

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592656

研究課題名(和文) 創傷治癒過程における炎症細胞の役割を探る—人工皮膚モデルを用いて—

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は今まで使用してきた人工皮膚材料にさらに組織工学的手法を用いて免疫細胞を加えヒト皮膚モデルとし、これに対して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て解明することである。

本研究では成立した再生医療法及び再生医療推進法に基づき、皮膚モデル作製プロトコルの検証並びに改訂を行った。新たな皮膚モデル作製プロトコルに基づき作製したヒト皮膚モデルにフラクショナルレーザーを照射して創傷を作成した後の創傷治癒過程について、その創傷治癒の変化についての新たな病理組織的・免疫組織化学的検索を行っている。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the behavior of inflammatory cells in the wound healing process in human skin using a new artificial skin model with macrophages. According to the new laws of regenerative medicine in Japan, we have revised our protocol for construction process of making artificial skin model.

After this revision, the monocytes changed to macrophages in the samples as the previous model. Also the number of macrophages increased and the size was larger after laser irradiation. The macrophages were activated both in the irradiated area and in the whole sample as well.

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

研究分野：再生医療

キーワード：ヒト皮膚モデル

### 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り、十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。

#### (2) 炎症細胞を導入したヒト皮膚モデルを用いて初期の創傷治癒過程を探る。

(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) 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。

(2)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。

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 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 °C、CO<sub>2</sub>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。

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。

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、通常の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。

##### 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。

##### 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。

##### 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。

##### 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)今までの成果を臨床応用するために人工皮膚モデルの改良を目的としてアミノ酸 1% と水 99%から構成される繊維構造を持ち、動物由来の材料や病原体が含まれず生体適合性に優れているペプチドハイドロゲルを担体として用いた培養皮膚を新たに開発して特許申請していたが、さらに人工真皮、皮膚作製において、合成担体であるペプチドハイドロゲルの合成の際にアミノ酸の種類と数を変えることにより細胞増殖抑制機能あるいは細胞分化抑制機能を付加できることを報告した。このことにより担体自体に機能を組み込んで細胞の遊走、誘導、増殖分化、機能発現を制御できることを示した。

(2)創傷治癒過程におけるメラノサイトの影響を評価するために、表皮内にメラノサイトを導入した。肝班皮膚モデルとして使用できるものの作製にも成功したため、これを特許申請した。

(3) 成立した再生医療等の安全性の確保等に関する法律 (以下「再生医療法」) 及び再生医療を国民が迅速かつ安全に受けられるようにするための施策の総合的な推進に関する

る法律（再生医療推進法）に基づき、皮膚モデル作製プロトコルの検証並びに改訂を行った。

(4) 上記皮膚モデル作製プロトコルに基づき作製したヒト皮膚モデルにフラクショナルレーザーを照射して創傷を作成した後の創傷治癒過程について、その創傷治癒の変化についての新たな病理組織的・免疫組織化学的検索を行った。

(5) これらの成果を臨床応用するために人工皮膚モデルの改良を目的として、アミノ酸 1%と水 99%から構成される繊維構造を持ち、動物由来の材料や病原体が含まれず生体適合性に優れているペプチドハイドロゲルを担体として用いた培養皮膚を新たに開発して、当研究に先だつ研究課題において特許申請していた。これに対して本年度特許が認められたので特許登録した。さらにこれを臨床応用する際の評価方法の検討を開始した。

#### 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 3件)

炭酸ガスフラクショナルレーザーを用いた瘢痕治療、加王文祥  
形成外科、査読有、58、印刷中、(2015)

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  
酒巻美保、加王文祥  
日本形成外科学会会誌、査読有、33、799-809、(2013)

組織工学を用いて生体外で再構成された3次元皮膚代替物の進歩、加王文祥  
昭和医学会雑誌、査読有、70、164-173、(2012)

##### 〔学会発表〕(計 4件)

加王文祥、CO2 フラクショナルレーザーの進化 より浅く、より深く、第56回日本形成外科学会学術集会、2013年4月4日、東京都千代田区

Kao B、Kadomatsu K、Okubo F、Watanabe A、Long term results and basic study of laser toning using the Q-switched Nd:YAG Laser for Melasma and Pigmented Lesion, The 21th congress of the International Society of Aesthetic Plastic Surgery, 2012年9月6日、スイス ジュネーブ

加王文祥、瘢痕治療 新たなるプロトコルの確立へ - 長期臨床結果に基づいて -、第55回日本形成外科学会学術集会、

2012年4月12日、東京都千代田区

加王文祥、ペプチドハイドロゲルを用いた培養真皮、培養皮膚の作製 ペプチドハイドロゲルを用いた培養真皮、培養皮膚の作製、第20回日本形成外科学会基礎学術集会、2011年10月7日、東京都新宿区

##### 〔図書〕(計 1件)

田畑泰彦、加王文祥、門松香一 他、メディカルドゥ、遺伝子医学MOOK 別冊 細胞の3次元組織化 - その最先端技術と材料技術、(2014)、372

##### 〔産業財産権〕

出願状況(計 3件)

名称：色素含有人工皮膚の製造方法

発明者：加王文祥

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2012-210539

出願年月日：2012年09月25日

国内外の別：国内

名称：色素含有人工皮膚

発明者：加王文祥

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2012-210539

出願年月日：2012年09月25日

国内外の別：国内

名称：色素斑疾患の治療方法を探索するための色素含有人工皮膚の使用

発明者：加王文祥

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2012-210539

出願年月日：2012年09月25日

国内外の別：国内

取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

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  
門松 香一 (KADOMATSU KOICHI)  
昭和大学・医学部・講師  
研究者番号：90317529

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：