

different cell/ porous film combinations for graft transplantation into model mice wounds. Investigations into the efficacy of transplanting 1) high density seeded keratinocytes on porous films 2) human dermal fibroblast / keratinocytes combinations on porous films on to 4 mm punch biopsy wounds are underway.

- 6) The *in vivo* grafted and transplanted models will be judged by the rate and mean final time until complete wound closure (n=3 for each group) 2) by the ability of the grafts to stimulate CD31 positive dermal neovascularization 3) by the survival rates MHC positive human cells delivered from the porous film in the model mouse wound bed.
- 7) We will use the RayBiotech ® cytokine array approach (capable of testing 174 different soluble human cytokines/factors) to determine what in the cultured keratinocyte cytokine profile promotes wound healing in our model SCID mice. We have detected over 150 cytokines present in either fibroblasts or HaCaT cell monocultures. Thus far, 7 cytokines have been identified as significantly upregulated (>2 fold) in cultured keratinocytes compared to fibroblasts (these include members of the TGF family of cytokines). These cytokines and their putative role in promoting wound healing will be investigated. Conversely, the general cytokine profile of each cell type (cultured on different porous films) will be evaluated for their overall pro-inflammatory or pro-growth promoting activity. This general profile of cytokine combinations may turn out to be more important in modulating the overall type of wounding response seen in our mouse models.
- 8) We will test the effects of specific cytokine combinations by injecting cytokine cocktails with controlled release gelatin hydrogel beads into the wounded dermis adjacent to the transplanted cell porous membrane grafts.
- 9) We will further characterize the efficacy of bilayered cultures to form using protective and intact epidermal structure 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. Expression of compounds involved in normal epidermal innate immunity will also be assessed (such as beta defensin 3).
- 10) 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 porous film by coating with layers of native and synthetic proteins.

C. Results

Porous film cell characteristics

We have examined the effects of pore size on multiple cellular characteristics and are elucidating the mechanisms underlying our observations. Our evidence supports keratinocyte (and fibroblast) substrate adhesion to small pore films is mediated via a mechanism that involves the focal adhesion system and not hemidesmosomes (HDs). The reason for this is complete, mature HD junctions are not assembled and taken together with the absence of laminin 332 the crucial ligand for the HD integrin $\alpha 6 \beta 4$ fail to support and role for HD mediated adhesion. Our evidence suggests the presence of vinculin, a focal contact marker and the matrix molecules vitronectin/fibronectin within overlying the pores acts as the main adhesive force in for cells. Small pore films consequently demonstrated greater numbers of focal contacts close to / at the pore edge and this correlated with greater cell adhesion. We surmised that small pores exhibit a greater length of pore edge and increased pore density which together promote cell adhesion.

Highly significant increased rates of keratinocyte cell growth and survival (but not fibroblast) were seen when using small pores. We are investigating the mechanisms of integrin and focal contact based cell signaling controlling growth using biochemical assays. One reason for this difference reflects the inability of keratinocytes (but not fibroblasts) to gain suffice cell contact (anoikis) and their need for migration to increase cell contact to promote growth signals and protect from apoptotic cell death. We have confirmed this finding using fluorescence assays like the live dead cell viability & cytotoxicity kit assayTM. This was confirmed after examining the apoptotic rates in cells grown on various sized pores films. Larger pores into which keratinocytes could fall and become trapped isolated from adjacent cells became TUNEL positive, a marker for apoptotic cell death.

Porous film trials in wounded model mice

We are now evaluating the basic porous film-host cell interactions in wounded model Balb C and SCID immunodeficient mice as a prerequisite for studying the porous film-human cell combination to optimize wound healing in SCID mice. Our experiments using wounded immunocompetent Balb c mice treated with porous films without cells demonstrated that the films were tolerated in mice for the duration of the experiment (up to three weeks) but also elicited a mild dermal lymphocytic and foreign body giant cell immunoreaction. No difference in the strength or composition of the immunological reaction was noted between different sized porous films in Balb c mice (with the normal immune system). However the survival of the porous films was very difficult to detect after 21 days in the wound.

Therefore we demonstrate that the porous film 1) either becomes rapidly incorporated into the dermal wound bed or degrades as a result of the wound healing or inflammatory processes. Furthermore the time taken for wound closure was measured in mice from each group. Treatment with the porous film (i.e. without any cells) and an occlusive covering of the 4 mm punch biopsy wounds (to maintain moisture retention) failed to increase the rate of wounding healing and even caused a minimal delay in wound healing (by an average of 1-2 days). All pore sizes examined showed similar or identical results in Balb c mice. However, small, 5 micron pore films supporting keratinocytes or HaCaT cells (but not fibroblasts) demonstrated any significant reduction in wound healing time when compared to the porous film only treated mice. While not demonstrating any clear benefit for the use of porous films alone our data suggest that porous films in combination with keratinocytes (but not fibroblasts) show the greatest reductions in wound closure times. Furthermore we are assessing the effects of increased keratinocyte seeding densities on porous films and of employing combinations of bilayered keratinocytes and fibroblasts. We have determined that the medium term graft cell survival time in SCID mouse wounds after porous film application is at least 21 days using human dermal and fetal fibroblasts, HaCaT cells and primary keratinocytes.

Quantification of the results would require only simple statistical comparisons between the two treatment groups. Examination of the effects of cytokines production and other different cell / porous film membrane combinations will be determined in a similar case by case manner. Identifying scientifically useful applications such as cell size filters or cell trapping to separate stem cells would require testing large numbers of primary human keratinocyte for colony forming efficiency by plating cell and staining colonies with crystal violet stain.

D. Discussion

Several important points arise from these observations of our data:

1. The low level of keratinocyte migration is not insurmountable but does require the use of higher initial seeding densities of keratinocytes and hence requires a longer preparation time but can avoid the slightly increases rates of cell death via apoptosis as a result of loss of keratinocyte cell-cell contact.
2. Initial results examining the effects of porous film treatments for full thickness wounds encourage their use in the support of keratinocyte monolayers alone or for combinations of skin equivalents containing keratinocytes with fibroblasts.

3. Our data support the fact of graft cell survival in the mouse wound bed for up to 21 days after wounded. We are convinced that even longer cell survival may be possible due to the high number of cells still present in wounds after 21 days.

4. Our analysis of the healed wound in the model mice has suggested that increased granulation tissue neovascularization plays an important part in promoting the wound repair process. Cytokine profiling of the graft cells supports this theory but we cannot however rule out a combination role for either cells aiding wound repair or from a contribution from the innate immunity functions present in keratinocytes for example beta defensins involved in innate immunity.
5. Complete analysis of the cytokine profiles of porous film supported graft cells that are able to shorten wound healing times will allow us to identify useful cytokines involved in wound repair and test them by applying them directly to wounds to observe their effects on the rate of wound healing.
6. We have been encouraged by the results to further develop new technologies to pursue the testing of pore less than 3 μm and related to that the development of more beneficial substrates.
7. The small pore film allows us to form a barrier separating different cell types that produce bilayered skin equivalents. These should be further tested to
8. Use of porous films as a cell filter system or trap to isolate and enrich specific cell types has only briefly and tentatively been tried. Further experiments in this area are required.

E. Conclusions

Our data show that porous films are able to effectively deliver properly supported, viable and beneficial human cells into the wound bed in our model SCID mouse. These data taken together with the already tested biocompatibility and rapid biodegradation of the porous films *in vivo* leaving just the grafted cell population, suggest that the films may be useful as grafts in patients with wound healing problems or severe genetic blistering diseases such as Epidermolysis Bullosa.

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

徐放剤の作製に関する研究

分担研究者 田畑泰彦

京都大学・再生医科学研究所・生体組織工学研究部門・生体材料学分野
教授

研究要旨

本研究の目的は、新規徐放剤、新規人工膜を用いた人工皮膚の作製である。これまでの人工皮膚は長期生着が困難であり、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。本研究においては、新規な徐放剤を用い、至適因子を持続的に供給することで、より生体に近い生物機能を獲得させる。また、本研究で用いる新規人工膜は、ハニカム構造をもち、細胞への親和性もよく、また、膜内の小孔に徐放剤を蓄えることができる。この徐放剤と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製ができると考える。

平成 18 年度の研究では、前年度に引き続き、1) 特に、ハイドロゲルの架橋方法の検討に力を入れ、新規徐放剤の作製、ならびに創傷治癒に対する最適化を検討し、研究成果に基づく人工皮膚を作製した。

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。生体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、新規徐放剤を用い、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。本研究において、複数の因子をタイミングを変えて持続放出する徐放剤を作製した。これを膜内の小孔に徐

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新規人工膜と組み合わせることで人工膜を作製した。また用いる細胞においても、成熟表皮細胞のみならず、表皮幹細胞を用いる。再生医療を実現するために、ともに重要な領域、すなわち幹細胞、前駆細胞を対象とした基礎生物医学の研究領域と、細胞に増殖、分化を促す場を与え、生体組織を誘導する医工学領域（生体組織工学と呼ばれる）とが融合することが必要不可欠である。これにより、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と考えられる。後者の生体組織工学では、生体材料を中心としたバイオメディカルエンジニアリングが重要な役割を果たしている。

B 研究方法

徐放剤の作製と成長因子の徐放評価

われわれは、これまでに、種々の成長因子の徐放化のため、生体吸収性のゼラチンをグルタルアルデヒドで化学架橋してハイドロゲルを作製している。ハイドロゲルの作製時におけるグルタルアルデヒド濃度を変えることによって、得られたハイドロゲルの生体内吸収性を変えることができた。また、作製条件を変えることで、サイズ、形状の異なるハイドロゲルの作製が可能となっている。ところが、化学架橋剤のグルタルアルデヒドによる架橋では、残留グルタルアルデヒドが、時として細胞組織毒性の原因となる。そこで、グルタルアルデヒドを用いない架橋方法が求められる。本研究では、熱脱水架橋法を提案した。この方法によって、架橋して得られたハイドロゲルの生体分解吸収性と成長因子の徐放性について調べた。ゼラチン水溶液を容器に入れ、凍結乾燥した。その後、減圧条件で、140、150、および160°Cの温度で、所定時間、乾燥ハイドロゲルの熱脱水処理を行った。得られた架橋凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルへ徐放したい成長因子水溶液を滴下、4°C、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。熱脱水処理温度と処理時間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。

C 研究成果

新規徐放剤の作製と成長因子の徐放

ゼラチンの架橋時における熱脱水処理温度と処理時間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)- 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。グルタルアルデヒドを用いて作製したハイドロゲルと熱脱水処理により得られたハイドロゲルを、その生体分解吸収性と成長因子の徐放性の観点から比較した。その結果、いずれの架橋方法においても、その条件を変化させることによって、望む生体吸収性、徐放性をもつハイドロゲルを作製できることがわかった。

D 考察

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、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。

E 結論

新規な多孔質薄膜を用いた細胞の増殖挙動について調べた。加えて、細胞の増殖を促す成長因子の徐放化ハイドロゲルシステムを調製した。今後は、これらの研究成果を組み合わせ、創傷治癒を促進させる人工膜の創製を目指す。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1. Inoue A, Takahashi K A, Arai Y, Tonomura H, Sakao K, Saito M, Fujioka M, Fujiwara H, Tabata Y, and Kubo T. The therapeutic effects of basic

fibroblast growth factor contained in gelatin hydrogel microspheres on experimental osteoarthritis in the rabbit knee. *Arthritis & Rheumatism*, 54(1), 264-270 (2006)

2. Nagato H, Umebayashi H, Wako M, Tabata Y, and Manabe M. Collagen-PGA hybrid matrix with bFGF accelerated angiogenesis and granulation tissue formation in diabetic mice. *J. Dermatology*, 33, 670-75 (2006)

3. Nakae M, Kimura H, Naruse K, Horio N, Ito Y, Mizubayashi R, Hamada Y, Nakashima E, Akiyama N, Kobayashi Y, Wtarai A, Kimura N, Horuguchi M, Tabata Y, Oisa Y, and Nakamura J. Effects of basic fibroblast growth factor on experimental diabetic neuropathy in rats. *Diabetes*, 55, 1470-1477 (2006)

4. Yamamoto M, Takahashi Y, and Tabata Y. Enhanced bone regeneration at a segmental bone defect by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from a biodegradable hydrogel. *Tissue Engineering*, 12(5), 1305-1311 (2006)

5. Hiraoka Y, Yamashiro H, Yasuda K, Kimura Y, Inamoto T, and Tabata Y. In situ regeneration of adipose tissue in rat fat pad by combining a collagen scaffold with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor. *Tissue Engineering*, 12(6), 1475-1487 (2006)

6. Takahashi S, Qin Chen, Ogushi T, Fujimura T, Kumagai J, Matsumoto S, Hijikata S, Tabata Y, and Kitamura T. Periurethral injection of sustained release basic fibroblast growth factor improves sphincteric contractility of the rat urethra denervated by botulinum-A toxin. *J Urology*, 176, 819-823 (2006)

7. Hirose K, Fujita M, Marui A, Arai Y, Sakaguchi H, Yuhong Huang, Shyamal Chandra BIR, Tabata Y, and Komeda M. Combined treatment of sustained-release basic fibroblast growth factor and sarpogrelate enhances collateral blood flow effectively in rabbit hindlimb ischemia. *Circ. J.* 70, 1190-1194 (2006)

8. Hamada Y, Katoh S, Hibino N, Kosaka H, Hamada D, Yasui N, Ozeki M, Tabata

Y. Effects of monofilament nylon coated with basic fibroblast growth factor on endogenous intrasynovial flexor tendon healing. J. Hand Surg. 31A, 530-540 (2006)

9. Tazaki J, Akazawa T, Murata M, Yamamoto M, Tabata Y, Yoshimoto R, Arisue M. BMP-2 dose-response and release studies in functionally graded Hap. Key Eng Mater, 18, 965-968 (2006)

10. Alejandro Soto-Gutierrez, Kobayashi N, Jorge David Rivas-Carrillo, Nalu Navarro-Alvarez, Debaio Zhao, Okitsu T, Noguchi H, Hesham Basma, Tabata Y, Yong Chen, Tanaka K, Narushima M, Miki A, Ueda T, Hee-Sook Jun, Tanaka N, Jane Lebkowski, Ji-Won Yoon, Ira J Fox. Reversal of mouse hepatic failure using an implanted liver-assist device containing ES cell-derived hepatocytes. Nature Biotechnology, 24, 1412-1419 (2006)

11. Iwai K, Nakagawa T, Endo T, Matsuoka Y, Kita T, T.S. Kim, Tabata Y, and Ito J. Cochlear protection by local IGF-1 application using biodegradable gel. Laryngoscope, 116 (4) , 529-533 (2006)

H 知的財産の出願・登録状況

特になし。

人工膜の作製に関する研究

分担研究者 下村政嗣

北海道大学電子科学研究所附属ナノテクノロジー研究センター
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製である。これまでの人工皮膚は長期生着が困難であり、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製ができると考える。

平成 18 年度の研究では、17 年度に見出した、孔径 3 ミクロンの多孔質薄膜の最適製膜条件を検討した。またこの膜上で皮膚由来細胞の増殖率が向上する理由について明らかにするために、血清からの吸着タンパク質の組成について調べた。また、多孔質薄膜の皮下埋め込みによる安全性を確認した。

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、従来の人工皮膚は、脆弱なため取り扱い困難、高価、作製に時間がかかる問題点があり、上皮細胞だけの細胞シートでは、真皮成分を欠損した皮膚欠損再生には適用できなかった。さらに、上皮細胞と真皮細胞を混合すると、バランス良い増殖が得られなかった。一方、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。

本研究では、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可能性がある。

B 研究方法

・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。

・多孔質薄膜への吸着タンパク質組成の検討

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。

・多孔質薄膜の安全性試験

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。

C 研究成果

・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

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 μ m、5 μ m、20 μ 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

埋殖部位では、肉眼的観察において埋殖期間 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。

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。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検討を行う。フィブロネクチンなどの細胞接着性タンパク質が他のタンパク質（接着タンパク質の吸着を阻害する）が存在しても位置選択的にハニカムフィルムの細孔周囲に吸着し、細胞接着サイトを提供していることが初めて分った。細胞機能を決める細胞のハニカムフィルム上の接着点はフィブロネクチンの吸着位置と一致することも明らかとなった。これらの結果から代表的な細胞接着性のタンパク質である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しているのではないかと考えられる。また、フィブロネクチンの多孔質薄膜への選択吸着により創処治癒が促進されることが示唆された。

多孔質薄膜をウサギ皮下へ埋殖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。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。

E 結論

今回の研究で、孔径 3 ミクロンの多孔質薄膜の最適性膜条件を見出した。こ

の多孔質薄膜には細胞接着性のフィブロネクチンが選択的に吸着することがわかった。また、多孔質薄膜の安全性を確認した。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1. M. Tanaka, A. Tkayama, E. Ito, H. Sunami, S. Yamamoto, M. Shimomura, Effect of pore size of self-organized honeycomb-patterned polymer films on spreading, focal adhesion, proliferation, and function of endothelial cells J. Nanosci. Nanotech, 7, 763-772 (2007)
2. M. Tanaka, K. Nishikawa, H. Okubo, H. Kamachi, T. Kawai, M. Matsushita, S. Todo, M. Shimomura: Control of hepatocyte adhesion and function on self-organized honeycomb-patterned polymer film, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 284-285, 464-469 (2006)
3. A. Tsuruma, M. Tanaka, S. Yamamoto, N. Fukushima, M. Shimomura: Topographical control of neurites extension on stripe-patterned polymer films Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 284-285, 470-474 (2006)
4. S. Yamamoto, M. Tanaka, H. Sunami, K. Arai, A. Takayama, S. Yamashita, Y. Morita, M. Shimomura Relationship between adsorbed fibronectin and cell adhesion on a honeycomb-patterned Film, Surf. Sci., 600, 3785-3791 (2006)
5. H. Sunami, E. Ito, M. Tanaka, S. Yamamoto, M. Shimomura: Effect of Honeycomb Films on protein Adhesion, Cell adhesion and proliferation: Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering 284-285 (2006)
6. H. Yabu, Y. Hirai, M. Shimomura, Electroless Plating of Honeycomb and Pincushion Polymer Films Prepared by Self-Organization, Langmuir, 22, 9760-9764 (2006)
7. J.R. McMillan, M. Akiyama, M. Tanaka, S. Yamamoto, M. Goto, R. Abe, D. Sawamura, M. Shimomura, H. Shimizu, Small diameter porous biodegradable membranes enhance adhesion and growth of human cultured epidermal keratinocyte and dermal fibroblast cells, Tissue Eng, 13, 1-10 (2007)
8. T. Okajima, M. Tanaka, S. Tsukiyama, T. Kadowaki, S. Yamamoto, M. Shimomura, H. Tokumoto, Stress relaxation of HepG2 cells measured by atomic force microscopy, Nanotechnology, 18, 1-5 (2007)
9. Y. Uraki, J. Nemoto, H. Otsuka, Y. Tamai, J. Sugiyama, T. Kishimoto, M. Ubukata, H. Yabu, M. Tanaka, M. Shimomura, Honeycomb-Like Architecture Produced by Living Bacteria, *Gluconacetobacter xylinus*, Carbohydrate Polymers, in press.

10. Y. M. Chen, M. Tanaka, JP Gong, K Yasuda, S. Yamamoto, M. Shimomura, Y. Osada, Platelet adhesion to endothelial cells cultured on various hydrogel scaffolds, *Biomaterials*.28,1752-1760 (2007)
11. T. Higuchi, H. Yabu, M. Shimomura, Simple Preparation of Hemispherical Polystyrene Nanoparticles, *Colloids and Surfaces A* 284-285, 250-253 (2006)
12. H. Yabu, M. Kojima, M. Tsubouchi, S. Onoue, M. Sugitani, M. Shimomura, Fabrication of Photo Cross-Linked Honeycomb-patterned Films, *Colloids and Surfaces A* 284-285, 254-256 (2006)
13. H. Yabu, K. Inoue, M. Shimomura, Multiple-periodic Structures of Self-organized Honeycomb-patterned Films and Polymer Nanoparticles Hybrids, *Colloids and Surfaces A* 284-285, 301-304 (2006)
14. Sachiko Matsushita and Masatsugu Shimomura, Light-propagation patterns in freestanding two-dimensional colloidal crystals, *Colloids and Surfaces A* 284-285, 315-319 (2006)
15. K. Tamaki, H. Yabu, T. Isoshima, M. Hara, M. Shimomura, Fabrication of luminescent polymeric nanoparticles doped with a lanthanide complex by self-organization process, *Colloids and Surfaces A* 284-285, 355-358 (2006)
16. Takuya Ohzono and Masatsugu Shimomura, Simple fabrication of ring-like microwrinkle patterns, *Colloids and Surfaces A* 284-285, 505-508 (2006)

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)
- (7) 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)

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表（雑誌）

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Sawamura D, Goto M, Sakai K, Nakamura H, <u>McMillan JR</u> , Akiyama M, Shirado O, Oyama N, Sato 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)			
Akiyama M, Sakai K, Arita K, Nomura Y, Ito K, Kodama K, <u>McMillan JR</u> , 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)			
Qiao H, <u>McMillan JR</u> .	Gelsolin segment 5 inhibits HIV-induced T-cell apoptosis via Vpr-binding to VDAC.	FEBS Lett	581	535-4 0	2007
<u>McMillan JR</u> , Akiyama M, Tanaka M Yamamoto S, Goto M, Abe R, Sawamura D Shimomura M, Shimizu H.	Small-Diameter Porous Poly (epsilon-Capro lactone) Films Enhance Adhesion and Growth of Human Cultured Epidermal Keratinocyte	Tissue Eng	13(4)	1-10	2007

	and Dermal Fibroblast Cells.				
Akiyama M, Titeux M, Sakai K, <u>McMillan JR</u> , 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
Akiyama M, Sakai K, Wolff G, Hausser I, <u>McMillan JR</u> , Sawamura D, Shimizu H.	A novel ABCA12 mutation 3270delT causes harlequin ichthyosis.	Br J Dermatol	155	1064-6	2006
Ito H, Akiyama M, Nakagawa H, Uematsu R, Deguchi K, <u>McMillan JR</u> , Nishimura S, Shimizu H.	N-Linked neutral oligosaccharides in the stratum corneum of normal and ichthyotic skin.	Arch Dermatol Res	298	403-7	2007
<u>McMillan JR</u> , 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
Inokuma D, Abe R, Fujita Y,	CTACK/CCL27 accelerates skin	Stem Cells	24	2810-6	2006

Sasaki M, Shibaki A, Nakamura H, <u>McMillan JR</u> , Shimizu T, Shimizu H.	regeneration via accumulation of bone marrow-derived keratinocytes.				
Goto M, Sawamura D, Nishie W, Sakai K, <u>McMillan JR</u> , 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
Akiyama M, Sakai K, Sugiyama-Nakagiri Y, Yamanaka Y, <u>McMillan JR</u> , 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	J Invest Dermatol	126	1518- 23	2006

	severity.				
<u>McMillan JR</u> , 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 Histoche m Cytochem	54	109-1 8	2006
Nemoto I, <u>Shibaki A</u> , 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
Yagi H, Hashizume H, Horibe T, Yoshinari Y, Hata M, Ohshima A, Ito T, Takigawa M, <u>Shibaki A</u> , Shimizu H, Seo N.	Induction of therapeuticall y relevant cytotoxic T lymphocytes in humans by percutaneous peptide immunization.	Cancer Res	66	10136 -44	2006
Sakai K, Akiyama M, Watanabe T, Sanayama K, Sugita K, Takahashi M, Suehiro K, Yorifuji K, <u>Shibaki A</u> , Shimizu H.	Novel ALDH3A2 Heterozygous Mutations in a Japanese Family with Sjogren-Larsson Syndrome.	J Invest Dermatol	126	2545- 7	2006
Yanagi T, <u>Shibaki A</u> , Tsuji-Abe Y,	Epidermodyspla sia verruciformis	Clin Exp Dermatol	31	390-3	2006

Yokota K, Shimizu H.	and generalized verrucosis: the same disease?				
Yanagi T, Akiyama M, Aoyagi S, <u>Shibaki A</u> , Homma A, Shimizu H.	Marked and restricted cutaneous pigmentation induced by selective intra-arterial cisplatin infusion.	J Am Acad Dermatol	54	362-3	2006
Goto M, Sawamura D, Ito K, Abe M, Nishie W, Sakai K, <u>Shibaki A</u> , 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	766-7 2	2006
Yanagi T, Sawamura D, Nishie W, Abe M, <u>Shibaki A</u> , Shimizu H.	Multiple apocrine hidrocystoma showing plane pigmented macules.	J Am Acad Dermatol	54	S53-4	2006
Shichinohe R, <u>Shibaki A</u> , 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
Fujita Y, <u>Abe R</u> , 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