

200706010A

厚生労働省科学研究費補助金

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19年度 総括・分担研究報告書

平成20(2008)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	15
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	20
分担研究者 下村政嗣 (東北大学)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	27
IV. 研究成果の刊行物・別冊	39

I . 総括研究報告

厚生労働省科学研究費補助金

(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

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 19 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。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。埋殖期間は1週及び4週、動物数は各埋殖期間につき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殖した。

⑤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。

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 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。

⑤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)- 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。

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。

さらに、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。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。

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、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。

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

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, 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PCT/J P 2007/051080 (2007/2/1)
- (2) 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PCT/J P 2007/051080 (2007/2/1)
- (3) 下村政嗣・石井大佑・藪浩 「ハニカム状多孔質フィルムを利用した高吸着性超撥水基板」 特願 2007-055467 (2007/3/6)
- (4) 「Method of culturing neurons, neuron culture substrate, neurons, neuron system, and method for manufacturing neuron system」 Kosuke Kuwabara, Akihiro Miyauchi, Masatsugu Shimomura, Masaru Tanaka, Hiroshi Yabu, Akinori Tsuruma Hitachi Ltd,

Hokkaido University Patent Number:GB2423774 (2007/3/14)

- (5) 下村政嗣、藪浩、三木康史、山崎英数、伊藤晃寿「多孔フィルムの製造方法」特願 2007-081832 (2007/3/27)
- (6) 森永忠輔、日置岳彦、吉田光則、田中大之、金木則明、島田浩次、下村政嗣、藪浩、児島美季「バイオセンサーチップ」特願 2007-089850 (2007/3/29)
- (7) 西埜文晃、高木斗志彦、桑原昌宏、下村政嗣、居城邦治、山本貞明、松尾保孝、藪浩「周期的な構造が形成された樹脂フィルムの製造方法」特願 2007-146849 (2007/6/1)
- (8) 西埜文晃、高木斗志彦、桑原昌宏、下村政嗣、居城邦治、山本貞明、松尾保孝、藪浩「3次元構造が形成された樹脂フィルムの製造方法」特願 2007-145890 (2007/5/31)
- (9) 築山周作、田中賢、山本貞明、下村政嗣、松下通明、藤堂省「睥島細胞からなる3次元凝集体をインビトロで製造する方法」特願 2007-123708 (2007/5/8)
- (10) 下村政嗣、田中賢、藪浩、山崎英数、外園裕久、福平由佳子、兼子博章「ハニカム状多孔質体の製造方法」特願 2007-526838 (2007/10/11)
- (11) 山本貞明、田中賢、下村政嗣、井ノ口仁一、佐藤貴繁「ハニカム状多孔質体を用いた脂肪細胞の長期培養方法」特願 2008-6906 (2008/1/16)

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金
(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
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 19 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

これまで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。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明らかにしているため、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. Tsubota A, Akiyama M, Sakai K, Yanagi T, McMillan JR, Higashi A, Shimizu H: Congenital ichthyosiform erythroderma mimicking ichthyosis bullosa of Siemens. *Br J Dermatol* 158: 191-194, 2008.
2. Yamanaka Y, Akiyama M, Sugiyama-Nakagiri Y, Sakai K, Goto M, McMillan JR, Ota M, Sawamura D, Shimizu H: Expression of the keratinocyte lipid transporter ABCA12 in developing and reconstituted human epidermis. *Am J Pathol* 171: 43-52, 2007.
3. 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* 127: 1537-1540, 2007.
4. Sakai K, Akiyama M, Sugiyama-Nakagiri Y, McMillan JR, Sawamura D, Shimizu H: Localization of ABCA12 from Golgi apparatus to lamellar granules in human upper epidermal keratinocytes. *Exp Dermatol* 16: 920-926, 2007.
5. Qiao H, McMillan JR: Gelsolin segment 5 inhibits HIV-induced T-cell apoptosis via Vpr-binding to VDAC. *FEBS Lett* 581: 535-540, 2007.
6. Nishie W, Sawamura D, Goto M, Ito K, Shibaki A, McMillan JR, Sakai K, Nakamura H, Olasz E, Yancey KB, Akiyama M, Shimizu H: Humanization of autoantigen. *Nat Med* 13: 378-383, 2007.
7. 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: 789-798, 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: Plectin defects in epidermolysis

- bullosa simplex with muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 35: 24-35, 2007.
9. 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: 403-407, 2007.
 10. 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: 568-573, 2007.
 11. Akiyama M, Sakai K, Sato T, McMillan JR, Goto M, Sawamura D, Shimizu H: Compound heterozygous ABCA12 mutations including a novel nonsense mutation underlie harlequin ichthyosis. *Dermatology* 215: 155-159, 2007.
 12. Akiyama M, Sakai K, Ogawa M, McMillan JR, Sawamura D, Shimizu H: Novel duplication mutation in the patatin domain of adipose triglyceride lipase (PNPLA2) in neutral lipid storage disease with severe myopathy. *Muscle Nerve* 36: 856-859, 2007.
 13. 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* 127: 1540-1543, 2007.

芝木晃彦

1. Shinkuma S, Nishie W, Shibaki A, Sawamura D, Ito K, Tsuji-Abe Y, Natsuga K, Chan P, Amagai M, Shimizu H: Cutaneous type pemphigus vulgaris with skin manifestations similar to the classical mucocutaneous type: a case report and review of the literature. *Clin Exp Dermatol*, in press.
2. Aoyagi S, Akiyama M, Mashiko M, Shibaki A, Shimizu H: Extensive proliferative nodules in a case of giant congenital naevus. *Clin Exp Dermatol* 33: 125-127, 2008.
3. Nishie W, Sawamura D, Goto M, Ito K, Shibaki A, McMillan JR, Sakai K, Nakamura H, Olsz E, Yancey KB, Akiyama M, Shimizu H: Humanization of autoantigen. *Nat Med* 13: 378-383, 2007.
4. Natsuga K, Abe R, Ujiie H, Shibaki A, Sawamura D, Nishio M, Fujimoto K, Koike T, Shimizu H: Non-Hodgkin lymphoma preceded by recalcitrant eczema. *Eur J Haematol* 79: 369-370, 2007.
5. Moriuchi R, Shibaki A, Yasukawa K, Onozuka T, Sato T, Kaneda M, Iguchi A, Kobayashi R, Shimizu H: Neonatal vesiculopustular eruption of the face: a sign of trisomy 21-associated transient myeloproliferative disorder. *Br J Dermatol* 156:

1373-1374, 2007.

6. Hoshina D, Shibaki A, Aoyagi S, Kimura K, Shimizu H: Giant dermatofibroma: a rare variant of dermatofibroma preferentially developing on the lower limbs. *Clin Exp Dermatol* 32: 132-134, 2007.

阿部理一郎

1. Yamagishi S, Abe R, Jinnouchi Y, Matsui T, Imaizumi T, Inoue H: Pigment epithelium-derived factor (PEDF) inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced vascular hyperpermeability both in vitro and in vivo. *J Int Med Res*, in press.
2. Abe R, Murase S, Nomura Y, Natsuga K, Tateishi Y, Tomita Y, Tsuji-Abe Y, Matsumura T, Shimizu H: A case of acquired perforating dermatosis manifesting as elastosis perforans serpiginosa and perforating folliculitis. *Clin Exp Dermatol*, in press.
3. Abe R, Hirayama T, Shimizu H: Disseminated subcutaneous nodules alone as manifestations of Churg-Strauss syndrome. *Int J Dermatol*, in press.
4. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H: Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol* 180: 2581-2587, 2008.
5. Honda A, Abe R, Makino T, Norisugi O, Fujita Y, Watanabe H, Nishihira J, Iwakura Y, Yamagishi S, Shimizu H, Shimizu T: Interleukin-1beta and macrophage migration inhibitory factor (MIF) in dermal fibroblasts mediate UVA-induced matrix metalloproteinase-1 expression. *J Dermatol Sci* 49: 63-72, 2008.
6. Asano Y, Makino T, Norisugi O, Watanabe H, Abe R, Shimizu H, Shimizu T: Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci* 49: 95-97, 2008.
7. Yaosaka M, Abe R, Ujiie H, Abe Y, Shimizu H: Unilateral periorbital oedema due to sarcoid infiltration of the eyelid: an unusual presentation of sarcoidosis with facial nerve palsy and parotid gland enlargement. *Br J Dermatol* 157: 200-202, 2007.
8. Natsuga K, Abe R, Ujiie H, Shibaki A, Sawamura D, Nishio M, Fujimoto K, Koike T, Shimizu H: Non-Hodgkin lymphoma preceded by recalcitrant eczema. *Eur J Haematol* 79: 369-370, 2007.
9. Murata J, Abe R: Soluble Fas ligand: is it a critical mediator of toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome? *J Invest Dermatol* 127: 744-745, 2007.
10. 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: 789-798, 2007.

11. Chen KR, Sakamoto M, Ikemoto K, Abe R, Shimizu H: Granulomatous arteritis in cutaneous lesions of Churg-Strauss syndrome. *J Cutan Pathol* 34: 330-337, 2007
12. Abe R, Fujita Y, Yamagishi S: Angiogenesis and metastasis inhibitors for the treatment of malignant melanoma. *Mini Rev Med Chem* 7: 649-661, 2007.

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 annual report 2007

Porous film grafts with high density seeded keratinocytes improve the healing rates in wounded model mice

James R. McMillan

Department of Dermatology, Graduate School of Medicine and Creative Research Initiative Sousei,
Faculty of Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan

We have previously demonstrated that self-organized patterned porous poly-(epsilon-caprolactone) films with regularly spaced, controlled pore sizes provide adhesion and support for cultured human keratinocytes and dermal fibroblasts. We determined the effects of applying various sized porous films (n=3 mice per treatment) on to 4 mm punch biopsy wounded Balb C/SCID mice to assess wound healing response. Films with pores ranging in size from 3-20 microns, elicited a mild lymphocytic and foreign body perifollicular immune response and increased dermal thickening, regardless of pore size but this treatment failed to significantly improve wound healing time or increase wound closure rates. By 21 days after wounding the porous film grafts had become fully biodegraded within the wounded dermal tissue. Furthermore, we assessed the proof of principle that live cultured cells (keratinocytes, fibroblasts or in combination) can be delivered into model SCID mouse wounds using porous films. Human cells (15,000 or 30,000 cells/mm² fibroblasts or keratinocytes) were subconfluent cultured on 3 micron (for keratinocyte or cell combinations) or 5 micron (fibroblasts alone) porous films. These cell/film combinations were then transplanted onto wounded mice and wounding/vascularization was quantitatively assessed. Fibroblasts alone or in combination with low density seeded keratinocytes failed to significantly improve wound healing. However, transplanted cells were readily detected using anti-human HLA antibodies in wounded SCID (but not Balb C) mouse skin 21 days after treatment, when the wounds had completely healed. Only high density (30,000 cells/mm²) seeded keratinocytes on films improved wounding but without altering dermal vascularization. These keratinocytes expressed intrinsic immune-related factors including beta defensins and other differentiation-specific markers of keratinization and cell cohesion. Taken together, our data demonstrate for the first time the feasibility of using porous films to deliver living cells into skin wounds as part of our aim to utilize cell therapy to improve the wound healing response.

厚生労働科学研究費補助金
(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 19 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

我々は、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℃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℃、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