched chain amino acids govern the high learning ability phenotype in Tokai high avoider (THA) rats.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-021-02591-7	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 Matsuki Y, Yanagawa T, Sumiyoshi H, Yasuda J, Nakao S, Goto M, Shibata-Seki T, Akaike T, Inagaki Y.	4. 巻 583
2. 論文標題 Modification of exosomes with carbonate apatite and a glycan polymer improves transduction efficiency and target cell selectivity.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 93 - 99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.10.063	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 Kawaguchi T A, Tanaka T, Yamano M, Sumiyoshi H, Kitagishi H, Yamada Y, Kawaguchi T G, Bergsland J.	4. 巻 11
2. 論文標題 Carboxyhemoglobin particle infusion, but not carbon monoxide inhalation ameliorates myocardial infraction via attenuated oxidative stress and in situ inflammation in a rat model.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Medical Research Archives	6. 最初と最後の頁 1-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18103/mra.v11i11.4810	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 Kawaguchi T A, Salybekov A A, Yamano M, Sumiyoshi H, Kawaguchi T G, Matsuda S, Sekine K, Shibata M, Yamada Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 De novo biological coronary artery bypass in a rat model: Case report and the concept of hybrid cardiovascular regeneration.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Medical Research Archives	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18103/mra.v12i2.4992	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 住吉秀明、池田麻里子、岡村陽介、中尾祥絵、柳川享世、花井 潮、今川 孝太郎、赤松 正、稲垣 豊
2. 発表標題 真皮組織を模倣する、次世代人工真皮構造体の取り組み
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 住吉秀明、池田麻里子、三浦浩美、中尾祥絵、柳川享世、大塚正人、稲垣 豊
2. 発表標題 創傷瘢痕形成過程に由来する線維芽細胞の解析
3. 学会等名 第55回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 住吉秀明、池田麻里子、岡村陽介、喜多理王、中尾祥絵、柳川享世、花井 潮、今川 孝太郎、赤松 正、稲垣 豊
2. 発表標題 創傷癒痕形成過程に由来する線維芽細胞の解析
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 住吉秀明、池田麻里子、岡村陽介、喜多理王、中尾祥絵、松木勇樹、柳川享世、花井 潮、今川 孝太郎、赤松 正、稲垣 豊
2. 発表標題 健常および糖尿病モデルマウスにおける新開発人工真皮の実証実験
3. 学会等名 第54回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 住吉秀明、岡村陽介、喜多理王、中尾祥絵、松木勇樹、柳川享世、花井 潮、今川 孝太郎、赤松 正、稲垣 豊
2. 発表標題 健常および糖尿病モデルマウスにおける新開発人工真皮の実証実験
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 住吉秀明、岡村陽介、遠藤 整、中尾祥絵、安田純平、松木勇樹、柳川享世、稲垣 豊
2. 発表標題 宿主細胞の生着により理想的な自己組織化を果たす新型人工真皮の開発
3. 学会等名 第53回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	岡村 陽介 (Okamura Yosuke) (40365408)	東海大学・工学部・教授 (32644)	ナノシートとミズクラゲコラーゲンをを用いた徐放性薬剤投与ユニットの開発
研究分担者	遠藤 整 (Endo Hitoshi) (10550551)	東海大学・医学部・准教授 (32644)	中・長期動物実験モデルの構築
研究分担者	根本 仁 (Nemoto Hitoshi) (40465183)	東海大学・医学部・講師 (32644)	人工真皮移植手術の術後評価、再生促進薬と新型人工真皮の開発と使用法についての指導

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