

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500545

研究課題名(和文) 同種培養真皮と上皮成長因子含有創傷被覆材の併用による新規治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of noble therapy using allogeneic cultured dermal substitute combined with wound dressing containing epidermal growth factor

研究代表者

黒柳 能光 (Kuroyanagi, Yoshimitsu)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：80170140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：同種培養真皮と上皮成長因子(EGF)含有創傷被覆材の併用による皮膚欠損創治療のための新規治療法の確立を目的とした。最終的には、同種培養真皮とEGF含有被覆材を一体化した2層型の理想的な培養真皮を開発した。この同種培養真皮は、冷凍保存しないため、冷凍、解凍、リンス操作による細胞へのダメージがない。さらに、無血清培地を使用しているため血清をリンスする操作を省けることが利点であり、実践的な治療法である。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to establish a novel therapy for skin defect using allogeneic cultured skin substitute combined with wound dressing containing epidermal growth factor (EGF). Finally we developed an excellent two-layered cultured dermal substitute (CDS). The upper layer is a hyaluronic acid (HA) and collagen (Col) spongy sheet with epidermal growth factor (EGF). The lower layer is a HA spongy sheet and Col gel containing fibroblasts. The CDS is promising, because there is no risk of cellular damage caused by cryopreservation, thawing and rinsing processes. The CDS is prepared in serum-free medium, followed by placing on a wound surface. The critical issue is how to reduce the cellular damage during a prolonged period of incubation in serum-free medium. EGF-incorporating CDS can be used after a period of several days incubation in serum-free medium. This period is sufficient for transport of CDS from manufacturing facilities to hospitals. This CDS is promising for a practical therapy.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学、生体材料学

キーワード：培養真皮 線維芽細胞 ヒアルロン酸 コラーゲン 上皮成長因子 熱傷 難治性皮膚潰瘍 創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

- (1) 重症熱傷や難治性皮膚潰瘍の治療に人工皮膚が使用されている。人工皮膚は、創傷被覆材と培養皮膚代替物(培養表皮、培養真皮、培養皮膚)に大別される。我々は、線維芽細胞を組み入れた培養真皮が創傷治癒を促進することを基礎研究および臨床研究を通して明らかにした。
- (2) これまでの臨床研究では、創傷面に培養真皮を貼付した上に軟膏ガーゼをあてて包帯固定する方法であった。培養真皮の機能をさらに高める目的で軟膏ガーゼに代わる新規のカバー材の開発は重要な研究課題であった。
- (3) 同種培養真皮の研究開発と平行して上皮成長因子(EGF)含有創傷被覆材の研究を展開していた。そこで、この EGF 含有創傷被覆材を同種培養真皮のカバー材として使用することに着目して本研究をスタートした。

2. 研究の目的

- (1) 我々は、線維芽細胞を組み入れた培養真皮が種々の細胞成長因子を産生して創傷治癒を促進することを基礎研究および臨床研究を通して明らかにした。これまでの臨床研究では、創傷面に培養真皮を貼付した上に軟膏ガーゼをあてて包帯固定する方法であった。本研究では、培養真皮の機能をさらに高める目的で軟膏ガーゼの代わりに上皮成長因子(EGF)含有創傷被覆材を使用する治療法の確立を目的とした。
- (2) 本研究の最終段階として、EGF 含有創傷被覆材と同種培養真皮を一体化した新規の2層製培養真皮の開発に焦点を置いた。凍結保存した同種培養真皮は重症熱傷のように緊急性を要する場合に有利であるが、凍結/解凍/リンス操作による細胞へのダメージが問題となる。難治性皮膚潰瘍のように緊急性を要しない場合には、凍結・解凍・リンス操作を省くことができる。そこで、本研究では、難治性皮膚潰瘍の治療に使用する同種培養真皮の開発を目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 同種培養真皮を創傷面に適用する際にカバー材の選択が重要である。本研究ではヒアルロン酸とコラーゲンを基材とした EGF 含有創傷被覆材をカバー材として適用することにより培養真皮中の線維芽細胞の細胞成長因子産生能をどの程度高

めるかを検討する。ヒアルロン酸とコラーゲンの2層構造スポンジ状マトリックスにヒト線維芽細胞を播種して培養真皮を作成する。培養シャーレにステンレスネットの台を置き、その上に培養真皮を載せ、さらに EGF 含有創傷被覆材を載せる。培養液を培養真皮の上面に達するように添加して1週間培養する(創傷面モデル)。培養液に含まれる血管新生因子の量を ELISA により測定する。この実験系は、創傷面に培養真皮を貼付し、その上に EGF 含有創傷被覆材を貼付したモデルとなる。

- (2) 同種培養真皮と EGF 含有被覆材を一体化した2層型の理想的な培養真皮を製造する。上層は EGF を含有したヒアルロン酸とコラーゲンからなるスポンジ状シートであり、下層はヒアルロン酸スポンジ状シートに線維芽細胞を組み込んだコラーゲンゲルを複合させた培養真皮である。この培養真皮を用いて、創傷面モデルで血管新生因子の産生量を測定する。

4. 研究成果

- (1) ラットの熱傷創および糖尿病性マウの全層皮膚欠損創に対して EGF 含有創傷被覆材の治癒促進効果を確認した。これらの基礎研究と平行して、平成23年4月に当該被覆材の臨床研究の承認を受け[承認番号C倫10-656:難治性潰瘍、熱傷創に対する上皮成長因子含有ヒアルロン酸・コラーゲンスポンジの創傷治癒効果の検討]、北里大学病院形成外科において難治性皮膚潰瘍を対象とした臨床研究を行っており優れた治癒効果を確認した。この研究をさらに発展させて新規の創傷被覆材の開発を行った。
- (2) 同種培養真皮を培養液と空気の界面に設置し、その上に EGF 含有創傷被覆材を貼付した培養系において EGF の効果を調べた。被覆材中の EGF が同種培養真皮中の線維芽細胞に作用して血管新生因子の産生量を顕著に増加することを確認した。
- (3) 同種培養真皮と EGF 含有創傷被覆材を一体化した新規の培養真皮の研究開発を進めた。培養真皮は無血清培地中でも3~5日間保存できることを確認した。製造所から医療機関への輸送が可能であるため実践的な治療が可能となる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9件)

Shimizu N, Ishida D, Yamamoto A,

Kuroyanagi M, Kuroyanagi Y: Development of a functional wound dressing composed of hyaluronic acid spongy sheet containing bioactive components: evaluation of wound healing potential in animal tests. J Biomater Sci, in press. (査読有)

Kuroyanagi M, Yamamoto A, Shimizu N, Toi A, Inomata T, Takeda A, Kuroyanagi Y: Development of anti-adhesive spongy sheet composed of hyaluronic acid and collagen containing epidermal growth factor. J.Biomater Sci, in press. (査読有)

Kuroyanagi M, Yamamoto A, Shimizu N, Ishihara E, Ohno H, Takeda A, Kuroyanagi Y: Development of cultured dermal substitute composed of hyaluronic acid and collagen spongy sheet containing fibroblasts and epidermal growth factor. J.Biomater Sci, in press. (査読有)

Niiyama H, Kuroyanagi Y: Development of Novel Wound Dressing Composed of Hyaluronic Acid and Collagen Sponge Containing Epidermal Growth Factor and Vitamin C Derivative. J. Artificial Organs, 17: 81-87, 2014. (査読有)

Iijima E, Toyada D, Yamamoto A, Kuroyanagi M, Kuroyanagi Y: In vitro analysis of VEGF and HGF production by fibroblast in cultured dermal substitute combined with EGF-incorporating top dressing. Open Journal of Regenerative Medicine, 3: 13-21. 2014. (査読有)

Yamamoto A, Shimizu Nahoko, Kuroyanagi Y: Potential of wound dressing composed of hyaluronic acid containing epidermal growth factor to enhance cytokine production by fibroblasts. J. Artificial Organs, 16(4): 489-494. 2013. (査読有)

Yu A, Niiyama H, Kondo S, Yamamoto A, Suzuki R, Kuroyanagi Y: Wound dressing composed of hyaluronic acid and collagen containing EGF or bFGF: comparative culture study. J. Biomater Sci, 24(8): 1015-1026, 2013. (査読有)

Mineo A, Suzuki R, Kuroyanagi Y: Development of an artificial dermis composed of hyaluronic acid and collagen. J Biomater Sci, 24(6): 726-740, 2013. (査読有)

Sawa M, Kuroyanagi Y: Potential of cryopreserved cultured dermal substitute composed of hyaluronic acid and collagen

to release angiogenic cytokine. J Biomater Sci, 24(2):224-238, 2013. (査読有)

[学会発表](計 9件)

大野悠、黒柳美里、石原恵依子、清水菜穂子、山本昭子、黒柳能光: ヒアルロン酸とコラーゲンを基材とした被覆材積層型培養真皮の開発: 培養系評価。第13回日本再生医療学会総会(2014年3月4日~6日、国立京都国際会館、京都府)

稲吉一磨、黒柳美里、清水菜穂子、山本昭子、鈴木龍介、黒柳能光: 上皮成長因子あるいは塩基性線維芽細胞成長因子を含有した創傷被覆材の開発。第13回日本再生医療学会総会(2014年3月4日~6日、国立京都国際会館、京都府)

石田大貴、磯野恵理、清水菜穂子、鈴木龍介、黒柳能光: 分子間架橋/未架橋ヒアルロン酸を基材とした上皮成長因子含有創傷被覆材の開発: 動物実験評価。第13回日本再生医療学会総会(2014年3月4日~6日、国立京都国際会館、京都府)

稲吉一磨、黒柳美里、清水菜穂子、山本昭子、鈴木龍介、黒柳能光: 細胞成長因子含有創傷被覆材の培養系評価: 上皮成長因子と塩基性線維芽細胞成長因子の比較。第35回日本バイオマテリアル学会大会(2013年11月25日~26日、タワーホール船堀、東京都)

石原恵依子、黒柳美里、大野悠、清水菜穂子、山本昭子、黒柳能光: ヒアルロン酸とコラーゲンを基材とした被覆材積層型培養真皮の開発。第35回日本バイオマテリアル学会大会(2013年11月25日~26日、タワーホール船堀、東京都)

石田大貴、清水菜穂子、鈴木龍介、黒柳能光: 分子間架橋/未架橋ヒアルロン酸を基材とした上皮成長因子含有創傷被覆材の開発。第35回日本バイオマテリアル学会大会(2013年11月25日~26日、タワーホール船堀、東京都)

Nahoko Shimizu, Akiko Yamamoto, Yoshimitsu Kuroyanagi: Potential of a functional wound dressing composed of hyaluronic acid spongy sheet containing epidermal growth factor. 5th Congress of the International Federation for Artificial Organs (2013年9月27日~29日、Conference Center, Pacifico Yokohama, Japan)

Akiko Yamamoto, Nahoko Shimizu,

Miho Aoki, Hayato Niiyama,
Yoshimitsu Kuroyanagi: Potential of a
wound dressing composed of
hyaluronic acid containing bioactive
substances to enhance cytokine
production of fibroblast . The 4th Asian
Biomaterials Congress(2013 年 6 月 26
日 ~ 29 日, The Hong Kong University
of Science and Technology, Hong Kong)

Nahoko Shimizu, Akiko Yamamoto,
Yoshimitsu Kuroyanagi: Development
of a Functional Wound Dressing
Composed of Hyaluronic Acid Spongy
Sheet Containing Bioactive Substances .
The 4th Asian Biomaterials Congress
(2013 年 6 月 26 日 ~ 29 日, The Hong
Kong University of Science and
Technology, Hong Kong)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

黒柳 能光 (KUROYANAGI , Yoshimitsu)

研究者番号 : 8 0 1 7 0 1 4 0