

創傷をより綺麗に修復させる皮膚再生促進薬の開発

東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学

住吉 秀明

It is generally known that a serious dermal injury causes scar formation. The cleaner dermal restoration, that is scarless regeneration, is an important theme in the next stage of regenerative medicine for keeping the quality of life of patients. Our previous study indicated that the scar tissue made a different composition of collagen fiber from that in normal dermal tissue. Artificial dermis has been utilized clinically for accelerating wound healing in the field of skin regenerative medicine. However, because of the inefficient re-epithelialization, conventional artificial dermis requires the subsequent epidermal auto-transplantation.

In the present study, we have developed a novel artificial dermis containing “jellyfish” collagen that accelerates skin regeneration through both re-epithelialization and granulation tissue formation. Since the jellyfish (*Aurelia aurita*) collagen is water soluble, the artificial dermis was prepared as a mixture of porcine type I collagen and jellyfish collagen. The effect was evaluated in vivo using the skin full-thickness wound mouse model. The results indicated that, the collagen film with jellyfish promoted epidermal cell migration. On the other hand, collagen sponge with jellyfish enhanced fibroblast infiltration into the granulation tissue. Subsequently we determined the most effective content ratio of the porcine and jellyfish collagens, and further examined the combinatorial effect of collagen film and sponge materials. Additionally we tried the freeze and drying procedure under t-butyl alcohol solvent, to mimic native dermal collagen fiber structure.

We developing new artificial dermis could also call “artificial skin” because more physiological infiltration both of donor keratinocytes and fibroblasts like native wound restoration. Experiments are in progress to demonstrate that accelerate cleaner dermal healing without scar formation when used with additional time span. It provides a novel devise that can be used in the variety range of skin diseases instead of the conventional manners.

1. 緒言

これまで重篤な創傷の後に「傷跡」が残ってしまうことは、止むを得ないこととされてきた。傷跡をいかに自然に近い状態で修復できるかというテーマは、美容面と精神面における受傷者のQOLを維持する上で重要な要素であるにも関わらず、未だ再生医療の主題にはなっていない。しかし今後の皮膚再生医療は損傷を回復させるだけでなく、より自然に綺麗に再生させることを実現させる段階に進むべきであると考えます。

我々は本研究の目標として、傷跡と健全皮膚を構成する細胞外基質 (Extracellular matrix : ECM) の微細構造の相違点の解析と、健全皮膚構造を模倣し更に再生を促進するコラーゲンをベースとした新しい人工皮膚の開発を行なった。

マウスを用いた皮膚の創傷治療における我々の先行研究では、創傷時に新生されるコラーゲンは組成や微細線維構造が正常真皮組織と異なることを報告している¹⁻³⁾。再生肉芽組織は瘢痕となり傷跡を形成する。本研究において、更に長期 (9 ヶ月) にわたって傷跡の微細構造を解析し、特

に二次的な線維化として生じたコラーゲン線維がどのように走行しており、正常真皮と異なっているかを観察した。観察結果を基に、一般的な人工真皮に用いられているブタI型コラーゲンを基本成分とし、自然な真皮の線維構造をできるだけ模倣した細胞が進入し易い構造物の作製を試みた。

研究目的のもう一つは、早く綺麗に傷を治癒させるための付加的な成分の探索である。当初はV型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖等、創傷治療過程で発現する微量ECM成分に着目したが、微量成分を充分量確保するのが困難であった。その進化の過程でV型コラーゲンと似ているといわれるミズクラゲ (*Aurelia aurita*) 由来のコラーゲン⁴⁾を配合した結果、従来の人工真皮にはない、再上皮化と肉芽形成両方を促進するはたらきが見出された。クラゲコラーゲンは安価で大量に確保できる新しい資源であり、細胞の接着性の評価⁵⁾、免疫の賦活化^{6, 7)}、軟骨組織の足場グラフトとしての利用例⁸⁾などがこれまで報告されているが、人工皮膚としての応用例はない。我々はこの表皮細胞と肉芽形成細胞に対する遊走促進効果を最大限発揮できるように最適化した人工真皮を作製し、さらに創傷モデルマウスへの移植実験を行ない、in-vivoにおける生着と皮膚再生の評価を行なった。

2. 方法

2. 1. マウスの創傷モデルの作製と瘢痕組織の観察・正常真皮との比較

マウスの創傷モデルは、6 mm の生検用トレパンを用い



Development of regenerating compounds for cleaner dermal restoration

Hideaki Sumiyoshi

Regenerative Medicine, Division Basic Clinical Science, Tokai University School of Medicine

て背部両側に表皮、真皮、皮下組織全層を欠損させるものを採用した。受傷後6日目と9ヶ月後の傷跡の組織の外観を撮影した後、マウスを安楽死させ、創面を横断する検体を採材し、パラフィン標本と電子顕微鏡用樹脂包埋標本を作製した。標本はHE染色、透過型電子顕微鏡による観察を行ない、細胞と組織形態、コラーゲン線維束の走行、密度、直径の計測を行ない、正常真皮と癒痕組織の組織構築における相違点についての比較を行なった。本研究の実験で用いたマウスは、東海大学内に設置される「東海大学動物実験委員会」の審査・承認を得た上で実施された。

2. 2. コラーゲンを基礎材料とした人工真皮用フィルム材・スポンジ材の作製

ブタI型コラーゲンはブタ胎児皮膚組織より既成の方法を用い、アテロコラーゲンとして抽出・精製を行なった⁹⁾。ミズクラゲコラーゲンは株式会社海月研究所より購入した。

2. 2. 1. コラーゲンフィルムの作製

コラーゲンフィルムは500 µg/mlのコラーゲン5mM酢酸可溶化液を1 X PBSによる中性化を行ない、線維形成させた後ラップフィルム上に薄く進展させ風乾することで作製した。ミズクラゲ混合コラーゲンフィルムはミズクラゲコラーゲン(以下J.C.)がブタI型コラーゲン(以下P.C.)に対し含まれる量が各0、20、40、45、50、55、60、65、80、100各%で混合したものを作製し、総コラーゲン量が500 µg/mlとなるようにした。風乾後85%エタノールで洗浄し脱塩を行なった。作製したコラーゲンフィルムは走査電子顕微鏡によって超微細構造を確認した。

2. 2. 2. コラーゲンスポンジの作製

コラーゲンスポンジは1 mg/mlコラーゲン5mM酢酸可溶化液を1 X PBSによって中性化し37℃に加温することで、コラーゲングルを作製し、そのまま凍結乾燥させるものと、エタノールからt-ブチルアルコール(t-BA)に溶媒転換して凍結乾燥させたものを作製した。ミズクラゲ混合コラーゲンスポンジはJ.C.がP.C.に対し、各0、20、50各%で混合したものを作製し、総コラーゲン量が1 mg/mlとなるようにした。コラーゲンスポンジは走査電子顕微鏡にて超微細構造を確認した。

2. 3. 創傷モデルマウスへのコラーゲン生体デバイス移植

2. 1. の全層欠損モデルに上記の人工真皮候補である、ミズクラゲコラーゲンを含有するフィルム材とスポンジ材をそれぞれ移植し、短期の創傷治癒に対する寄与を観察した。人工真皮デバイスを創部に密着させ、ドレッシングテープで被覆し創部の保護と保湿を行なった。移植後6日後にマウスを安楽死させ、人工真皮デバイスと創傷中心部を横断する面が表面に出るようにHE染色標本を作製した。

細胞と組織の観察をすると同時に、宿主マウスの表皮角化細胞の創傷辺縁部から人工真皮上への伸長距離と、肉芽形成細胞の人工真皮内への遊走数を計測した。全ての移植マウスの表皮角化細胞の伸長距離、肉芽形成細胞の遊走数を集計し、統計処理を行なった。有意差の検定はt検定を用いた。

2. 4. フィルム・スポンジハイブリッド型、J.C.混合人工皮膚の開発

フィルム材とスポンジ材の特性を併せ持つハイブリッド型人工真皮の成型を行なった。最終的にはt-BA凍結乾燥法を基本とし、酸性可溶化したコラーゲン溶液を液体のまま薄くコラーゲングル上にコーティングした後、t-BA置換し凍結乾燥する方法を開発し、フィルム構造を表面にもつ二層性の人工真皮が作製された。このハイブリッド型人工真皮を上記と同じく全層欠損モデルマウスへの移植を行ない、短期の創傷治癒に対する寄与について従来の人工真皮と比較した。

3. 結果

3. 1. 正常真皮組織と受傷後の癒痕組織(傷跡)のコラーゲン超微細組織構築の比較

皮膚を全層欠損する深い創傷から治癒した癒痕組織の特徴を、電子顕微鏡を用いて超微細構造レベルで解析した。受傷後6日目に形成されるコラーゲン線維は細くて方向性が一定でないコラーゲン細線維①(破線内)と、中間径のコラーゲン線維②が共に存在し(図1)、細線維は直径15.1 ± 1.1 nm (n 100)、中間径線維は40.6 ± 5.6 nm (n 100)であった。9ヶ月後の癒痕組織の外見は正常部位と色調、質感も異なり明瞭に見分けることが可能であった(図1)。コラーゲン線維径は直径39.2 ± 4.6 nm (n 100)であり、受傷後6日目の中間径線維と同じであった。これに対し正常真皮のコラーゲン線維は直径94.7 ± 7.1 nm (n 100)と明らかに太い上に、綺麗な流紋状の走行を持つこと、線維の間隙が密であり線維の表面も滑らかである等、構造上の明らかな違いがみられた(図1)。本実験から、創傷治癒後の再生組織はコラーゲン分子構造のレベルで異なる組織として構築されることが確認された。

3. 2. ブタ/ミズクラゲコラーゲンをを用いた新しい人工真皮の開発

広く臨床応用されている、ブタのI型コラーゲン(P.C.)を基本素材とし、新素材であるミズクラゲコラーゲン(J.C.)を組み込んだ新しい人工真皮の試作例を示す。SDS-PAGEによるタンパク質電気泳動像からJ.C.はP.C.に匹敵する分子量を持つことが示されている(図2A)。J.C.は水溶性であり、また中性下で加温してもゲル化しない性質が

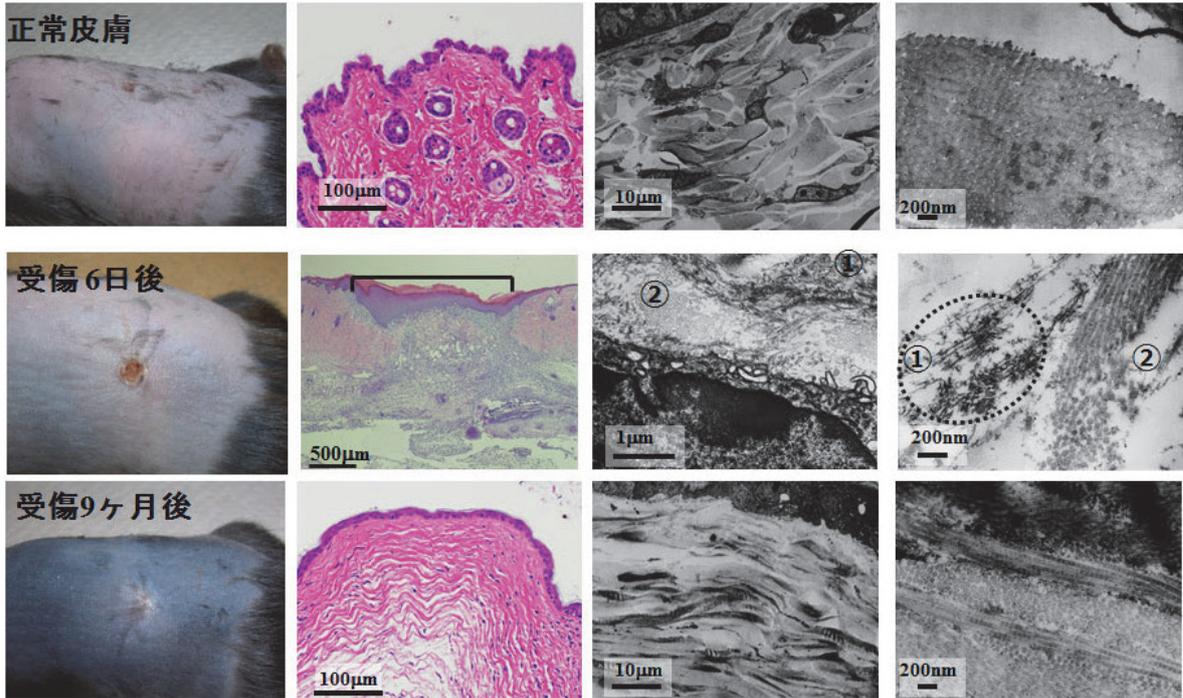


図1 正常真皮組織と瘢痕組織のコラーゲン超微細組織構築の比較

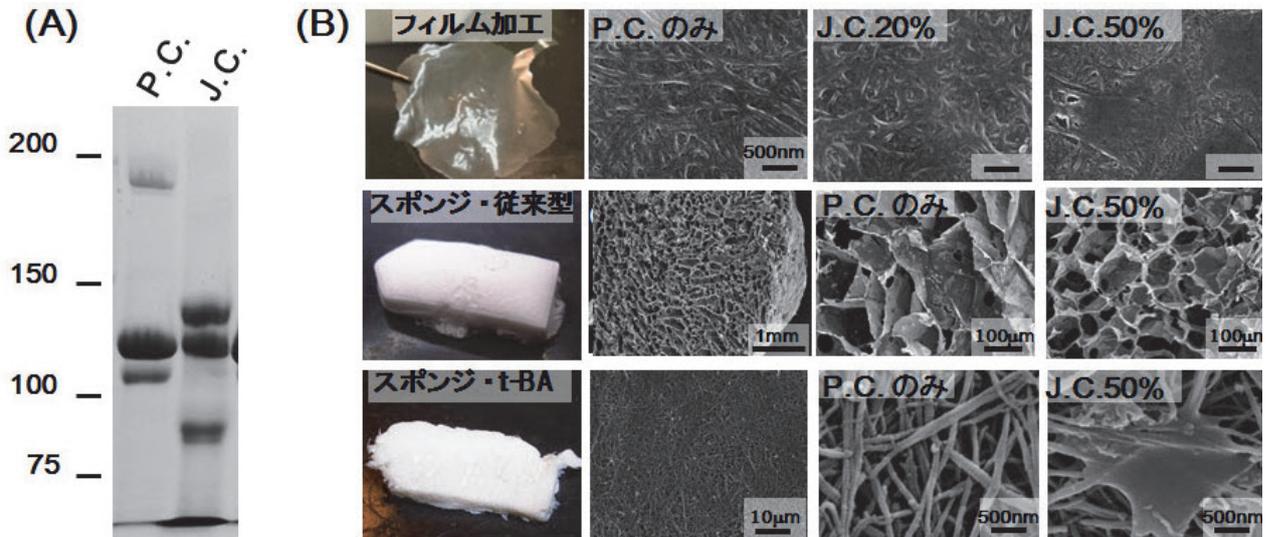


図2 ブタ・ミズクラゲ配合コラーゲンを素材とする人工皮膚デバイス

あるため、基本的にP.C.と混合することで新しい人工真皮の成型が行なわれた。走査型電子顕微鏡（以下SEM）のより確認された超微細構造を示す。

コラーゲンフィルムの作製

フィルム形状なら、J.C.が100%でも作製が可能であった。図2B上段にSEMによる超微細構造を示す。P.C.のみから作製したコラーゲンフィルムは直径100nmに及ぶ線維構造を有していた。J.C.濃度を高めるほどコラーゲンの線維量は少なくなり、50%より高濃度になるとほぼ無構造になった。

コラーゲンスポンジの作製

コラーゲンをゲル化させた後、凍結乾燥することでコラーゲンスポンジを作製した。この方法ではJ.C.濃度は50%まで作製できた。ゲル化コラーゲンをそのまま凍結乾燥すると、一般的なハニカム構造の発泡スポンジとなり、そこに線維構造は認められなかった。J.C.の混合による形状的な差も認められなかった（図2B中段）。我々はSEMでコラーゲン分子を観察する際に用いられるt-ブチルアルコール（以下t-BA）溶媒置換と凍結乾燥によるスポンジ成型を試みた。その結果、天然のコラーゲンと同等の直径約

100 nmの緻密な線維構造を再現したコラーゲンスポンジを作製することができた(2B下段)。このサンプルでJ.C.を含むスポンジは線維量が減少するものの線維径には影響を与えず、J.C.はP.C.の線維束形成過程に干渉しないと考えられた。また粗になったP.C.線維の隙間にJ.C.を混合したときのみ無構造の固形物が沈着しているのが観察された。

3. 3. 創傷モデルマウスへのコラーゲン埋め込みデバイス(人工真皮)の移植

皮膚全層欠損による創傷モデルマウスに実験3.2.で作製したコラーゲンフィルムとスポンジを人工真皮として移植する手術を行なった。移植手術行程を図3Aに示す。

①フィルム材移植例、②スポンジ材移植例、③シールと縫合による創部の保護、④⑤移植後6日経過時の外観である。④は100% P.C.フィルム材で上皮化が完全ではなく、滲出液のため光沢がある。⑤は50% J.C.混合フィルム材、既に上皮が被覆している。

図3Bは6日経過後の人工真皮組織サンプルにおいてHE染色像を行ない、表皮角化細胞の人工真皮上での伸長距離を測定した図であり、数字の単位は μm である。上段はフィルム材、下段はスポンジ材の代表例を示す。表皮角化細胞の伸長はおよそ500 μm 前後であったが、J.C.を50%含むフィルム材では伸長距離が突出して伸びていた。同様の効果は下段に示しているスポンジ材にはみられなかった。

図3Cは同じスポンジ材のサンプルを高倍率で観察した

ものであり、人工真皮内部への細胞の遊走・生着を調べたものである。J.C.を混合しないもの(左端)に比べ、20%、50% J.C.混合スポンジの方が明らかに多くの細胞が遊走していることが示されている。人工真皮内部への細胞の遊走は図3Bに示されるとおり、フィルム材にはみられていない。このことより、ミズクラゲコラーゲン(J.C.)の成分はフィルム形状では表皮角化細胞による再上皮化を、スポンジ形状では肉芽形成を促進し、創傷治癒を著しく促進することが示された。

図4は図3B、3Cの全実験データを数値化しグラフにしたものである。

図4Aは表皮角化細胞の伸長距離を表す。J.C.が40%以上のフィルム材において有意な伸長促進効果が示された。また45%以上で一定化し、60%以上になると人工皮膚が融解し、データが得られなかった。図4Bは単位面積あたりの、スポンジ内への細胞遊走数を示したもので、Eは辺縁部、Cは中央部である。J.C.を20%、50%含むスポンジで有意に多くの細胞が遊走しており、J.C.が肉芽を形成する細胞を人工皮膚内に誘引する効果が示された。

3. 4. フィルム・スポンジ ハイブリッド型、J.C.混合人工真皮の開発

これまでの実験結果を受け、フィルムとスポンジの特性を併せ持ったハイブリッド型人工真皮の成型を試みた。図5Aに示すように最薄5 μm のフィルムを表面に持つ二層性

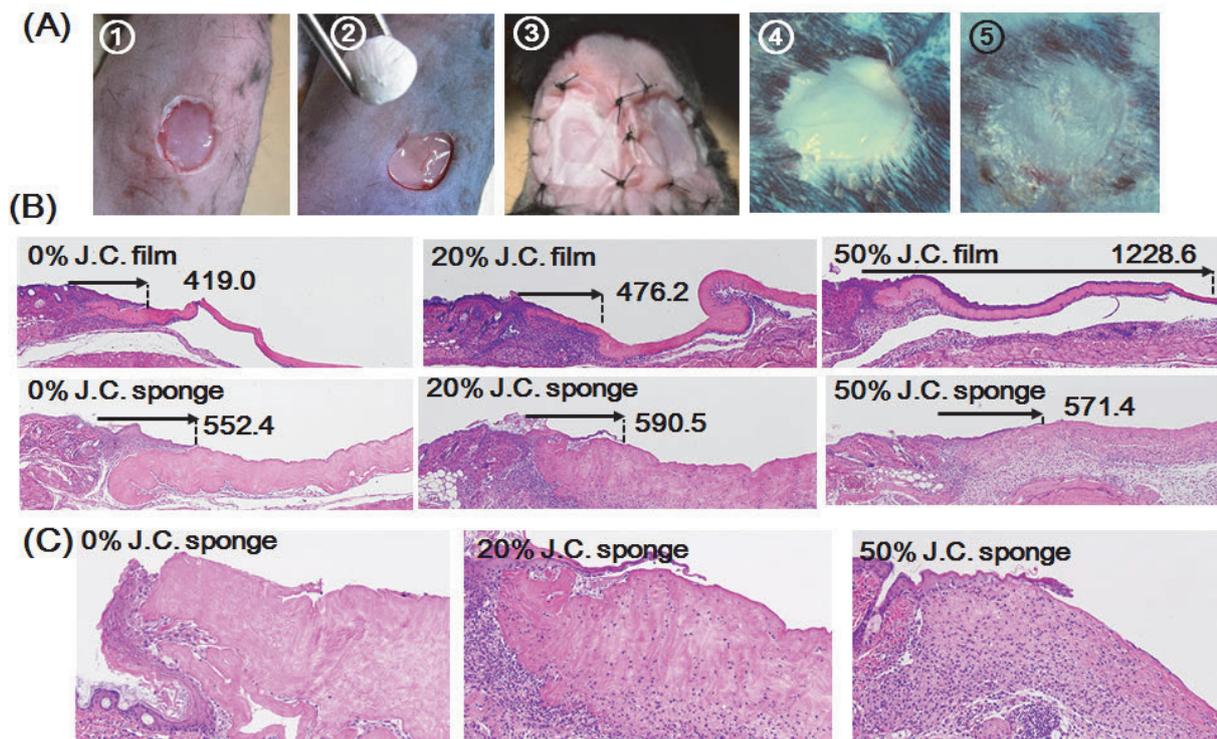


図3 創傷モデルマウスへの新型人工皮膚デバイスの移植と6日後組織の解析

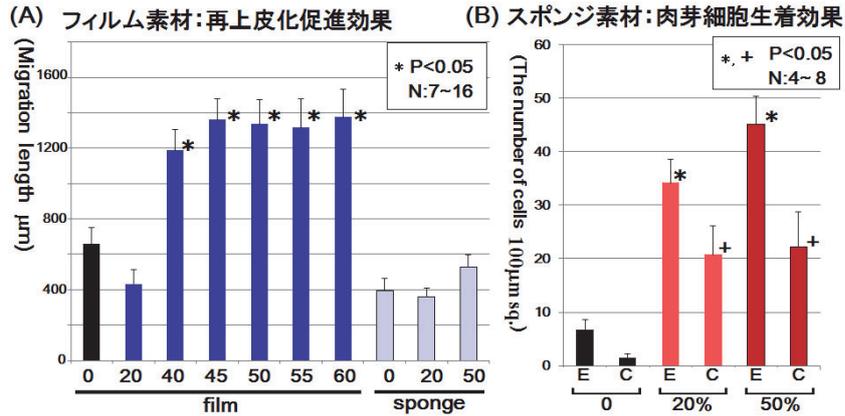


図4 人工皮膚への表皮角化細胞の伸長と肉芽組織細胞の遊走生着効果

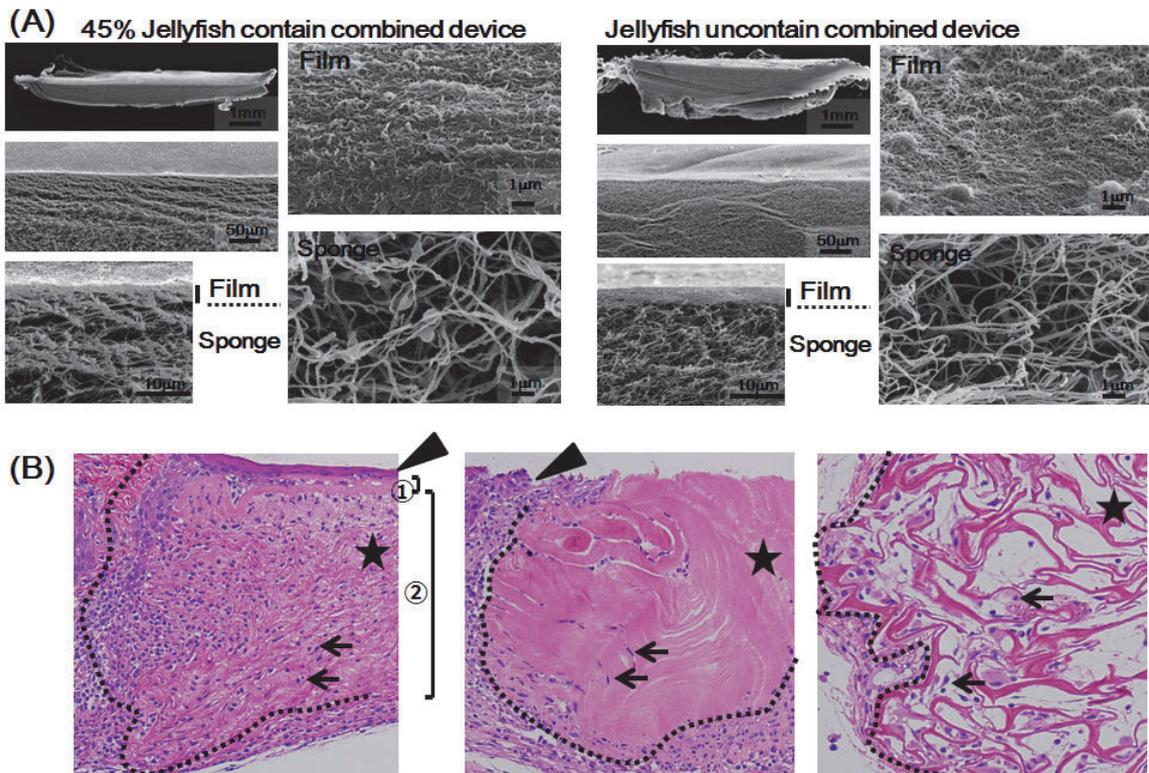


図5 フィルム/スポンジハイブリッド型人工皮膚 J.C. 複合・非複合タイプの作製

の人工真皮が作製された。45% J.C.混合(左側)と、P.C.のみで作製したもの(右側)を示す。

図5Bはこれらのハイブリッド型人工真皮を創傷モデルマウスに移植し、6日後の組織回復を観察したものである。ねらい通り45%J.C.を混合したもの(左端)はフィルム表面において、表皮角化細胞の伸長(黒矢頭)、人工真皮内部(星印)への肉芽細胞の遊走(矢印)両方に優れており、P.C.のみで作製したもの(5B中央)や市販人工真皮(同右端)と比べ、ミズクラゲコラーゲンの持つ治癒促進効果を最大限に引き出せる素材に仕上がった。

4. 考察

皮膚は人間の最外部のバリアであり、環境からの様々な刺激・衝撃に曝され、しばしば損傷するが直ぐ修復されることから皮膚の再生能力はかなり高いという認識がある。しかしながら、実験結果3.1.に示されるように、治癒後の瘢痕(傷跡)の組織は構築が全く異なり線維芽細胞の形態やコラーゲン線維の直径や走行も異なることから、創傷治癒は真皮線維芽細胞とは性質の異なる線維芽細胞によりなる異形の再生といえる。さらに瘢痕は後に拘縮し、引き攣れが起こってくる。つまり欠損による大規模な創傷では

真皮は再生しないのが現実である。真皮のコラーゲンは直径 100 nm 程の太くて密な線維が、規則的で綺麗な流紋を形成するがこれは他の組織にない独特の構造である。創傷治癒時に動員される線維芽細胞はこの構造を造れないため、創傷を綺麗に修復させるために真皮の構造を模したコラーゲン線維の足場を人工的に作製し、迅速に足場へ細胞を生着させる構造体を考えた。一般的な人工真皮にも用いられている、精製ブタ I 型コラーゲンを試験管の中で自己会合させると、直径 100 nm の真皮に近いコラーゲン線維を構築できるが、凍結乾燥を行なうと線維構造は失われハニカム構造となる。私達は走査電子顕微鏡のサンプル調整で用いる t-ブチルアルコール (t-BA) による凍結乾燥法を用いて線維束構造を保持したコラーゲンスポンジを独自に開発した。コラーゲンは加工性に優れており、風乾によりフィルム状、凍結乾燥によりスポンジ状の成形を行える。傷を綺麗に修復しうる構造材の理想的な形状の検討にこれを応用した。

本実験のもう一つねらいである創傷を早く治すための皮膚再生促進薬の探索について、V 型コラーゲンなどの創傷治癒時に特異的に発現してくる微量コラーゲン成分は mg 単位のコラーゲンスポンジに混合できる量の確保ができなかった。その一方でサンプルとして試験されたミズクラゲコラーゲン (J.C.) に予想外の表皮角化細胞の伸長促進と肉芽組織細胞の遊走促進効果が見出されたため、J.C. の皮膚再生医療への応用と可能性の開拓を目的とする新規人工真皮構造体の開発を行なった。

結果として、J.C. が加えられることによる効果は、表皮角化細胞の伸長はフィルム材に、肉芽組織細胞の遊走はスポンジ材に特異的に見られる現象であり、統計的に優位であることが確認された。その効果は 45% 以上で一定となり、J.C. の量比が多くなると構造体が脆くなることから、最適混合比を 45% とした。無脊椎動物の原始的線維性コラーゲンは V 型コラーゲンに構造的に近いとされるが、この効果の由来は現時点で不明である。J.C. はブタ I 型コラーゲンの線維形成を阻害せず、I 型コラーゲンは直径 100 nm の線維を形成し、隙間に J.C. に由来する固形物が充填される構造となること、また中性溶液で水溶性を示すことなど、哺乳類のコラーゲンと異なる性質を有していた。最終的に J.C. の効果を最大現に引き出せるよう、実験結果 図 5A に示される上面がフィルム、下面がスポンジの二層性ハイブリッド人工真皮を開発した。創傷モデルマウスへの移植により、この人工真皮が真皮の構造を模倣したコラーゲン線維を持ち、かつ、表皮角化細胞の伸長と、肉芽を形成する線維芽細胞の遊走・生着の両方を促進できる新しい機能を持っていることを確認した。

5. 総括

創傷部分の治癒・再生においては表皮角化細胞による再上皮化と線維芽細胞による肉芽形成が同時に速やかに進行することが、予後の改善に繋がる重要な要素となる¹⁰⁾。広範囲の欠損を従う重度外傷の治療法として人工真皮が用いられてきたが^{11, 12)}、従来の人工真皮は人工物の足場上に対する表皮角化細胞の生着が悪く、再上皮化が起こらないため、後日に表皮の再移植が必要となる点に課題があった。表皮の細胞が生着するには、コラーゲンスポンジ内に自身の細胞が侵入し自己組織化するのを待たなければならず、この間体液の漏出と感染を防がねばならない。我々は今回、人工真皮への直接的な自己表皮による再上皮化と、肉芽組織による自己組織化が同時に起こることだけでなく、肉芽由来の線維芽細胞は真皮を模したコラーゲン線維構造の型枠に鋤き込まれ、拘縮の起こらない真皮様組織を再現するというこれまでにない要素を持った「人工皮膚」を目指すものを開発した。この人工皮膚は乾燥体として常備することが可能で、従来品通りに開封して直ぐ使うことができる上、自家培養細胞、幹細胞、増殖因子を必要としない安価で汎用性の高いデバイスとしての利用が可能であり、数多くの事例に対処できることを期待している。長期経過についての検討がこれからであり、ミズクラゲコラーゲンの生体反応性の評価等、今後の課題として残されている面も多いが、本助成研究から生まれた新規のシーズとして、実用化を目指し育てていきたいと考えている。

(引用文献)

- 1) Sumiyoshi H, Kitamura H, Matsuo N, Tatsukawa S, Ishikawa K, Okamoto O, Fujikura Y, Fujiwara S, Yoshioka H, Transient expression of mouse pro- α 3(V) collagen gene in wound healing, *Connect. Tissue Res*, 53, 4, 313-317, 2012.
- 2) 住吉秀明, 稲垣 豊, マウス皮膚創傷治癒モデルにおける筋膜由来線維芽細胞と希少コラーゲンののはたらき, *日本食品・機械研究会*, : 食品加工技術, 33, 3, 2013, 22-28 頁
- 3) 住吉秀明, 稲垣 豊, コラーゲン分子種と線維症形成へのかかわり, *医歯薬出版*, : 医学のあゆみ, 244, 6, 2013, 515-520 頁
- 4) Miki A, Inaba S, Baba T, Kihira K, Fukada H, Oda M, Structural and physical properties of collagen extracted from moon jellyfish under neutral pH conditions, *Biosci. Biotethnol. Biochem.*, 79, 10, 1603-1607, 2015.
- 5) Addad S, Exposito J Y, Faye C, Blum S R, Lethias C, Isolation, characterization and biological evaluation

- of jellyfish collagen for use in biomedical applications, *Marine Drugs*, 9, 967-983, 2011.
- 6) Nishimoto S, Goto Y, Morishige H, Shiraishi R, Doi M, Akiyama K, Yamaguchi S, Sugahara T, Mode of action of the immunostimulatory effect of collagen from jellyfish, *Biosci. Biotethnol. Biochem.*, 72, 11, 2806-2814, 2008.
- 7) Morishige H, Sugahara T, Nishimoto S, Muranaka A, Ohni F, Shiraishi R, Doi M, Immunostimulatory effect of collagen from jellyfish in vivo, *Cytotechnology*, 63, 481-492, 2011.
- 8) Hoyer B, Bernhardt A, Lode A, Heinemann S, Sewing J, Klinger M, Notbohm H, Gelinsky M, Jellyfish collagen scaffolds for cartilage tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 10, 883-892, 2014.
- 9) 蛭原哲也, 服部俊治, :型別コラーゲンの精製・同定法 I型, III型コラーゲン, :細胞外マトリックス研究法, 畑隆一郎, 服部俊治, 新井克彦, (編) 1巻, コラーゲン技術研究会, 14-20, 1998.
- 10) Yamaoka H, Sumiyoshi H, Higashi K, Nakao S, Sumida K, Saito K, Ikoma N, Mabuchi T, Ozawa A, Inagaki Y, :A novel small compound accelerates dermal wound healing by modifying infiltration, proliferation and migration of distinct cellular components in mice, *J. Dermatol Sci*, 74, 3, 204-213, 2014.
- 11) Yannas I V, Lee E, Orgill D P, Skrabut E M, Murphy G F, Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 86, 933-937, 1989.
- 12) Akita S, Tanaka K, Hirano A, Lower extremity reconstruction after necrotizing fasciitis and necrotic skin lesions using a porcine-derived skin substitute, *J. Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*, 59, 759-763, 2006.