

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）研究報告書
細胞組織工学を応用した培養皮膚の開発に関する研究
分担研究者 古江増隆 九州大学・皮膚科教授

研究要旨：同種培養真皮の最も大きな特徴はその材料自身（コラーゲン＋ヒアルロン酸）の創傷治癒促進効果と真皮内に播種された同種線維芽細胞が持続的に血管内皮成長因子などの各種成長因子やサイトカインを放出できることにある。これによって、創部周囲からの血管新生を促し良好な肉芽増生を可能とし、創傷の早期治癒が望める可能性を有している。そこで我々は、北里大学が開発した同種培養真皮を難治性皮膚潰瘍患者に適用し、その有用性を評価した。

A. 研究目的

当科における下腿潰瘍・膠原病性皮膚潰瘍などの難治性皮膚潰瘍に対して、北里大学人工皮膚研究開発センターで作成された同種培養真皮を適用し、速やかな創傷治癒を目指す。

B. 研究方法

北里大学人工皮膚研究開発センターで作成された同種培養真皮は、ドライアイス梱包の後、九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野に搬送された。この同種培養真皮を同研究室で-80℃に保存、用時解凍した。患者創部へ移植する際には、皮膚欠損用被覆材を用いて同種培養真皮を保護し、その後定法に従った創部保護と管理を行った。

なお、本研究は九州大学倫理委員会の承認のもと、患者ならびに患者家族に十分な説明と同意を得た上で実施した。

C. 研究結果

静脈瘤症候群に伴う皮膚潰瘍 5 例、膠原病による皮膚潰瘍 2 例、の計 7 例に同種培養真皮を適用した。全例において適用約 7～10 日後には肉芽が増生し、良好な植皮床となった。植皮せずに経過した例では、その後比較的速やかに創部の上皮化が進行した。

D. 考察

難治性の皮膚潰瘍は肉芽形成が不良であるため創傷治癒が遅延し、治療に難渋することが多い。今回我々は同種培養真皮を用いることで、

良好な肉芽の増生が得られ、その後の創部管理を容易にした。いずれも従来の治療では効果が無く、難治性の経過をとっていたが、同種培養真皮により速やかに移植床が形成され植皮可能となり、その生着は極めて良好であった。また、植皮しなかった例においても、特に強皮症による指の潰瘍 1 例に完全上皮化が認められた。

従来の創傷被覆材に比べ、同種培養真皮は極めて有効である。これは同種培養真皮の材料自身（コラーゲン＋ヒアルロン酸）の創傷治癒促進効果と同種線維芽細胞から産生される血管内皮成長因子などのサイトカインによる創傷治癒促進効果の相乗効果と考える。以上の結果より、同種培養真皮の有用性が推察される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yoichi Moroi et al: Clinical evaluation of allogeneic dermal substitutes for intractable skin ulcers.
Eur. J. Dermatol. 14: 172-176, 2004.

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

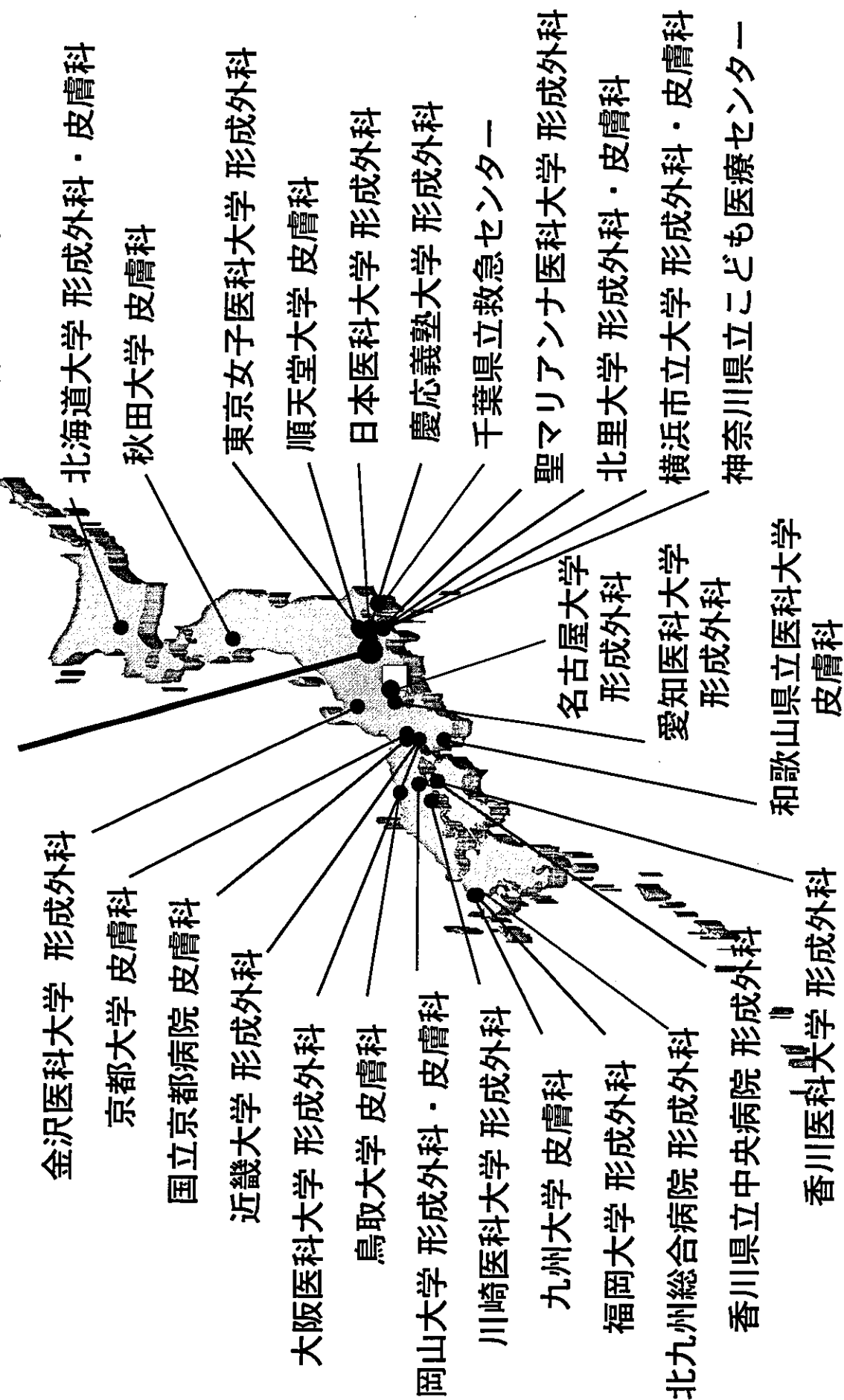
1. 特許申請

なし

平成12年度～16年度
同種培養真皮多施設臨床研究結果

厚生労働科学再生医療ミレニアムプロジェクト: 皮膚部門

北里大学 医療衛生学部人工皮膚研究開発センター



多施設臨床研症例分類

(平成12年度～16年度集計)

共同研究施設	有効症例	1	2	3	4	5	6	7	8	9
北海道大形成外科	15	0	2	4	0	8	1	0	0	0
北海道大学皮膚科	4	1	1	0	0	1	0	1	0	0
秋田大皮膚科	23	3	1	1	0	12	2	0	0	4
慶應義塾大形成外科	8	0	0	0	0	1	1	6	0	0
日本医大形成外科	19	0	0	1	0	18	0	0	0	0
東京女子医形成外科	25	9	0	0	0	12	3	1	0	0
順天堂大皮膚科	18	0	2	0	0	13	0	1	2	0
聖マリ医大形成外科	20	7	2	1	0	6	3	1	0	0
北里大形成外科	16	3	0	0	3	9	0	1	0	0
北里大皮膚科	4	0	0	0	0	4	0	0	0	0
横市大形成外科	17	2	2	0	0	13	0	0	0	0
横市大皮膚科	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
名古屋大形成外科	13	0	0	0	0	11	2	0	0	0
愛知医大形成外科	14	0	0	0	0	2	0	0	0	12
金沢医大形成外科	17	5	0	12	0	0	0	0	0	0
京都大皮膚科	18	0	0	0	0	18	0	0	0	0
和歌山医大皮膚科	15	0	0	7	0	7	1	0	0	0
近畿大形成外科	15	9	3	1	0	1	1	0	0	0
大阪医大形成外科	21	1	5	0	0	7	2	0	6	0
川崎医大形成外科	19	4	2	1	0	12	0	0	0	0
岡山大皮膚科	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0
鳥取大皮膚科	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0
香川医大形成外科	4	0	1	1	0	2	0	0	0	0
福岡大形成外科	20	14	1	4	0	1	0	0	0	0
九州大皮膚科	37	1	0	1	0	18	9	0	1	7
千葉県救急センター	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0
湘南鎌倉病院形成外科	4	1	0	3	0	0	0	0	0	0
国立京都病院皮膚科	4	0	1	0	0	3	0	0	0	0
香川県中央病形成外科	16	2	0	9	0	5	0	0	0	0
北九州総合病形成外科	5	0	2	1	0	0	2	0	0	0
合計	404	62	27	49	3	193	27	11	9	23
比率%		15.3	6.7	12.1	0.8	47.8	6.7	2.7	2.2	5.7

1：深達性2度熱傷

5：難治性皮膚欠損壊死組織切除創

2：3度熱傷壊死組織切除創

6：外傷性皮膚欠損創

3：高倍率自家メッシュグラフトの被覆
分層自家パッチグラフトの被覆

7：色素性母斑切除創

8：熱傷等瘢痕切除創

4：採皮創

9：腫瘍切除創

多施設臨床研究総合評価

(平成12年度～16年度集計)

共同研究施設	有効症例	極めて有用	有用である	普通	有用でない	参考症例
北海道大形成外科	15	13	1	0	1	0
北海道大皮膚科	4	1	2	1	0	0
秋田大皮膚科	23	14	7	2	0	0
慶應義塾大形成	8	3	5	0	0	0
日本医大形成外科	19	8	5	6	0	0
東京女子医形成	25	24	0	0	1	1
順天堂大皮膚科	18	14	3	1	0	0
聖マリ医大形成	20	11	9	0	0	3
北里大形成外科	16	13	3	0	0	0
北里大皮膚科	4	3	1	0	0	0
横浜市大形成外科	17	15	2	0	0	0
横浜市大皮膚科	6	1	5	0	0	1
名古屋大形成外科	13	3	9	1	0	0
愛知医大形成外科	14	11	2	1	0	0
金沢医大形成外科	17	3	8	6	0	0
京都大皮膚科	18	10	7	1	0	0
和歌山医大皮膚科	15	8	7	0	0	1
近畿大形成外科	15	7	6	1	1	0
大阪医大形成外科	21	15	6	0	0	0
川崎医大形成外科	19	8	10	1	0	0
岡山大皮膚科	3	1	2	0	0	0
鳥取大皮膚科	2	0	2	0	0	1
香川医大形成外科	4	2	2	0	0	0
福岡大形成外科	20	12	8	0	0	1
九州大皮膚科	37	27	5	5	0	1
千葉県救急センター	2	0	2	0	0	0
湘南鎌倉病院形成	4	3	1	0	0	0
国立京都病院皮膚	4	4	0	0	0	0
香川県中央病形成	16	14	1	1	0	1
北九州総合病形成	5	5	0	0	0	1
合計	404	253	121	27	3	11
比率%		62.6	30.0	6.7	0.7	—

全症例数：415 有効症例数：404 (97.3%) 参考症例数：11 (2.7%)

多施設臨床研究安全評価

(平成12年度～16年度集計)

共同研究施設	有効症例	A	B	C	D
北海道大形成外科	15	13	1	0	1
北海道大皮膚科	4	3	0	0	1
秋田大皮膚科	23	19	4	0	0
慶應義塾大形成外科	8	8	0	0	0
日本医大形成外科	19	14	5	0	0
東京女子医形成外科	25	25	0	0	0
順天堂大皮膚科	18	18	0	0	0
聖マリ医大形成外科	20	20	0	0	0
北里大形成外科	16	16	0	0	0
北里大皮膚科	4	3	1	0	0
横市大形成外科	17	16	1	0	0
横市大皮膚科	6	5	1	0	0
名古屋大形成外科	13	13	0	0	0
愛知医大形成外科	14	13	0	1	0
金沢医大形成外科	17	14	3	0	0
京都大皮膚科	18	15	2	1	0
和歌山医大皮膚	15	15	0	0	0
近畿大形成外科	15	12	2	0	1
大阪医大形成外科	21	18	3	0	0
川崎医大形成外科	19	17	2	0	0
岡山大皮膚科	3	3	0	0	0
鳥取大皮膚科	2	2	0	0	0
香川医大形成外科	4	4	0	0	0
福岡大形成外科	20	16	4	0	0
九州大皮膚科	37	32	4	1	0
千葉県救急センター	2	0	2	0	0
湘南鎌倉病院形成	4	4	0	0	0
国立京都病院皮膚科	4	4	0	0	0
香川県中央病形成	16	14	1	1	0
北九州総合病形成	5	5	0	0	0
合計	404	361	36	4	3
比率%		89.4	8.9	1.0	0.7

A 安全（不具合なし）

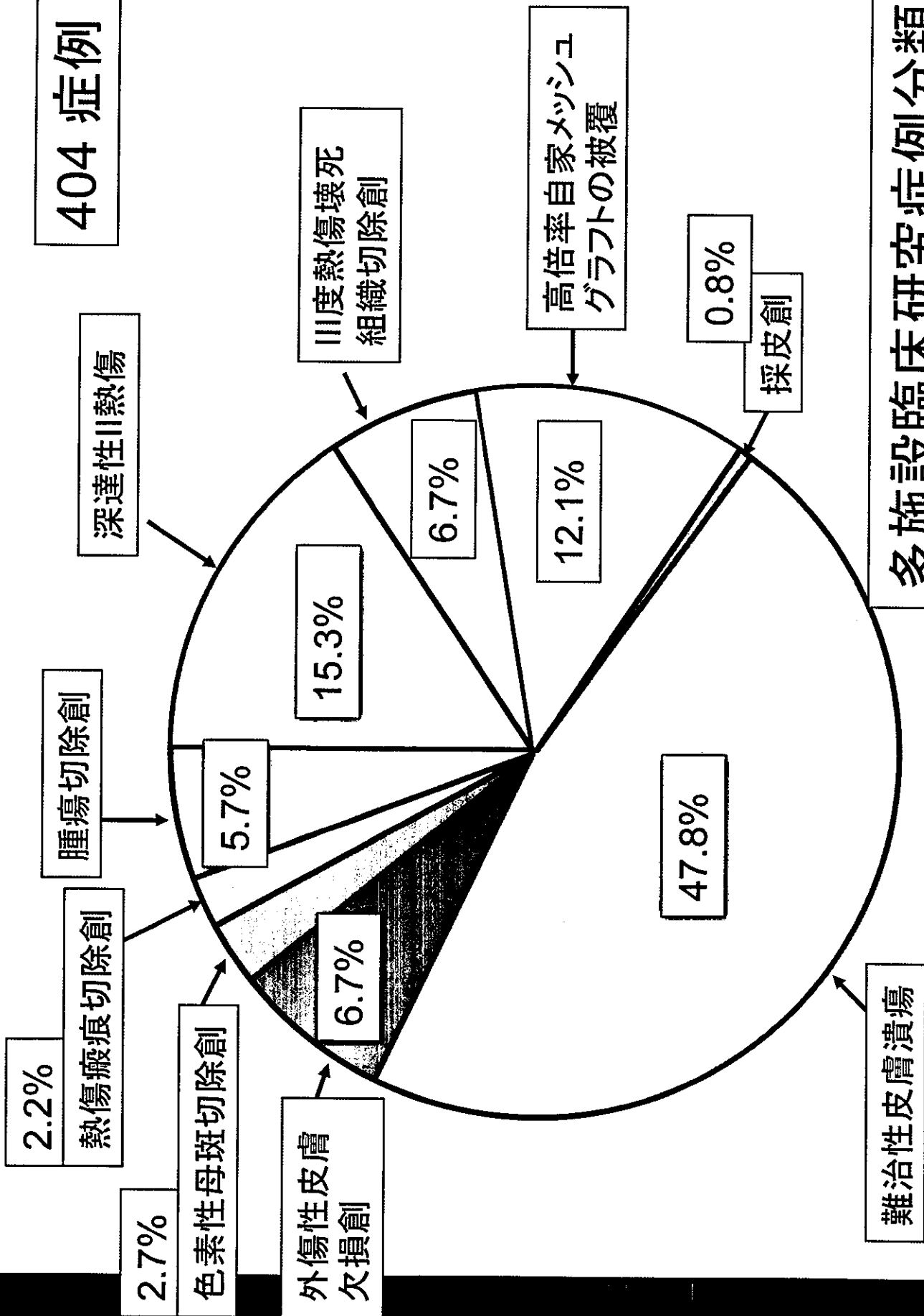
B ほぼ安全（軽度の不具合で特別な処置を必要とせず継続使用可能）

C 安全に疑問あり（重度の不具合が発生し特別な処置を必要とした）

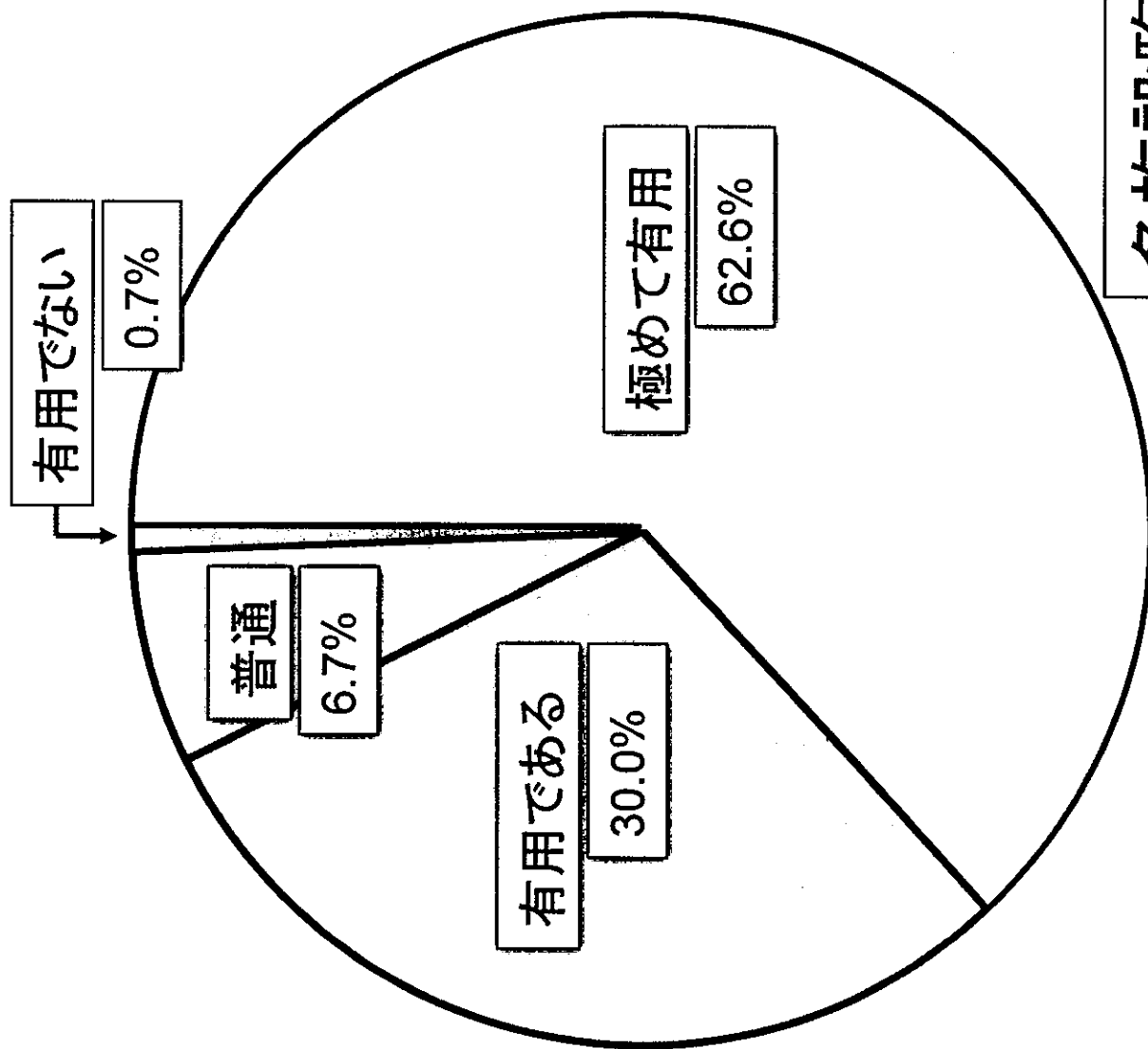
D 安全でない（有害事象発現 合併症／症状悪化）

404 症例

多施設臨床研究症例分類



多施設臨床研究総合評価



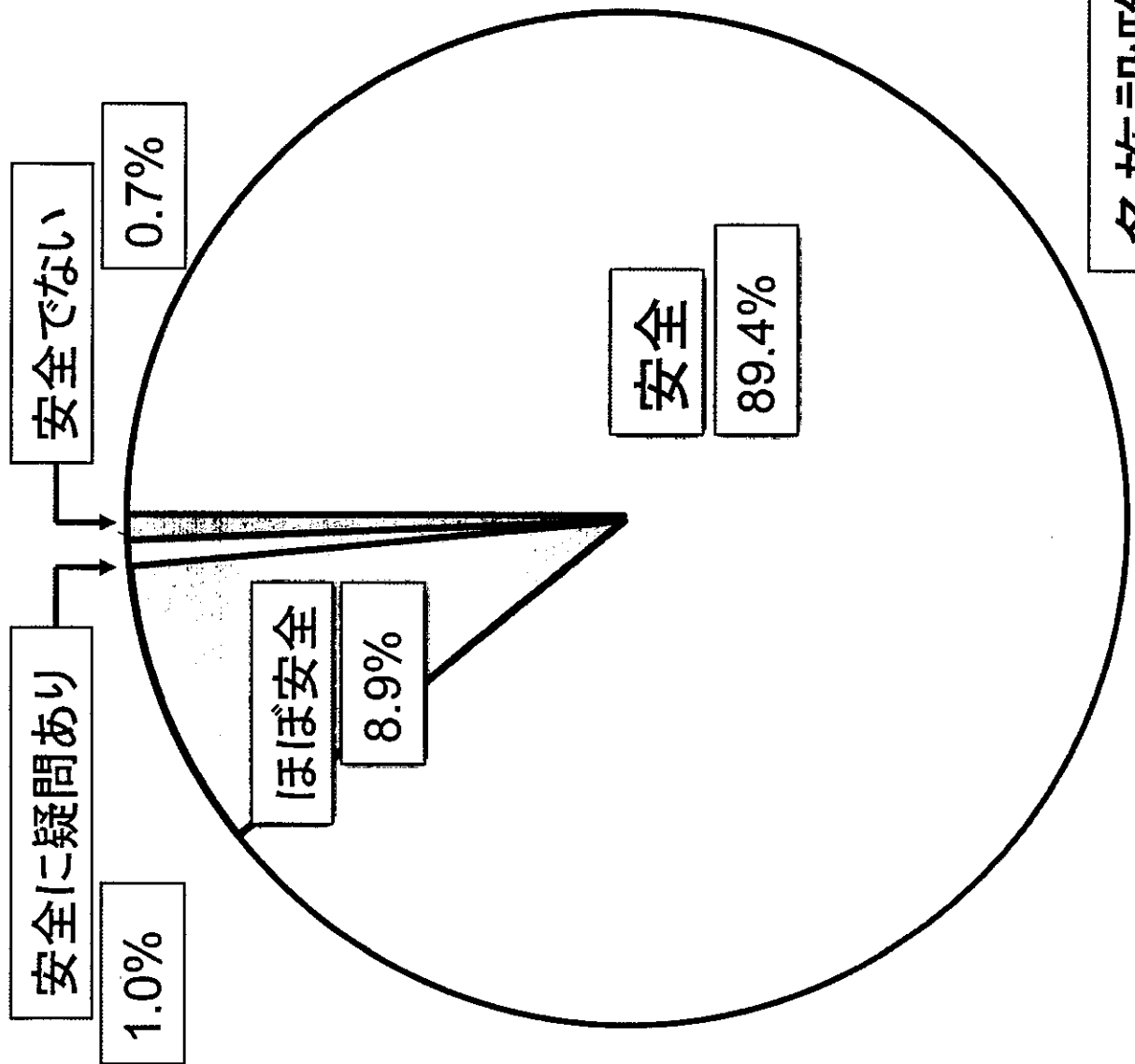
全症例数
415

有効症例数
404 (97.3%)

参考症例数
11 (2.7%)

多施設臨床研究安全評価

有効症例数
404



IV. 研究成果の刊行物・別刷

皮膚の再生医療

黒 柳 能 光

小児外科 第36巻 第11号 別刷

(2004年11月)

東京医学社

〒113-0033 東京都文京区本郷 3-35-4
電話 03(3811)4119(代表)

■ 特集 わが国における再生医療研究の現況

皮膚の再生医療

黒 柳 能 光*

はじめに

皮膚は、外的な要因によって損傷を受けたとき、速やかに創傷部位を閉鎖して組織の機能を回復しようとする「自然治癒力」を備えている。この創傷治癒の過程は、厳密には「再生」と「修復」に分類される。再生とは、失った組織や器官を完全に元の状態に再現することである。浅い擦り傷のように基底膜が温存されている場合は、角化細胞の分裂により表皮は“再生”される。一方、真皮層まで達する損傷を受けた場合には、線維芽細胞が結合組織の主要成分であるコラーゲンを急速に産生する。しかし、産生されたコラーゲンの量と配列は、本来の結合組織中と同一ではなく、完全に元の状態が再現されたとはいえない。その結果、組織は瘢痕を伴って“修復”される。

上述した皮膚再生能力を最大限に発揮できる環境をつくるのが皮膚の再生医療である。人工皮膚は、「創傷被覆材」と「培養皮膚代替物」に大別される。前者は、適切な材料を利用して創傷面を被覆することにより皮膚再生能力を発揮できる環境をつくることを目的としている。後者は、細胞を利用して皮膚再生能力を最大限に発揮できる環境をつくることを目的としている。厳密には、患者自身の角化細胞や線維芽細胞を利用して永久生着を目的として使用する“自家培養皮膚代替物”と他人由来の角化細胞や線維芽細胞を利用して、細胞から産生される生理活性物質により創傷治癒を促進する目的で使用する“同種培養皮膚代替物”に分類する。本稿では、組織工学の技術を用いて作製される「培養皮膚代替物」について述べる。

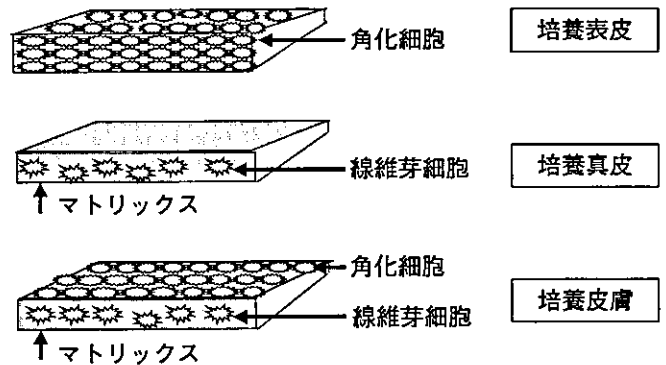


図 1 組織工学を応用した培養皮膚代替物の種類

I. 培養皮膚代替物の種類と機能

角化細胞をフラスコ内で培養して表皮のシートを作製する技術が1979年に、Greenらにより発見された。それ以来、細胞を使用した皮膚再生の研究が展開され、再生医療の一翼を担う研究分野となった。とくに、患者自身の角化細胞から作製した培養表皮の使用により広範囲重症熱傷患者の救命に成功したことが、研究展開に拍車をかけることになった。その後、真皮中に存在する線維芽細胞も研究対象となり、種々のタイプの培養皮膚代替物の研究開発が進められてきた。より厳密な分類として、角化細胞を利用したものを“培養表皮”，線維芽細胞を利用したものを“培養真皮”，角化細胞と線維芽細胞を利用したものを“培養皮膚”とよぶ(図1)。そして、患者自身の細胞を使用したものには“自家”を付け、他人の細胞を使用したものには“同種”を付ける。

1. 自家培養表皮：広範囲重症熱傷の治療

Greenらにより報告された培養表皮は、マウス由来の線維芽細胞である3T3細胞をfeeder layer(細胞支持層)として用いる培養系において

* 北里大学医療衛生学部人工皮膚研究開発センター
(〒228-8555 相模原市北里1-15-1)

表皮から採取した角化細胞を急速に培養して薄いシート状に作製するものである。この技術は、米国において企業化された。熱傷センターから輸送された広範囲重症熱傷患者の正常部分の小さな皮膚から角化細胞を採取して、3~4週間で自家培養表皮を製造して患者に供給するシステムが整備された。当初は、自家植皮が不可能な広範囲重症熱傷患者の救命を目的として脚光を浴びた。しかし、自家培養表皮を製造する3~4週間、いかにして広範囲重症熱傷患者の生存を保証するかといった問題が現実的な障壁となり、自家培養表皮の普及は当初の予想を大きく下回っている。

2. 自家培養真皮：小児の熱傷瘢痕や巨大色素性母斑の治療

線維芽細胞は、角化細胞のように重層化して自発的にシート状になる特性をもたないため、適切な細胞の「足場」すなわちマトリックスを利用する必要がある。熱傷瘢痕や巨大色素性母斑の治療として、患部を切除した創傷面に適切な真皮様組織（移植床）を形成し、この上に、患者自身の正常な部分から切除した薄い皮膚を移植する。この移植床の形成として、患者自身の線維芽細胞を適切なマトリックスに組み込んだ自家培養真皮が有効と考えられる。現在、北里大学人工皮膚研究開発センターで製造された自家培養真皮を使用して、幾つかの施設において臨床試験が進められている。この自家培養真皮は、ヒアルロン酸とアテロコラーゲンの2層構造のスポンジに患者自身の線維芽細胞を播種して培養したものである。とくに、小児の熱傷瘢痕や巨大色素性母斑の治療を対象とし、繰り返しの手術に対応できるように、患者自身の線維芽細胞をマスターセルとして凍結保存し、必要に応じて細胞を解凍して培養し、自家培養真皮を製造するシステムを整えている。

3. 自家培養皮膚：試験的応用段階

Hansbroughら²⁾により開発された自家培養皮膚は、グリコサミノグリカン少量含有したコラーゲンスポンジの下層面に線維芽細胞を播種し、上層面に角化細胞を播種して培養したものであり、1989年に臨床研究の報告がある。

黒柳ら³⁾の開発した自家培養皮膚は、貫通孔を有するコラーゲンのスポンジにコラーゲンのゲル

を塗布したものをマトリックスとして、この下層面に線維芽細胞を播種し、上層面に角化細胞を播種したものであり、1993年に臨床研究の報告がある。自家培養皮膚の製造は、培養皮膚代替物の中で、最も高度な技術を必要とし、短期間の製造が困難であるため、緊急性を要する重症熱傷に適用することはできない。むしろ、待機的な治療が可能な熱傷瘢痕切除創や巨大色素性母斑切除創の治療に適している。しかしながら、現状では、整容的な観点から判断して自家分層植皮に優るとはいえない。そこで、マトリックスの改良を含め、さらなる研究が期待されている。

4. 同種培養表皮：試験的応用段階

Greenらにより開発された技術を用いて、他人由来の角化細胞から作成された同種培養表皮は、生理活性物質を産生放出するので生物学的な被覆材として試験的に臨床使用されているが、浅い皮膚欠損創への適用に限られるため、従来の創傷被覆材と比較して大差がないことから普及はしていない。

5. 同種培養真皮：広範囲重症熱傷や難治性皮膚潰瘍の治療

線維芽細胞は、コラーゲンやフィブロネクチンなどの創傷治癒に重要な細胞外マトリックスを産生するほかに、血管新生を促進する生理活性物質を産生放出する。そこで、マトリックスに線維芽細胞を組み込んだ同種培養真皮が注目され、創傷治癒促進を目的とした生物学的な被覆材として臨床応用されている。

すでに2種類の同種培養真皮が米国で製品化された。そのひとつは、生体内吸収性の合成高分子（グリコール酸と乳酸の共重合体）からなるネット上に線維芽細胞を播種して培養したものである。他のひとつは、シリコン膜にナイロンネットを貼付した創傷被覆材のナイロンネット側に線維芽細胞を播種して培養したものである。しかしながら、細胞の足場となる材料自身に創傷治癒促進効果が期待できないため、これらの製品の普及は当初の予想を大きく下回っている。

これに対して、黒柳ら⁴⁾は、細胞の足場となる材料自身が創傷治癒促進効果をもつことが重要と考え、ヒアルロン酸とアテロコラーゲンのスポン

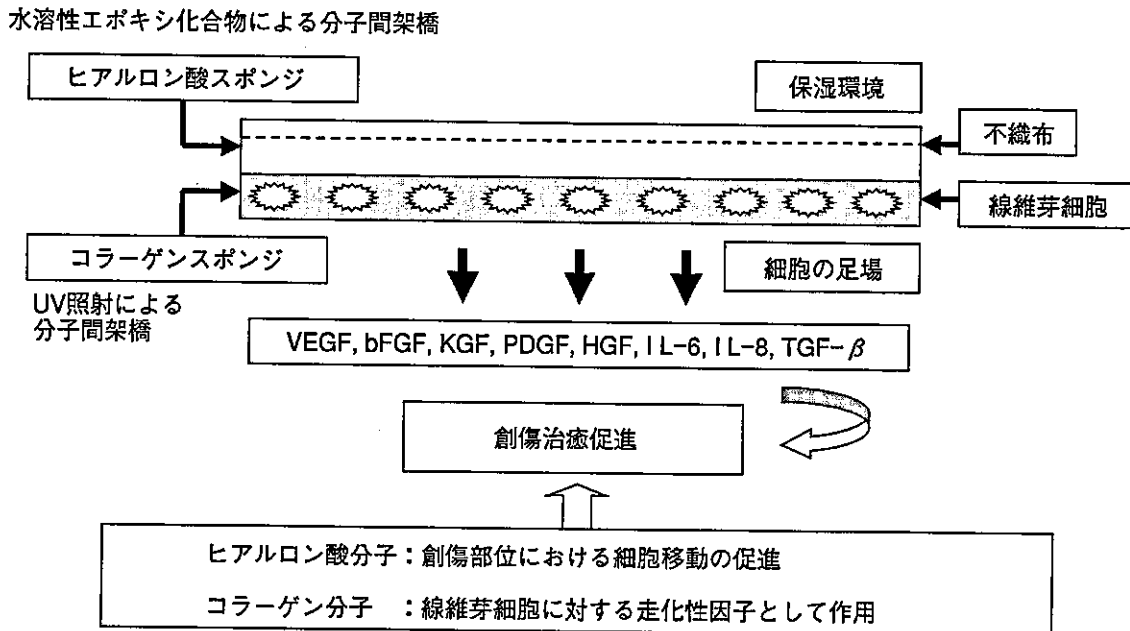


図2 ヒアルロン酸とアテロコラーゲンからなるスポンジ状マトリックスに線維芽細胞を組み入れた同種培養真皮の機能

ジをマトリックスとした同種培養真皮を開発し、全国規模の多施設臨床研究を推進している。

6. 同種培養皮膚：難治性皮膚潰瘍の治療

Bellら⁶⁾により開発された同種培養真皮は、コラーゲンを溶解した培養液に線維芽細胞を浮遊させて、これをゲル化させ、この上に角化細胞を播種して培養したものである。当初は、自家培養皮膚として研究が進められていたが、その後、同種培養皮膚として米国で製品化され、難治性皮膚潰瘍の治療として使用されている。しかしながら、製造コストが高いため、この製品の普及は当初の予想を大きく下回っている。

II. 厚生労働科学再生医療ミレニアムプロジェクト：同種培養真皮の開発

北里大学人工皮膚研究開発センターで製造した同種培養真皮を使用して、全国30の医療施設において多施設臨床研究が推進され、350症例の臨床実績がある。同種培養真皮の優れた性能は、マトリックスを構成する材料自身による創傷治癒促進効果および線維芽細胞から産生される種々の生理活性物質による創傷治癒促進効果に基づく。そこで、ヒアルロン酸とアテロコラーゲンの2層構造のスポンジをマトリックスとした新規の同種培養

真皮を開発した(図2, 3)。ヒアルロン酸は細胞の移動を促進し、コラーゲンおよびその分解生成物であるペプチドは線維芽細胞に対して走化性因子として作用する。線維芽細胞は、創傷治癒に重要な作用をもつVEGF, bFGF, KGF, PDGF, HGF, IL-6, IL-8, TGF- β を産生する。このほかに、創傷治癒に重要な作用をもつフィブロネクチンも産生する。

おわりに

培養皮膚代替物の開発は、自家分層植皮という最強の競争相手に対して、どのような位置付けになるかを明確にすることが重要である。全層皮膚欠損創に自家培養表皮を適用した場合は、生着しても真皮組織が欠損しているため、整容的には満足できない。これに対して、自家培養真皮は、良好な移植床を形成することが可能であり、極薄い自家分層植皮の適用により整容的に満足できる結果が期待できる。とくに、小児の熱傷瘢痕や巨大色素性母斑の治療においては、成人になるまでに繰り返しの手術が必要となるケースが多いため、本人の線維芽細胞をマスターセルとして凍結保存しておき、必要に応じて解凍して培養し、自家培養真皮を提供できることは大きなメリットであ

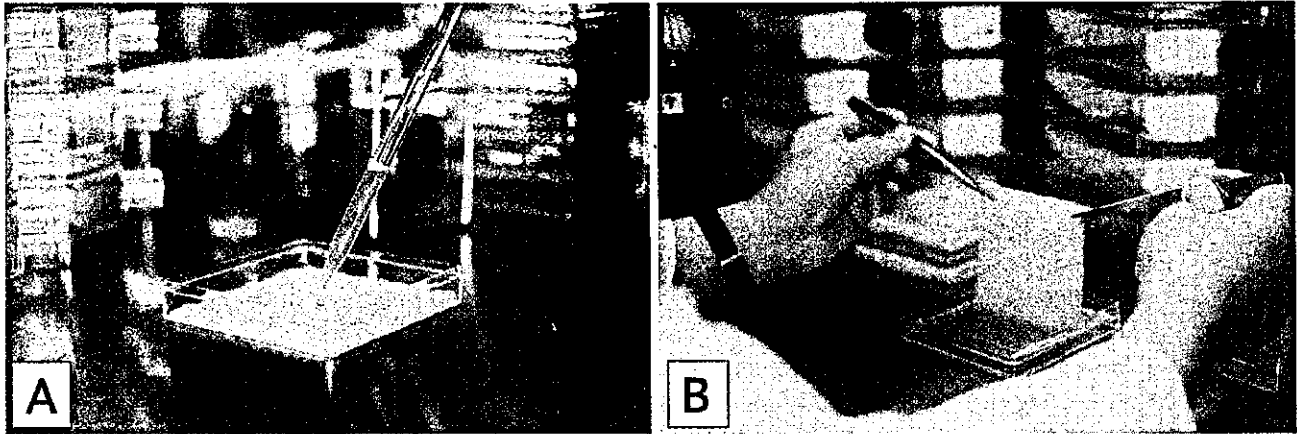


図 3 同種培養真皮の製造
マトリックス上に線維芽細胞の浮遊液を滴下 (A), 翌日培養液を加えて1週間培養 (B)。

る。最強の競争相手である自家分層植皮を補完する位置付けとして実用性は高いと考えられる。皮膚の構造に類似した自家培養皮膚は、皮膚分野における組織工学の最終ゴールであるが、自家分層植皮より優れた臨床結果を得ることが難しいため、臨床応用が本格的に展開されていない。一方、角化細胞と線維芽細胞は免疫拒絶の弱い細胞であるため、拒絶されるまでに、生理活性物質を産生して創傷治癒を促進させることが可能である。とくに、線維芽細胞は、創傷治癒に重要な作用をもつ VEGF, bFGF, KGF, PDGF, HGF, IL-6, IL-8, TGF- β , フィブロネクチンを産生する。同種培養真皮は、このような特性を最大限に発現することができるため、現実的な皮膚の再生医療が可能であり、最も普及すると考えられる。

文 献

- 1) Green H, Kehinde O, Thomas J : Growth of cultured human epidermal cells into multiple epith-

elia suitable for grafting. Proc Natl Acad Sci USA 76 : 5665-5668, 1979

- 2) Hansbrough JF, Boyce ST, Cooper ML, et al : Burn wound closure with cultured autologous keratinocytes and fibroblasts attached to a collagen-glycosaminoglycan substrate. JAMA 262 : 2125-2130, 1989
- 3) Kuroyanagi Y, Kenmochi M, Ishihara S, et al : A cultured skin substitute composed of fibroblasts and keratinocytes with a collagen matrix ; preliminary results of clinical trials. Ann Plast Surg 31 : 340-349, 1993
- 4) 黒柳能光, 久保健太郎, 松井宏道, 他 : 同種培養真皮の製造と供給システム (厚生科学再生医療ミレニアムプロジェクト). 熱傷 29 : 28-38, 2003
- 5) Kuroyanagi Y, Kubo K, Matsui H, et al : Establishment of banking system for allogeneic cultured dermal substitute. Artificial Organs 28 : 13-21, 2004
- 6) Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, et al : Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. Science 211 : 1052-1054, 1981

Regenerative Medicine for the Skin

YOSHIMITSU KUROYANAGI

R & D Center for Artificial Skin, School of Allied Health Sciences, Kitasato University

Key words : Keratinocyte, Fibroblast, Cultured epidermal substitute, Cultured dermal substitute, Cultured skin substitute.

Jpn. J. Pediatr. Surg., 36(11) ; 1430~1434, 2004.

Tissue engineering is moving rapidly from fundamental research to commercial applications. The first product is an autologous cultured epidermal substitute. Other representative products are allogeneic cultured dermal substitute and allogeneic cultured skin substitute. Surgical closure with auto-skin grafting is the gold standard for treatment of victims with extensive deep skin defects. Therefore, tissue engineers have to develop cultured skin substitutes, taking into account the successful application of auto-skin grafting, Kuroyanagi developed an allogeneic cultured dermal substitute, which was composed of a two-layered spongy matrix of hyaluronic acid and atelocollagen containing fibroblasts. This product is able to release a number of biologically active substances that are necessary for wound healing. A multi-center clinical study on the use of this product has been performed at 30 hospitals across Japan as the Regenerating Medical Millennium Project of the Ministry of Health, Labor and Welfare.

* * *

小児外科 バックナンバー

第35卷	第9号 (2003年9月)	特集	水腎症 (腎盂尿管移行部狭窄による)	(2,700円)
	第10号 (2003年10月)	特集	小児救急医療の現状と問題点	(2,700円)
	第11号 (2003年11月)	特集	小児の感染症	(2,700円)
	第12号 (2003年12月)	特集	吐血をきたす疾患の病態と治療	(2,700円)
第36卷	第1号 (2004年1月)	特集	小児悪性腫瘍の治療成績はどこまで改善したか	(2,700円)
	第2号 (2004年2月)	特集	重症心身障害児に対する外科的治療の実際	(2,700円)
	第3号 (2004年3月)	特集	小児疾患における画像診断の進め方	(2,700円)
	第4号 (2004年4月)	特集	脾・胆管合流異常のトピックス	(2,700円)
	第5号 (2004年5月)	特集	小児呼吸器外科の新たな展開	(2,700円)
	第6号 (2004年6月)	特集	肝臓, 小腸移植の最前線	(2,700円)
	第7号 (2004年7月)	特集	小児科・小児外科領域における臨床試験	(2,700円)
	第8号 (2004年8月)	特集	役に立つ材料, 器具, 装置あれこれ	(2,700円)
	第9号 (2004年9月)	特集	小児の排尿障害	(2,700円)
	第10号 (2004年10月)	特集	こんなときどうすればよいの?	(2,700円)

上記のご注文ならびに在庫照会は下記までご連絡下さい。定価は(本体価格+税)です。

東京医学社(販売部) 〒101-0051 東京都千代田区神田神保町2-20-13 Y's コーラルビル TEL 03-3265-3551(代)

FAX 03-3265-2750

Guest Editorial

Studies on Regenerative Medicine in Japan

Tissue engineering is moving rapidly from fundamental research to commercial applications. Structural tissues, such as skin, cornea and cartilage, will most likely continue to dominate the first wave of success stories, thanks to their relative simplicity in structure as well as in cell source. The U.S. Food and Drug Administration has already approved a living skin product. The next tissue to be widely used in humans will most likely be cartilage for orthopedic and craniofacial applications. Regenerating Medical Millennium Projects of the Ministry of Health, Labor and Welfare have started in Japan since 2001. These projects cover many fields including skin, cornea, bone, cartilage, blood vessels, nerves and bone marrow.

Regenerative medicine is based on tissue engineering, a new field of science. In general, the tissue-engineered products include three prime constituents, i.e., cells, cell growth factors and materials (often referred to as scaffolds). In the first approach, cell growth factors, such as basic fibroblasts growth factor (bFGF), endothelial growth factor (VEGF) and bone morphogenic protein (BMP), are applied into a site of damaged tissues, together with a proper material to make it possible to release in a sustained fashion. In some cases, these factors are applied directly into a site of damaged tissues. These factors cause the patient's own cells to migrate into the desired area, turn into the correct type of cell and regenerate the lost tissue.

In the second approach, the usual procedure entails the proliferation of isolated cells in culture. These cells are seeded on or within a scaffold, such as biodegradable synthetic polymer or collagen, the protein that forms the natural support scaffolding of most tissues. As well as delivering the cells, the scaffold both creates and maintains a space for the formation of new tissue and guides its structural development. In the case of bone, bio-ceramic is used as a scaffold to maintain adequate mechanical strength. In this approach, the patient receives autologous cells that have been harvested previously and incorporated into a three-dimensional

scaffold. The entire structure of cells combined with a scaffold is transplanted into the lost area of tissue, where the cells replicate, reorganize and form new tissue. When a biodegradable material is used as a scaffold, the scaffolding materials break down, leaving only a completely natural final product, a neo-organ in the body. In some cases, cell growth factors were preloaded into a scaffold to promote the formation of a neo-organ. According to this technique, allogeneic cells can also be combined with a scaffold. Although these cells are rejected gradually in the immune system, they are able to release some types of cell growth factors, and regenerate a damaged tissue as quickly as possible.

Of course, the holy grail of tissue engineering remains complete internal organs such as liver, pancreas, and kidney. A number of investigators have demonstrated that new liver-like tissues can be created in animals from transplanted liver cells, but the entire function of the organ has not yet been replicated. Some investigators have been attempting the implantation of encapsulated pancreatic islets isolated from pigs, the clusters of cells that contain the insulin-secreting components, to restore the proper pattern of insulin release. Some investigators are using kidney cells in animal tests to make a neo-organ that possesses the filtering capability of the kidney. Even the heart is a target for regenerative medicine. Some researchers have been trying the application of cardiac muscle cells derived from bone marrow to repair the damaged area of heart. It will likely take scientists ten to twenty years to learn how to grow an entire heart, but tissues such as heart valves and blood vessels may be available sooner.

The tissue-engineered products used in clinical applications are composed of human cells isolated from own tissue or a donor's tissue. The successful application is dependent on the cell source. The three products skin, cornea and cartilage can be prepared by using their cultured cells. On the contrary, other sophisticated organs with various functions should be prepared by using cells derived from bone

marrow or embryonic stem cells. This is why the study of these organs has remained at the fundamental step. The practical use of these organs depends on how to proliferate these cells in culture after isolation from bone marrow or the mass of embryonic stem cells.

This review includes studies on regenerative medicine in Japan, covering various organs, i.e., skin, cornea, cartilage, bone, blood vessels, liver, pancreas, kidney and heart.

Prof. Yoshimitsu Kuroyanagi
Regenerative Tissue Engineering
Graduate School of Medical Sciences, Kitasato
University Kitasato 1-15-1, Sagamihara, Kanagawa
228-8555, Japan
E-mail: kuroyana@cc.ahs.kitasato-u.ac.jp

Establishment of Banking System for Allogeneic Cultured Dermal Substitute

Yoshimitsu Kuroyanagi, Kentaro Kubo, Hiromich Matsui, Hyun Jung Kim,
Shinichiro Numari, Yho Mabuchi, and Shizuko Kagawa

R&D Center for Artificial Skin, School of Allied Health Sciences, Kitasato University, Kanagawa, Japan

Abstract: Allogeneic cultured dermal substitute (CDS) was prepared by culturing fibroblasts on a two-layered spongy matrix of hyaluronic acid (HA) and atelo-collagen (Col). Allogeneic CDS can be cryopreserved and transported to other hospitals in a frozen state. Vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), hepatocyte growth factor (HGF), platelet derived growth factor (PDGF)-AA, transforming growth factor (TGF)- β 1, keratinocytes growth factor (KGF), interleukin (IL)-6 and IL-8 were contained in the culture medium which was used in preparing CDS over a cultivation period of one week (fresh CDS culture medium sample). After thawing a cryopreserved CDS, the CDS was recultured in a culture medium for one week. VEGF, bFGF, HGF, TGF- β 1 and IL-8 were contained in the culture medium which was used in reculturing CDS for one week (cryopreserved

CDS culture medium sample), although some cytokines were detected at a lower level than those before freezing. This finding suggests that the cryopreserved CDS retains its ability to release these cytokines. Clinical research on allogeneic CDS, which was newly developed at the R & D Center for Artificial Skin of Kitasato University, has been carried out in medical centers across Japan with the support of the Millennium Project of the Ministry of Health, Labor and Welfare. It was demonstrated that the allogeneic CDS functions as an excellent cell therapy for intractable skin ulcers as well as burn injuries. The spongy matrix itself, as well as the cytokines released from the allogeneic CDS, seemed to be beneficial for the treatment of intractable skin defect. **Key Words:** Cultured dermal substitute—Fibroblasts—Hyaluronic acid—Collagen—Cell growth factor—Tissue engineering.

A variety of skin substitutes have been developed (Table 1 and Fig. 1), and the following are commercially available in the U.S.A.: autologous cultured epidermal substitute (CES) composed of stratified keratinocytes (1–5) (Epicel); allogeneic cultured dermal substitute (CDS) composed of fibroblasts on a scaffold (6–11) (Dermagraft and Trans Cyte); and allogeneic cultured skin substitute (CSS) composed of keratinocytes and fibroblasts on a scaffold (12–16) (Apligraf). Allogeneic CDS and CSS require an appropriate matrix, i.e., a scaffold for fibroblasts and/or keratinocytes. Recently, however, the use of these allogeneic products has declined, possibly due to problems in material design.

Kuroyanagi and colleagues developed an allogeneic CDS composed of a spongy collagen containing fibroblasts (17–20). The efficacy of this allogeneic CDS on wound healing has been studied in animal tests and in preliminary clinical trials. On the basis of this technique, an advanced version of CDS was developed through the cultivation of fibroblasts on a two-layered spongy matrix of HA and Col (21–25). HA has a high capacity for hydration, resulting in a moist environment at the wound site. HA molecules

TABLE 1. *Type and function of tissue-engineered skin products*

- | |
|---|
| (1) Autologous products: permanent coverage |
| Autologous cultured epidermal substitute* |
| Autologous cultured dermal substitute |
| Autologous cultured skin substitute |
| (2) Allogeneic products: cell therapy for wound healing |
| Allogeneic cultured epidermal substitute |
| Allogeneic cultured dermal substitute* |
| Allogeneic cultured skin substitute* |

* U.S.A. products.

Received September 2003.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Yoshimitsu Kuroyanagi, Regenerative Tissue Engineering, Medical Sciences of Graduate School, Kitasato University, Kitasato 1-15-1, Sagami-hara, Kanagawa 228-8555, Japan. E-mail: kuroyana@ahs.kitasato-u.ac.jp

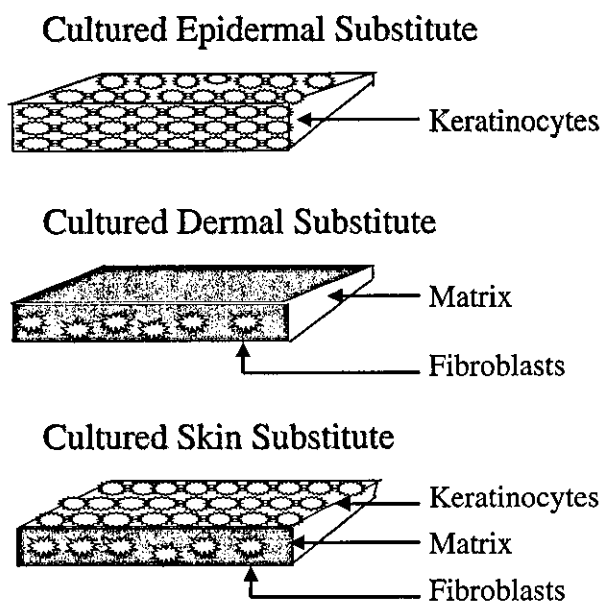


FIG. 1. Structure of tissue-engineered skin products.

play a critical role in several cellular functions, such as migration and proliferation, by promoting adhesion and disadhesion on the tissue substrate (26). Collagen and collagen-derived peptides act as chemoattractants for fibroblasts *in vitro*, and may have similar activity *in vivo* (27). The fibroblasts incorporated in this CDS can release cytokines and extracellular matrix (ECM) that are necessary for wound healing. This CDS is designed to promote wound healing by synergic effect of both the fibroblasts and the matrix.

Since April 2001, the R&D Center for Artificial Skin of Kitasato University has been the heart of the Regenerating Medical Millennium Project (skin department) of the Ministry of Health, Labor and Welfare. This center has established a banking system for cryopreserved allogeneic CDS, and distributed it to hospitals in a frozen state (28). A multicenter clinical study on the use of allogeneic CDS was performed in thirty hospitals across Japan. The results of a multicenter clinical study suggest that this type of allogeneic CDS can effectively promote the healing of full-thickness severe skin defects, such as chronic ulcers and burn injuries (29,30).

ESTABLISHMENT OF CELL BANKING

Cell banking was established by the procedure described in previous articles (22,23). A small piece of skin was obtained from patients younger than 1 year old during surgical excision of excrescence. These patients were free from infectious viruses such

as HBV, HCV, HIV and HTLV, and also negative on the treponema pallidum hemagglutination test (TPHA). All procedures were in compliance with the ethical guidelines of St. Marianna Medical College. The sterilized piece of skin was immersed in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing dispase for 20 h at 4°C. After this enzymatic treatment, the epidermis was mechanically separated from the dermis. The dermis was minced and then treated with 0.5% collagenase in DMEM supplemented with 1% fetal bovine serum (FBS) for 2 h at 37°C to obtain the cellular suspension. Fibroblasts isolated by enzymatic treatment were cultivated successively in a culture medium to establish cell banking. The cultured fibroblasts were suspended in a cryo-tube containing DMEM supplemented with 10% DMSO and 20% FBS and then cryopreserved in liquid nitrogen according to a conventional procedure. The cells were checked to be negative for viruses including HBV, HCV, HIV, HTLV and Parvovirus.

PREPARATION OF CULTURED DERMAL SUBSTITUTE (CDS)

The CDS was prepared using a method described in previous articles (22,23). Prior to seeding of fibroblasts, the two-layered sponge of HA and Col (10.5 cm × 9.5 cm) was immersed in 50 mL of culture medium in a polystyrene dish (11 cm × 10 cm) to hydrate the sponge (Fig. 2). Excess culture medium was carefully removed from the dish by suction. The fibroblasts obtained from successive cultivation of the cryopreserved cells were seeded onto the two-layered sponge by adding 5 mL of cellular suspension dropwise onto the collagen surface of the sponge. The number of fibroblasts on the two-layered sponge was adjusted to 1.0×10^5 cells/cm². The cell-seeded sponge was kept in an incubator in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C overnight, followed by the addition of 50 mL of cultured medium and culturing for one week (Fig. 3). The fibroblasts used in production of CDS were checked for mycoplasma and confirmed to be negative. The culture medium used in the production of CDS was checked for bacteria and confirmed to be negative.

CRYOPRESERVING AND THAWING OF CDS

Cryopreserving and thawing of CDS was performed according to the method described in previous articles (22,23). The CDS was turned upside down in a polystyrene dish and the culture medium was replaced with 30 mL of DMEM supplemented with 10% DMSO and 20% FBS. The CDS was frozen