

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 18 年度 総括・分担研究報告書

平成 19 (2007) 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. 人工皮膚を用いた動物実験に関する研究 .....	7
分担研究者 芝木晃彦 (北海道大学)	
3. 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 阿部理一郎 (北海道大学)	
4. 除放剤の作成に関する研究 .....	21
分担研究者 田畑泰彦 (京都大学)	
5. 人工膜の作成に関する研究 .....	26
分担研究者 下村政嗣 (北海道大学)	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	31
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別冊 .....	43
-----------------------	----

# 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

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 18 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) 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孔径3ミクロンの多孔質薄膜の製膜条件の最適化

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。

加えて、多孔質薄膜への吸着タンパク質組成の検討として、10%血清の培地を37℃、2時間浸漬し、緩衝溶液で洗浄後、アルブミン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチンそれぞれの抗体により染色を行った。緩衝溶液中で共焦点レーザー顕微鏡により吸着タンパク質の観察を行った。平膜を対照実験とした。

さらに多孔質薄膜の安全性試験としてウサギを用いる短期筋皮下埋植試験を行った。埋植期間は1週及び4週、動物数は各埋植期間につき6匹とし、肉眼的観察用及び病理組織学的観察用にそれぞれ3匹ずつ使用した。また、陰性対照試料として高密度ポリエチレンロッドを併せて埋植した。

### 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マウス細胞による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

## 効果の検討

これまでの検討で、孔径3ミクロンの多孔質薄膜が最も薄膜上での表皮細胞の増殖および遊走に適していることを見出し、これを用いた多孔質膜を用いた人工皮膚を作製する。同時に線維芽細胞を用いた人工皮膚も作成する。Ba1b/cマウスの背部に全層欠損の皮膚創傷を作成し、この人工皮膚を移植し、創傷治癒過程に対する影響を観察する。

④ヒト細胞による人工皮膚を免疫不全マウス皮膚創傷部に移植し、創傷治癒に対する効果の検討

上記と同様に、ヒト表皮細胞または線維芽細胞を用いて人工皮膚を作成する。免疫不全マウスの背部に皮膚全層欠損創を作成し、ヒト細胞人工皮膚を移植し、創傷治癒過程に対する影響を観察する。

⑤創傷部への人工皮膚移植の創傷治癒過程に対する影響

人工皮膚の創傷治癒過程に対する詳細な影響を検討する。さらに経時的に同部位を組織学的に検討した。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。

## C 研究結果

①孔径3ミクロンの多孔質薄膜の製膜条件の最適化

孔径制御には、溶媒蒸発時間を制御する溶液量、溶液の厚み、基板の温度が効果的なパラメーターであることがわかった。例えば、直径10cmのガラスシャーレ上で製膜する場合、溶液濃度1mg/mlの高分子溶液を2mlキャストすることによって、孔径3ミクロンの多孔質薄膜が製膜できることがわかった。

多孔質薄膜への吸着タンパク質組成の検討としては、平膜には主にアルブミンが吸着し、フィブロネクチンはほとんど吸着していないのに対して、ハニカムフィルムではフィブロネクチンがハニカムの細孔内に選択的に吸着していた。また、ハニカムフィルムの孔径を3 $\mu$ m、5 $\mu$ m、20 $\mu$ mと変えることで、フィブロネクチンの吸着構造が大きく異なることが観測された。これらの結果から、フィブロネクチンの吸着構造がハニカムフィルムと平膜で大きく異なること、および、フィブロネクチンの吸着構造はハニカムフィルムの孔径に依存することがわかった。

多孔質薄膜の安全性試験においては、埋植部位では、肉眼的観察において埋植期間1週及び4週ともに出血、被包形成、変色などの異常は認められなかった。病理組織学的には、線維芽細胞の浸潤を伴う線維性皮膜及びマクロファージを主体とする細胞浸潤が若干認められた。

## 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) とトランスホーシング増殖因子 (TGF)- $\beta$ 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マウス細胞による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の検討

孔径 3 ミクロンの多孔質薄膜を用い表皮細胞を表面に付着させた人工皮膚を作製した。同時に線維芽細胞を用いた人工皮膚も作成した。Balb/c マウスの背部に全層欠損の皮膚創傷を作成し、この人工皮膚を移植し、創傷治癒過程に対する影響を検討したところ、表皮細胞をつけた人工皮膚は有意に創傷治癒を促進させた。一方線維芽細胞を付けた人工皮膚は創傷治癒に対する効果はほとんど認められなかった。

## ④ヒト細胞による人工皮膚を免疫不全マウス皮膚創傷部に移植し、創傷治癒に対する効果の検討

上記と同様に、ヒト表皮細胞または線維芽細胞を播種した孔径 3 ミクロンの多孔質薄膜の人工皮膚を作成した。免疫不全マウスの背部に皮膚全層欠損創を作成し、ヒト細胞人工皮膚を移植し、創傷治癒過程に対する影響を見たところ、上記と同様に、表皮細胞を播種した人工皮膚は有意に創傷治癒を促進させた。

## ⑤創傷部への人工皮膚移植の創傷治癒過程に対する影響

人工皮膚の創傷治癒過程に対する詳細な影響を検討するため経時的に同部位を組織学的に検討した。病理学的に人工皮膚移植により、特に血管新生促進がみられた。また移植した人工皮膚の構成細胞も比較的長期に移植部で生存することが明らかになった。

## D 考察

本年度の研究で、皮膚由来細胞の接着率と増殖率が向上する孔径 3 ミクロン多孔質薄膜作製の最適条件を検討した。蒸発時間を決定する溶液の厚みの制御が重要であることがわかった。今後は、孔径 3 ミクロン以下の孔貫通膜の製膜条件検討を行う。また、フィブロネクチンの吸着構造がハニカムフィルムによって決定され、それが細胞の分化、増殖あるいは機能に影響を及ぼすことを示すデータが得られた。

多孔質薄膜をウサギ皮下へ埋植した場合の組織反応は、線維性被膜の増殖及びマクロファージによる異物処理反応を主体としたものであり、多孔質薄膜のウサギ皮下組織への炎症はないものと考えられる。多孔質薄膜はFDA認可実績のある医療製品に使用されている生分解性高分子で作製しているため、安全性および生体適合性に優れていると考えられる。

今後は、これ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。

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- $\beta$ 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、グルタルアルデヒドを用いない熱脱水処理を利用したハイドロゲルの作製条件が明らかとなった。得られたハイドロゲルからは、それらの成長因子が異なる時間パターンで徐放化されること、また、そのパターンがハイドロゲルの生体吸収性パターンによって制御されることがわかった。加えて、人工膜との組み合わせを考えて、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) 田中 賢, 鶴間章典, 山本貞明, 下村政嗣, 非スフェロイド化幹細胞の調製方法, 特願 2006-237680 (2006/9/1)
- (2) 田中 賢, 鶴間章典, 藪浩, 山本貞明, 下村政嗣, 桑原孝介, 宮内昭浩, 神経幹細胞の培養基材, 特願 2006
- (3) 田中 賢, 築山周作, 山本貞明, 下村政嗣, 成瀬英明, 山崎英数, セルチップ, 特願 2006-149284. (2006/5/30)
- (4) 田中 賢, 陳 咏梅, グンチェンピン, 安田和則, 山本貞明, 下村政嗣, 長田義仁, 人工血管の作製方法, 特願 2006-141838 (2006/5/22)
- (5) 田中 賢, 山本貞明, 下村政嗣, 榊昭雄, 浮遊系細胞に好適な材料, 特願 2006-141093. (2006/5/22)
- (6) 白谷俊史, 相京浩幸, 遠田 淳, 下村政嗣, 山本貞明, 居城邦治, 土方健二, 藪 浩, 松尾保孝, 田中 賢, 炭素構造体の製造方法及び炭素構造体, 特願 2006-317609 (2006/11/24)  
田中 賢, 吉澤恵子, 鶴間章典, 山本貞明, 下村政嗣, 硬組織再生治療に用い得るハニカム状多孔質体 国際出願P C T / J P 2007/051080 (2007/2/1)

## 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 芝木晃彦

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 阿部理一郎

北海道大学・北海道大学病院・皮膚科学  
講師

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 18 年度の研究において、1) マウス細胞による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の検討、2) ヒト細胞による人工皮膚を免疫不全マウス皮膚創傷部に移植し、創傷治癒に対する効果の検討、3) 創傷部への人工皮膚移植の創傷治癒過程に対する影響、4) 創傷部への人工皮膚移植の創傷治癒過程に対し、効果促進させる液性因子の同定、を行った。

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マウス細胞による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の検討

平成17年度の検討で至適構成成分、培養条件を同定し、作成したマウス細胞成分の人工皮膚を用いた。平成17年度の検討で、孔径3ミクロンの多孔質薄膜が最も薄膜上での表皮細胞の増殖および遊走に適していることを見出し、これを用いた多孔質膜を用いた人工皮膚を作製する。同時に線維芽細胞を用いた人工皮膚も作成する。Balb/cマウスの背部に全層欠損の皮膚創傷を作成し、この人工皮膚を移植し、創傷治癒過程に対する影響を観察する。

②ヒト細胞による人工皮膚を免疫不全マウス皮膚創傷部に移植し、創傷治癒に対する効果の検討

上記と同様に、ヒト表皮細胞または線維芽細胞を用いて人工皮膚を作成する。免疫不全マウスの背部に皮膚全層欠損創を作成し、ヒト細胞人工皮膚を移植し、創傷治癒過程に対する影響を観察する。

③創傷部への人工皮膚移植の創傷治癒過程に対する影響

人工皮膚の創傷治癒過程に対する詳細な影響を検討する。さらに経時的に同部位を組織学的に検討した。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創傷部への人工皮膚移植の創傷治癒過程に対し、効果促進させる液性因子の同定

RayBiotech® cytokine array を用いて表皮細胞が産生分泌する170種以上の

サイトカインを検討し、上記の創傷モデルにおいて、創傷治癒を促進させる液性因子を同定する。

## C 研究結果

①マウス細胞による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の検討

孔径3ミクロンの多孔質薄膜を用い表皮細胞を表面に付着させた人工皮膚を作製した。同時に線維芽細胞を用いた人工皮膚も作成した。Balb/cマウスの背部に全層欠損の皮膚創傷を作成し、この人工皮膚を移植し、創傷治癒過程に対する影響を検討したところ、表皮細胞をつけた人工皮膚は有意に創傷治癒を促進させた。一方線維芽細胞を付けた人工皮膚は創傷治癒に対する効果はほとんど認められなかった。

②ヒト細胞による人工皮膚を免疫不全マウス皮膚創傷部に移植し、創傷治癒に対する効果の検討

上記と同様に、ヒト表皮細胞または線維芽細胞を播種した孔径3ミクロンの多孔質薄膜の人工皮膚を作成した。免疫不全マウスの背部に皮膚全層欠損創を作成し、ヒト細胞人工皮膚を移植し、創傷治癒過程に対する影響を見たところ、上記と同様に、表皮細胞を播種した人工皮膚は有意に創傷治癒を促進させた。

③創傷部への人工皮膚移植の創傷治癒過程に対する影響

人工皮膚の創傷治癒過程に対する詳細な影響を検討するため経時的に同部位を組織学的に検討した。病理学的に人工皮膚移植により、特に血管新生促進がみられた。また移植した人工皮膚の構成細胞も比較的長期に移植部で生存することが明らかになった。

④創傷部への人工皮膚移植の創傷治癒過程に対し、効果促進させる液性因子の同定

RayBiotech® cytokine array を用いて表皮細胞が産生分泌する170種以上のサイトカインを検討し、上記の創傷モデルにおいて、創傷治癒を促進させる液性因子を同定した。現在までに数種の候補液性因子を同定しており、今後更なる検討を行う。

## D 考察

本年度の研究で、表皮細胞を播種した人工皮膚を用い、マウスモデルにおいて創傷治癒促進効果を確認した。また免疫不全マウスを用いた、ヒト細胞の人工皮膚においても創傷治癒促進効果を確認した。この創傷治癒促進効果は移植の効果に加え特に血管新生を促進させることによるものであった。

## 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。加えてこのマウスおよびヒト細胞を用いた人工膜は創処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. Sawamura D, Goto M, Sakai K, Nakamura H, McMillan JR, Akiyama M, Shirado O, Oyama N, Satoh M, Kaneko F, Takahashi T, Konno H, Shimizu H.  
Possible Involvement of Exon 31 Alternative Splicing in Phenotype and Severity of Epidermolysis Bullosa Caused by Mutations in PLEC1.  
J Invest Dermatol. (in press)
2. Akiyama M, Sakai K, Arita K, Nomura Y, Ito K, Kodama K, McMillan JR, Kobayashi K, Sawamura D, Shimizu H.  
A Novel GJB2 Mutation p. Asn54His in a Patient with Palmoplantar Keratoderma, Sensorineural Hearing Loss and Knuckle Pads.  
J Invest Dermatol. (in press)
3. Qiao H, McMillan JR.  
Gelsolin segment 5 inhibits HIV-induced T-cell apoptosis via Vpr-binding to VDAC.  
FEBS Lett 581. 535-40, 2007.
4. McMillan JR, Akiyama M, Tanaka M, Yamamoto S, Goto M, Abe R, Sawamura D, Shimomura M, Shimizu H.  
Small-Diameter Porous Poly (epsilon-Caprolactone) Films Enhance Adhesion and Growth of Human Cultured Epidermal Keratinocyte and Dermal Fibroblast Cells.  
Tissue Eng 13(4). 1-10
5. Akiyama M, Titeux M, Sakai K, McMillan JR, Tonasso L, Calvas P, Jossic F, Hovnanian A, Shimizu H.

DNA-Based Prenatal Diagnosis of Harlequin Ichthyosis and Characterization of ABCA12 Mutation Consequences.

J Invest Dermatol 127. 568-73, 2007.

---

6. Akiyama M, Sakai K, Wolff G, Hausser I, McMillan JR, Sawamura D, Shimizu H.

A novel ABCA12 mutation 3270delT causes harlequin ichthyosis.

Br J Dermatol 155. 1064-6, 2006.

7. Ito H, Akiyama M, Nakagawa H, Uematsu R, Deguchi K, McMillan JR, Nishimura S, Shimizu H.

N-Linked neutral oligosaccharides in the stratum corneum of normal and ichthyotic skin.

Arch Dermatol Res 298. 403-7, 2007.

8. McMillan JR, Akiyama M, Rouan F, Mellerio JE, Lane EB, Leigh IM, Owaribe K, Wiche G, Fujii N, Uitto J, Eady RA, Shimizu H. Related Articles, Links Plectin defects in epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. Muscle Nerve 35. 24-35, 2007.

9. Inokuma D, Abe R, Fujita Y, Sasaki M, Shibaki A, Nakamura H, McMillan JR, Shimizu T, Shimizu H.

CTACK/CCL27 accelerates skin regeneration via accumulation of bone marrow-derived keratinocytes.

Stem Cells 24. 2810-6, 2006.

10. Goto M, Sawamura D, Nishie W, Sakai K, McMillan JR, Akiyama M, Shimizu H.

Targeted skipping of a single exon harboring a premature termination codon mutation: implications and potential for gene correction therapy for selective dystrophic epidermolysis bullosa patients.

J Invest Dermatol 126. 2614-20, 2006.

11. Akiyama M, Sakai K, Sugiyama-Nakagiri Y, Yamanaka Y, McMillan JR, Sawamura D, Niizeki H, Miyagawa S, Shimizu H. Related Articles, Links Compound heterozygous mutations including a de novo missense mutation in

ABCA12 led to a case of harlequin ichthyosis with moderate clinical severity.

J Invest Dermatol 126. 1518-23, 2006.

---

12. McMillan JR, Akiyama M, Nakamura H, Shimizu H. Related Articles, Links Colocalization of multiple laminin isoforms predominantly beneath hemidesmosomes in the upper lamina densa of the epidermal basement membrane.

J Histochem Cytochem 54. 109-18, 2006.

芝木晃彦

1. Nemoto I, Shibaki A, Aoyagi S, Tsuji-Abe Y, Shimizu H.

Aggressive squamous cell carcinoma developing in a giant epidermal cyst of the abdomen.

Int J Dermatol 45. 1444-6, 2006.

2. Yagi H, Hashizume H, Horibe T, Yoshinari Y, Hata M, Ohshima A, Ito T, Takigawa M, Shibaki A, Shimizu H, Seo N.

Induction of therapeutically relevant cytotoxic T lymphocytes in humans by percutaneous peptide immunization.

Cancer Res 66. 10136-44, 2006.

3. Sakai K, Akiyama M, Watanabe T, Sanayama K, Sugita K, Takahashi M, Suehiro K, Yorifuji K, Shibaki A, Shimizu H.

Novel ALDH3A2 Heterozygous Mutations in a Japanese Family with Sjogren-Larsson Syndrome.

J Invest Dermatol 126. 2545-7, 2006.

4. Yanagi T, Shibaki A, Tsuji-Abe Y, Yokota K, Shimizu H. Epidermodysplasia verruciformis and generalized verrucosis: the same disease?

Clin Exp Dermatol 31. 390-3, 2006.

5. Yanagi T, Akiyama M, Aoyagi S, Shibaki A, Homma A, Shimizu H.

Marked and restricted cutaneous pigmentation induced by selective intra-arterial cisplatin infusion.

J Am Acad Dermatol 54. 362-3, 2006.



6. Goto M, Sawamura D, Ito K, Abe M, Nishie W, Sakai K, Shibaki A, Akiyama M, Shimizu H.

Fibroblasts show more potential as target cells than keratinocytes in COL7A1 gene therapy of dystrophic epidermolysis bullosa.  
J Invest Dermatol 26. 766-72, 2006.

7. Yanagi T, Sawamura D, Nishie W, Abe M, Shibaki A, Shimizu H.

Multiple apocrine hidrocystoma showing plane pigmented macules.  
J Am Acad Dermatol 54. S53-4, 2006.

8. Shichinohe R, Shibaki A, Nishie W, Tateishi Y, Shimizu H.

Successful treatment of severe recalcitrant erosive oral lichen planus with topical tacrolimus.  
J Eur Acad Dermatol Venereol 20. 66-8, 2006.

阿部理一郎

1. Fujita Y, Abe R, Sasaki M, Honda A, Furuichi M, Asano Y, Norisugi O, Shimizu T, Shimizu H.

Presence of circulating CCR10+ T-cells and elevated serum CTACK/CCL27 in the early stage of mycosis fungoides.  
Clin Cancer Res 12. 2670-2675, 2006.

2. 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 244. 825-8, 2006.

3. Chi A, Valencia JC, Hu Z, Watabe H, Yamaguchi H, Mangini NJ, Huang H, Canfield VA, Cheng KC, Abe R, Yamagishi S, Shabanowitz J, Hearing VJ, Wu C, Appella E, Hunt DF.

Proteomics and Bioinformatics Characterization of the biogenesis and function of melanosomes.  
J Proteome Res 5. 3135-44, 2006.

4. Tanimura S, Arita K, Iwao F, Kasai M, Fujita Y, Kawasaki H, Abe R, Sawamura D, Kimura T, Shimizu H.

Two cases of folliculosebaceous cystic hamartoma.

Clin Exp Dermatol 31. 68-70. 2006.

5. Murata J, Shimizu T, Tateishi Y, Abe R, Shimizu H.

Coexistence of systemic lupus erythematosus and porphyria cutanea tarda-a case successfully improved by avoidance of sun exposure-.

Int J Dermatol 45, 435-7, 2006.

6. Yanagi T, Shimizu T, Ujiie H, Ito M, Abe R, Tsuji-Abe Y, Hige S, Shimizu H.

Peginterferon alfa-2b for mycosis fungoides.

Arch Dermatol 142, 649-651, 2006.

7. Natsuga K, Shimizu T, Abe R, Kodama K, Shimizu H.

Mycosis fungoides bullosa. Arch Dermatol 142, 793-5, 2006

8. Osawa R, Abe R, Inokuma D, Yokota K, Ito H, Nabeshima M, Shimizu H.

Chain saw granuloma : reaction to the deep implanted chain saw fragment.

Arch Dermatol 142, 1079-80, 2006.

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 2006-2007

### I. SUMMARY

#### *Previous year's result*

We have previously demonstrated that both monocultured human keratinocyte and fibroblasts can attach to, and grow/survive on porous poly-( $\epsilon$ -calprolactone) films ranging in size from 3-20 microns (McMillan et al 2007). However, keratinocyte cell migration was inhibited on these films due to pores trapping the cells but we were able to circumvent this problem by seeding at higher keratinocyte cell densities. We have identified that the smallest pore 3  $\mu$ m porous film exhibit several beneficial properties *in vitro* including cell adhesion, survival and growth and that these small pore 3-5  $\mu$ m films also show positive characteristics as a graft support and cell separator that make it beneficial for growing sheets of skin cells, particularly keratinocytes for application onto wounds. We have determined that application of keratinocytes grafts show significant shortening of wound healing time compared to the use of porous films without cells or porous films with just fibroblasts. The *in vivo* grafted and transplanted models have been preliminary judged by the rate and mean final time until complete wound closure; by the ability of the grafts to stimulate dermal neovascularization and by the survival rates of grafted human cells delivered from the porous film in the model mouse wound bed. Keratinocyte-porous film treatments showed the highest rates of wound closure, the shortest time to complete wound closure and slight increases in wound bed vascularization. Fibroblasts on films alone failed to show such beneficial changes but together with keratinocytes mimicked the changes observed for keratinocytes alone. Keratinocyte cytokine profiling revealed the expression of multiple cytokines (over 157) and distinct profile different from that of fibroblasts alone in culture. Further analysis of these cytokine profiles is ongoing.

#### *Next year's plan:*

##### A. Aims

To gain a better understanding of the precise mechanisms involved in cell-porous film interactions leading to cell growth and improved wound healing:

1. Investigating the underlying keratinocyte signaling pathways and mechanisms modulating cell adhesion, growth, survival.
2. Identify more beneficial porous film cell combinations that form better structured human skin equivalents and their characteristics that encourage more rapid wound healing in model SCID wounded mice

3. Identify the critical keratinocyte cytokines or growth factors that might be involved in modulating / enhancing keratinocyte wound healing in wounded model mice.
  4. Examine the usefulness of trapping / filtering of specific keratinocyte stem cell numbers to enrich or isolate these cell types.
- 

## B. Materials and Methods

- 1) Investigate the underlying mechanisms of why small porous films (3 and 5  $\mu\text{m}$ ) show the highest rates of keratinocyte (but not fibroblast) cell growth and adhesion rates. We are using biochemical activation kits to assess Rac1, Rho CDC42 and Focal Adhesion Kinase phosphorylation in keratinocyte signaling pathways.
- 2) Investigate the focal contact associated protein expression using advanced confocal and polarized microscopy techniques together with a battery of antibodies to examine the full range expression of adhesion related proteins and their spatial expression with respect to the porous film. 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  $\alpha$  actinin. Our hypothesis is that decreasing the pore size and thereby increasing the pore density on the porous films increases the number of focal contact adhesions per cell and hence their adhesion and growth response in culture.
- 3) The previous drawback identified in our culture system was the lack of keratinocyte cell migration and subsequent loss of keratinocyte cell contact between cells. Despite both keratinocytes and HaCaT cells displaying limited migration rates on poly( $\epsilon$ -calprolactone) PCL porous films compared to flat polystyrene based tissue culture plastic, individual cells do spread in a limited fashion *in situ* over the medium term (up to 6 days) and can cover parts of the porous film. We have optimized our system by performing keratinocyte cell seeding experiments at higher density to avoid the need for cell migration. Keratinocytes survive and grow better after forming cell-cell contacts and can more easily cover the entire surface of the porous film, both of which are expected to enhance wound covering capabilities and properties of porous film grafts.
- 4) We have used Balb C model mice with normal immunological systems in preliminary experiments to assess the feasibility and effects of using porous films without any cells in treating *in vivo* back skin wounds. Porous films only suffer from mild lymphocytic and foreign body granulomatous immune reactions and do not significantly inhibit wound healing in Balb C mice.
- 5) We have used Severe Combined Immuno-Deficiency (SCID) model mice treated with porous films and human keratinocyte and fibroblast to assess the efficacy of using