

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：32622

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659837

研究課題名(和文) 肝斑の治療戦略を探る－肝斑培養皮膚モデルを用いて－

研究課題名(英文) Search for treatment strategies of melasma using an artificial skin model with melanocyte

研究代表者

渡辺 あずさ (WATANABE, AZUSA)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：20407571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はメラノサイトを導入したヒト皮膚モデルを組織工学、再生医療の手法を用いて改良して、肝斑の病態をシミュレーションしうる皮膚モデル作製に挑むことである。このモデルを用いて肝斑の治療法としてよく行われているレーザートニング、Intense Pulsed Light (IPL)治療、ハイドロキノン、レチノイン酸、トラネキサム酸、ビタミンCの作用機序を探り、またその至適治療条件のスクリーニングを行った。さらに表皮内のみメラノサイトを含む今までの肝斑皮膚モデルを改良して、新たに真皮層内にもメラノサイトが落ち込んだ深在性肝斑皮膚モデルの作製法を確立して知的財産権の申請を行った。

研究成果の概要(英文)：Melasma is an irregular brown or grayish-brown facial hypermelanosis, and the most common hyperpigmentation disorder in middle-aged women, especially those living in intense UV areas such as Asian and Pan-Pacific lesions. The etiology of melasma is not only related to photodamage but genetics and hormonal factors. Chemical peels, laser toning, and intense pulsed light (IPL) therapy have been used to treat melasma. This study challenged to create a novel artificial skin model using some methods of tissue engineering, which could simulate the behavior of human skin with melisma. The model was applied for three patents, model its own, process of manufacture and applications of the model. We also search for the best conditions and parameters of the treatment for malasma using this model. In conclusion, this new artificial skin model with melanocyte can mimic the behavior of human skin after treatments for melisma.

研究分野：再生医療

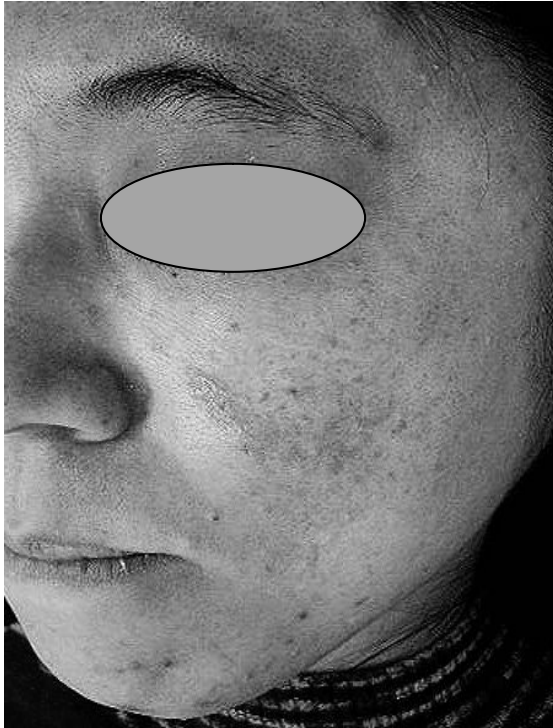
科研費の分科・細目：医歯薬学・形成外科学

キーワード：肝斑皮膚モデル

## 1. 研究開始当初の背景

本研究を申請するに至る典型的な肝斑の症例を提示する。

患者： 45歳、女性。妊娠、出産を契機に顔面のシミ、くすみが出現した。40歳頃から両側頬部を中心に不整形のシミの増強を認めた。



治療法：

トラネキサム酸、ビタミンC内服  
内服への不安  
レーザートニング、IPL治療  
自費診療であり経済的負担  
ハイドロキノン、レチノイン酸外用  
どの程度の濃度をどのくらいの期間必要か

患者の想い いつまでこの症状が続くのか。予防法は無いのか。現在受けている治療法は私に合っているのか。

医師の考え 結果的に改善しているが、何で効いているのかよくわからない。今の照射条件が適切なのか不安。現在行っている治療法の選択は正しいのか。研究のためには病理組織を採取したいが、肝斑治療目的でできている患者からの採取は難しい。

肝斑の治療を考える上で基礎的な研究、治療条件のスクリーニング、治療法同士の比較は重要であるが、これらを行うのに十分なモデルは存在していない。治療法開発の遅れにつながっている。

## 2. 研究の目的

### 肝斑皮膚モデルの作製

メラノサイトを導入したヒト皮膚モデルを組織工学、再生医療の手法を用いて改良して、肝斑の病態をシミュレーションしうる皮膚モデル作製に挑む。

### 各治療法の至適条件の検索

このモデルを用いて肝斑の治療法としてよく行われているレーザートニング、Intense Pulsed Light (IPL)治療、ハイドロキノン、レチノイン酸、トラネキサム酸、ビタミンCの作用機序を探り、またその至適治療条件のスクリーニングを行う。

これにより既存の治療法の効果の比較を行うことができるようになり、肝斑治療の標準的なプロトコルの確立、新たな治療法の開発、評価法の確立につなげる。

## 3. 研究の方法

(1).メラノサイト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。深在性肝斑のモデルを作製するときには、この時にメラノサイトも混合する。インキュベーター内で37℃、CO<sub>2</sub>濃度5%にて24時間培養してコラーゲンの固화를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とメラノサイト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って以下の実験に供用する。

(2).ヒト皮膚モデルで作用過程を調べる。

(1).で作製したヒト皮膚モデルに各種の肝斑治療を様々な条件で作用させたのち、培養を継続する。必要に応じて培養液内にも薬剤またはその阻害剤を付加して真皮層からの浸潤により持続的に作用させ、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メラノサイトの個数、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、メラノサイト、表皮角化細胞の遊走、増殖、分化を調べる。

#### 細胞数および産生メラニンの定量

まず各種治療法の標本へのダメージを検討する目的で標本内の細胞数、コラーゲン量を定量する。さらに治療法の効果を判定するためにメラノサイト数と各種メラニン量を定量し経時的な変化を調べる。

#### 遺伝子発現の精査

メラノサイトが活性化または抑制されたときに発現が認められる各種因子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

初年度は肝斑皮膚モデルの作製法を確立するために、今までに確立した表皮内にメラノサイトを含む肝斑皮膚モデルを改良して、新たに真皮層内にもメラノサイトが落ち込んだ深在性肝斑皮膚モデルの作製法を確立した。これについては知的財産権の申請を行った。

さらに MTT アッセイ法による標本内の細胞数の計測と各種コラーゲン量の定量、各種メラニンの定量法を本実験の評価方法として確立した。

同時に光干渉断層画像診断装置 (Optical Coherence Tomography: 以下 OCT) による評価法を確立することに注力したが、OCT 機器の解像度が十分ではなくさらなる改良が必要となっている。

また最終年度は改めてこれを用いた試料を作成しての追加実験を行うこととして、従来からの病理学的手法とは直接関係のない定量 PCR 法、RT-PCR 法による各種増殖因子、各種コラーゲンの遺伝子発現評価法を試みた。

#### 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 2 件)

加王 文祥、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、昭和医学会雑誌、査読有、71 巻、2011、391 - 402

酒巻美保 加王文祥、炭酸ガスフラクショナルレーザー照射直後超早期の組織再生に関する基礎研究 - 人工皮膚モデルを用いて -、日本形成外科学会誌、査読有、33 巻、2013、799 - 809

##### [学会発表](計 3 件)

加王 文祥、肝斑に対するレーザートニング治療とメラノサイト含有人工皮膚モデルを用いたその作用機序の病理、第 20 回日本形成外科学会基礎学術集会、2011 年 10 月 6 日、ハイアットリージェ

ンシー東京(東京都)

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 09 月 04 日 ~ 2012 年 09 月 08 日、スイス ジュネーブ

加王 文祥、レーザートニング治療の長期経過、第 8 回日本美容抗加齢医学会、2013 年 11 月 24 日、横浜シンポジア (神奈川県)

##### [図書](計 1 件)

加王文祥、他、メディカルドゥ社、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：特許願 2012-210539

出願年月日：24 年 9 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：特許願 2012-210542

出願年月日：24 年 9 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：特許願 2012-210543

出願年月日：24 年 9 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：

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

渡辺 あずさ (WATANABE, Azusa)  
昭和大学・医学部・助教  
研究者番号：20407571

(2) 研究分担者

加王 文祥 (KAO, Bunsho)  
昭和大学・医学部・准教授  
研究者番号：10327893

大久保 文雄 (OKUBO, Fumio)  
昭和大学・医学部・教授  
研究者番号：30223762

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：