

学 位 論 文 要 旨

氏 名 山本 昭子



論 文 題 目

「Potential of wound dressing composed of hyaluronic acid
containing epidermal growth factor to enhance cytokine
production by fibroblasts」

(EGF 含有ヒアルロン酸創傷被覆材の有効性：

線維芽細胞のサイトカイン産生能促進効果)

指 導 教 授 承 認 印

黒 柳 能 光



Potential of wound dressing composed of hyaluronic acid containing epidermal growth factor to enhance cytokine production by fibroblasts

(EGF 含有ヒアルロン酸創傷被覆材の有効性:線維芽細胞のサイトカイン産生能促進効果)

北里大学大学院医療系研究科博士課程 DM10031 山本 昭子

【背景】

熱傷や難治性皮膚潰瘍の治療に多くの創傷被覆材が市販されている。また、上皮成長因子(EGF)や塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)のような細胞成長因子の凍結真空乾燥製剤が市販されている。凍結真空乾燥された細胞成長因子製剤は、臨床使用前に専用の溶解液に溶解後、冷蔵庫で保存し、調製後一定期間内に使用しなければならない。細胞成長因子の水溶液を創面にスプレー式に投与し、市販の創傷被覆材がトップドレッシング材として使用される。この際に、創面に投与した細胞成長因子の水溶液の一部がトップドレッシング材に吸収されてしまう欠点がある。また、難治性皮膚潰瘍の創面には過剰なタンパク分解酵素が存在しているため、細胞成長因子の水溶液をスプレー式に局所投与しても早期に失活してしまう欠点がある。このような状況を改善する目的で、創傷治癒能力のあるヒアルロン酸(HA)のスポンジ状シートにEGFを含有した創傷被覆材を開発した。HAは特有の吸湿性、流動性そして粘弾性特性を持つため、創傷治癒に重要な生体材料である。高分子量HAは優れた創傷治癒環境を与え、低分子量HAは血管新生を誘導する。EGFは角化細胞の他に、線維芽細胞と血管内皮細胞の増殖を促進する。EGFは線維芽細胞を刺激し、血管内皮成長因子(VEGF)と肝細胞成長因子(HGF)の産生量を増大させる。VEGFとHGFは血管新生を促進する有力なサイトカインである。VEGFは血管内皮細胞の増殖を促進する。一方、HGFは血管新生に加えて上皮化に関わる重要なサイトカインの一つであると考えられる。最近の研究では、VEGFとHGFの同時投与は、VEGFとHGFの単独投与に比べて、新しい血管形成を相乗的に促進することが実証されている。

本研究では、HAのスポンジ状シートにEGF、アルギニン(Arg)、リン酸アスコルビルMg(VC誘導体:VC)を含有した新規創傷被覆材の開発を目的とする。コラーゲンゲル内にヒト線維芽細胞を組み込んだ培養真皮を培養液と空気の界面に設置して創傷面モデルを構築し、その上に新規創傷被覆材を貼付して、線維芽細胞からのサイトカイン産生能を指標として新規創傷被覆材の有効性を調べた。

【方法】

1) 新規創傷被覆材の作製方法

本創傷被覆材は2層性のスポンジ構造である。上層は分子間架橋した高分子量HAから成り、下層は生理活性物質を含有した低分子量HAから成る。分子間架橋剤(エ

チレングリコールジグリシジルエーテル) を含有した高分子量 HA 水溶液をトレーに分注し、その上に Arg、VC を含有した低分子量 HA 水溶液を分注し、凍結真空乾燥により 2 層性の創傷被覆材 (EGF 非含有群) を作製した。同様な方法で EGF、Arg、VC を含有した創傷被覆材 (EGF 含有群) を作製した。高分子量 HA と架橋剤の比率を 10:1 および 20:1 に設定した。10:1 の EGF 非含有群を I 群、10:1 の EGF 含有群を II 群、20:1 の EGF 非含有群を III 群、20:1 の EGF 含有群を IV 群とした。得られた創傷被覆材は 110℃、1 時間の条件で乾熱滅菌を行った。

2) 培養真皮中の線維芽細胞によるサイトカイン産生に及ぼす創傷被覆材の効果

コラーゲングルにヒト線維芽細胞を組み込んだ培養真皮を作製し、空気と培養液の界面に設置して創傷面モデルを構築し、その上に各創傷被覆材を貼付し、37℃、5%CO₂ 条件で 1 週間培養した。また、創傷被覆材を貼付しないものを対照群とした。1 週間培養後、MTT assay を用いて細胞代謝活性、ELISA を用いて VEGF と HGF 産生量を測定した。

3) 創傷被覆材に含まれる EGF の効果の持続性

コラーゲングルにヒト線維芽細胞を組み込んだ培養真皮を作製し、空気と培養液の界面に設置して創傷面モデルを構築し、その上に各創傷被覆材を貼付し、37℃、5%CO₂ 条件で 3 日間培養した (第 1 期培養)。その後、各創傷被覆材を回収して他の培養真皮上に再貼付し、さらに 37℃、5%CO₂ 条件で 3 日間培養した (第 2 期培養)。創傷面モデルにおける EGF 含有創傷被覆材の効果の持続性は、MTT assay を用いた細胞代謝活性および ELISA を用いた VEGF と HGF 産生量測定により評価した。

【結果】

1) 新規創傷被覆材の作製方法

所定量の分子間架橋剤を含有した高分子量 HA 水溶液は高い粘度を示した。一方、生理活性物質を含有した低分子量 HA 水溶液は低い粘度を示した。そのため、高粘度の高分子量 HA 水溶液の上に低粘度の低分子量 HA 水溶液を容易に分注することができた。2 層状態の水溶液を凍結し、真空乾燥する手法により 2 層性のスポンジ状シートを作製できた。使用する際には表裏を反転する。走査型電子顕微鏡より本創傷被覆材が 2 層構造であることを確認した。上層は架橋した高分子量 HA スポンジ層であり、下層は Arg、VC あるいは EGF、Arg、VC を含有した低分子量 HA スポンジ層である。

2) 培養真皮中の線維芽細胞によるサイトカイン産生に及ぼす創傷被覆材の効果

細胞代謝活性に関しては、EGF 非含有群 (I 群と III 群) は被覆材を貼付しない対照群と比べて差はみられなかった。このことから架橋剤による細胞毒性がないことが示唆された。EGF 含有群 (II 群と IV 群) は EGF 非含有群 (I 群と III 群) と比べて高い細胞代謝活性を示した。この結果から乾熱滅菌後も EGF の活性が保持されていることが示唆された。VEGF 産生量に関しては、II 群は I 群と比較して 6.4 倍、IV 群は III 群と比較して 4.1 倍の産生量を示した。HGF 産生量に関しては、II 群は I 群と比較して 5.8 倍、IV 群は III 群と比較して 4.0 倍の産生量を示した。これらの結果は EGF 含有創傷被

覆材が VEGF と HGF 産生量を効果的に増加させたことを示している。EGF 含有群（Ⅱ群とⅣ群）においては、VEGF の産生量は約 1ng/mL に対して HGF の産生量は約 20ng/mL であった。HGF は、血管新生促進効果と表皮形成促進効果があるので創傷治癒促進に大きく寄与する。

3) 創傷被覆材に含まれる EGF の効果の持続性

VEGF 産生量において第 1 期培養では、Ⅳ群はⅢ群と比較して 4.1 倍の産生量を示し、さらに第 2 期培養では、Ⅳ群はⅢ群と比較して 5.4 倍の産生量を示した。HGF 産生量において第 1 期培養では、Ⅳ群はⅢ群と比較して 3.5 倍の産生量を示し、さらに第 2 期培養では、Ⅳ群はⅢ群と比較して 3.5 倍の産生量を示した。これらの結果は、創傷被覆材を置きかえた後の第 2 期培養においても EGF 含有創傷被覆材は VEGF と HGF 産生量を効果的に増大させたことを示している。すなわち、高度に水和した架橋高分子 HA スポンジ状シート内に有効濃度の EGF が保持されていることを示している。

【考察】

本研究において、2 層性の EGF 含有創傷被覆材を凍結真空乾燥 1 回で製造する方法を考案した。架橋した高分子量 HA 水溶液 (pH 4.0) をトレーに分注し、その上に Arg 等を含有した低分子量 HA 水溶液 (pH 10.5) を分注し、凍結真空乾燥により 2 層構造スポンジシートを作製した。架橋剤は、酸性 pH 条件下では HA のカルボキシル基と反応するが、塩基性 pH 条件下では HA のカルボキシル基が解離した状態のため反応しない。これにより、低分子量 HA のほとんどは未架橋な状態となる。なお、酸性の高分子量 HA 水溶液と塩基性の低分子量 HA 水溶液は混合すると pH 中性になるためスポンジシート全体では pH 中性の特性をもつように設計されている。

第 1 の実験において、HA と架橋剤の比率を変えることにより、スポンジシートの含水時における特性を調べた。EGF 非含有群（Ⅰ群とⅢ群）と比較して、EGF 含有群（Ⅱ群とⅣ群）は、培養真皮中の線維芽細胞からの VEGF と HGF の産生量を顕著に増加した。Ⅱ群とⅣ群においては顕著な差はみられなかった。このことは、架橋剤の比率が 10:1 あるいは 20:1 の条件で製造した分子間架橋高分子量 HA スポンジシートは、水和した状態で EGF を保持できることを示している。

第 2 の実験において、架橋剤の比率が低い 20:1 の条件で製造した EGF 非含有創傷被覆材（Ⅲ群）と EGF 含有創傷被覆材（Ⅳ群）を用いて、EGF の効果の持続性を調べた。EGF 含有創傷被覆材は第 1 期培養と第 2 期培養の両方において、EGF 非含有創傷被覆材と比較して、VEGF と HGF 産生量を増大した。これらの結果は、架橋高分子量 HA から成る高度に水和した層に EGF が有効濃度残存していたことが示唆された。

培養真皮を用いた創傷面モデルにおける EGF と VC の相乗効果は既に当研究室の先行研究で報告している。さらにラットを用いた動物実験における EGF 含有創傷被覆材の治癒促進効果も当研究室の先行研究で解明している。これらの知見を基にして、本研究では、分子間架橋高分子量 HA からなる上層と未架橋低分子量 HA からなる下層の 2 層性のスポンジ状シートを設計し、下層に EGF、Arg、VC を含有した新規創傷被覆材

を開発した。この創傷被覆材は、創傷面モデルを用いた培養系の実験において、少なくとも6日間はEGFを有効濃度で保持していることを実証した。

【結論】

創傷面モデルを用いた培養系の実験より、EGF含有創傷被覆材は、少なくとも6日間EGFを有効濃度に保持し、線維芽細胞からの血管新生因子であるVEGFとHGFの産生能を高める効果を持つことが確認できた。このことから、EGF含有創傷被覆材は、現在臨床で用いられている細胞成長因子製剤の使用法、すなわち細胞成長因子の水溶液を毎日患部に使用する方法を簡素化することが可能となり、有効な治療法を提供することができた。