

200500/89A

厚生労働省科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

重度熱傷、皮膚潰瘍等に対する新規超微細多孔質薄膜を活用した培養皮膚再生技術の開発

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

平成 18 (2006) 年 3 月

主任研究者 マクミラン ジェームス
McMillan, James R.

目次

I. 総括研究報告

重度熱傷、皮膚潰瘍等に対する新規超微細多孔質薄膜を活用した 培養皮膚再生技術の開発	1
主任研究者 McMillan, James R. (北海道大学)	

II. 分担研究報告

1. 人工皮膚の作成に関する研究	7
主任研究者 McMillan, James R. (北海道大学)	
2. 除放剤の作成に関する研究	13
分担研究者 田畑泰彦 (京都大学)	
3. 人工膜の作成に関する研究	17
分担研究者 下村政嗣 (北海道大学)	
4. 人工皮膚を用いた動物実験に関する研究	7
分担研究者 清水忠道 (北海道大学)	
5. 人工皮膚を用いた細胞培養、および表皮幹細胞分離に関する研究	7
分担研究者 西村栄美 (北海道大学)	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	29
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	39
-----------------------	----

I. 総括研究報告

厚生労働省科学研究費補助金
(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)
総括研究報告書

重度熱傷、皮膚潰瘍等に対する新規超微細多孔質薄膜を活用した培養
皮膚再生技術の開発

主任研究者 McMillan, James R.

北海道大学・創成科学共同研究機構・皮膚再生医学

学術研究員 (特任教授)

研究要旨

本研究の目的は、新規人工膜、新規徐放剤を用いた人工皮膚の作成である。これまでの人工皮膚は長期生着は困難であり、また ES 細胞などからの皮膚構成細胞分化誘導も実用レベルに達していない。本研究において用いる人工膜は、ハニカム構造を呈し、細胞へのダメージが小さく、膜内の小孔に徐放剤を蓄えることができる。この人工膜を用いることで、分化誘導因子の解明ならびに、より長期生着可能な人工膜の作成ができると考える。

平成 17 年度の研究において、1) 多孔質薄膜の最適化、2) 新規徐放剤の作製、3) 細胞、培養条件の最適条件をそれぞれ検討し、研究成果に基づく人工皮膚を作製した。さらに作製した人工皮膚をマウス皮膚創傷部に移植し、創傷治癒に対する効果を検討した。

A 研究目的

本研究の目的は、新しい発想に基づく皮膚再生の開発を行い、同時に創傷治療に応用することである。再生組織工学の分野において、いわゆる人工皮膚は同種表皮細胞を人工膜上に播種したものをを用いていたが、この人工皮膚は創傷部に移植しても長期の生着をすることはできず、比較的短期間しか生存できない。また幹細胞研究の分野において、皮膚構成細胞への分化を誘導する因子の解明は十分でなく、かつ分化しえた細胞が生物学的に機能しえるか検討もされていない。

本研究において、全く新しい人工膜 (多孔質薄膜) を用いる。ハニカム構造を呈する多孔質薄膜は細胞接着時に、細胞と接する面積が小さいため、細胞へのダメージも小さい。かつ、その構造ゆえに膜内の小孔に徐放剤をはじめとする様々な極小物質を蓄えることができる。この膜は細胞を、特に 3 次元的に培養できることを明らかにしており、今回の検討においても最適なものとする。加えて、新規徐放剤を作成し、至適因子を持続的に供給することで、より生体に近い機能を獲得させる。現在まで様々な創傷促進効果のあるサイトカイ、成長因子が明らかになっている。しかしながら、創傷治癒、すなわち皮膚再生過

程において、時間的・空間的に必要とされる因子が異なり、それゆえに単一因子での創傷治癒効果には限界があった。また再生医学の両極的に重要な領域、すなわち幹細胞、前駆細胞を対象とする細胞の研究領域と、バイオエンジニアリングと呼ばれる人工生体物質を対象とする領域、それぞれを融合することでより革新的でかつ速やかな臨床応用ができる実用性の高い結果が得られる点である。

B 研究方法

①多孔質薄膜の最適化

高湿度環境下で、生分解性高分子の非水溶性有機溶媒の希薄溶液を直径約10cmのガラスシャーレ上にキャストすることで多孔質薄膜の作製を行った。光学顕微鏡を用いてキャストした高分子溶液表面のその場観察を行った。溶液濃度、キャスト量などを変えることで多孔質薄膜の3次元構造制御を行った。さらに、膜の孔の形に異方性を付与するために、膜の両端を固定して延伸する装置を作製した。

②新規徐放剤の作製

ゼラチン水溶液に濃度の異なるグルタルアルデヒド水溶液を加え、40℃で12時間の条件で、ゼラチンを化学架橋した。その後、室温で、12時間、ハイドロゲルをグリシン水溶液中に浸漬することで未反応のアルデヒド基を化学的にブロックした。架橋ゼラチンハイドロゲルを蒸留水で洗浄後、凍結乾燥を行った。凍結乾燥ハイドロゲルへ徐放したい成長因子水溶液を滴下、4℃、12時間、放置することで、ハイドロゲルを成長因子水溶液で膨潤させ、成長因子含浸ゼラチンハイドロゲルを得た。グルタルアルデヒド濃度を変化させることによって、ハイドロゲルの架橋程度を変化させた。次に、同様の方法で、放射性ヨードラベルした成長因子をハイドロゲル内に含浸させた。これをマウスの背部皮下に埋入、継時的に皮下に残存する放射活性を測定することによって、成長因子の *in vivo* での徐放性を調べた。

③細胞、培養条件の最適条件の検討

上記の多孔質薄膜の最適化に加え、それぞれの条件のもと、培養細胞や、培養条件を検討した。

④研究成果に基づく人工皮膚を作製、および創傷治癒に対する効果の検討

上記のように作製した人工皮膚を用いて、マウス皮膚創傷部に被覆し、創傷治癒への関与も検討した。

⑤作製人工皮膚の具体的応用として、角化異常マウスに対しての応用を検討する。角化異常のモデルマウス (ABCA12 ノックアウトマウス) を作製する。

C 研究結果

①多孔質薄膜の最適化

溶液キャスト後のパターン形成過程は、溶媒の蒸発と溶媒表面への水の凝縮により、濃度、温度、粘度など様々な物理パラメーターが経時的に変化する複雑な非平衡系である。多孔質薄膜形成過程の観察から、孔の鑄型となる微小水滴は、経時的に成長することが分かったので、孔径制御には、溶媒蒸発時間が効果的なパラメーターであることが示唆された。事実、孔径は溶媒の蒸発時間に比例して大きくなった。孔の貫通、非貫通は、キャスト量とキャスト面積を一定にした場合、溶液の濃度変化で制御できた。また、様々な生分解性速度を有する高分子で同様の膜構造制御ができた。孔径3ミクロンの膜を用いた場合、細胞増殖や細胞外マトリックス産生量が向上することが分かった。

②新規徐放剤の作製

ゼラチンの架橋時におけるグルタルアルデヒドの濃度を増加させることで得られたハイドロゲルの架橋程度は増加した。また、架橋程度の増加にともなって、ハイドロゲルの生体内での分解が遅くなることがわかった。成長因子として、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) とトランスフォーミング増殖因子

(TGF) - β 1 を用いた。これらの成長因子のハイドロゲルからの *in vivo* における徐放試験を行ったところ、それぞれの成長因子がハイドロゲルから徐放されること、また、その徐放期間がハイドロゲルの分解期間によって、コントロールできることがわかった。

③細胞、培養条件の最適条件の検討

上記の多孔質薄膜の最適化に加え、それぞれの条件のもと、培養細胞や、培養条件を検討し、それぞれの最適条件も明らかにした。

④研究成果に基づく人工皮膚を作製、および創傷治癒に対する効果の検討

上記のように作製した人工皮膚を用いて、創傷治癒への関与も検討した。具体的には、ヒト由来細胞から作製した人工皮膚を、免疫不全マウス背部に被覆し、創傷治癒過程への影響を検討した。人工皮膚被覆創傷は、有意に創傷治癒が促進した。

⑤角化異常のモデルマウス (ABCA12 ノックアウトマウス) の作製を委託している。

D 考察

本年度の研究で、多孔質薄膜作製の最適条件を検討し、多孔質膜を用いた人工皮膚を作製した。孔径3ミクロンの膜を用いた場合、細胞増殖や細胞外マトリックス産生量が向上する理由を明らかにするために、細胞の膜表面への接着点解析やシグナル伝達について調べる予定である。人工皮膚組織再生に必要とされる上皮細胞と真皮細胞からなる3次元組織形成には、孔の貫通した膜の孔径、膜厚の最適化が必要である。今後は、孔径3ミクロン以下の孔貫通膜の製膜条件 (基板温度、溶液の厚み、蒸発時間、溶媒の種類) 検討を行う。また、現在までの成果を、より臨床応用に近づけるべく、人工膜の孔径や孔の貫通度が及ぼす細胞増殖や機能発現への影響の詳細な検討も引き続き行い、創傷治癒

促進効果のより高い人工膜の作製を行う。さらに、ヒトの皮膚組織と同様に細胞が配向した人工皮膚を作製するために、延伸多孔質薄膜の表面と裏面での上皮細胞と真皮細胞の3次元共培養を行う。これにより生体の皮膚組織に近い上皮-真皮の多層構造の実現を目指す。

加えて徐放剤に関しては、ゼラチンハイドロゲルから生理活性をもつbFGFとTGF- β 1の徐放を実験的に確認していた。本年度の研究によって、それらの成長因子がハイドロゲルの作製条件によって、異なる時間パターンで徐放化されることがわかった。また、人工膜との組み合わせを考へて、フィルム、粒子状などの異なる形状をもつハイドロゲルの作製条件も確立した。今後は、これらのハイドロゲルを利用して、人工膜との組み合わせ技術、方法論についての検討を行うとともに、成長因子の選択と創傷治癒促進について最適化を行っていく予定である。また、人工膜の孔径およびハイドロゲルからの成長因子の徐放が細胞増殖に与える影響についても検討を加えることによって、臨床応用を目指した人工膜の作製を行う。

さらに、多孔質薄膜、および細胞・培養条件の最適条件をそれぞれ検討し、研究成果に基づく人工皮膚を作製した。さらに作製した人工皮膚をマウス皮膚創傷部に移植し、創傷治癒を促進することを明らかにした。今後は現在までの成果を、より臨床応用に近づけるべく、創傷治癒促進効果のより高い人工膜の作製を行う。あわせて、人工膜の孔径が及ぼす細胞への影響の詳細な検討も引き続き行う。

E 結語

今回の研究で、新規多孔質薄膜および新規徐放剤を用いた人工皮膚を作成した。加えてこの人工膜は創傷治癒を促進させることを明らかにした。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

H 知的財産の出願・登録状況

1. 硬組織再生治療に用い得るハニカム状多孔質体 (特願 2006-18260)
2. ハニカム状多孔質体の製造方法 (特願 2005-115623)
2. 細胞増殖抑制法および医療用具 (特願 2005-162044)

3. 腫瘍細胞転移抑制材料および腫瘍細胞増殖抑制材料、並びに医療器具（特願 2005-133320）
4. 間葉系幹細胞から軟骨細胞を調整する方法（特願 2005-143162）
5. 皮膚再生用の細胞シートを作製するための構造体およびその利用（特願 2005-188948）
6. 細胞増殖抑制フィルムおよび医療用具（特願 2005-162043）
7. 積層フィルムおよび医療用具（特願 2005-162043）
8. 人工血管（特願 2005-281268）
9. 微生物セルロースからなるハニカム状多孔質体とその製造方法（特願 2005-156882）
10. 新規複合体とその製造方法（特願 2005-266439）
11. パターン化ハニカム状多孔質体の製造方法（特願 2005-303898）
12. パターニングされた物質の製造方法（特願 2005-309601）
13. 微細構造体および微細構造体の製造方法（特願 2005-321717）
14. 細胞の分化/増殖を制御するための基材（特願 2005-058236）
15. 孔の孤立したハニカムフィルム（特願 2005-052009）

Ⅱ. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金
(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)
分担研究報告書

人工皮膚に関する研究

主任研究者 McMillan, James R.

北海道大学・創成科学共同研究機構・皮膚再生医学
学術研究員 (特任教授)

人工皮膚を用いた動物実験に関する研究

分担研究者 清水忠道

北海道大学・北海道大学病院・皮膚科学
講師

人工皮膚を用いた細胞培養、および表皮幹細胞分離に関する研究

分担研究者 西村栄美

北海道大学・創成科学共同研究機構・幹細胞生物学
学術研究員 (特任助教授)

研究要旨

本研究の目的は、新規人工膜、新規徐放剤を用いた人工皮膚の作成である。これまでの人工皮膚は長期生着は困難であり、また ES 細胞などからの皮膚構成細胞分化誘導も実用レベルに達していない。本研究において用いる人工膜は、ハニカム構造を呈し、細胞へのダメージが小さく、膜内の小孔に徐放剤を蓄えることができる。この人工膜を用いることで、分化誘導因子の解明ならびに、より長期生着可能な人工膜の作成ができると考える。

平成 17 年度の研究において、1) 多孔質薄膜の最適化、2) 細胞、培養条件の最適条件をそれぞれ検討し、研究成果に基づく人工皮膚を作製した。さらに作製した人工皮膚をマウス皮膚創傷部に移植し、創傷治癒に対する効果を検討した。

A 目的

本研究の目的は、新しい発想に基づく皮膚再生の開発を行い、同時に創傷治療に応用することである。再生組織工学の分野において、いわゆる人工皮膚は同種表皮細胞を人工膜上に播種したものをを用いていたが、この人工皮膚は創傷部に移植しても長期の生着をすることはできず、比較的短期間しか生存できない。また幹細胞研究の分野において、皮膚構成細胞への分化を誘導する因子の

解明は十分でなく、かつ分化しえた細胞が生物学的に機能しえるか検討もされていない。

本研究において、全く新しい人工膜（多孔質薄膜）を用いる。ハニカム構造を呈する多孔質薄膜は細胞接着時に、細胞と接する面積が小さいため、細胞へのダメージも小さい。かつ、その構造ゆえに膜内の小孔に徐放剤をはじめとする様々な極小物質を蓄えることができる。この膜は細胞を、特に3次元的に培養できることを明らかにしており、今回の検討においても最適なものとする。また再生医学の両極的に重要な領域、すなわち幹細胞、前駆細胞を対象とする細胞の研究領域と、バイオエンジニアリングと呼ばれる人工生体物質を対象とする領域、それぞれを融合することでより革新的でかつ速やかな臨床応用ができる実用性の高い結果が得られる点である

B 研究方法

①多孔質薄膜の最適化

人工皮膚の細胞成分である表皮細胞および線維芽細胞を種々の多孔質薄膜上に播種、培養し、それぞれの膜における増殖能、接着能、遊走能を検討した。形態学的に電子顕微鏡を用いた微細構造も検討した。

②細胞、培養条件の最適条件の検討

上記の多孔質薄膜の最適化に加え、それぞれの条件のもと、培養細胞や、培養条件を検討した。

③研究成果に基づく人工皮膚を作製、および創傷治癒に対する効果の検討

上記のように作製した人工皮膚を用いて、マウス皮膚創傷部に被覆し、創傷治癒への関与も検討した。

④作製人工皮膚の具体的応用として、角化異常マウスに対しての応用を検討する。角化異常のモデルマウス（ABCA12 ノックアウトマウス）を作製する。

C 研究結果

①多孔質薄膜の最適化

人工皮膚の細胞成分である表皮細胞および線維芽細胞を様々な孔径の多孔質薄膜上に接着し、増殖できた。しかし、ある孔径以上であると特に線維芽細胞は孔内を移動し膜を通過してしまう結果となった。この条件に加え、細胞接着面積などの因子の影響から、ある特定の孔径で、最も増殖し、かつ分化・成熟することを明らかにした。

②細胞、培養条件の最適条件の検討

上記の多孔質薄膜の最適化に加え、それぞれの条件のもと、培養細胞や、培養条件を検討し、それぞれの最適条件も明らかにした。

③研究成果に基づく人工皮膚を作製、および創傷治癒に対する効果の検討

上記のように作製した人工皮膚を用いて、創傷治癒への関与も検討した。具

体的には、ヒト由来細胞から作製した人工皮膚を、免疫不全マウス背部に被覆し、創傷治癒過程への影響を検討した。人工皮膚被覆創傷は、有意に創傷治癒が促進した。

④角化異常のモデルマウス (ABCA12 ノックアウトマウス) の作製を委託している。

D 考察

本年度の研究で、多孔質薄膜、および細胞・培養条件の最適条件をそれぞれ検討し、研究成果に基づく人工皮膚を作製した。さらに作製した人工皮膚をマウス皮膚創傷部に移植し、創傷治癒を促進することを明らかにした。今後は現在までの成果を、より臨床応用に近づけるべく、創傷治癒促進効果のより高い人工膜の作製を行う。あわせて、人工膜の孔径が及ぼす細胞への影響の詳細な検討も引き続き行う。

E 結論

今回の研究で、新規多孔質薄膜を用いた人工皮膚を作成した。加えてこの人工膜は創傷治癒を促進させることを明らかにした。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

McMillan, James R.

1. McMillan JR, Akiyama M, Nakamura H, Shimizu H.

Colocalization of multiple laminin isoforms predominantly beneath hemidesmosomes in the upper lamina densa of the epidermal basement membrane.

J Histochem Cytochem (in press)

2. Akiyama M, Sugiyama-Nakagiri Y, Sakai K, McMillan JR, Goto M, Arita K, Tsuji-Abe Y, Tabata N, Matsuoka K, Sasaki R, Sawamura D, Shimizu H. Mutations in lipid transporter ABCA12 in harlequin ichthyosis and functional recovery by corrective gene transfer.

J Clin Invest 115. 1777-84, 2005.

3. Sawamura D, Goto M, Shibaki A, Akiyama M, McMillan JR, Abiko Y, Shimizu H.

Beta defensin-3 engineered epidermis shows highly protective effect

for bacterial infection.

Gene Ther 12. 857-61, 2005.

4. Nakamura H, Sawamura D, Goto M, Nakamura H, McMillan JR, Park S, Kono S, Hasegawa S, Paku S, Nakamura T, Ogiso Y, Shimizu H.
Epidermolysis bullosa simplex associated with pyloric atresia is a novel clinical subtype caused by mutations in the plectin gene (PLEC1).
J Mol Diagn 7. 28-35, 2005.

清水忠道

1. Kitaichi N, Shimizu T, Honda A, Abe R, Ohgami K, Shiratori K, Shimizu H, Ohno S.
Increase of macrophage migration inhibitory factor levels in lacrimal fluid of patients with severe atopic dermatitis.
Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol (in press)
2. Yanagi T, Shimizu T, Ujiie H, Tsuji-Abe Y, Abe R, Hige S, Shimizu H.
Improvement of mycosis fungoides during treatment of hepatitis C with peginterferon alfa-2b.
Arch Dermatol (in press)
3. Natsuga K, Shimizu T, Abe R, Kodama K, Shimizu H.
Mycosis fungoides bullosa.
Arch Dermatol (in press)
4. Zhao Y, Shimizu T, Nishihira J, Koyama Y, Kushibiki T, Honda A, Watanabe H, Abe R, Tabata Y, Shimizu H.
Tissue regeneration using macrophage migration inhibitory factor-impregnated gelatin microbeads in cutaneous wounds.
Am J Pathol 167. 1519-29, 2005
5. Shimizu T, Ogata A, Honda A, Nishihira J, Watanabe H, Abe R, Zhao Y, Shimizu H.
Expression of macrophage migration inhibitory factor in rat skin during embryonic development.
Exp Dermatol 14. 819-23, 2005.

6. Yanagi T, Shimizu T, Abe R, Shimizu H.
Zinc dental fillings and palmoplantar pustulosis.
Lancet 366. 1050, 2005.
7. Natsuga K, Akiyama M, Shimizu T, Suzuki T, Ito S, Tomita Y, Tanaka J, Shimizu H.
Ultrastructural features of trafficking defects are pronounced in melanocytic nevus in Hermansky-Pudlak syndrome type 1.
J Invest Dermatol 125. 154-8, 2005.
8. Shimizu T, Hizawa N, Honda A, Zhao Y, Abe R, Watanabe H, Nishihira J, Nishimura M, Shimizu H.
Promoter region polymorphism of macrophage migration inhibitory factor is strong risk factor for young onset of extensive alopecia areata.
Genes Immun 6. 285-9, 2005.
9. Hoshina D, Shimizu T, Abe R, Murata J, Tanaka K, Shimizu H.
Multicentric reticulohistiocytosis associated with rheumatoid arthritis.
Rheumatol Int 25. 553-4, 2005.
10. Ujiie H, Shimizu T, Shimizu H.
Cutaneous reactions to imatinib mesylate treated by topical steroid.
Am J Hematol 78. 246, 2005.
11. Nakamura H, Shimizu T, Kodama K, Shimizu H.
Metastasis of lung cancer to the finger: a report of two cases.
Int J Dermatol 44. 47-9, 2005.

西村栄美

1. Nishimura EK, Granter SR, Fisher DE.
Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche.
Science 307. 720-4, 2005.

H 知的財産の出願・登録状況

出願番号：特願 2005-188948 「皮膚再生用の細胞シートを作製するための構造体およびその利用」（発明者：McMillan, James R.、田中賢、山本貞明、清水宏、下村政嗣、特許出願人：北海道大学）

Kosei Kaken first year report 2005-2006

I. SUMMARY

Previous year's result

Human epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts were cultured on variously sized (range 3-20 μm) porous poly-calprolactone membranes (from now on, referred to as honeycomb membranes, HCMs). We examined the effects of growing the monocultures on these membranes. Cultures were finally maintained under high calcium conditions and were compared with similar cells grown on flat (pore-less) polymer and glass substrates. Cell growth rates, adhesion, migration and basic morphology were examined using confocal laser scanning microscopy. Cell ultrastructure was subsequently examined using scanning and transmission electron microscopy. Human keratinocytes and fibroblasts attached to all porous membranes. Furthermore, the small-pore (3 μm) membranes provided the best surface on which cells could most effectively attach, adhere, divide and mature. In addition, cells were prevented from undergoing transmembrane migration (to the opposing membrane surface) by the 3 μm porous membrane. Larger pores (>5 μm) allowed limited transmembrane migration of keratinocytes and particularly fibroblasts to the opposite side of the membrane. Subsequently, the rapid fibroblasts mitotic replication rate (greater than for keratinocytes) allowed these cells to predominate on both sides of the HCM. Our data show that both keratinocytes and fibroblasts can attach and grow on honeycomb membranes. However, keratinocytes, the most discerning of the two cell types attached and grew best on the 3 μm pore membranes due in part to the greater pores numbers surface area and length of pore edge, allowing better cell attachment and a larger surface area over which cells could adhere. The small pore size also inhibits cells from crossing the membrane while, at the same time allowing them to maximize cell adhesion and some matrix communication together with diffusion of soluble nutrients/factors from the wound bed. Our ultrastructural and immunohistochemical data suggest that hemidesmosome formation not essential for keratinocyte adhesion to HCMs whatever the pore size. Immunostaining has revealed the presence of fibronectin and limited amounts of type I collagen but no other extracellular matrix molecules at the cell-HCM surface, in addition to certain cell associated focal contact proteins. As a final preliminary experiment, we have

determined that flat pore less PCL film and small pore membranes without the addition of any cells can be successfully transplanted onto the wounded back skin of model mice and that these wounds can adequately and normally heal. These characteristics are important in developing graft technologies, for use in the treatment of human skin wounds.

Next year's plan:

A. Aims

1. To gain a better understanding of the precise cell-HCM substrate interactions in vitro including transmigration of cell through the HCM pores.
2. To evaluate the spatial relationship between cell-HCM interactions and the substrate pores in vitro.
3. To evaluate the basic HCM-host cell interactions in wounded model mice.
4. Determine the efficacy of using different cell/HCM combinations for graft transplantation into model mice wounds.
5. Identify the cytokines critical for allowing keratinocyte migration over the HCM to enhance wound healing.
6. Identify the critical cytokines responsible for aiding wound healing either by enhancing host cell responses or by manipulating graft cells to increase the speed of wound closure.
7. Determine if the HCM exhibits any other scientifically or commercially useful properties important in the skin bioengineering field, for example filtering of specific cell types, cell trapping or isolating capability.
8. Comparison of the surface characteristics of normal human dermis (using both intact and split skin) to enable better replication of the surface features found in human dermis on the surface of the HCM by coating with layers of native and synthetic proteins.

B. Materials and Methods

- 1) Investigate why smaller pore (3 and 5 μm) honeycomb membranes (HCM) show the best rates of keratinocyte cell growth but fibroblast growth rates are not affected by pore size. Our efforts in this respect have involved

assessing the expression of important matrix proteins (fibronectin and collagens) and focal contact proteins (including kindlin-1) using real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (PCR) and immunohistochemistry. Preliminary results suggest that of these proteins it would appear that the expression of the cytoplasmic focal contact proteins (including kindlin-1) are upregulated on the small pore HCM and that this increase in expression is correlated with increased keratinocyte growth on the smaller pore HCM.

- 2) In addition we have raised, tested and developed specific polyclonal antibodies to two focal contact associated proteins including kindlin-1. These will be tested on cultured keratinocyte and fibroblast cells grown on different HCM to a) determine the number of focal contacts per cell and b) the exact position of these focal contacts in relation to the underlying HCM structure.
- 3) Further investigate the expression of kindlin-1 using advanced confocal microscopy techniques such as total internal reflection (TIRF) microscopy and polarized microscopy that are not so severely affected by the presence of the pores and allow the focal contacts to be readily visualized. Using 3D computer based modeling we can assess and simultaneously compare the distribution and expression of plural cells and junctional protein molecules in relation to the pores on the HCM. We wish to model the effect of keratinocyte trapping and cell isolation (loss of any adjacent cell-cell contact) within the larger pored HCM to explain the poor growth rates on these substrates.
- 4) Complete a full battery of antibody tests to examine the full range expression of adhesion related proteins and their spatial expression with respect to the HCM. These will include the $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrins, actin and other focal contact proteins including vinculin, talin and α actinin. Our working hypothesis is that decreasing the pore size and thereby increasing the pore number on the HCM increases the number of focal contact adhesions per cell and hence their adhesion and growth response in culture.

- 5) Continue to investigate the efficacy of transplanting human dermal fibroblasts / keratinocytes cell sheet combinations onto porous HCM on to Severe Combined Immuno-Deficient (SCID) model mice. Regular, reproducible control-sized 4 mm superficial wounds made by punch biopsy will have their wound healing time (in days) assessed until full wound closure has been completed using porous membrane/keratinocyte/fibroblasts cell combinations.
- 6) Assessment of short-medium term cell viability from HCM in vivo transplants. We have isolated primary fibroblast and keratinocyte cells from a young (less than 1 month old) female LacZ transgenic Rosa mouse (background B6.129S7-Gt(ROSA)26Sor/J LacZ, JAX, Oriental Yeast Industry, Sapporo). These cells after culture on HCMs will be transplanted onto wounded SCID mice for an extended period of time (> 3 months) to assess the medium term cell viability. If the cells from the LacZ mouse survive this period after HCM transplantation, they can be labeled, identified and quantified using β galactosidase staining.
- 7) We will use two approaches to determine cytokine profile for “normal healing SCID mouse wounds”, firstly a) an antibody based cytokine microarray analysis system to examine the expression profile of cytokines in properly healing wounds, non healing wounds and in cultured cells grown on various substrates including porous membranes. We will attempt to use this array to identify cytokines that are expressed in normal fast healing wounds but not in our HCM membrane system. Secondly, we will use a candidate cytokine approach to testing the efficacy of cytokine selected on the basis of previous reports of effectiveness on cultured keratinocytes or similar, related epithelial cells. Cytokines that show promise in this will be tested by direct application of the commercially available cytokine after mixing the gelatin hydrogel microbeads produced by our collaborator Prof Tabata from Kyoto University.

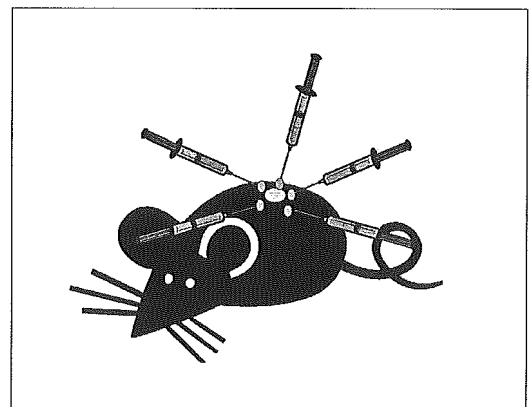
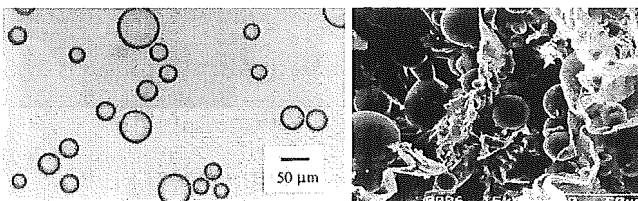
Cytokines and drugs involved in keratinocyte

The major problem thus far identified with our HCM system is the poor rate of keratinocyte migration observed in the porous membranes when compared to

the pore less membranes or to keratinocytes grown on plastic dishes. After extensive literature searches several candidate cytokines have emerged that have the potential to increase keratinocyte migration rates and these include:

Cytokine name	Target cell & concentration	Reference
KGF	Keratinocyte	Werner, 1998
IL-1a	Keratinocyte, fibroblast	Imanishi, et al., 2000 Chen et al, 1995
IL-6	Keratinocyte	Imanishi, et al., 2000; Ono, 1999
TGF-β1	Fibroblast	Ono, 1999 Chen et al, 1995
TGF-β3	Keratinocyte, fibroblast	Komarcevic, 2000
bFGF	Fibroblast	Ono, 1999
INF-α	Keratinocyte	Komarcevic, 2000

- 8) We will inject novel cytokine-controlled release gelatin hydrogel bead cocktail combinations into the dermis beneath the transplanted porous membranes. These 70-100 μm diameter hydrogel beads will then slowly release their cytokine contents upon tissue enzymic degradation. This cytokine release should subsequently alter particular cell responses including affecting the rates of cell growth and particularly cell migration and increase the rate of wound healing.



- 9) We have identified using direct scanning electron microscopy, immunogold scanning electron microscopy, tracer dyes, and immunohistochemistry in control, normal dermis and control organ cultured dermis that the epidermal basement membrane contains small-pore like structures varying between 1-3 μm in size. This is the first observation of