

Gel-in-Oilエマルションによる効率的な増殖因子の 経皮送達に関する研究

張, 怡

<https://hdl.handle.net/2324/7182419>

出版情報 : Kyushu University, 2023, 博士 (工学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :



Gel-in-Oil エマルションによる効率的な
増殖因子の経皮送達に関する研究

令和 5 年 12 月
張 怡

目次

目次	I
第 1 章 序論	1
1.1 本研究の背景と目的	1
1.2 本研究の方針	2
1.3 本論文の構成および各章の位置付け	3
第 2 章 既往研究	5
2.1 はじめに	5
2.2 経皮送達	5
2.2.1 超音波(Sonophoresis)	5
2.2.2 フォトメカニカルウェーブ	6
2.2.3 マイクロニードル	6
2.2.4 熱アブレーション	7
2.3 血管新生	7
2.3.1 皮下における前血管化の誘導技術	8
2.3.2 血管新生における増殖因子の応用	8
2.3.3 増殖因子生物安定性を向上させる既存の研究	9
2.3.4 増殖因子の固定化	12
2.3.5 血管新生定量の方法	12
2.3.6 血管評価の指標	14
2.4 UVB 創傷に関する研究	16
2.4.1 UVB 損傷の特徴	16
2.4.2 UVB 損傷の予防および治療	17
2.4.3 UVB 誘発性皮膚創傷の化学予防のための DDS 戦略	18
2.5 糖尿病創傷に関しての研究	20
2.5.1 増殖因子とサイトカインの糖尿病性足潰瘍治癒における役割	21
2.5.2 褥瘡の治癒に関与する 3 つの段階	21
2.5.3 褥瘡の治癒	24
第 3 章 G/O エマルションの開発	25
3.1 本章の目的および概要	25
3.2 G/O エマルションの調整	26
3.2.1 実験目的	26
3.2.2 実験方法	26
3.2.3 結果および考察	28
3.2.4 本節のまとめ	31
3.3 G/O の安定性評価	32
3.3.1 実験目的	32
3.3.2 実験方法	32
3.3.3 結果および考察	32
3.3.4 本節のまとめ	34

3.4 G/O の皮膚浸透性評価	35
3.4.1 実験方法	35
3.4.2 結果および考察	35
3.4.3 本節のまとめ	36
3.5 考察 36	
3.6 本章のまとめ	37
第4章 bFGF 固定化 G/O エマルションの経皮送達による血管新生誘導技術	38
4.1 本章の目的および概要	38
4.2 増殖因子 bFGF の添加量に伴う血管新生誘導効果実験	39
4.2.1 実験目的	39
4.2.2 実験方法	39
4.2.3 結果および考察	40
4.2.4 本節のまとめ	42
4.3 増殖因子 bFGF の添加量に伴う血管新生誘導効果の定量評価	43
4.3.1 実験目的	43
4.3.2 実験方法	43
4.3.3 結果および考察	45
4.3.4 本節のまとめ	49
4.4 bFGF の添加量に伴う血管新生誘導効果実験(1 週間と 2 週間評価における比較)..50	
4.4.1 実験目的	50
4.4.2 実験方法	50
4.4.3 結果および考察	51
4.4.4 本節のまとめ	59
4.5 考察 60	
4.5 本章のまとめ	62
第5章 増殖因子固定化 G/O の経皮投与による UVB 誘発皮膚障害の予防・修復効果.....63	
5.1 本章の目的および概要	63
5.2 UVB 皮膚損傷モデルマウス作製に関する検討	64
5.2.1 実験目的	64
5.2.2 実験方法	64
5.2.3 結果および考察	64
5.2.3 本節のまとめ	66
5.3. 増殖因子カクテル G/O による UVB 照射に伴う皮膚障害の創傷治療.....67	
5.3.1 実験目的	67
5.3.2 実験方法	67
5.3.3 結果および考察	69
5.3.4 本節のまとめ	75
5.4 考察	76
5.5 本章のまとめ	77
第6章 増殖因子カクテル G/O の経皮送達による糖尿病褥瘡モデルの治療	79
6.1 本章の目的および概要	79
6.2 糖尿病マウスモデルの作製および褥瘡モデルの検討.....79	

6.2.1 目的	79
6.2.2 実験方法	79
6.2.3 結果および考察	83
6.2.4 本節のまとめ	90
6.3 増殖因子カクテル G/O の経皮送達による糖尿病褥瘡モデルの治療	91
6.3.1 目的	91
6.3.2 実験方法	91
6.3.3 結果および考察	92
6.3.4 本節のまとめ	99
6.4 考察	99
6.5 本章のまとめ	103
第 7 章 結論と未来の展望	104
7.1 結論	104
7.2 将来の展望	106
[参考文献].....	107
謝辞	124

List of Abbreviations

1-NPZ	1-(1-ナフチル)ピペラジン
BDNF	脳由来神経栄養因子
bFGF	塩基性線維芽細胞増殖因子
BMP-2	骨形成因子 2
CAF	カフェイン
CGF	濃縮増殖因子
DDS	薬物送達システム
DFD	糖尿病性足症
DFUs	糖尿病性潰瘍
DIM-D	抗酸化物質ジンジョール誘導体
DMSO	二メチルスルホキシド
ECM	細胞外マトリックス
EDC	1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩
EGCG	エピガロカテキンガレート
FGF	線状線維芽細胞増殖因子
G/O	Gel-in-Oil ナノエマルション
GF	増殖因子
GRGDSP	細胞付着ペプチド
GTP	緑茶ポリフェノール
H&E 染色	hematoxylin and eosin stain
HA	ヒアルロン酸
HUVECs)	血管内皮細胞
IGF	インスリン様成長因子
IGF1R	インスリン様成長因子 1 受容体
IPM	ミリスチン酸イソプロピル
IRS-1	インスリン受容体基質-1
ME	微乳液
MMPs	マトリックスメタロプロテアーゼ
MT 染色	マッソントリクローム染色
NGF	神経成長因子
NHS	N-ヒドロキシスクシンイミド
PCL	ポリカプロラクトン
PDGF	血小板由来増殖因子
PDLA	ポリ D-乳酸
PDLLA	ポリ D, L-乳酸
PEO	ポリエチレンオキシド
PGA	ポリグリコール酸
PKB	プロテインキナーゼ B
PLA	ポリ乳酸

PLGA	ポリ乳酸とポリグリコール酸の共重合体
PLLA	ポリ L-乳酸
Pus	圧潰瘍
ROS	活性酸素
S/O	Solid-in-Oil
STZ	ストレプトゾトシン
TDDS	経皮薬物送達システム
TE	トランスファゾーム
TGF- β	トランスフォーミング増殖因子 β
TiO ₂	二酸化チタン
TNF α	腫瘍壊死因子 α
UV	紫外線
UVB	紫外線 B
VEGF	血管内皮細胞増殖因子
VEGF	血管内皮増殖因子
Vus	慢性下肢静脈性潰瘍
W/O	Water-in-Oil エマルション
WL	波長
ZnO	亜鉛酸化物

第1章 序論

1.1 本研究の背景と目的

皮膚は人体最大の器官であり、単なる身体の保護機能だけでなく、重要な代謝、排泄機能も担う。また、その広大な表面積と血管ネットワークにより、皮膚は薬物送達システム(DDS)において理想的な経路の一つとされる[1]。経皮薬物送達システム(TDDS)を通して、経口投与がリスクのある消化管吸収と初回通過効果を回避し、バイオアベイラビリティを向上させ、薬剤が消化器系統に対して引き起こす副作用を減少させ、患者の生活の質を向上させる[2]。

しかし、TDDS は現在もいくつかの課題がある。例えば、皮膚は天然のバリアであり、その主な機能は外部環境から体を保護することである。しかし、これは薬物が皮膚層に送達される際に困難を伴う原因となる。薬物が角質層のバリアを克服できない場合、いくつかの薬物は TDDS プロセスで透過性が不足し、治療効果が低下する。また、一部の薬物は皮膚上で活性を失ったり分解されたりする可能性があり、治療効果に影響を与える。薬物の過剰な投与は副作用を引き起こす可能性がある[3,4]。TDDS には皮膚の角質層のバリアを克服する必要があり、薬物の皮膚内への浸透、薬物の安定性、薬物の投与量の制御などの問題が存在する。薬物が制御可能に皮下に放出されることを確保することが難しいという課題を抱えている。

一方、ナノエマルジョン技術は近年、研究と注目を集めている DDS キャリアシステムの一つである。このシステムは水または油中の微小な油滴または水滴から成り、界面活性剤により、ナノエマルジョンの安定性、浸透性を向上し、一般的に粒径は 20-200 nm の範囲内にある[5]。ナノエマルジョンは優れた安定性、浸透性を有しており、理想的な DDS キャリアとなる。過去の研究では、Water-in-Oil(W/O)エマルジョンが開発され、水相に親水性薬物を含ませ、疎水性の界面活性剤で被覆し、油中に分散させることで皮膚バリア機能を担う角質層を突破する可能性が示された[6]。

増殖因子は、細胞の増殖、組織再生、傷の治癒プロセスの調節において重要なタンパク質の一群である。伝統的な増殖因子の投与方法には、経口、注射などがある。しかし、安定性が低い、分解しやすいなど、さまざまな問題が存在する[7]。これらの課題に対し、当研究室の既往研究では、ヘパリン導入ゼラチン(heparin-gelatin)が開発され、増殖因子の固定化、活性の維持と徐放性付与が確認された。これにより、増殖因子が体内で迅速に失活するのを防ぎ、組織中での作用可能時間を延長する。

上記の背景に基づき、本研究は、heparin-gelatin を油中に分散させ、ナノサイズの Gel-in-Oil ナノエマルジョン(G/O)を開発する。G/O の粒子表面は疎水性の界面活性剤で被覆され、油中に分散されているため疎水性の皮膚角質層を突破できる。さらに、heparin-gelatin を使用して増殖因子を固定化し、活性を維持し、ゲルの分解による徐放性を持たせる。Basic fibroblast growth factor(bFGF)の血管新生を促進する能力は既に報告されている[8]。したがって、本研究ではモデルケースとして *in vivo* における bFGF 固定化 G/O による皮下の血管新生効果の評価を行い、G/O による増殖因子の経皮送達の有効性を評価する。さらに、紫外線 B(UVB)誘発の急性皮膚損傷モデルおよび慢性糖尿病皮膚褥瘡モデルを使用し、増殖因子固定化 G/O が急性および慢性皮膚損傷の予防および修復に及ぼす効果を評価し、G/O の経皮送達の有効性を検証する。

1.2 本研究の方針

増殖因子の徐放制御と生物学的な安定性を向上させる必要性から、ポリマーバイオマテリアル(ヒドロゲル、マイクロカプセルなど)を使用した増殖因子の放出制御システムが研究されている[9]。ヘパリンを増殖因子として結合させた機能性材料の開発も報告されており、ヘパリンはさまざまな増殖因子(例：塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、トランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β)など)と高い親和性で結合し、ヘパリンに固定された増殖因子は安定性が向上し、適用部位での作用期間を延長することができる。このコンセプトに焦点を当て、ヘパリンを化学的にゼラチンに導入した heparin-gelatin 基材に注目した。ゼラチンは化学的架橋によって微粒子が生体温度でゲル状態を保つことができるようになり、ゼラチンの分解過程で含まれる成分が徐々に放出され、長期的な効果を提供できると予想される。bFGF は血管内皮細胞の増殖と遊走を刺激し、血管新生を促進する能力が報告されている[10]。そのため、bFGF をモデル増殖因子として経皮送達による血管新生の結果から、経皮送達の有効性を評価することができる。

急性損傷の場合、複数の増殖因子が協調して創傷の治癒、組織再生、および炎症の調節を促進することができる[11]。UVB は皮膚細胞に対して DNA 損傷、細胞のアポトーシス、炎症反応、皮膚バリアの損傷、そしてメラニン生成などの悪影響を及ぼし、急性皮膚障害を誘発する。長期または過度の紫外線暴露により、皮膚癌などの皮膚問題のリスクが高まることがある[12,13]。

また、複数の増殖因子を協調して使用することで、慢性傷害の治癒を効果的に促進し、炎症反応を軽減し、感染リスクを低減し、損傷した組織の構造と機能を最大限に回復させることができる[9]。糖尿病性慢性損傷では、高血糖が血管に不利な影響を及ぼす可能性があり、褥瘡では持続的な圧力が血流を妨げる。これらの損傷からの治癒には通常長い時間がかかり、慢性的な創傷に発展しやすく、感染と合併症のリスクを高める[14]。

UVB および難治性糖尿病性褥瘡などの損傷の治療において、増殖因子は皮膚保護および予防において、皮膚細胞の修復と再生、血液供給の改善、抗炎症作用、皮膚バリアの維持などの方法を通じて主要な役割を果たす[9,15]。

したがって、この研究では以下の条件を満たす経皮増殖因子送達キャリアを開発することを目指した：

1) 増殖因子をナノサイズの粒子に封入し、油中に分散させることで、角質層の突破が可能となる。

2) Heparin-gelatin 基材を使用して、ナノサイズの微粒子を製造し、増殖因子をその効力を維持したまま、安定的に体内へ送達することができる。また、内水相をゲル化させることで、体内でゲルが分解する過程で増殖因子が徐々に放出されることが可能となる。bFGF の経皮送達後の血管新生を評価することで、G/O の経皮送達の有効性を評価できる。

3) 急性と慢性皮膚損傷の予防・治療のために、複数種類増殖因子カクテル G/O を使用した経皮送達システムを活用し、血管新生の促進、損傷した細胞の修復、再生を実現できる。

本研究により、新しい経皮増殖因子送達キャリア G/O を開発し、増殖因子を効果的に体内へ送達し、皮膚損傷の予防と治療に貢献することを目的とする。

1.3 本論文の構成および各章の位置付け

Fig. 1-1 に本論文の概要を示す。

第 1 章では、本研究を行うにあたっての背景、目的および本研究の方針を示した。

第 2 章では、本研究と関係する既往研究について示した。

第 3 章では、G/O の特性評価と最適化を行った。

第 4 章では、bFGF 固定化 G/O の経皮送達による血管新生誘導評価を行った。

第 5 章では、増殖因子カクテル G/O の経皮投与による紫外線 B 誘発皮膚障害の予防・修復効果を行った。

第 6 章では、増殖因子カクテル G/O の経皮送達による難治性糖尿病褥瘡モデルの治療を行った。

第 7 章では、本論文の総括および将来の展望を示した。

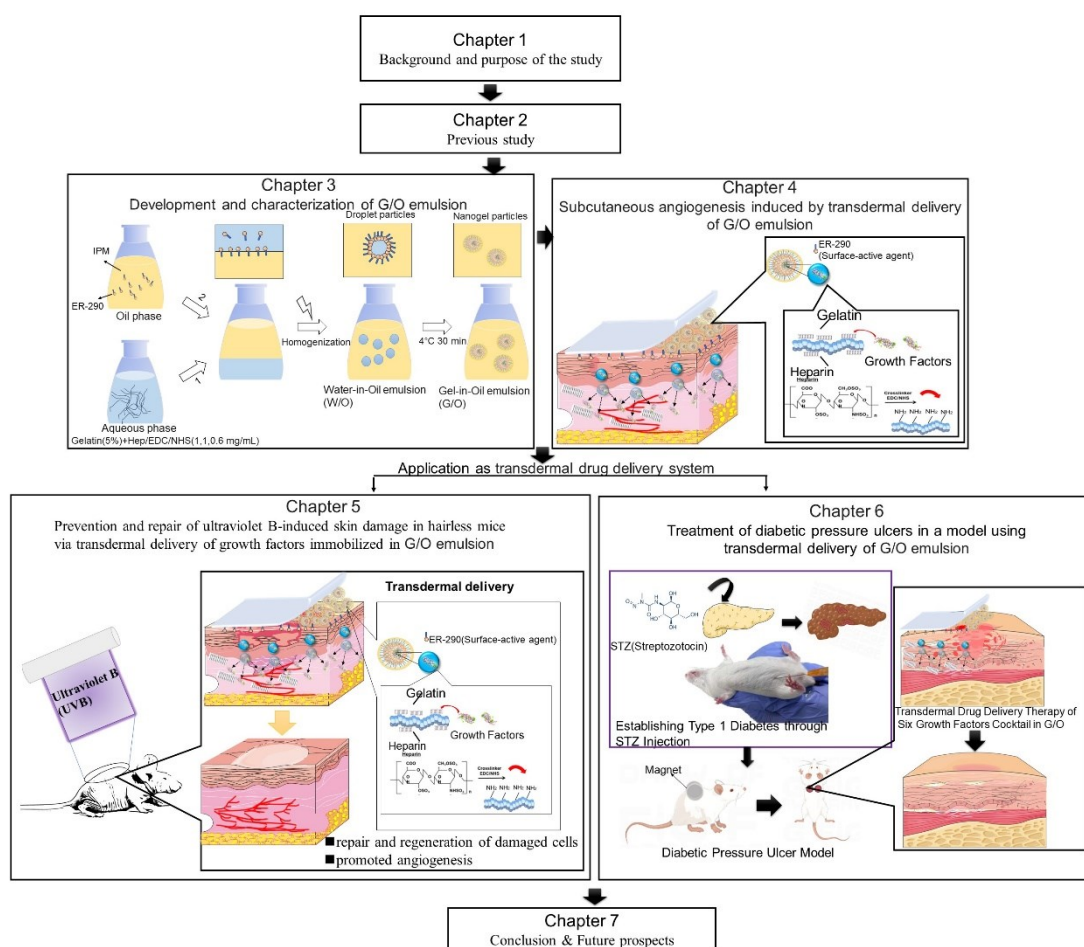


Fig. 1-1 Outline of this study.

第2章 既往研究

2.1 はじめに

この研究は、皮下で血管新生を促進するための増殖因子固定能力を持つ、経皮的薬物送達が可能ナノエマルションの開発を目指す。そのため、この章では経皮送達、血管新生および皮膚損傷の治療法の現状について概説し、過去の血管新生の研究についても論じる。さらに、過去の研究におけるナノエマルションの開発と改善についても述べ、増殖因子固定化に関連する類似の研究についても紹介する。

2.2 経皮送達

DDS は、細胞、組織、および臓器への薬理的に活性な物質の送達と放出を制御できる一連の物理化学技術の総称であり、薬理活性物質が最適な効果を発揮できる[16]。言い換えれば、DDS は治療効果を最大化し副作用を最小化するための経路や薬物の製剤を含む。送達経路に応じて、経口投与、経皮投与、肺吸入、粘膜投与、静脈注射などさまざまな種類の投与方法がある[17]。その中でも、TDDS は魅力的なアプローチであると考えられる。

TDDS は、針に基づく注射を利用しない体内への非侵襲的な薬物投与の最も広く研究されている経路の一つとなる。TDDS は、各種治療薬の投与において特に疼痛管理、ホルモン療法、心血管および中枢神経系疾患の治療に大きな影響を与える[18]。TDDS は胃腸経路を経ないため初回通過代謝による損失がなく、薬物は pH、酵素、および腸内細菌の干渉なしに送達される。さらに、最も重要なのは、TDDS が非侵襲的な投与方法であり、患者にほとんど痛みや負担がないため、安全で簡単に患者に薬物を投与できる[19]。

ただし、固有の皮膚バリアのために、まだその全ての潜在能力を活用できていなかった。皮膚は最も外側の器官で、多層構造を持ち、皮膚の役割は化学物質、熱、毒素などの環境の危険から身体を保護する[2]。このような皮膚は保護機能を持つ表皮と、血管があり、皮膚細胞を生成する真皮に分かれ、それぞれの層には経皮投与を妨げる要素がある。

表皮の角質層は最外層であり、表皮の皮膚バリア効果がある。このバリア効果は、分子量の大きな物質の輸送において非常に重要である。TDDS では、小さな分子量の物質の輸送には細胞内経路が利用されると一般的に考えられる。ただし、大きな分子量を持つ物質に対しては、細胞間経路に加えて細胞内経路を利用するさまざまな方法とメカニズムが導入および使用される[20]。したがって、TDDS の最大の課題は角質層のバリア効果を解消し、薬物を皮膚組織に送達し、細胞および血管組織を通過して目標組織に到達することである[21]。

この問題を解決するために、さまざまな新しい TDDS 技術が次々と開発され、魅力的な投与方法として浮上している。

2.2.1 超音波(Sonophoresis)

超音波デバイスによって経皮薬物送達を向上させることができる。低周波超音波 (20 Hz-20 kHz) は、振動を引き起こし、キャビテーションを生じ、二重膜を攪乱し、水分子が透過する通路を作り出すことにより、薬物の移動を容易にする効果的な手段となる。具体的には、この技術は低周波音波が生じる機械的な振動を利用している。これらの音波が水を含むシステムに伝わると、液体中で高強度の振動が発生する。この振動はキャビテーシ

オン効果を引き起こし、液体中に微小な気泡が形成され、迅速に崩壊する。これにより局所的な高温と高圧が発生する。このプロセスでは、振動と圧力の変化が細胞膜や他の生物組織の構造を破壊するのに役立つ。薬物の伝達においては、この破壊が通路を作り出し、水分子が細胞膜をより容易に透過できるようになり、薬物の移動が促進される。要するに、低周波超音波は水中の気泡の形成と崩壊を引き起こすことで、局所的な機械的な圧力と振動を生じ、薬物が細胞膜を通り抜けやすくなる通路を作り出す手段となる。これは薬物の伝達を促進する技術経路を提供する[22]。薬物は特定の結合剤(ゲルまたはクリームなど)と混合され、薬剤と結合剤が超音波を皮膚に伝達し、皮膚層を攪乱して薬物が注入できる水の通路を作り出す。通常、薬物は超音波の適用によって形成される通路を通過し、そのエネルギー値は 20 kHz-16 MHz の間にある。超音波はまた、皮膚領域の局所温度を上昇させ、皮膚のバリアを一時的に変性させ、薬物の浸透をさらに促進する。ただし、この方法を介した薬物浸透の正確なメカニズムはまだ完全に理解されておらず、デバイスの利用可能性、投与のための露出および治療サイクルの最適化、およびやけどを含む望ましくない副作用の問題が依然として存在している。

2.2.2 フォトメカニカルウェーブ

皮膚に伝わるフォトメカニカルウェーブは角質層を貫通し、角質層が一時的に変性し、一時的に形成されたチャネルを通して薬物が通過することを可能にする。発生波は低い放射線照射(約 5-7 J/cm²)によって制御され、送達の深さを 50-400 μm に増加させる。フォトメカニカルウェーブにより、皮膚内の意図された深さへの製品の送達を確実にするために光力学的な波の特性を制御する必要がある。単一のレーザーパルスによって生成される波は、数分間に皮膚の浸透性が増加し、大きな分子が皮膚に拡散するのを可能にする。これによって 40 kDa のデキストランマクロ分子と 20 nm のラテックス粒子は、23 ns の持続時間を持つ単一の光力学的なレーザーパルスによって送達される[23]。

2.2.3 マイクロニードル

マイクロニードル薬物送達システムは、薬物が針を介して循環系に送達される新しい薬物送達システムであり、これは経皮的な薬物送達の最も人気のある方法の一つであり、現在アクティブな研究領域である。これは、ミクロンサイズの針が皮膚の表層を刺し、薬物が表皮層を横断して拡散するシステムを含み、これらのマイクロニードルは短くて細いため、これらは薬物を直接血管キャピラリー領域に送達し、痛みを最小限に抑えるのに役立つ[24]。

マイクロニードルシステムの製造は、目標、薬物の種類と用量、使用対象を考慮して幅広く調査される。現在までに、マイクロニードルはレーザーを利用した技術とフォトリソグラフィを用いて製造することができる。レーザーを利用した製造技術は、金属またはポリマーマイクロニードルの製造に使用される。マイクロニードルの 3D 構造は、レーザーを使用して平らな金属/ポリマー表面を切断または蒸発させることによって生成される。さまざまな形状の針をさまざまな材料を使用して製造することができるという利点がある。この方法は、マイクロニードル構造に基づく逆型モールドを作製し、フォトレジストのエッチングを介してマイクロニードル製剤やヒドロゲルマイクロニードル、またはシリコンマイクロニードルを製造するために主に使用される[25]。

2.2.4 熱アブレーション

熱アブレーションまたは熱透析は局所的な熱によって表皮構造を選択的に破壊する有望な技術であり、これにより皮膚に作成された微小なチャネルを通じて薬物送達が増進する。熱アブレーションによって角質層を剥離するには、100°C以上の高温が必要で、これによりケラチンの加熱と蒸発が引き起こされる。また、局所的に上昇した温度に比例して角質層構造の変化の程度が増加するため、これは薬物送達を精密に制御するための理想的な技術である。熱的な露出は、生存する表皮を損傷せずに角質層を選択的に剥離するために、マイクロ秒単位の短さでなければならない。熱アブレーションから生じるミクロンスケールの欠陥は十分に小さく(直径 50-100 μm)、痛み、出血、刺激、感染の可能性を回避するため、深部組織の細胞に損傷がない場合、患者は十分耐えることができる。また、熱アブレーションは、機械的な削り取り、化学処理、またはテープ剥離などの他の手法よりも優れた制御性と再現性を持ち、小分子だけでなく高分子量の化合物の効果的な送達も提供する。ただし、特に薬物分子の拡散率を増進させるために高いエネルギーを使用する場合は、皮膚の構造変化を評価する必要がある[2]。

TDDS 技術は製薬分野で急速に成長しており、局所経路を通じて薬物送達を増進させる製剤システムとして、価値を確立している。しかし、過去数十年にわたる広範な研究にもかかわらず、化学的な増強剤などの受動的な手法は、小分子の経皮輸送を増進させることに限定的な成功しか収めておらず、潜在的に臨床的に許容される条件下で大規模分子の輸送を増進させる能力は比較的低い。外部デバイスを使用したアクティブトランスポート法は、薬物および大規模分子の経皮的な送達効率をより広範に増加させる。ただし、これらの技術が薬物を効果的に送達する能力は、エネルギー源を必要とする電子制御デバイスに依存しており、その有用性とコストを制限している。マイクロニードルなどの皮膚に微小な孔を穿刺する方法は、薬物、大規模分子、または粒子の経皮的な送達を著しく増加させることができるが、これにはさらなる安全性と低い皮膚損傷、費用対効果の向上が必要である。

2.3 血管新生

既存の血管からの新しい血管形成、すなわち血管新生と呼ばれるプロセスは、傷の治癒には欠かせない。新たに形成された血管は、成長中の組織に栄養と酸素を供給する。さらに、炎症細胞は、血管内皮基底膜との相互作用と通過を必要として、損傷部位に入る。組織の損傷に対する血管新生は、セラムと周囲の特殊な細胞外マトリックス(ECM)環境からの信号によって高度に制御されるダイナミックなプロセスである[26]。

皮膚、神経、筋肉、骨などの損傷を受けた組織を工学的に設計する際の基本的な課題は、埋もれた深い組織内の細胞に栄養と酸素を供給し、同時に細胞から廃棄物を排除する血管を作り出すことである。合成組織内の血管の空間分布は、周囲の細胞の活力に重要な役割を果たす。細胞が最寄りの血管から 100-200 μm 以上離れたら、酸素と栄養の不足によって細胞が死ぬ[27]。したがって、血管形成バイオマテリアルの設計や血管形成工学の取り組みにおいては、この重要なポイントを考慮する必要がある。

2.3.1 皮下における前血管化の誘導技術

皮下細胞移植による機能的な臓器や組織の再生は、組織工学において有望な方法である[28]。皮下幹細胞移植は、臓器移植よりも安全性に関していくつかの利点があり、侵襲性が高く、ドナー不足と莫大な人的および財政的負担の問題点がある[29,30]。細胞移植は他の治療法と組み合わせて使用でき、患者に利益をもたらすだけでなく、移植に適していない臓器から細胞を収穫する可能性もある[31–33]。実際、移植された細胞は移植後の増殖能力が不確かであり、異常な増殖と腫瘍の形成のリスクを伴うため、移植部位の生検と移植細胞の簡単な回収が適切な安全管理のために不可欠である[34,35]。ただし、移植された細胞は元の循環ネットワークと ECM を失っているため、移植部位に適切な血管ネットワークが必要である[36–39]。皮下の血管は、他の移植部位よりも皮下での発展が難しく、細胞の生存率が低いいため、皮下移植はまだ臨床設定で使用されていなかった[40]。

皮下の低い血管分布を克服するための方法の中で、移植前の皮下の血管分布を増強する(前血管化)が、後続の移植を向上させる最も有望な方法と示されている[41,42]。通常、前血管化部位を作成するために材料(ナイロンディスクなど)を移植し、その前血管化部位の周囲には血管の豊富な組織が形成される。密集した血管は移植物と移植部位の間の分子交換を増強し、特に栄養物質や酸素(O_2)は細胞の生存に非常に重要である。さらに、高い血管分布は分子の迅速な感知と放出を可能にし、膵島移植の機能において重要な役割を果たす。たとえば、膵島は血管を介してインスリン感知を行い、インスリンおよびグルカゴンの放出を調整して血糖平衡を維持する。さまざまな研究が様々な前血管化手法を導入してきたが、それらが臨床実践に転化することについてはまだできなかった[42,43]。また、前血管化にはより長い時間がかかり、ナイロンディスクの移植と細胞移植の間に3週間以上かかることがある[44]。したがって、細胞移植前に安全で迅速な前血管化手法を開発することは、皮下の密な血管分布を実現するために非常に重要である。

皮下の血管不足を改善する効果的な方法として、目標移植部位の皮下に新生血管を人工的に誘導することが報告されている[45]。糖尿病マウスの皮下でのインスリン細胞と血管内皮細胞(HUVECs)の共移植により、短期間で血糖値が正常化された[46]。ただし、移植された細胞が宿主の免疫系と活発に相互作用し、炎症下では移植された細胞の機能が損なわれることがよく知られており、重要な免疫抑制法が必要である[42]。基本的な材料を使用した皮下移植前の血管新生の誘導に関する研究(例: コントロール可能なアンカー自己組み立て法またはポリ乳酸エチレングリコール酸共重合体およびアクリルスキャフォールドを用いて作成されたミクロバスキュラーメッシュなど)もある。しかし、時間とともに移植物への炎症反応が起こるため、移植を繰り返すことは安全ではない[47,48]。そのような基質の血管化誘導期間は長く、ナイロンディスクの移植と細胞移植の間で3週間以上かかることがある[42]。したがって、細胞移植前に密集した皮下血管を生成するための侵襲性の低い、安全で迅速な血管化技術を開発することは、臨床への応用にとって重要である。

2.3.2 血管新生における増殖因子の応用

生物分子(例えば増殖因子(GF)やサイトカイン)は生体内で非常に重要である。増殖因子の発見は1952年にさかのぼり、その時に神経成長因子(NGF)が初めて発見された[49]。それ以降、増殖因子に関する継続的な研究により、増殖因子が細胞とECMとの特定の相互作用を

調節する機能について深い理解が得られた。増殖因子は、特定の相互作用を誘導し、組織の形成につながるように、細胞の運命と振る舞いに影響を与えることが確立されている。各増殖因子は、細胞表面に存在する特定の受容体に結合できる。結合後、連鎖的なトリガーが特定の細胞運命につながるものが後に起こる。ほとんどの増殖因子は特定の細胞タイプのみを調節できるが、一部の増殖因子は多くの異なる細胞タイプに影響を与え、さまざまな種類の細胞に作用することがある。一部の場合、異なる増殖因子は重複した機能を持つ可能性がある。したがって、異なる種類の細胞が同じ種類の増殖因子を産生する。

増殖因子の安定性は、一部の分子が高い感受性を示すため、薬物デリバリーの研究において広く注目される[50]。増殖因子の変性に対する感受性は、物理的環境など多くの要因によって異なる。例えば、一部の増殖因子は凍結乾燥の形態で室温で保存できると報告されている。溶液状態にある増殖因子の形態は、低温(例えば-80°C)で最大12ヶ月間維持されることが、増殖因子に依存する。一方、増殖因子は室温または体温で急速に失活する。例えば、bFGFは、静脈内投与後に半減期がたった3-50分と報告されている[51,52]。同様の投与条件で、血小板由来増殖因子(PDGF)の半減期は2分未満であり、血管内皮増殖因子(VEGF)の半減期は30-45分である[53]。

増殖因子の失活の原因はさまざまである。高温(100°C以上など)で増殖因子に曝露することは、変性を引き起こし、自然な構造の展開につながる[54]。この展開はタンパク質の構造を変化させる可能性がある[55]。一方、増殖因子が崩壊し、自然な形態に戻らなくなる過程。酸化やpH値の変化などの微細な環境変化は分解を引き起こす原因となる[56]。pH値の変更も失活を促進する。Santanaらは、ヒトの再組み立てEGFソリューションのpH変化を調査し、最適な安定条件を見つけるために50°Cで増殖因子の分解を30日以上にわたって測定した[57]。彼らの研究によれば、逆相HPLC(rp-HPLC)およびELISAの結果が、増殖因子の分解が酸性とアルカリ性のpH値下で促進されることを示した。研究から導かれた結論は、pH範囲が6.0から8.0の間で増殖因子が最大の化学的、物理的、および構造的安定性を示す。この研究は、蛋白質の安定性を維持するために溶液のpH値とのバランスが重要であることを強調している。一方、生体内では増殖因子は天然に存在するタンパク質分解酵素によって分解される。これらの酵素から保護するためには、酵素阻害剤を使用するか、増殖因子を生体適合性のある材料で直接包装することが研究のテーマとなっている。増殖因子や他の生物分子を内包するための標準的な方法は、生体適合性のある材料を使用する。

bFGFは、細胞の増殖、分化、血管新生、組織の恒常性、組織修復を調節できる[58]。VEGFや他の増殖因子受容体とは異なり、線状線維芽細胞増殖因子(FGF)受容体は内皮細胞と平滑筋細胞の両方で発現し、成熟した血管ネットワークの形成に寄与す[59,60]。bFGFは内皮細胞の増殖を促進する強力なプロモーターであり、VEGFに比べて優れた薬剤候補とされる[61]。しかし、bFGFの使用は、その迅速な拡散、低い生物学的安定性、および短い半減期のため、標的領域内での親剤投与が精度が低いことから、臨床試験に限定される[62]。

2.3.3 増殖因子生物安定性を向上させる既存の研究

増殖因子の生物安定性を向上させることは、最適な結果を得るために重要である。これらの制限を克服するために、ポリマー生体材料(たとえば、スキャフォールド、ヒドロゲル、およびミクロスフィア)を使用したbFGFの徐放システムが研究されており、ポリ乳酸とポリグリコール酸の共重合体(PLGA)、キトサン、アルギン酸、ゼラチン、およびアセトアル

キルデキストランなどのポリマーに基づくミクロスフィアの使用も含まれる[63–65]。増殖因子のデリバリーキャリアには、おおよそ以下の種類がある。

2.3.3.1 増殖因子デリバリーに使用されるヒドロゲル

ヒドロゲルは、その構造内に水に高い親和性を持つ親水基が存在するため、大量の液体を保持することができる重合体ネットワークである[66]。これらのゲルは、共有結合または物理的な相互作用(イオン相互作用、疎水相互作用、水素結合など)によって架橋される。したがって、ヒドロゲルの水和度は 20%から 90%まで異なる[67]。一方、親水性ポリマーネットワーク(例: PLGA)は吸水能力が制限される[68]。ヒドロゲルは、環境分解から因子を保護し、増殖因子の生物活性を長期間維持する潜在能力がある。この独特の特性は、増殖因子介在の組織再生においてヒドロゲルを魅力的な選択肢として。例えば、軟骨、骨、筋肉など、研究によれば、骨形成因子 2(BMP-2)はヒアルロン酸(HA)ゲル内で 28 日間効果的に保持されたと報告される[69]。これらの例は、ヒドロゲルを使用すると、水溶性増殖因子と類似の親水性と親和性を持つため、生物活性を長期間保持できることを示す。さらに、高い水分含有量と ECM に似た物理的特性により、ヒドロゲルは高い生体親和性を持っており、これが成功した体内実験につながっている。Lee ら(2003)は、2 つの異なる GF を内包したアルギン酸液滴を製造し、重症免疫不全マウスの皮下組織における血管新生への VEGF と bFGF の影響を比較した。その結果、VEGF をデリバリーする場合、増殖因子濃度の増加に伴い血管の数と肉芽組織の厚さが増加し、血管密度は一定のままである。bFGF をデリバリーする場合も、血管の数と肉芽組織の厚さが似た傾向が見られるが、VEGF と比較して bFGF の血管密度は低かった。この研究から、アルギン酸ゲルを使用することで、異なる因子の効果を比較することができ、この材料がさまざまな増殖因子をデリバリーするための信頼性のあるキャリアとなり得ることが示される[70]。

ヒドロゲルには多くの利点があるが、いくつかの制約も存在する。分子の捕捉(およびそれに続く放出曲線)は封入方法に依存することもある[71]。物理的な封入方法を使用すると、増殖因子の放出曲線は主に分子がネットワークの孔を通じて拡散することによって制御され、これにより短期間の放出が引き起こされる可能性がある[72]。一方、ゲル内の生物活性物質の化学的な封入は、高分子の分解、結合体、またはゲル基質からの解離によって放出曲線が制御される。

2.3.3.2 疎水性ポリマー

疎水性ポリマーは、その構造中に多くの疎水性基が存在し、したがって低親水性で水和性が制限される。しかし、これらのポリマーは延性を持ち、正確に合成できる。そのため、疎水性の合成材料は組織工学の応用に使用される。人気のある疎水性ポリマー材料のグループには、乳酸異性体の派生物、すなわちポリ乳酸(PLA)、ポリ D-乳酸(PDLA)、ポリ L-乳酸(PLLA)およびポリ D, L-乳酸(PDLLA)が含まれる[73]。これらのポリマーは有機溶媒、クロロホルムなどに可溶で、単純な加水分解により降解が生じ、増殖因子の長期デリバリーに適す。また、ポリグリコール酸(PGA)の共重合体である PLGA やポリカプロラクトン(PCL)など、ポリエステルも科学的な興味を引いている。PLGA と PCL は、生物活性物質や薬物のデリバリーに必要な速度に合わせてポリマーの降解速度を調整するための優れた例である。

PLGA は、縫合糸、薬物デリバリーデバイス、組織工学のフレームなど、多くの生体医学の応用で最も研究されている分解性ポリマーの一つで、降解速度は PLA と PGA の組成比に応じて調整できる[74]。Meinel ら(2003)は、異なる濃度(30–100 µg)のインスリン様成長因子(IGF)を PLGA(50 : 50 比率)のマイクロスフィアに封入した。これらのマイクロスフィアは、2つの羊の長骨欠陥モデル(骨端端孔 : 8 mm、部分的な脛骨欠陥 : 10 mm)を充填するために使用される。著者は、100 µg のマイクロスフィアを与えることで、欠陥部に新しい骨形成が3週間後に誘導されることを発見した。さらに、8週間後、IGF-I を含む PLGA が炎症を減少させる、部分的な脛骨欠陥(10 mm)を補った[75]。同様に、PLGA は VEGF、NGF、TGFβ-3 などの多くの GF を含むマイクロスフィアの製造に使用され、このポリマーの幅広い応用が証明されている[76,77]。

PCL は、その生分解速度が他のポリマーよりも遅いため、長期デリバリーの応用で非常に注目される。PCL は生理的条件(生体内)で数年にわたる加水分解を経て、生成物は自然な生理経路によって排出される[78]。最近、Limongi ら(2018)によって、脳由来神経栄養因子(BDNF)のデリバリーに使用される PCL 製のデバイスが報告された[79]。このデバイスは、増殖因子を PCL デバイスに充填するために増殖因子を含む溶液に浸す。この研究により、材料の疎水性と孔率が最適な表面形態と増殖因子デリバリーを向上させるのに大きな影響を与えることが示唆された。PCL は、その生分解速度が他の PCL や PLGA と同様に、他の疎水性ポリマーも独自の機械的、化学的、物理的特性を持っており、臨床応用と商業化が期待される。ただし、PCL や PLGA と同様に、これらのポリマーの大部分は非常に疎水性を持っているため、細胞親和性が不足している可能性がある。この特性は炎症反応などの有害な影響を引き起こす[79]。さらに、一部の疎水性ポリマーは他の化学物質と結合する際に細胞毒性を示すと報告される[80]。

2.3.3.3 コンポジット材料

改善されたゲル材料と疎水性重合体の戦略には、このような複合材料を使用する、材料の機械特性を向上させる。2016年、Nojoomi らは軟骨再生用の PEG-リシン酸塩ベースの注入可能な複合材料を開発した[81]。この複合材料は、天然の軟骨に近い機械特性を示し、天然の軟骨の初期成長と類似した応力と負荷に耐える。同様に、Jeong らは細胞付着ペプチド(GRGDSP)で修飾されたアルギン酸塩と非修飾のアルギン酸塩をポリエチレンオキシド(PEO)と異なる濃度および混合比で混合した[82]。この研究の目的は、静電紡糸技術を使用してナノファイバーを製造できるようにする。結果から、PEO を添加しないとナノファイバーが形成されないことが分かった。これにより、ゲルの機械的特性を調整し、同時に線状細胞の付着、拡散、および増殖をサポートすることができる。これは、複合材料を作成する際に、複数の機能を調整して多機能材料を生成する方法を示しており、機械的な流動特性を向上させ、細胞の接着力を高めるなどの複数の機能を調整する。

複合材料を調整することで、キャリアの生体適合性を向上させたりできる。たとえば、PCL は、ヒアルロン酸、コラーゲン、キチンなどの天然ゲルと組み合わせて使用され、BMP-2、PDGF、BMP-6 などの輸送に使用される[83–85]。

2.3.4 増殖因子の固定化

増殖因子と結合できるヘパリンで固定化された機能材料の開発が報告される。ヘパリンは天然の多糖類であり、増殖因子との固定化および相互作用に適した特性を持っている[86]。ヘパリンは、物理的吸着、共有結合、または静電相互作用を含むさまざまな技術を使用して、さまざまな材料表面に固定化できる。この固定化により、ヘパリンが材料表面に提示され、増殖因子と相互作用できる基材が作成される[87]。

ヘパリンは、FGF、VEGF、およびTGF- β など幅広い増殖因子に結合する高い親和性を持っており、ヘパリン固定化材料への増殖因子の結合は、その安定性と生物活性を向上させ、制御された放出メカニズムを提供し、応用サイトでの存在を延長する。増殖因子のヘパリンへの結合は、彼らを分解から保護し、放出プロセス中にその生物活性を維持する[88]。

多くの生体材料は、硫酸ヘパランモデリング修飾を使用して、増殖因子のヘパラン硫酸結合能力を模倣し、そのデリバリーを改善する。たとえば、Jha ら(2015)は、ヘパラン機能化ヒアルロン酸ベースのハイドロゲルの一連の開発を行い、ヘパラン硫酸の分子量およびその相対濃度がTGF- β 1の負荷効率と保持挙動に及ぼす影響を調査した。結果は、高分子量ヘパラン硫酸がTGF- β 1の積載と保持に有利であり、最も遅い放出動力学を示した。これは、低分子量ヘパランと比較して、高分子量ヘパラン硫酸がTGF- β 1に対する親和性が高いためである[89]。さらに重要なことは、増殖因子が高分子量ヘパランに結合したハイドロゲルは、幹細胞を内皮細胞へより強力に分化させ、ハイドロゲル内での血管様ネットワークの形成をさらに促進した。

傷口癒合は、複雑で進化的に保守された多細胞プロセスであり、損傷を受けた上皮を修復するために設計されている。これらのプロセスは、多くの増殖因子と細胞因子が複雑なシグナル伝達ネットワークを介して増殖、分化、代謝の変化を調節し、標的細胞に影響を与えることに依存する。急性傷口癒合プロセスでは、これらの生物活性ペプチドは傷口内で容易に見られ、傷口癒合のさまざまな段階で機能する：炎症、肉芽組織の形成、再上皮化、基質形成、および再構築。ただし、体内および体外の研究は、治癒しない急性および慢性(生理学的に損傷した)傷口では、多くの増殖因子(例：PDGF、VEGF、およびbFGFなど)の緩和を示唆しており、これは外部の増殖因子と細胞因子の臨床環境での使用に関係をもたらし、治癒しない傷口の臨床的効果を向上させる目的である[90–92]。治癒しない傷口(糖尿病性潰瘍(DFUs)、圧潰瘍(Pus)、慢性下肢静脈性潰瘍(Vus)など)は主要な医療負担となっており、研究によれば、おおよそ年間71,000人の患者がDFUsのために四肢または指の切断を受けており、別の研究では重度の敗血症(III期およびIV期)に対する68%の死亡率を示し、入院費用は最高で12.4万ドルに上る可能性がある[93]。さらに、治癒しない傷口は入院期間を延長し、生活の質を低下させ、長期的な施設での監視が必要となる可能性を増加させます。遺伝子工学とバイオテクノロジーの進歩に伴い、外部の増殖因子と細胞因子を治療に応用する方法が提案される。

2.3.5 血管新生定量の方法

血管の定量的な研究では、血管の形態、数量、および分布を定量化するためのいくつかの既存の方法がある。

一般的な生体血管の定量方法:

2.3.5.1 光学顕微鏡と画像解析

光学顕微鏡と画像解析は、組織スライスまたはライブイメージングにより生体組織や細胞を光学顕微鏡で観察し、その後専用の画像解析ソフトウェアを使用して血管を定量的に分析する。微小な血管構造を観察し、定量的なデータを取得する。取得した画像は専用の画像解析ソフトウェアに投入され、血管の密度、直径、長さ、体積などのパラメータが定量的に解析される。ソフトウェアは通常、自動セグメンテーションや対象領域の計測などの機能を提供する[94]。

2.3.5.2 血管の造影剤注入

血管の造影剤注入は、血管系の視覚化や構造の明瞭化を目的として、体内の血管に造影剤を注入する診断技術である。これにより、X線や磁気共鳴画像法などの画像技術を用いて、血管の形態や血液流動などを詳細に観察し、異常を検出することが可能である。

血管造影は、動脈や静脈の異常、狭窄、瘤（動脈瘤）、血管奇形などの診断に使用される。冠状動脈造影（冠動脈カテーテル検査）、血管造影法（アンギオグラフィー）、および磁気共鳴アンギオグラフィ（MRA）などが一般的な手法である。生体内の血管構造を直接視覚化できる。血管の異常や疾患を確認しやすい[95]。

2.3.5.3 血管マーカーと免疫組織染色

血管マーカーと免疫組織染色は、生体内の血管や血管系の構造を視覚的に明瞭にするための手法である。これは、特定のタンパク質や抗原を検出するために特異的な抗体を用いて染色を行う免疫組織染色法と血管組織の特定の成分を標識するための血管マーカーを組み合わせて使用される。具体的な抗原やタンパク質を検出するための抗体を用いて、免疫組織染色を行う。これにより、特定の成分が染色され、色の変化によって視覚化が可能となる。

同時に、血管マーカーと呼ばれる特定の蛍光色素や標識物質を使用して血管を標識する。これにより、血管系の構造が目立つようになる。取得された画像は画像解析ソフトウェアを使用して解析され、血管の密度、形態、異常な部位などが定量的に評価される。この手法は、血管系の研究や疾患の診断に広く使用される。例えば、がん組織内の血管新生の評価、炎症反応中の血管変化の観察、または神経組織との関連性などが挙げられる。

生体組織内の血管や組織の微細な構造を視覚的に把握できる。特定の成分やタンパク質の発現を確認でき、組織内での位置関係を把握できる。血管マーカーの使用により、血管系が明瞭になりやすい[96]。

2.3.5.4 三次元再構築とマイクロ CT スキャン技術

三次元再構築とマイクロ CT スキャン技術を用いて、生体組織内の血管構造を非破壊的か

つ高解像度で観察する。これにより、血管系の微細な解剖学的構造や変化を詳細に把握することができる。血管の位置や分岐点、直径などの情報を得るために、取得したサンプルをマイクロ CT スキャンにかける。X 線を用いて非常に高い解像度で断層画像を取得する。マイクロ CT スキャンによって得られた断層画像データを収集する。これは、血管の空間的な配置や構造に関する情報を含んでいます。マイクロ CT スキャンによって得られた。収集された断層画像データをコンピュータで処理し、三次元の画像に再構築する。この過程で血管の立体的な構造が視覚的に表現される。三次元再構築された画像を解析し、血管の直径、長さ、枝分かれのパターンなどの定量的な情報を取得する。生体組織を損傷せずに内部の血管構造を観察できる[97]。

2.3.5.5 機能性 MRI

Magnetic resonance imaging (MRI)は、生体組織の血流や代謝の変化を非侵襲的に観察するための画像診断技術。fMRI を使用することで、脳の活動や血管の動態をリアルタイムで観察することが可能。機能性 MRI の前に、基本的な MRI 画像（解剖学的な構造を示す画像）を取得する。これにより、血管や組織の位置が確認される。血液中の酸素量が増加することによって生じる信号を検出することで、脳活動や血管の動態を観察する。MRI は主に BOLD 信号（血液酸素レベル依存性のコントラスト）を利用している。取得された MRI データは、データ解析ソフトウェアを使用して処理される。脳活動の特定の領域や、血管の動態が可視化され、機能的な情報が得られる。データは、データ解析ソフトウェアを使用して処理される。得られた MRI データを解析することで、血管の酸素供給と需要の変動や、血流の動態をリアルタイムで観察できる。血管の構造や動態の変化を観察し、血管性の疾患の診断に活用される。薬物治療による脳活動や血管の変化を評価し、治療効果をモニタリングするのに使用される。生体組織に侵入することなく血管の動態を観察できる。血管の微細な構造や脳の機能的な領域を高い解像度で可視化できる[98]。

2.3.6 血管評価の指標

血管評価における主な指標には、以下のようなものがある。これらは血管の形態や機能を測定・評価するための一般的な指標:

2.3.6.1 長さ(Length)

血管の全体的な長さを測定することで、血管ネットワークの拡張性や縮退、また新しい血管の形成などを評価することができる。血管の長さは体内の循環システムにとって極めて大事で、これが血液の効率的な循環、酸素や栄養物質の効果的な供給、代謝産物の排泄に直接影響を与える。適切な血管の長さは、組織や臓器の正常な機能、特に多くの血液供給が必要な組織の維持に不可欠だ。さらに、血管の長さの変化は新しい血管の形成や全体的な血管システムの再生にも影響を与える。総じて、血管の長さは生理学的な正常機能だけでなく、血流抵抗、病理生理学的な状態などにも直接的または間接的に関与し、健康状態を維持する上で不可欠だ[99]。

2.3.6.2 直径(Diameter)

血管の直径は、血流の速度や抵抗、血管壁の状態などに影響を与える。直径の変化は、血管の機能や健康状態に関する情報を提供する。血流の速さをコントロールして、組織や臓器にちゃんと血液が供給されるように拡張したり収縮したりして、生理学的なバランスを保つんだ。それに、血管の太さが変わると、血圧も変わる。血管が狭くなれば抵抗が増して、血圧が上がり、逆に広がれば抵抗が減って、血圧が下がる。それに、血管の太さは微小血管にも影響を与えて、組織や細胞に十分な血液が行き渡るのを助けている。ただ、血管があまりに狭くなると、血液が固まりやすくなって、血栓ができやすくなる[100]。

2.3.6.3 分岐(Branch)

血管の分岐によって、血液は複数の方向に流れ、異なる部位や組織に均等に供給されるため、各部位が十分な酸素と栄養素を受け取り、代謝産物を効率的に排出できる。また、組織の成長や修復に不可欠であり、怪我や損傷が生じた場合には、新しい組織に必要な酸素や栄養素を供給するために分岐した血管が新しく生じることがある。微小血管への分岐によって、血液は組織の最も細かい部分まで到達し、毛細血管が酸素と栄養素を供給し、同時に代謝産物を回収する。血管の分岐はまた、身体が異常な状態に対応する能力を向上させ、免疫応答にも関与する。総じて、血管の分岐は体内の生理的なプロセスにおいて効率的かつ適切な血液供給を確保し、組織や臓器の正常な機能をサポートしている。血管が分岐するパターンは、血流の分布や組織への酸素・栄養供給に影響を与える。分岐の評価は、血液供給のパターンや血管ネットワークの効率を理解する上で役立つ[101]。

2.3.6.4 面積(Area)

血管の断面積や表面積は、血管壁やその他組織との相互作用、血液と組織との物質交換に関与する要因を示す指標だ。特に微小血管の評価において有用である。これらの拡大によって血液と周囲の組織との物質交換が増加し、酸素や栄養素の効率的な供給と、代謝産物の効率的な排除が可能となる。その結果、組織細胞が必要な酸素や栄養素に素早くアクセスでき、生理的な機能が向上する。また、血管の断面積が広がると血管抵抗が低減し、これが心臓の負担を軽減し、循環システムの効率を向上させる。さらに、微小血管や毛細血管においても物質の交換や酸素供給が向上する。これらの血管の特性の拡大は、組織との効果的な物質交換や循環効率の向上、体温調節などにおいて非常に重要だ[102]。

2.3.6.5 体積(Volume)

血管の体積は体内の血液量を貯蔵し調節する役割を果たす。体積の調整により、必要に応じて血液を適切に貯蔵でき、逆に必要な場合には放出できる。次に、適切な血管体積は循環システムの安定性を維持する。十分な体積があると、血圧や循環の安定性が確保され、血液が体内で効率的に循環する。また、血管の体積が十分であることは、組織や器官への血液供給にも直接影響を与える。適切な体積があれば、組織に必要な酸素や栄養素を十分に供給できる。血管の体積は健康な循環システムと正常な体内機能の維持に不可欠な役割を果たす[103]。

2.4 UVB 創傷に関する研究

人間の皮膚は、さまざまな物理的、化学的、生物学的損傷にさらされ、これらの損傷がさまざまな皮膚疾患の原因となっている[104]。すべての環境リスク要因の中で、オゾン層の減少とそれに続く地表の UVB レベルの増加により、UVB 照射がますます注目される[105]。太陽のスペクトルは電磁波を放射する。大気とオゾン層は、有害な高エネルギー放射線の大部分を取り除き、UVB 放射線(200–400 nm)は地球に到達し、人間の皮膚にまで届くことがある。太陽の UV 放射線は、1-10%が高エネルギーの中波 UVB(290-320 nm)と 90-99%が長波長 UVA(320-400 nm)の光線から構成されており、これらは成層圏オゾンによって完全に吸収される。日光にさらされると、波長(WL)300 nm の高エネルギー変異原性 UV 光はほぼ完全に表皮細胞成分に吸収され、高い WL を持つ低エネルギーの UV 光は皮膚内に深く浸透する。UVB は、日光による人間へのほとんどすべての有害な影響、日焼け、真皮結合組織への光ダメージ、光老化、紅斑、皮膚癌の主要な原因である[106,107]。

2.4.1 UVB 損傷の特徴

UVB は、地球表面に到達する最も強力な太陽放射線の一種であり、酸化ストレスを引き起こす。UVB は表皮および真皮の上層を透過する能力を持っており、そのためには少量の陽光でもより深刻な皮膚損傷を引き起こす可能性がある[12]。その有害な影響は主に DNA およびタンパク質の損傷に起因し、細胞周期の停止とアポトーシスを引き起こす。DNA と RNA に存在する芳香族の複素環の塩基は、UVB の WL に近い 260-265 nm で吸収極大を持っており、直接の UVB 吸収によりピリミジン塩基が二量体を形成し、損傷した DNA の複製により光透過性の位置で塩基が誤って挿入され、変異が生じる。UVB 誘導性の変異は、DNA に明確な変化をもたらし、UVB を効果的な腫瘍促進剤とする。したがって、UVB によるケラチン形成細胞の損傷を減少させるための効果的な戦略の開発は不可欠である。

UV 放射線の損傷効果には、光老化と光誘発性癌が含まれる[108]。光老化の臨床的な表現には、年齢とともに皮膚の糖タンパク質、コラーゲン、弾性タンパク質のレベルが低下し、皮膚の老化が引き起こされる可能性があり、その主要な原因は環境要因(UVB)によって誘発される酸化ストレスが核心的な役割を果たす[109]。

皮膚は表皮、真皮、および皮下組織という三つの層である。表皮は、角質細胞で構成される角質化した上皮細胞で、その約 80%は角質形成細胞で、物理的な保護バリア機能だけでなく、免疫、炎症、腫瘍変換など、さまざまな細胞生物学的プロセスに関与し、外部刺激から体を保護し、体内環境の恒常性を維持する。真皮は、密に不規則な結合組織で構成され、コラーゲンタンパク質と弾性繊維が存在する ECM で主に形成されており、真皮層の圧縮性と弾性を保持する。真皮層の主要な細胞は線維芽細胞であり、その発達した粗面内質網は、I 型および II 型コラーゲンなどのさまざまなコラーゲンを構成される。さらに、真皮には肥大細胞、マクロファージ、脂肪細胞、浸液細胞などの細胞が含まれており、これらの細胞は周囲の神経線維、血管、リンパ管と絡み合っており、表皮層に豊富な栄養を供給し、表皮細胞の分化、増殖、移動を促進する[110]。角質形成細胞は外部の損傷に対して一定の修復能力を持っており、外部の損傷の強度が角質形成細胞自体が耐えられる能力を超えると、早期ま

たは異常な角質化、さらには細胞のアポトーシスが現れる[111]。皮膚の老化は外観に重大な影響を与え、乾燥や粗い肌、毛細血管の拡張、弾性の低下、不規則な色素沈着、皮脂過多などの症状が現れる可能性がある。UV 放射線は皮膚の老化プロセスを促進し、外見と容姿に早期の老化をもたらし、正常な皮膚の組織構造と生理機能に害を及ぼし、皮膚癌のリスクを著しく増加させる可能性がある。光誘発性癌は細胞および DNA 損傷に起因しており、細胞レベルで DNA 損傷は紫外線暴露後の主要な出来事であり、生成される損傷のタイプは放射線の波長とエネルギー分布に依存し、異なる光生成物を形成する。内因性の DNA 修復メカニズムは DNA の修復に一定の効果を持っているが、一部の DNA 損傷は依然として存在し、慢性的な曝露とともに蓄積する可能性がある。DNA 損傷をさらに制限するために、UVB 防護策、例えば日焼け止めの使用が非常に重要である。皮膚は環境との相互作用の主要な媒体であり、毎日紫外線を受けるため、最終的には細胞の光損傷と皮膚の老化につながり、皮膚の光老化を予防するために抗酸化剤の使用が皮膚科で行われ、化粧品に応用される。

2.4.2 UVB 損傷の予防および治療

皮膚を UVB から保護するための有益な製品が多く開発されている。その中で、日焼け止めクリームの使用が一般的である。最近の研究の 1 つのアプローチは、バイオポリマーであるヒドロゲルを使用して日焼け止め材料を設計する。ヒドロゲルは高い水分含有量と分子が均等に分散する三次元ポリマーネットワーク構造を持ち、UVB 防御機能を持つ成分を封入するのに適す。ヒドロゲルは生物製剤を封入するのに特に有用であり、生物分子がその活性を発揮するために必要な自然な水中環境を提供する。キトサンベースのヒドロゲルは、外用製品の設計に考慮される。それらは生体適合性、無毒性、皮膚への刺激がないという特性を持ち、適切な生体粘着性を備える[112]。

UVB が皮膚に及ぼす負の影響から、ほとんどの日焼け止め製品は紫外線フィルター機構に基づく。伝統的な UVB フィルターには通常 2 つのタイプがある：物理的フィルターと化学的フィルター。高い化学的安定性と紫外線吸収能力により、二酸化チタン(TiO_2)および亜鉛酸化物(ZnO)から成る物理的フィルターは、化粧品に広く使用される[113]。一方、化学的紫外線フィルターにはオクチノキサート、アボベンゾン、オキシベンゾンなどが含まれ、これらは紫外線放射線を効果的に吸収し、エネルギーを熱または光の形で分散させて皮膚を保護する。ただし、この両方には欠点がある。特に、物理的吸収剤は活性酸素(ROS)を生成し、DNA や組織に損傷を与える可能性がある。一方、化学物質は皮膚に浸透することができ、これは皮膚を紫外線から保護する効果を制限するだけでなく、潜在的な健康被害をもたらす。これらの伝統的な紫外線フィルターは、動的な生理学的条件下での耐久性に欠け、生体親和性にも問題があり、実際の応用に制約がある。そのため、自然由来の紫外線防御成分をキトサンヒドロゲルにロードする研究が行われており、これらは皮膚を有害な外部要因から保護する安全で環境に優しく、効果的な新しい日焼け止め製品となり得られた。

現在、無毒で抗酸化性のある天然成分を使用した日焼け止め化粧品製剤が消費者に支持される。サリバンバジウ(SB)などの植物由来の化学物質は、証明済みの抗酸化活性を持ち、肌の老化と皮膚疾患の改善に役立つ。サリバンバジウは強力な抗酸化活性を持ち、UVB による皮膚の損傷を抑制できることが示される[114]。以前の研究によれば、サリバンバジウを摂取することは、UVB による損傷に対する皮膚の耐性を向上させ、DNA 損傷の防止または修復を通じて効果的であり、UVB 放射線による増殖反応を減少させ、紫外線による細胞

死および日焼け細胞の形成を抑制することができる。しかし、サリバンバジウは胃酸で分解され、水溶性が低く、腸管吸収が悪いため、消化管への供給が制限される。したがって、サリバンバジウを局所的に送達する新しい方法は、皮膚を UVB 放射線から保護するための潜在的なアプローチを示す可能性がある。キトサンヒドロゲルは薬物送達に使用されるだけでなく、環境から薬物を保護し、ゲル構造が環境刺激に反応して薬物の放出を制御する。天然化合物は一般的に温度、光、pH 値、酸化などの外部環境条件の影響を受けやすい。したがって、サリバンバジウを封入したキトサンヒドロゲルは製品の安定性を向上させ、製品の品質を維持するだけでなく、天然化合物の放出を制御する。体内実験により、サリバンバジウを携帯したキトサンヒドロゲルは、UVB 放射線による酸化剤および H_2O_2 の生成を防ぐ効果が示された[115]。

皮膚は複雑な抗酸化物質と酵素システムを備え、酸化ストレスと抗酸化防御のバランスを維持できる[116]。多くの活性酸素を抑制する能力を持つ抗酸化物質が、皮膚細胞の光による損傷を抑制できる。現在、陸生植物、海産物、血小板を豊富に含むフィブリン分解物や富血小板血漿などの製剤が広く光老化損傷の修復に使用される。第三世代の血漿エキスである濃縮増殖因子(CGF)は、2006年に Sacco によって初めて提案され、多くのフィブリンと血小板を含む新しい生物フレームと見なされる。CGF フィブリンゲルの重要な役割は、多くの増殖因子とフィブリンを含んでおり、傷ついた組織の修復に使用される[117]。自己 CGF フィブリンゲルを使用して骨再生を促進し、下顎関節を修復し、骨の欠陥を修復してきた。そして、良好な臨床効果を得られた[118]。UVB 照射は一般的な健康問題となっており、UVB 照射による皮膚の光老化を予防する価値が高いとされる。

2.4.3 UVB 誘発性皮膚創傷の化学予防のための DDS 戦略

近年、UVB の損傷に対抗するための皮膚を介した薬物送達は高い関心を集めている。経皮的な送達の利点は、初回通過代謝の低減と全身的な副作用の削減である。薬物の比較的低い投与量は治療費を削減し、効果的な持続放出効果により患者の生活の質を向上させることができる。

2.4.3.1 超柔軟ナノキャリア(Ultra-flexible nanocarriers)

超柔軟ナノキャリアは、UVB による皮膚がんを化学的に予防するために局所的に抗酸化物質ジンジョール誘導体(DIM-D)の投与に使用される。報告によると、Ultra-flexible nanocarriers は、より深い皮膚層に浸透できるため、必要な量の薬物を皮膚に運ぶのに役立つ。これらのナノキャリアは流体膜から構成されており、皮膚層に簡単に浸透するのを助ける。Boakye CH らの研究では、DIM-D を含む超柔軟なナノゲルが調製され、皮膚内の薬物蓄積を増加させ、UVB 誘発の皮膚がんの予防効果が評価された。UVB 照射のみのグループの平均累積腫瘍数は DIM-D-Ultra-FLEX-Nano ゲル治療の 3.3 倍だった。UVB 照射のみのグループでは、背中 of 皮膚に腫瘍ができる割合が 87.5%であるのに対し、日焼け止め SPF30 および DIM-D-Ultra-FLEX-Nano の予処理グループの割合はそれぞれ 37.5%と 62.5%であった。24 週後、UVB のみ、日焼け止め SPF30、DIM-D-Ultra-FLEX-Nano ゲルの各グループの平均腫瘍数はそれぞれ 20.00 ± 2.52 、 3.00 ± 1.52 、 6.00 ± 0.58 だった。また、DIM-D-Ultra-FLEX-Nano は、DNA 損傷(8-ヒドロキシデオキシグアノシン)、転移(Vimentin、MMP-9、TIMP1)、

皮膚炎症、免疫抑制、上皮増殖、細胞生存、細胞アポトーシス増加を有意に減少させたことが観察された。さらに、市販の日焼け止め(SPF30)と比較して、DIM-Dを含むUltra-FLEX ナノキャリアはマウスの背中の皮膚に腫瘍形成を遅延させた。これらの研究は、超柔軟なナノキャリアが皮膚がんの予防に有望な薬物送達手法である可能性があることを示した[119]。

2.4.3.2 脂質ベシクル(Lipid vesicles)

二メチルスルホキシド(DMSO)およびトランスファゾームを含む小胞体は、UVB 照射による皮膚がんの治療薬の提供に使用される[120]。トランスファゾームは、トランスファゾームとリポゾームから成る脂質ベシクル(Lipid vesicles)である[121]。DMSO は、その抗酸化、鎮痛、抗炎症、および皮膚浸透増強の特性から、脂質小胞体の開発に使用される。Menezes AC らの研究では、トランスファゾーム(TE)および DMSO を含む小胞体(NPZ-DM)を含む 1-(1-ナフチル)ピペラジン(1-NPZ)が開発され、UVB 照射による炎症への治療効果が評価された。UVB 照射は白血球浸潤を誘導し、それによって炎症が引き起こされ、最終的に腫瘍の進行を促す。実験結果から、NPZ-DM 製剤が UVB による白血球浸潤を抑制できることが示された[122]。DMSO を NPZ-DM は、UVB 照射による皮膚疾患の治療の選択的な薬物送達方法として考えられる。

2.4.3.3 親水性のクリーム/ローション

親水性のクリームまたはローションの処方は、緑茶ポリフェノール(GTP)が UVB によるマウスの皮膚損傷に対する効果を評価するためにも使用される。Vayalil PK らの研究によれば、日焼け止め、スキンケア製品、保湿クリーム、フェイスクリーム、脱毛クリームなどの局所的なスキンケア製品に GTP を添加することで、UVB による皮膚疾患の治療または予防に使用できる。GTP を含む外用製剤は、UVB による抗酸化酵素の消耗を著しく抑制することが示された。この研究では、GTP の成分であるエピガロカテキンガレート(EGCG)が UVB 誘導の酸化ダメージと MAPK タンパク質の発現を減少させるのに役立ち、MAPK タンパク質は発癌の原因とされる。これは、UVB による皮膚損傷を減少させるために緑茶ポリフェノールを含む外用クリームを調製した[123]。

2.4.3.4 微乳液 (Microemulsions)

微乳液(ME)は、カフェイン(CAF)の局所的なナノキャリアとして使用され、CAF の皮膚内での保持を増強し、UVB 誘発性皮膚癌の治療効果を向上させるために用いられる。ME は UVB 誘発性皮膚癌治療に有望な局所的な CAF デリバリーシステムとなる可能性がある。また、微乳液はクエルセチンのデリバリーキャリアとしても使用されている。Vicentini FT らの研究では、クエルセチンを搭載した微乳液が UVB 暴露による酵素の分泌/活性を抑制し、正常なグルタチオン(GSH)レベルを維持するのに役立ち、UVB 暴露下で GSH レベルが非暴露時に比べて約 2 倍低下した対照グループと比較し、微乳液のない製剤では薬物浸透性に有意な差が見られた。

2.4.3.5 新しいナノエマルジョンキャリア

新しいナノエマルジョンキャリアは、経皮的な薬物送達によって引き起こされる皮膚刺激を大幅に減少させる。ナノエマルジョンの利点には、皮膚の保湿を実現し、皮膚の保護バリアの向上、および持続的な薬物放出が含まれる。薬物の生体利用能と効果を向上させるために使用できる[124–127]。

2.5 糖尿病創傷に関する研究

現在、全世界には 5.29 億人の糖尿病患者がおり、2050 年までにはこの数が 13 億人に達すると予想されており、各国で糖尿病患者の数が増加する。糖尿病は、心血管合併症、糖尿病腎症、糖尿病性網膜症、神経障害、糖尿病性足症、免疫系の問題など、さまざまな長期合併症を伴う[128]。糖尿病の長期合併症は、多くの臓器とシステムに影響を及ぼし、長期的な苦痛と医療負担をもたらす、患者の生活の質と幸福感に影響を与える可能性がある。約 15% の患者が糖尿病性足症を経験し、その中の 85% が最終的に切断手術を受ける必要があり、切断手術後の 5 年生存率は 50% に過ぎない。潰瘍の後の 5 年間の死亡率は約 40% である。DFU およびその長期的な後遺症は、直接的な医療費と長期の障害の原因となる。

糖尿病性足症(DFD)は、主要な罹患率、死亡率、および生活の質の低下に関連する糖尿病合併症の一つであり、糖尿病の最も重大な合併症の一つである。DFD の発症率は依然として増加する。国際的な糖尿病足の共通の定義によれば、足の潰瘍は、糖尿病患者で足首以下の全層の傷であるかどうかにかかわらず、足の状態を指す。推定によれば、糖尿病患者が一生で DFU を発症するリスクは 25% である。非潰瘍性糖尿病患者と比較して、DFU 患者の死亡率は 2 倍以上に上昇する。潰瘍の後の 5 年間の死亡率は約 40% である。さらに、DFD およびその長期の後遺症は、直接的な医療費と長期の障害の原因となる[129]。疫学研究によれば、約 15% の糖尿病患者が糖尿病性足症を発症し、糖尿病性足症の発症率は年間 2% 程度であり、潰瘍が治癒した後の初年度の再発率は 30–40% である。これらの患者のうち、85% が最終的に切断手術を受ける必要があり、切断手術後の 5 年生存率は 50% に過ぎなかった[130]。

糖尿病性慢性創傷は、持続的な炎症反応を特徴とし、血管新生を変化させ、最終的に上皮化を遅延させ、タンパク質酵素の分泌不均衡を誘導し、病理的な遅延癒合プロセスを示す。糖尿病性創傷の治癒プロセスにおける炎症段階の延長に伴い、炎症細胞は一般的に活性化され、炎症段階から増殖段階への転換が遅れる。細胞が分泌する多くの炎症性サイトカイン、例えば腫瘍壊死因子(TNF- α)やインターロイキン 6(IL-6)などは、創傷部位に放出され、糖尿病性創傷の修復に必要な細胞の増殖と移動を妨げる[131]。さらに、過度な炎症活性化は、マトリックスメタロプロテアーゼ-9 の発現を増加させ、自然なコラーゲン、線状結合タンパク質、弾性タンパク質の迅速な分解を引き起こし、それにより糖尿病性創傷の修復プロセスが遅くなる。火傷、外傷、潰瘍などの創傷には通常、水分とタンパク質の大量の喪失、細菌感染、内分泌および免疫系の機能障害などの一連の問題が伴う。重度の皮膚損傷は生命を脅かす可能性がある。医療用包帯は損傷した皮膚組織を代替し、汚染や化学的刺激に対抗し、適切な創傷環境を創り出し、乾燥と電解質の喪失を防ぎ、最終的に創傷治癒を促進する。しかし、創傷治癒は多くの細胞、増殖因子、細胞外シグナル源の協調作用を含む複雑なプロセスであることが証明される。さらに、細菌感染は創傷治癒プロセスから避けがたく、炎症を

悪化させ、酸化ストレスを引き起こし、損傷した組織の修復を妨げる。したがって、従来の包帯やガーゼなどの包帯は創傷治癒の要求を満たすのが難しく、多機能で効果的な包帯の開発が急務である[132]。

傷口癒合は、非常に複雑なプロセスであり、止血、炎症、増殖、再構築の連続的かつ重複する段階を含み、各段階に多くの細胞と細胞因子が関与する。止血は、初期の傷害の直後から数秒から数分の間に発生する。損傷した血管はすぐに収縮して血栓を形成し、血管の損傷による出血を防ぎます。炎症段階では、マクロファージが主要な貪食細胞であり、損傷した細胞と壊死組織をクリアし、さまざまな細胞因子、ケモカイン、増殖因子を放出する。これらは線維芽細胞と内皮細胞の増殖に幅広く影響を及ぼし、新しい血管形成に影響を与え、炎症から増殖への転換を調整する。炎症段階の特徴は、角質形成細胞、線維芽細胞、マクロファージ、内皮細胞の広範な活性化です。血管形成と肉芽組織の形成を調整し、上皮組織を修復する。増殖期には線維芽細胞の増殖、再上皮化、血管形成、神経再生が含まれる。組織モデリング段階では、炎症と増殖段階で開始されたすべての修復プロセスが終了する。線状線維芽細胞と肉芽組織内の筋肉成分が減少し、III型コラーゲンがI型コラーゲンに置き換えられ、線維が形成され、傷口は完全に閉じる[133,134]。

2.5.1 増殖因子とサイトカインの糖尿病性足潰瘍治癒における役割

糖尿病足潰瘍の創傷癒合は、複雑で極めて挑戦的な生物学的および分子プロセスであり、さまざまな細胞タイプの協調努力を含みます。様々な増殖因子が創傷の臨床的管理において、慢性静脈潰瘍、圧瘡、および糖尿病足潰瘍に対する治療効果がある。糖尿病足潰瘍患者では、様々な細胞因子の変化が見られると結論づけられる。同様に、糖尿病合併症（糖尿病腎症、網膜症、および神経症など）を抱える患者でも細胞因子のレベルの変化が見られる。その後、糖尿病性創傷癒合プロセスは、サイトカインのレベルを調節することで加速できるとされる。

2.5.2 褥瘡の治癒に関与する3つの段階

皮膚創傷治癒過程は受傷直後から始まり、炎症期、増殖期、再構築期の3つの過程が互いにオーバーラップしながら進行する一連のプロセスである。糖尿病性の潰瘍(褥瘡)治癒の分子段階には、病態生理学を理解するために増殖因子の役割を詳細に検討する。増殖因子は通常の治癒プロセスの仲介に関連するが、傷口治癒の障害において不可欠な役割を果たす。PDGF、FGF、EGF、VEGF、IGF、TGFなどのサイトカインは、その生理学的な作用を通じて傷口治癒を加速し増強する。増殖因子は、傷口治癒の選択において重要な役割を果たし、様々なプロセスに影響を与える。これには、様々な細胞タイプの増殖と移動、内皮細胞の刺激、血管新生、線維芽細胞や炎症細胞のケモタクシスなどが含まれる。サイトカイン増殖因子はアポトーシスの予防にも寄与し、ECMの生成とリモデリングに影響を与える。傷口治癒の段階を順序正しく進行させるには、様々な体液因子、細胞、および他の物質が相互作用する。これにより、傷口は適切な時期に正確に閉じることができる。これらの方法のいずれかでの異常或不規則性は、慢性的な非治癒性の傷口から肥厚性瘢痕形成またはケロイドまでの病理学的な傷口治癒を引き起こす可能性がある。PDGFやIGFなどの増殖因子はアポトーシス経路を抑制する作用があり、これらの増殖因子は生理学的な傷口治癒の異なる段

階を可能にするために[135]。

2.5.2.1 PDGF の役割

PDGF は傷口治癒において重要な要素であり、その影響は過小評価できなかった。PDGF は、傷口閉鎖を加速するために局所的に適用するために承認された最初の組み換え増殖因子である。血管の形成や血管新生、既存の血管組織からの血管の新生において、PDGF は血小板によって放出され、活性化したマクロファージによって PDGF が分泌される。傷口治癒の初期段階では、PDGF は炎症部位への線維芽細胞、好中球、および単球の移動のためのケモアトラクタントとして機能する。PDGF は新しい ECM 成分の生成を促進し、線維芽細胞の分裂促進因子でもある。さらに、PDGF は線維芽細胞の分化を促進し、コラーゲンマトリックスの収縮と傷口の増殖段階での役割を助ける[136]。

2.5.2.2 FGF の役割

FGF は、広範なプロセスに関与する細胞シグナリングタンパク質ファミリーであり、最も重要なのは正常な発達のプロセスである。同様に、その機能に異常があると、さまざまな発達異常が生じる。その機能には神経発達、角質細胞の組織化、血管新生、および傷口治癒プロセスが含まれる。FGF は PDGF や VEGF よりも強力な血管増殖因子であり、FGF は血管新生と線維芽細胞の増殖を刺激し、これにより肉芽組織が形成される。この組織は傷口治癒プロセスの初期段階で傷口のスペースに充填される[137]。

2.5.2.3 VEGF の役割

VEGF はサイトカイン増殖因子ファミリーに属する。VEGF は、血管透過性、血管新生、およびリンパ管新生の重要な仲介物質として認識される。同様に、VEGF は傷口治癒においてコラーゲンの沈着と上皮化を促進する。VEGF の産生は低酸素状態の下流にあり、これは内皮細胞上に存在する受容体に結合し、それにより血管の成長が誘導される[138]。

2.5.2.4 IGF の役割

IGF は抗カタボリックであり、多くの細胞タイプに作用する増強作用のある物質である[21]。IGF は2つのペプチド、すなわち IGF-1 および IGF-2 から成る複合体である。IGF-1 はサイトカインであり、成長ホルモンのファシリテーターおよびモデレーターである[139]。成長ホルモンが血流中に放出されると、肝臓によって IGF-1 が生成される。IGF-1 は成長において重要な役割を果たし、体のすべての細胞の成長促進を促す[140]。それは細胞内シグナリングのプロセスを開始するために、細胞内でインスリン様成長因子1受容体(IGF1R)に結合する。これにより、細胞増殖、アポトーシス、およびグルコース代謝を引き起こすプロテインキナーゼ B(PKB)が活性化される[141]。さらに、細胞の移動と転写も引き起こす。糖尿病性褥瘡では、IGF-1 は傷口治癒中の細胞の肉芽形成に参加する。IGF-1 の発現は糖尿

病患者では減少し、これにより細胞の肉芽形成に異常が生じる。IGF-1 はアポトーシス経路を抑制し、プロおよびアンチ炎症性サイトカインの産生を抑制する。さらに、線維芽細胞および角質細胞に対してミトゲンであり、細胞外マトリックス成分の産生を刺激する。

2.5.2.5 TGF- β の役割

TGF- β はサイトカインの変異成長因子ベータスーパーファミリーのポリペプチドメンバーである。TGF- β はさまざまな細胞機能を実行し、細胞の成長、細胞の分化、細胞の増殖、およびアポトーシスの制御に関与する[142]。糖尿病は持続的な炎症と不全な組織修復反応と関連する。TGF- β -1 は、受容体経路を通じたシグナリングをブロックすることで、マクロファージの刺激を逆転させ、防ぎます。TGF- β の増加は2型糖尿病と関連する。これは細胞の機能的な数の減少をもたらす ECM の蓄積を抑制する。これにより、腎臓の再吸収および排泄機能が弱くなる。

2.5.2.6 TNF α の役割

腫瘍壊死因子 α (TNF α)またはカシエキシン/カシエクチンは、全身性の炎症に関与し、急性期反応の一環として多くのサイトカインの1つである細胞シグナリングプロテインである。主に活性化されたマクロファージによって生成され、免疫細胞の調節に重要な役割を果たす。また、インスリン抵抗性を誘発し、インスリン受容体基質-1(IRS-1)のセリンリン酸化を促進することでインスリン信号を低下する。TNF α は結合組織の破壊と関連する。これは、住民および炎症細胞によって生成される溶解酵素の放出によるもの。TNF α の削除または阻害は組織修復プロセスに重要な役割を果たす。TNF α の発現の制御は、糖尿病患者の傷口治癒において有意な助けとなることが示される。TNF α ブロッカーは、糖尿病性傷口の骨膜細胞のアポトーシスを減少させ、糖尿病性傷口治癒プロセス中に骨の形成を増強することが示される。一方で、十二指腸潰瘍や胃癌の発症は TNF α などのサイトカイン遺伝子のポリモルフィズムと関連する[143]。

2.5.2.7 MMP の役割

マトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)は、カルシウム依存性の亜鉛含有エンドペプチダーゼである。MMPs は細胞の行動において重要な役割を果たし、細胞の増殖、移動、分化、血管新生、粘着と分散、アポトーシス、および宿主防御などさまざまな機能に関与する。適切なレベルでは、MMPs は傷口治癒に理想的である。それらは傷口の炎症段階で損傷した細胞外マトリックスの除去に関与する。さらに、増殖段階では、それらは細胞の移動と血管新生のために意図された毛細血管膜の崩壊において重要な役割を果たす。したがって、MMPs は傷口治癒の組織リモデリング段階で大いに役立っている。MMPs の高いレベルは組織修復およびそれに伴う糖尿病性足潰瘍の不良な傷口治癒プロセスに否定的な役割を果たします。彼らはまた、糖尿病性腎症の発症に関与しており、糸球体肥大と ECM の沈着を引き起こす[144]。

2.5.3 褥瘡の治癒

褥瘡の治癒は、提供されるケアの質と患者のそれに対する遵守度に強く影響される。事故や高血糖がさまざまな理由で制御できない場合、感染や擦過の可能性がある。一般的に、傷の治癒の四つの段階は止血、炎症、増殖、熟成またはリモデリングである。止血過程は、怪我や傷の場合に出血を止めるための身体の防御機構である[145]。出血があるとすぐに始まり、血管は血液の流れを制御するために収縮する。血小板は結合して壊れた血管を修復する。結果として、フィブリンの糸が結合剤として機能し、凝固物を形成する。傷の治癒の第二段階は炎症段階であり、ここでは血管が透過を受けて傷が腫れる。充血は修復細胞を傷の領域に移動させることで傷の治癒を促進する。この段階に関連する症状には痛み、腫れ、赤み、熱がある。この段階では、多くの酵素、白血球、栄養素、増殖因子が細菌、病原体、傷から損傷した細胞を取り除くために一生懸命働きる。第三段階は増殖段階であり、傷が再構築され始める。新しい組織は通常、ECM とコラーゲンでできる[49]。新しい組織が構築されると、傷はミオフィブロブラストの助けを借りて収縮する。最後に、上皮化過程が発生し、上皮細胞が表面に現れる。傷の治癒の最終段階は熟成またはリモデリング段階であり、コラーゲンのリモデリングが発生する。この段階では、増殖段階でおおよそ組織化されたコラーゲンがきちんと構造化され、より密に結合する。傷の治癒のカスケードはさまざまな段階で構成され、慢性の非治癒性傷を形成する可能性がある。傷の治癒には増殖因子、サイトカインなどの炎症細胞、プロテアーゼなどの仲介者の努力が必要なため、これらの要因のいずれかの変化が傷の治癒に悪影響を与える可能性がある。同様のことが糖尿病患者で観察され、外因性の要因の影響を受けるため、傷が適切な方法で癒えず、慢性的な傷が形成されることがある。これは傷をさらに複雑にする。リモデリング段階は増殖段階の後に始まり、血管の成熟と後退に従い、怪我が発生してから 6-24 か月かかる[146]。

Table 2-1 Summary of the Research Position of the Technology

Research Theme	Development of a transdermal delivery system for growth factors using G/O
Overview of Prior Research	Transdermal drug delivery systems and nanoemulsion technology have been under focus, and this study is positioned within that context
Limitations of Prior Research	Challenges exist in the stability of growth factors and overcoming the skin barrier, and this study addresses these challenges with its uniqueness
Objectives of this Research	To achieve transdermal delivery of growth factors using G/O and develop an effective system for the treatment of acute and chronic skin injuries
Characteristics of this Research	The use of Heparin-gelatin base and the effective delivery of growth factors through nanoemulsion are key features
Positioning of the Study	Addressing challenges in traditional growth factor transdermal delivery systems and proposing a new approach using G/O
Expected Contributions	Providing an effective method for the treatment of acute and chronic skin injuries through transdermal delivery of growth factors using G/O

第3章 G/O エマルションの開発

3.1 本章の目的および概要

増殖因子とは、細胞の増殖や分化を促す親水性の生体高分子である。皮膚内の細胞に増殖因子が作用することで、しみやたるみ等の肌トラブルを改善することが知られており、有効的な効果の発現には長期的な治療が必要である。そこで本研究では、増殖因子の長期的な経皮投与が可能なキャリアである、Gel-in-Oil (G/O)の開発を目指した。

皮膚は、外側から順に表皮層、真皮層で構成されている。皮膚の真皮層に存在する繊維芽細胞はコラーゲンを生産する細胞であり、線維芽細胞のコラーゲン生産能の低下によってしわやたるみといった肌トラブルが引き起こされる。

皮膚再外層である角質層は疎水性であるため、親水性の高分子である増殖因子が透過できないことである。そこで本研究では、薬物を微粒子に封入し体内へ送達するエマルション化技術に着目した。既往の研究として、親水性の薬物を含んだ水相を疎水性の界面活性剤で被覆し油中へ分散させた Water-in-Oil (W/O) エマルションや、凍結乾燥により W/O の内水相の水を除去した Solid-in-Oil (S/O) エマルションが開発されており、様々な分野への応用が研究されている。このエマルション化技術を利用して、増殖因子をナノサイズの粒子に封入し油中へ分散することで角質層の突破が可能となる。

増殖因子は非常に安定性が低く、効能を維持したまま体内へ送達することが困難な点である。そこで本研究では、増殖因子固定化能を有するヘパリンを、化学架橋によって生分解性のあるゼラチンに導入した heparin-gelatin 基材に着目した。本基材は、ヘパリンに増殖因子を固定化することによる活性の維持がすでに評価されており、再生医療の分野における応用が期待されている。Heparin-gelatin 基材を用いてナノサイズの微粒子を作製することで、増殖因子を安定的に体内へ送達することを目指した。また、粒子の内水相をゲル化させたことで、体内でゲルの分解に伴って増殖因子が徐放することが期待される。

以上のような特徴を持った TDDS のための G/O の開発を目的とした。

3.2 G/O エマルションの調整

3.2.1 実験目的

Heparin-gelatin 基材を使用して、ナノサイズの微粒子を製造し、増殖因子をその効力を維持したまま、安定的に体内へ送達する、また、内水相をゲル化させるキャリア G/O の開発を目的とした。

3.2.2 実験方法

[1]G/O エマルションの作製

G/O エマルション作製手順を **Fig.3-1** に示す。化学架橋剤である 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)および N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)を用いてヘパリン中のカルボキシル基を NHS 活性化させ、ゼラチン中のアミノ基と縮合結合させることでゼラチンにヘパリンを導入した。ヘパリン導入ゼラチンゾルの水相と、疎水性界面活性剤であるショ糖脂肪酸エステルを溶解したミリスチン酸イソプロピル (IPM)の油相を混合し、超音波ホモジナイザーを用いて攪拌して W/O エマルションを得た。この W/O を冷却することで、内水相のゲル化を行うことで G/O を調製した。界面活性剤に用いたショ糖脂肪酸エステルは、食品や医薬品などに広く用いられており、安全性が高いことが知られている。また、ショ糖脂肪酸エステルは体内で D-グルコースと D-フルクトースに分解されて吸収されるため、体内に残存することによる影響もない。分散溶媒として用いた IPM は角質層に存在するセラミドなどの脂質成分に対して親和的であり、細胞間隙を乱し、角質層の流動性を高めることで IPM に分散させた薬物の角質層中への浸透性を向上させる効果を持つ。

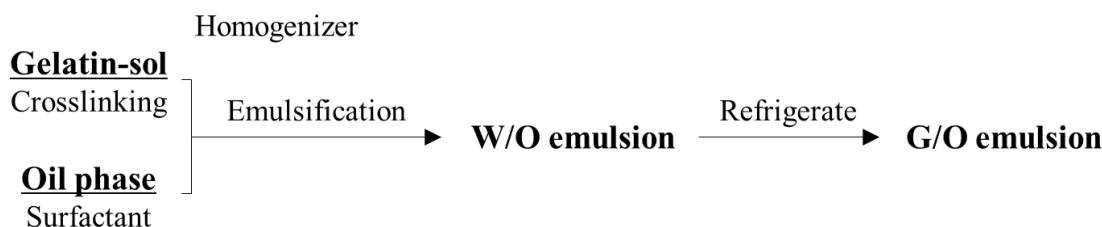


Fig. 3-1 Preparation of Gel-in-Oil (G/O) emulsion.

[2]粒子径制御

G/O は、薬物のキャリアとしてその内包物や用途によって粒子径を制御できることが好ましい。そこで、G/O 調製時の界面活性剤濃度(**Table 3-1**)、水相と油相の体積比、ゼラチン濃度が粒子径に及ぼす影響について検討を行った。具体的には、水相としてゼラチン溶液を調整し、恒温槽で溶かした。界面活性剤をクロヘキサンに添加し油相を調整した。水相と油相を超音波ホモジナイザー(Sonifier 250, Branson Ultrasonics Co., Danbury, CT, USA)で混合した(Duty cycle : constant、出力 : 7、時間 : 10 min)。粒子 5 μ L(約 3 mg)を IPM 3 mL に分散させた。DLS 測定を行った。

Table 3-1 Surfactant concentration

No.	volume(mL)		Surfactant concentration(mg/mL)	Gelatin concentration(%)
	Water phase	Oil phase		
#1			12.5	
#2	1	2	25	5
#3			50	

Table 3-2 Volume Ratio of Aqueous Phase and Oil Phase

No.	volume(mL)		Surfactant concentration(mg/mL)	Gelatin concentration(%)
	Water phase	Oil phase		
#1	1	1.5		
#2	1	2	50	5
#3	1	2.5		

Table 3-3 Gelatin concentration

No.	volume(mL)		Surfactant concentration(mg/mL)	Gelatin concentration(%)
	Water phase	Oil phase		
#1				3
#2	1	2	50	5
#3				10

[3] 架橋濃度

疎水性界面活性剤 ER-290 を 50 mg/mL の濃度でミリスチン酸イソプロピル(IPM)に溶解させた。50 mg/mL の MES buffer に Hep/EDC/NHS を質量比でそれぞれ 10:6 になるように添加し(ボルテックス)、30 分静置した。5%-ゼラチン溶液を調製した。ゼラチン溶液に Hep/EDC/NHS 溶液を Table.3-4 の濃度で混合した。ピペットを用いて、IPM にを滴下することで直径数 mm のエマルションを作製した。4℃下で冷却してエマルションをゲル化させた。シャーレに移し、37℃のインキュベーター内に静置した。15 分後、形態観察した。

Table 3-4 Cross-linking conditions for internal water phase

No.	Heparin/EDC/NHS concentration (mg/mL-Internal water phase)		
	Heparin	EDC	NHS
#1	0	0	0
#2	0.05	0.05	0.03
#3	0.5	0.5	0.3
#4	1	1	0.6

[4] 架橋時間

疎水性界面活性剤 ER-290 を 50 mg/mL の濃度でミリスチン酸イソプロピルに溶解させた。50 mg/mL の MES buffer に Hep/EDC/NHS を質量比でそれぞれ 10:6 になるように添加し、30 分静置した。終濃度 5% になるようにゼラチン溶液を調製した。Heparin/EDC/NHS がそれぞれ 1 mg/mL、1 mg/mL、0.6 mg/mL の濃度になるように混合した。直径 15 mm の円形の方に流し込み、4 度下でゲル化させることで高さ 5 mm のゲルフィルムを作製した。異なるゲル化時間で作製したゲルフィルムを用いて圧縮試験を行った(プローブ直径：3.5 mm、Max 設定値：2.5 mm)。

[5] G/O エマルションの内水相ゲル化評価

まず、5%ゼラチン溶液を調整した。ER-290 を 50 mg/mL で IPM に溶解させた。5%ゼラチン溶液 1 mL と IPM 2 mL を超音波ホモジナイザー(Sonifier 250, Branson Ultrasonics Co., Danbury, CT, USA)で混合した(Duty cycle : constant、出力：7、10 min)。ドラフト内でふたを開け保冷材下でシクロヘキサンを揮発させた。W/O エマルションを作製した。レオメーターを用いて W/O と G/O の動的粘弾性の測定を行った。

3.2.3 結果および考察

Fig. 3-2 に動的光散乱法により測定した粒子径分布を示す。界面活性剤の濃度が大きくなるにつれて、粒子径および PDI 指数の小さいナノゲル粒子が得られた。界面活性剤の濃度が高くなると、粒子の周りに配列する界面活性剤が多くなることで小さな粒子が安定して調整されることが考えられた。

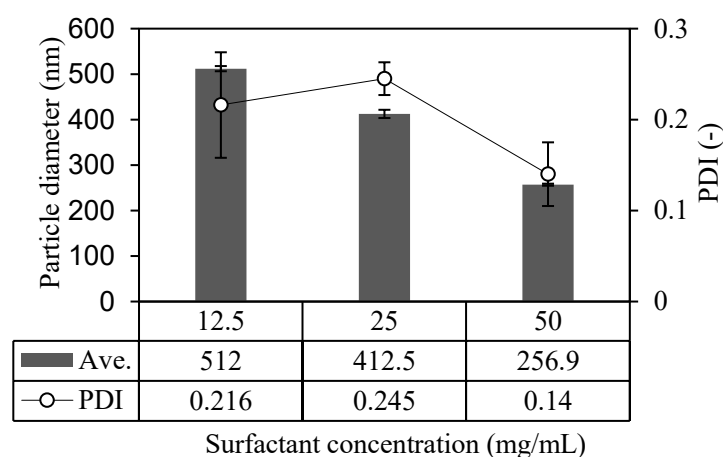


Fig. 3-2 DLS measurement of G/O emulsion by changing surfactant concentration

A: 12.5 mg/mL, B: 25 mg/mL, C: 50 mg/mL.

Fig.3-3 に動的光散乱法により測定した粒子径分布を示す。水相と油相の組成比は、水相：油相 = 1：2.5 の条件において粒子径および PDI 指数の小さいナノゲル粒子が得られた。これは分散相である油相の割合が大きくなることで、連続相である水相が安定して分散でき

るようになったためだと考えられる。

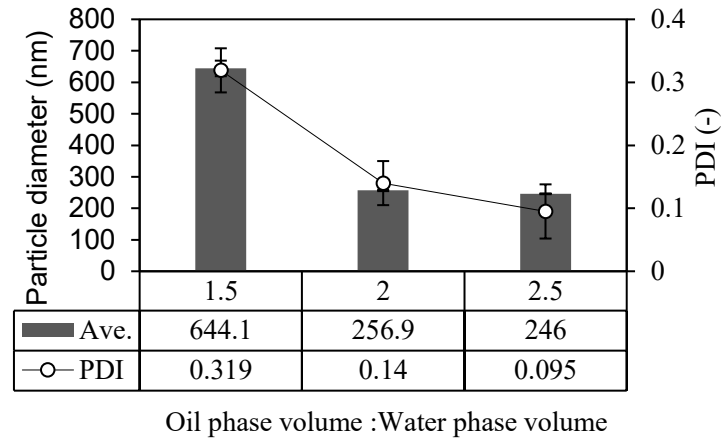


Fig. 3-3 DLS measurement of G/O emulsion by changing ratio of water and oil volume

A: water : oil = 1 : 1.5, B: water : oil = 1 : 2, C: water : oil = 1 : 2.5.

Fig.3-4 に動的光散乱法により測定した粒子径分布を示す。ゼラチン濃度は3%の条件において粒子径および PDI 指数の小さいナノゲル粒子が得られた。これはゲル濃度が高くなると強固なゲルネットワークが形成されるためだと考えられる。

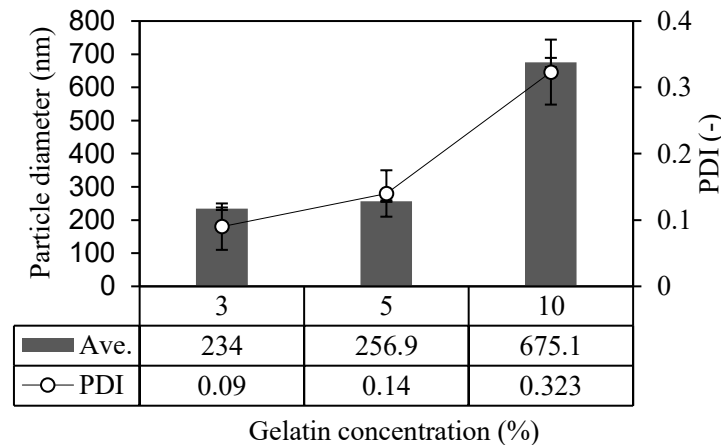


Fig. 3-4 DLS measurement of G/O emulsion by changing gelatin concentration

A: 3w/v%, B: 5w/v%, C: 10w/v%.

粒子調製直後は、すべての条件においてエマルションがゲル化し球状を保っている様子が確認された(**Fig.3-5 A**)。しかし、37℃下で15分静置後、#4の条件で作製した粒子だけが球状を保ったゲル粒子であった(**Fig.3-5 B**)。よって、G/O エマルションの内水相が生体内温度下においてゲル化状態を維持するためには、内水相の EDC、NHS 濃度をそれぞれ

1 mg/mL、0.6 mg/mL 以上で添加する必要があることが確認された。

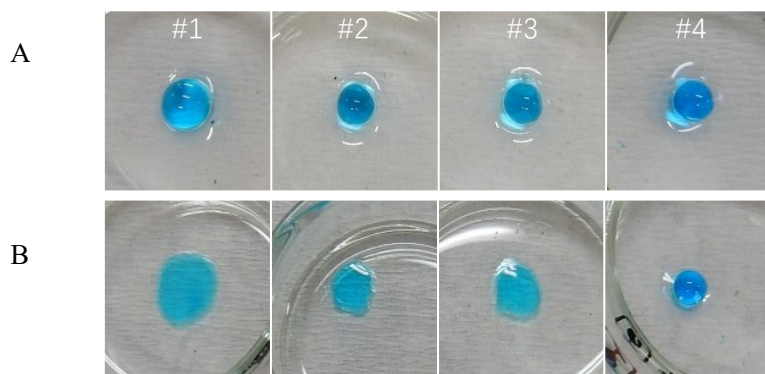


Fig. 3-5 Morphological images. After the preparation A: 0 min, B: 15 min.

応力-ひずみ曲線より、ゼラチンゲルは経時的に硬くなる様子が確認された (**Fig.3-6 A**)。これまで G/O エマルションの架橋時間を 30 分に設定していたが、内水相の架橋は不完全であったことが確認された。最大応力が架橋後 330 分で最も高い値を示したことから (**Fig.3-6B**)、内水相の十分な架橋には約 6 時間以上の時間が必要であることが示唆された。

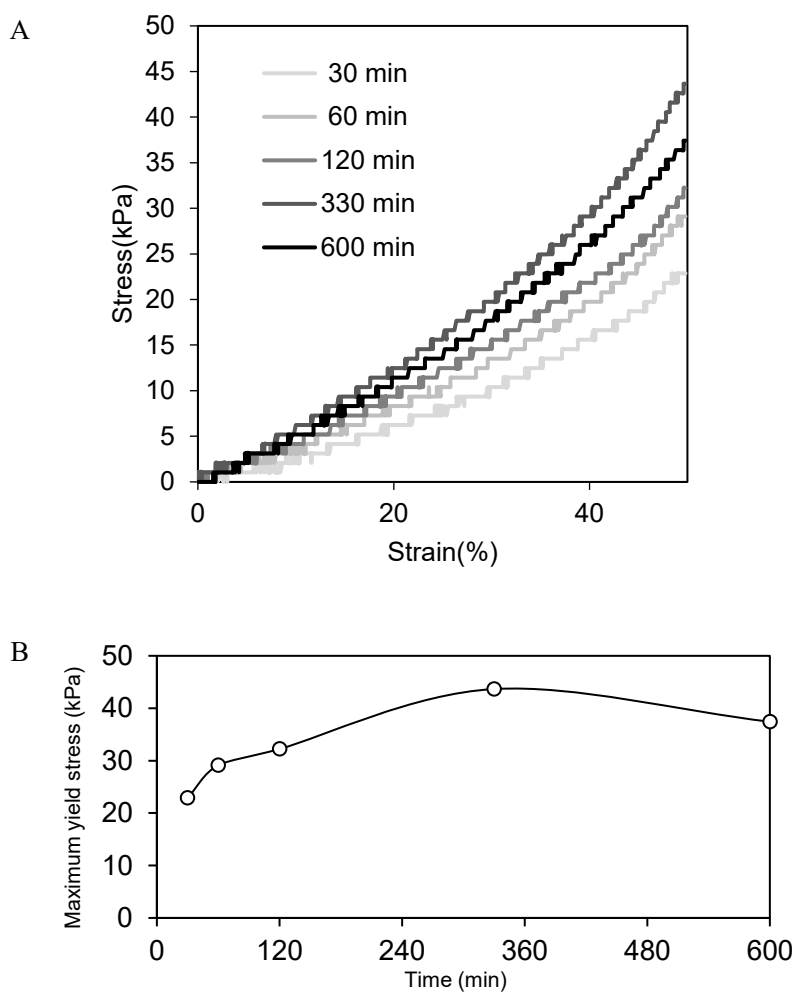


Fig. 3-6 Compression test results. A: Stress-strain curve, B: Maximum yield stress.

エマルションの固さの指標として、フィックの法則に基づく弾性率とニュートンの法則に基づく粘性率を複素的に表現した複素弾性率 $|G'|$ (動的粘弾性) の測定結果を **Fig.3-7** に示す。今回の測定範囲においては、常に G/O の複素弾性率の方が W/O よりも高い値を示した。よって、G/O が W/O よりも相対的に固いことが示され、G/O の内水相ゲル化が示唆された。

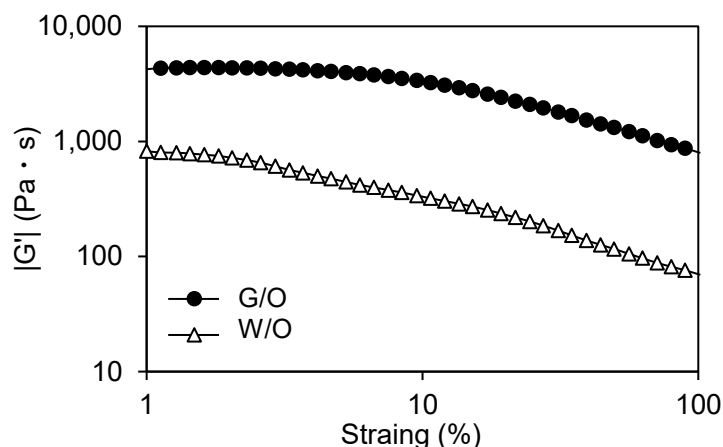


Fig. 3-7 Dynamic viscoelasticity measurement results. Amplitude dependence measurement.

**Strain (g) is 1%, Angular frequency (ω) is 0.1-1000 rad/s, Measurement points is 40 s,
Time unit is (s), Measurement interval is 10 s, interval is 400 s.**

3.2.4 本節のまとめ

以上の結果より、G/O は粒子調整時の諸条件によって粒径制御が可能であり、約 250 nm の大きさで単分散の安定した粒子が調整可能であった。体内での薬物の滞留やマクロファージなどによる異物排除といった観点より、DDS に用いるキャリアは数 10 nm-400 nm 以下に制御することが求められていることから、調製された G/O は DDS のキャリアとして適切かつ皮膚浸透が期待されるサイズであった[147]。調整されたナノゲル粒子は W/O よりも相対的に固く、内水相がゲル化した G/O の開発が示唆された。

3.3 G/O の安定性評価

3.3.1 実験目的

増殖因子の有効的な効果を発現するためには比較的時間を要するため作用対象部位における増殖因子の徐放が望ましい。ここでゲル粒子の分解による徐放性により十分な効果を得るには生体環境下で一定期間粒子形状を維持する必要がある。本節では安定性の指標として粒子径に焦点をあて、作製した G/O を 7 日間 4°C(保存温度)および 37°C(生体内温度)下で静置し経時的に粒子径を測定することで、G/O の安定性評価を試みた。

3.3.2 実験方法

[1]G/O の作製

疎水性界面活性剤 ER-290 (Mitsubishi-Chemical Foods Co., Tokyo, Japan)を IPM (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan)に 50 mg/ml で溶解させた。50 mM MES buffer にヘパリン(Wako)、EDC (Peptide Institute Inc., Osaka, Japan)、NHS (Wako)を質量比でそれぞれ 10 : 10 : 6 となるように添加し、ヘパリン濃度が 10 mg/mL のヘパリン/EDC/NHS 溶液を作製後、30 分間室温で静置した。ゼラチン (porcine-skin-derived gelatin Type A, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)終濃度が 5%の PBS 溶液を調製した。ゼラチン溶液 900 μ L とヘパリン/EDC/NHS 溶液 100 μ L を混合した。油相と水相を体積比 2:1 で混合した。超音波ホモジナイザー(Sonifier 250, Branson Ultrasonics Co., Danbury, CT, USA)を用いて 3 分間処理した (Duty cycle : 70%, Output control : 7, 30 秒インターバル)、4°C下で 30 分間冷却して G/O を調製した。G/O 5 μ L (約 3 mg)を IPM3 mL に分散させた。DLS 測定を行った。

[2]安定性評価

3.3.2 の[1]作製したのサンプルを 4°Cおよび 37°C下でそれぞれ保存し、経時的に DLS 測定を行った。

3.3.3 結果および考察

作製した G/O は 120 nm の大きさと単分散の安定した粒子が調整可能であった(**Fig.3-8**)。体内での薬物の滞留やマクロファージなどによる異物排除といった観点より、DDS に用いるキャリアは数 10 nm-400 nm 以下に制御することが求められていることから、調製された G/O は DDS のキャリアとして適切かつ皮膚浸透が期待されるサイズであった[2]。

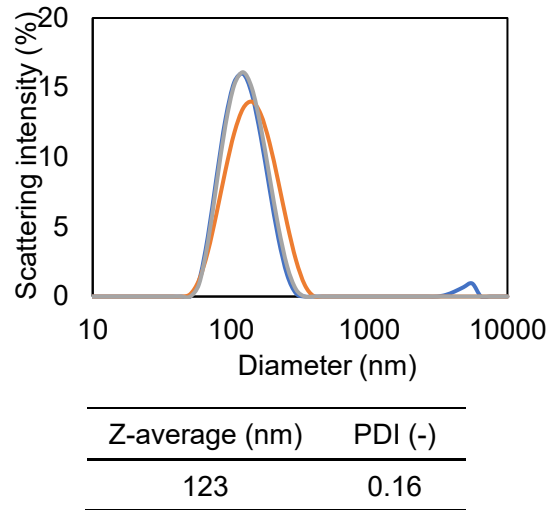


Fig. 3-8 Particle size distribution.

Fig. 3-9 に 4℃および 37℃下における G/O の粒子径分布の変化を示す。粒子径に関しては 7 日間ではほぼ変化はなく 120 nm 前後と経皮投与に応用可能なサイズを保っていた。また PDI に関しては、4℃下においては 0.1(PDI < 0.1 で単分散)に近い値を 7 日間示しており、一方 37℃下においては 7 日目で PDI が 0.2 近くまで上がっていた。これは温度が高くなると粒子の熱運動が活発になり粒子同士の衝突頻度が多くなることで粒子が合一しやすくなったことが原因と考えられる。しかしながら、一般的に PDI は 0.3 以下であれば単分散に良好な分散であると言え、G/O は生体内温度の 37℃下においてもその粒子形状を維持することが可能であることが示された[148]。

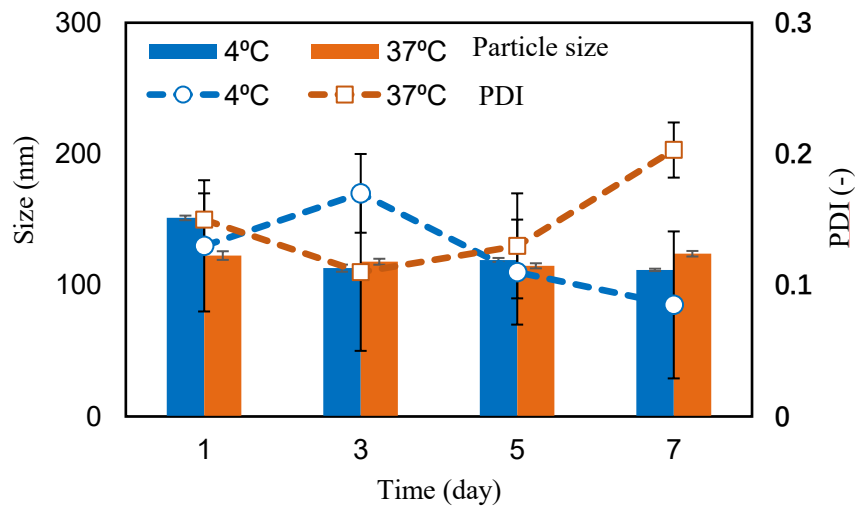


Fig. 3-9 Stability study of G/O at 4 °C and 37 °C.
Bars represent standard deviation, n=3.

3.3.4 本節のまとめ

経皮投与に利用可能な粒子を単分散で作製可能である。また、G/O の長期保存が期待された。

3.4 G/O の皮膚浸透性評価

G/O のゼラチン粒子は疎水性界面活性剤により油中に分散しているため、角質層の疎水性バリアの透過が容易であり皮膚への浸透性が向上している。過去の検証において G/O の高い皮膚浸透性は確認されていたものの、当時の G/O 内水相の組成が現在の最適化された組成とは異なっていた。そこで本検討では現在の G/O 内水相の組成においても高い皮膚浸透性が示されるか検証した。方法としてはフルオロセインを含有した G/O を摘出したマウス背部皮膚の表皮側から添加し、所定の時間静置後皮膚断面の蛍光観察を行うことで皮膚への浸透を確認した。

3.4.1 実験方法

[1]フルオレセイン-G/O の作製

疎水性界面活性剤 ER-290 125 mg を IPM 2.5 mL に溶解させた。50 mM MES buffer にヘパリン、EDC、NHS を質量比でそれぞれ 10 : 10 : 6 となるように添加し(ボルテックス)、ヘパリン濃度が 10 mg/mL のヘパリン/EDC/NHS 溶液を作製後、30 分間室温で静置した。クリーンルームで遠沈管にゼラチンを入れて外の天秤で重さを計り、終濃度が 5% になるように、ゼラチン 50 mg に対して PBS を 895 μ L の割合で入れた。100 mg/mL フルオレセイン溶液 5 μ L とヘパリン溶液 100 μ L およびゼラチン溶液 895 μ L を混合した。超音波ホモジナイザー(Sonifier 250, Branson Ultrasonics Co., Danbury, CT, USA) を用いて 3 分間処理した(Duty cycle : constant、出力 : 7、30 秒インターバル)。

[2] G/O の皮膚浸透性評価

マウスの背中毛を剃刀で軽く剃った後、除毛剤を用いて残りの毛をきれいに除去した。はさみでマウスの背中皮膚を切り取った。はさみで皮膚を 2 cm 角程度に切り、拡散セルに挟んだ。拡散セルを 6-well plate に入れ、PBS を皮膚下面が接する程度まで加えた。サンプル添加口に作製したフルオレセイン含有 G/O を 200 μ L 添加した。インキュベーターに入れて 1 日間静置することで透過試験を行った。皮膚を回収し、プロワイプで軽く表面をふき取った。皮膚を小さくカットし、OCT コンパウンドに包埋した。 -80°C で凍結した。ミクロトームで 20 mm の組織片を作製した。スライドガラスに皮膚切片を吸着させ、位相差観察と蛍光観察を行った。

3.4.2 結果および考察

Fig.3-10 にフルオレセインを溶解した PBS(F-PBS)とフルオレセインを含有した G/O(F-G/O)をマウス背部皮膚に添加した後、所定の時間における断面の位相差および蛍光写真を示す。添加後 5 分および 1 時間において F-PBS 添加条件では皮膚内部に蛍光は確認されなかったが、F-G/O 添加条件では皮膚表面から 13 mm の深さまで蛍光が確認された。マウスの表皮厚さは 13 mm でありそのうち疎水性バリアを有する角質層は 5 mm とされ、親水性成分であるフルオロセインが角質層を透過していることが示された。本検討ではフルオレセインが G/O のゼラチン粒子内部に保持された状態で皮膚の親水性領域に存在しているのか、界面活性剤である IPM の親水基に結合したフルオレセインが粒子外でミセルを形成し

角質層を透過し親水部に放出されたのか確認できていない。今後の検討では蛍光物質と粒子を結合させることで粒子自体の皮膚添加後の動態を確認する必要がある。

添加後 24 時間では F-PBS、F-G/O 添加条件ともに皮下に蛍光が確認された。フルオレセインは低分子であるため親水性溶媒中でも皮膚にある程度浸透する可能性があり、F-PBS 添加条件においても蛍光が確認されたことが考えられる。しかしながら、皮膚中の蛍光輝度は F-G/O の方が強くより多くのフルオレセインが送達されていることが確認され、G/O の親水性薬物に対する皮膚吸収促進効果が示された。

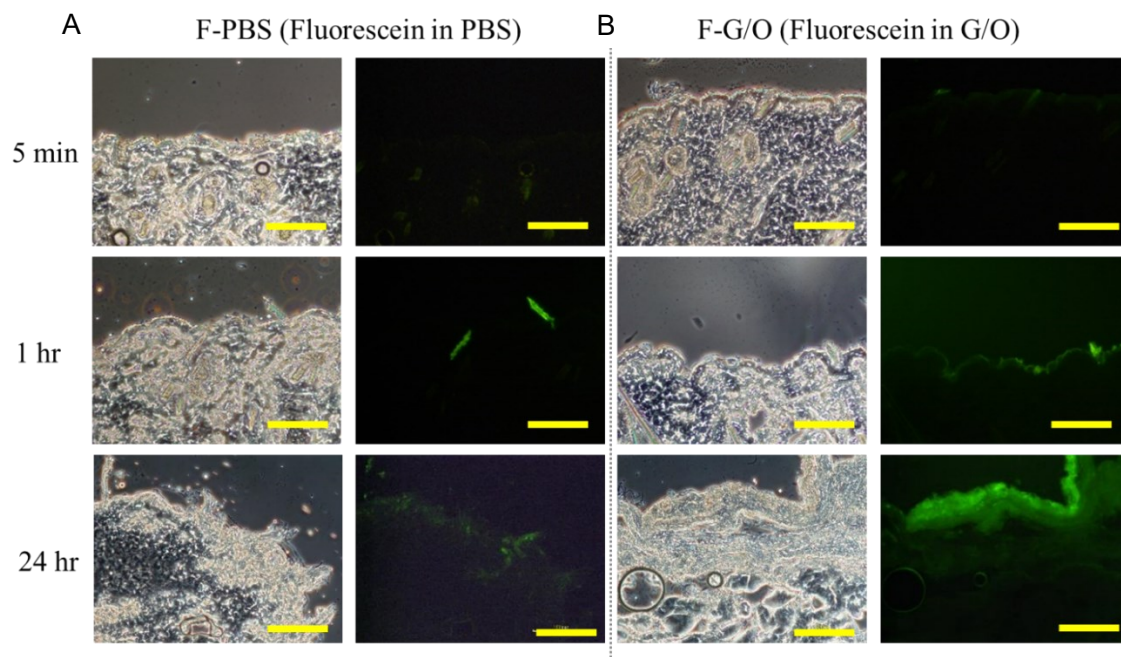


Fig. 3-10 *In vitro* permeability of gel-in-oil (G/O) emulsion through the skin. **A:** Permeability of enhanced green fluorescent -aqueous solution. **B:** permeability of fluorescent-G/O emulsion. Scale bar: 100 mm. Bars: 100 mm, exposure time 5 min · 1 h: 1/10 s, 24 h: 1/100 s

3.4.3 本節のまとめ

G/O は高い皮膚浸透性を示し親水性成分の経皮送達が可能であった。

3.5 考察

本章では、G/O エマルションを開発する試みを行なった。まず、エマルション調製中にさまざまな条件を変更して G/O エマルションの粒子サイズ分布を測定した。粒子直径が減少すると、粒子の比表面積が増加し、粒子を囲むために必要な界面活性剤が増加する。したがって、界面活性剤濃度が増加すると、粒子サイズと PDI が減少する。一般的に、内部水相の粘度が低いほど、形成される粒子は小さくなる。したがって、水相ゼラチン濃度が低く粘度が低い条件下では、小さくて安定した粒子が得られると考えられた。G/O の粒子サイズは、界面活性剤濃度、水相と油相の体積比、ゼラチン濃度などのさまざまな条件を変更すること

で制御できた。さらに、直径が 250 nm 以下の均一に分散した安定した粒子を調製することが可能だった。DDS に使用されるキャリアは、体内での薬物の保持とマクロファージなどの異物の排除の観点から、数十 nm から 400 nm 未満に制御されなければならない[149]。したがって、調製した G/O は DDS のキャリアとして適しており、皮膚を貫通することが期待されるサイズを持っている。

次に、マウスの皮膚を使用して green fluorescent を含む G/O(F-G/O)の皮膚透過研究を行いました。**Fig.3-10** に示すように、F-G/O エマルションは皮膚表面を透過し、経皮的に投与することができた。蛍光イメージから推定すると、蛍光は皮膚の約 150-190 μm の深さまで確認された。マウスの背中の皮膚の表皮層は約 13 μm である[150]。したがって、G/O は真皮層に到達した可能性が示唆された。この研究で使用されたマウスの皮膚は、透過性と調整毒理学研究で一般的に使用され、人間の皮膚と似た構造を持っているが、厚さは人間の皮膚の約半分である[151]。将来的には、このテストを人間の皮膚と似た豚皮を使用して実施する必要がある。

さらに、ゼラチンゾルを化学的に架橋することで、粒子は体温下でもゲル状態を維持し、ゲルの生物分解に伴い包含物が徐々に体内に放出されると考えられる。現在、増殖因子の持続的な放出は示されていないが、物理化学的な相互作用によりコラーゲンに固定された増殖因子はゼラチンの架橋濃度に応じてその放出を制御できることが示された。内水相の化学的な架橋によって調製された G/O についても同様の制御が可能であると期待される。

3.6 本章のまとめ

この研究で得られた結果から、調整されたナノゲル粒子は W/O よりも相対的に固く、内水相がゲル化した G/O エマルションの開発が示唆された。ゼラチンを油中にナノサイズで分散させた G/O の作製が可能であり、その粒子径は約 120 nm で高い粒子安定性を有することから DDS キャリアとしての応用が可能であることが期待された。また、粒子表面が疎水性界面活性剤で被覆され油中に分散していることから親水性薬物の皮膚浸透性を向上することができ、経皮送達基材として有望なキャリアであることが期待された。

第4章 bFGF 固定化 G/O エマルションの経皮送達による血管新生誘導技術

4.1 本章の目的および概要

増殖因子は、細胞の増殖、組織再生、傷の治癒プロセスの調節において重要なタンパク質の一群である。伝統的な増殖因子の投与方法には、経口、注射などがある。しかし、安定性が低い、分解しやすいなど、さまざまな問題が存在する[7]。これらの課題に対し、当研究室の既往研究では、ヘパリン導入ゼラチン(Heparin-Gelatin)が開発され、増殖因子の固定化、活性の維持と徐放性付与が確認された。これにより、増殖因子が体内で迅速に失活するのを防ぎ、組織中での作用可能時間を延長する。

第3章では、Heparin-gelatin を油中に分散させ、ナノサイズの G/O を開発した。G/O の粒子表面は疎水性の界面活性剤で被覆され、油中に分散されているため疎水性の皮膚角質層を突破できる。さらに、Heparin-gelatin を使用して増殖因子を固定化し、活性を維持し、ゲルの分解による徐放性を持たせる[88]。したがって、本研究ではモデルケースとして *in vivo* における bFGF 固定化 G/O による皮下の血管新生効果の評価を行い、G/O による増殖因子の経皮送達の有効性を評価する(Fig. 4-1)。

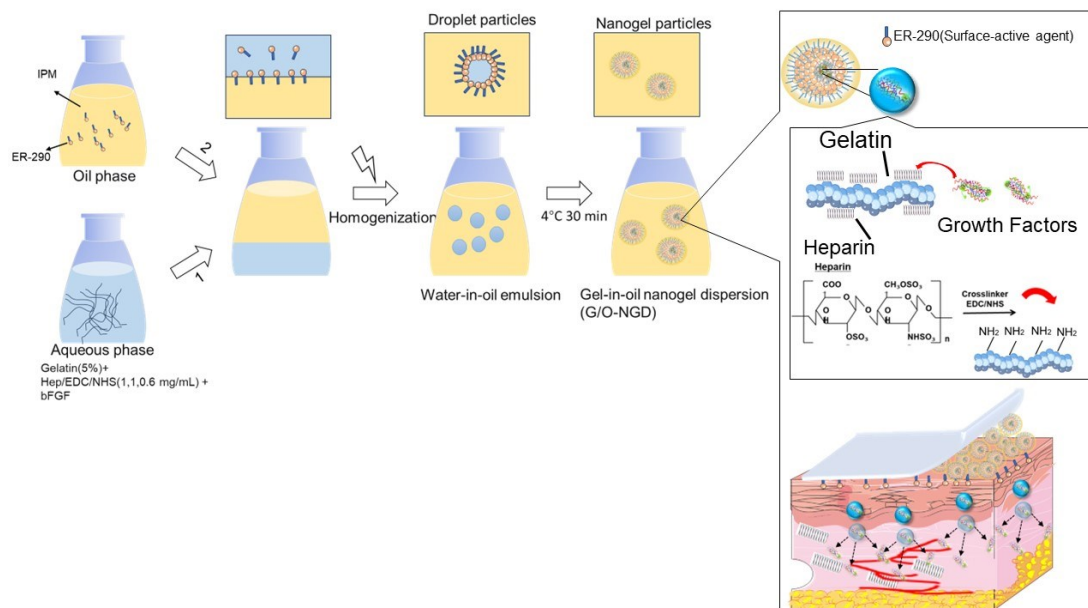


Fig. 4-1 The synthesis of G/O and it's mechanism to induce angiogenesis.

4.2 増殖因子 bFGF の添加量に伴う血管新生誘導効果実験

4.2.1 実験目的

増殖因子との高い親和性を有するヘパリン導入ゼラチンゲルを油中にナノ分散させた G/O という新たな経皮送達システムを開発した。G/O は増殖因子を固定化した Heparin 導入 gelatin が油中に分散したナノエマルションであり、皮膚に塗布することで低侵襲な皮下血管新生を可能である。G/O の有効性評価について評価する。また、bFGF の異なる添加量により、血管新生誘導の効果を検討する。低侵襲で効果的な皮下血管新生誘導が可能であるかを検証する。bFGF の異なる添加量が G/O を介した血管新生に及ぼす効果を定量的に評価し、最適な添加量を検討する。

4.2.2 実験方法

[1]bFGF 固定化 G/O の作製

IPM(ミリスチン酸イソプロピル(Fujifilm Wako Pure Chemical Co.))に ER-290(ショ糖エルカ酸エステル(Mitsubishi Chemical Foods Co.))を 50 mg/mL となるように溶解させて、室温で振動させて油相を形成した。50 mM MES buffer (2-morpholinoethanesulfonic acid monohydrate buffer (pH 5.6;Dojindo Laboratory)) に ヘパリン (WAKO), EDC(Peptide Institute Inc.), NHS(WAKO)を質量比でそれぞれ 10 : 10 : 6 となるように添加し(ボルテックス)、ヘパリン濃度が 10 mg/ml のヘパリン/EDC/NHS 溶液を作製後、30 分間冷蔵庫内で静置した。PBS[-]1.8 ml にゼラチン粉(porcine-skin-derived gelatin type A, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)0.105 g をインキュベーター内で溶解させた(架橋剤を加えたときにゼラチンが終濃度 5%となるようにする)。超音波処理する直前に、ゼラチン溶液にヘパリン/EDC/NHS 溶液を 200 μ l 添加後十分にピペッティングを行なった。超音波処理の直前に bFGF(#3: 0.1、#4: 1、#5: 10 ng/mL) (R&D Systems) 10 μ L を **Table 4-1** の条件で水相に添加し十分にピペッティングを行った。油相 2000 μ L と水相 1000 μ L を混合した(水相 : 油相 = 1 : 2)。超音波ホモジナイザー(Sonifier 250, Branson Ultrasonics Co., Danbury, CT, USA)を用いて 3 分間処理した(Duty cycle: 70%, Output control: 7, インターバル : 30 秒間)。4°C下で冷却し、G/O を調製した。前の研究で得られたように、モノディスパース(PDI<0.3)であり、平均粒子径は < 250 nm であった[152]。

Table 4-1 Conditions for mouse application

#1	No treatment
#2	G/O(Heparin(-))
#3	G/O(Heparin(+))
#4	*0.1 μ g bFGF G/O
#5	*1 μ g bFGF G/O
#6	*10 μ g bFGF G/O

※ 2 回のテープ張替えでの総送達量

[2]血管新生マウスの作製

調製した bFGF G/O をサンプルチューブに当量ずつ分け、5000 rpm で 7 分間遠心分離した後、上澄み液を吸引除去した。イソフルランで 4 週齢ヘアレスマウス(Hos : HR-1, SLC Inc. Japan)に麻酔をかけた。2.0×3.0 cm²に切った滅菌済みガーゼを医療用サージカルテープの中央に固定し、抗菌剤(フェニバックス、5 mg/mL ((Finibax for Intravenous Drip Infusion 0.5 g, Shionogi & Co. Ltd.))を含んだ滅菌水約 250 μ L を染み込ませ、作製した G/O をガーゼに塗布した。マウスの背中にサージカルテープを巻き、その上から粘着性布伸縮包帯で巻き付けた。3 日後に塗布の作業を繰り返した。一週間後に、背中の皮膚をハサミで摘出(2 cm×2.5 cm)した。摘出した皮膚裏側の写真を撮り、溶血剤(0.9% NH₄Cl) 1 mL 中で皮膚を細かく切り刻んだ。4℃下で一晩溶血させた。皮膚と溶血剤を遠心分離(3500 rpm, 30 min)し、上澄み液の吸光度(415 nm)を分光光度計を用いて測定した。1 週間後、マウスの背中の皮膚全体の血管新生を定量的に分析した。

4.2.3 結果および考察

Fig. 4-2 に皮膚裏側切片の写真を示す。No treatment、G/O(Heparin(-))の条件に対して、Heparin 含有 G/O の全条件はにおいて、既存の血管から伸びるようにより多くの血管が枝分かれし新たな血管網が形成されているまた主要な血管が太くなっている様子が見られた。**Fig.4-3** に単位重量当たりヘモグロビン量のグラから、No treatment と G/O(Heparin(-))の条件比較して、ヘモグロビンがあまり変わらない、G/O(Heparin(-))と G/O(Heparin(+))の条件と比較して G/O(Heparin(+))の条件がヘモグロビン高いことから、Heparin 固定化基材が体内に増殖因子を捕まえることから内因性増殖因子が誘導されたことが考えておる。一方、0、0.1 μ g、1 μ g、10 μ g の bFGF 固定化 G/O の外因性増殖因子投与する条件を比べると、ヘモグロビンの値の差が見られなかった。皮膚に元々あった血管に対して新生の血管が小さいので、血管新生を誘導されたがヘモグロビン総量はあまり変わらなかったものと考えられる。

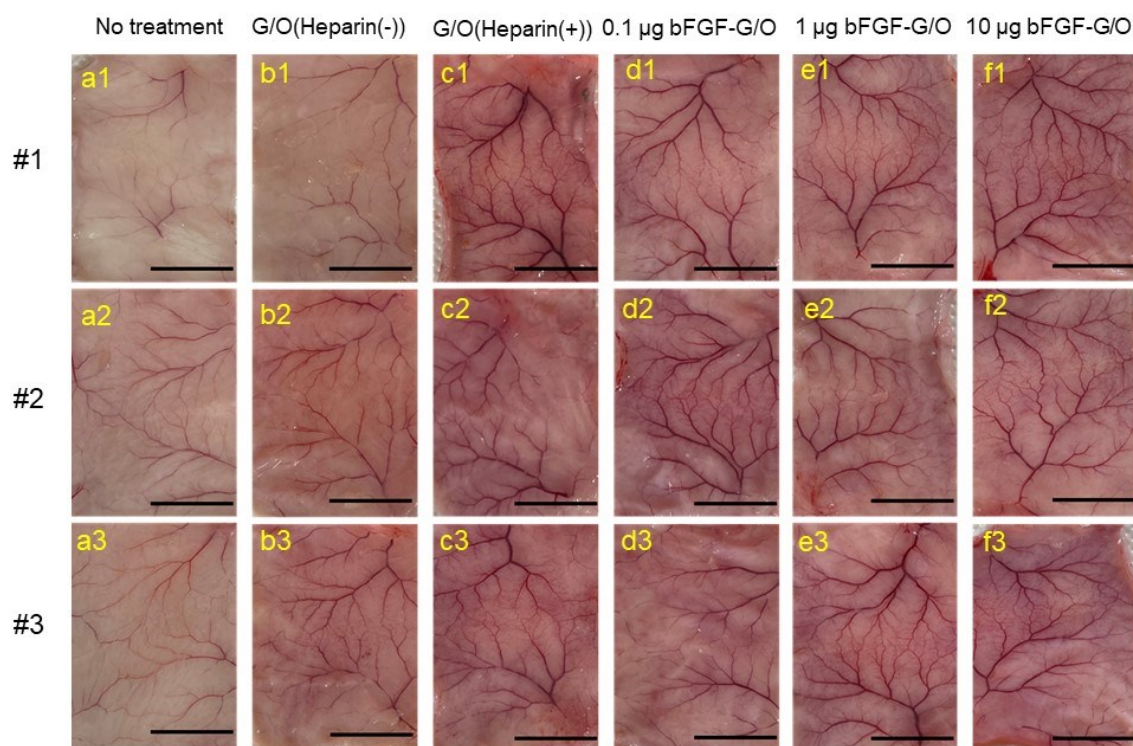


Fig. 4-2 Vascular network formed in the mice's back skin. Scale bar =1 cm.

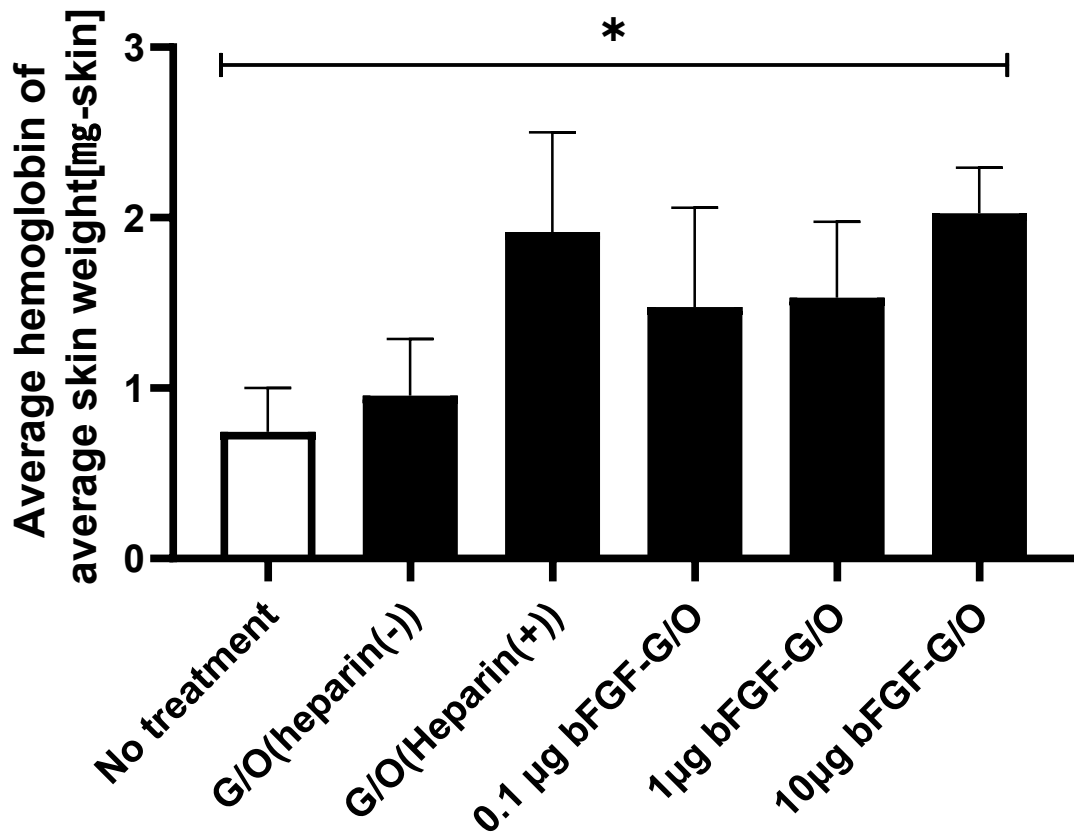


Fig. 4-3 Measurement of hemoglobin per unit of skin mass. Bars represent standard deviation, $n = 3$, $*p < 0.05$.

4.2.4 本節のまとめ

bFGF 固定化 G/O を皮膚に塗布することにより、Heparin を含む条件では内因性増殖因子による血管新生誘導が確認された。しかし、外因性増殖因子である bFGF 固定化 G/O の条件では、新生の血管が小さく、ヘモグロビン総量には大きな変化が見られなかった。これにより、Heparin の存在が内因性増殖因子による血管新生に寄与している可能性が示唆された。

この結果は、外因性増殖因子の投与が期待されたほどの効果を示さなかったことから、内因性増殖因子の誘導がより有効である可能性が示唆された。また、Heparin の存在が内因性増殖因子の捕捉と誘導に寄与していることが示唆された。

これらの観察結果から、外因性および内因性増殖因子を組み合わせたアプローチが、血管新生の最適な誘導を実現する可能性があることが示唆された。

4.3 増殖因子 bFGF の添加量に伴う血管新生誘導効果の定量評価

4.3.1 実験目的

bFGF 固定化 G/O 生成された血管に対する異なる量の bFGF の影響を定量的に評価した。新生の微小血管は肉眼で観察するのが難しいため、異なる指標を用いて血管新生を定量的に分析した。

4.3.2 実験方法

[1]血管の総面積

Fig. 4-4 のように写真を二値化(8 bit)にし、Image J「Analyze Particles」で、黒い部分の面積を測定した、ただ例えば皮膚のふち反射など、血管以外の部分も黒くなってしまう場合もあるので血管以外の黒い面積を測定して総面積から引くことで血管面積を計算した。

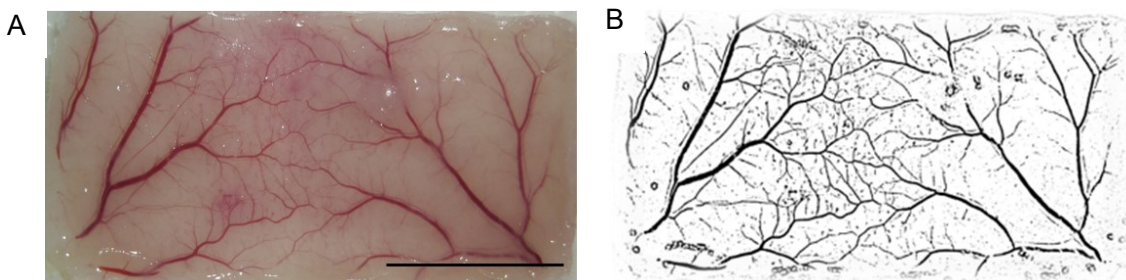


Fig. 4-4 A: Bright field image of the subcutaneous vascular network. B: 8 bit to the binary conversion of the vascular image on A. Scale bar: 1 cm.

[2]血管の枝分かれ数

血管の枝分かれ数の定量的な解析プロセスでは、「ノード」と「エンドポイント」が定義された。**Fig.4-5** に示す通り、ノードは、血管の中心線上で 2 本の線が交差するポイントである。エンドポイントは、血管に沿って最後のポイントと定義した。ノードの数を数えることにより、血管の枝の数を得ることができる。

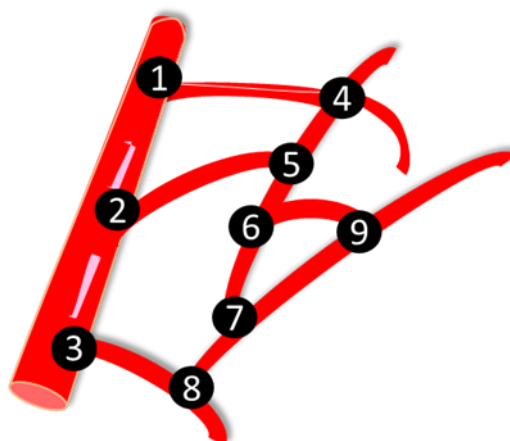


Fig. 4-5 Diagram of the branch of a blood vessel.

[3]血管の体積、長さおよび血管半径の分布

一般的に、血管の腔内面積は円形と考えられており、血管の中心線に垂直な2つの点の接続長さが血管の断面直径とみなされる。血管の直径分布が均一でないため、血管の一部のセクションでいくつかの直径を取り、これらのセクションの平均直径と長さで血管の体積を計算した。

Fig. 4-6は、ノード1からノード2までの血管の体積をどのように計算したかの例を示す。いくつかの直径(d_1 、 d_2 、 d_3)を取り、平均直径 $D_{12} = ((d_1 + d_2 + d_3)/3)$ を求めた。次に、血管の長さ (L_1) および血管の体積 ($V_{12} = (\pi D_{12}^2) * L_1 / 8$) を測定した。血管の合計体積は、各セグメントの体積を合算して得られ、合計長さはすべての長さを合算して得られる。最終的に、直径の間隔分布は平均直径を合算することで得られる。

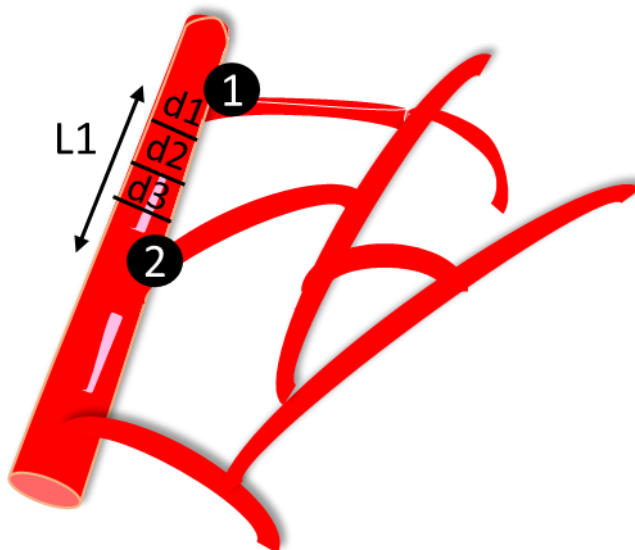


Fig. 4-6 Diagram of the vessel volume, perimeter, and vessel radius distribution.

4.3.3 結果および考察

血管面積の定量化の結果、No treatment と G/O(Heparin(-))では同じレベルが示された(Fig. 4-7)。G/O(Heparin(+))および bFGF-G/O(Heparin(+))グループの両方で、総血管面積が有意に増加したことが示唆された。しかし、bFGF 濃度の増加とともに血管領域は有意に増加しなかった。

Fig. 4-8 に血管の枝分かれ数の指標に関しては、No treatment と G/O(Heparin(-))の条件では、枝分かれ数量に違いは見られなかった。一方、G/O(Heparin(+))および bFGF 固定化 G/O グループでは、総血管枝の数が有意に増加した(* $p < 0.05$)。これは、ヘパリンが血管の誘導効果を示している。さらに、bFGF の添加量を増やすとともに値が大きくなる傾向が得られた。

Fig. 4-9 は、塗布部位での総血管体積、長さおよび血管半径分布の結果を示す。No treatment と G/O(Heparin(-))を比較することで、G/O(Heparin(-))の総血管体積が増加したことが観察された(Fig. 4-9 A)。同様に、G/O(Heparin(-))と G/O(Heparin(+))を比較した場合も、ヘパリンが血管体積の増加を促進することを示した。また、bFGF がある場合、血管体積も増加したが、低い bFGF 濃度(0.1 μg)を追加した場合は差は少なかったことが示唆された。しかし、1 μg の bFGF で治療後の総血管体積は、No treatment と G/O と比較して有意に高かった。ただし、高濃度の bFGF(10 μg)を使用した場合、1 μg の bFGF G/O と比較して総血管体積はさらに増加しなかった。

G/O の塗布部位における総血管長は Fig. 4-9 B に示される。No treatment と G/O(Heparin(-))には総血管長に差異はなかった。しかし G/O(Heparin(+))は総血管長を増加させ、ヘパリンが血管新生と血管の伸長を促進することを示唆している。血管の総長さが bFGF 濃度に従って増加し、投与した bFGF が皮下に効率的に送達されたこと、そして、皮下の血管新生と血管の伸長を効果的に誘導したことを示している。全体的に、ヘパリンは血管新生を促進し、G/O(Heparin(+))は bFGF などの生体高分子を皮下に効率的に運ぶことができることが結論づけられる。増殖因子の外因性投与は、皮下の血管新生を大きく誘導する。

Fig. 4-9 C に示されているように、血管の平均直径分布を定量化する結果を示唆された。すべての血管直径サイズ範囲において、No treatment と G/O(Heparin(-))の直径分布は大きな変動がなく一貫しており、G/O(Heparin(-))が血管誘導とサイズ変化に有意な影響を与えていないことが示唆された。No treatment の血管の直径は、< 0.012 cm の範囲にあるが。G/O(Heparin(+))または 0.1 μg bFGF-G/O の場合はより高い(> 0.012 cm)ことが示唆された。したがって、G/O(Heparin(+))および低濃度の bFGF (0.1 μg)は、元の血管の直径を初期に太くすることを示唆された。すべての血管直径範囲内の血管の総数は、< 0.012 cm の範囲ではより多かった。しかし、最も多くの血管は 1 μg bFGF-G/O の条件の下で見られた。

10 μg bFGF-G/O の血管の直径も高かったが、より小さな血管の数は 1 μg bFGF-G/O の場合ほど多くなかった。これらの結果から、1 μg bFGF-G/O の条件は元々の血管の太さの増加とともに多血管新生を誘導できることが示唆された。

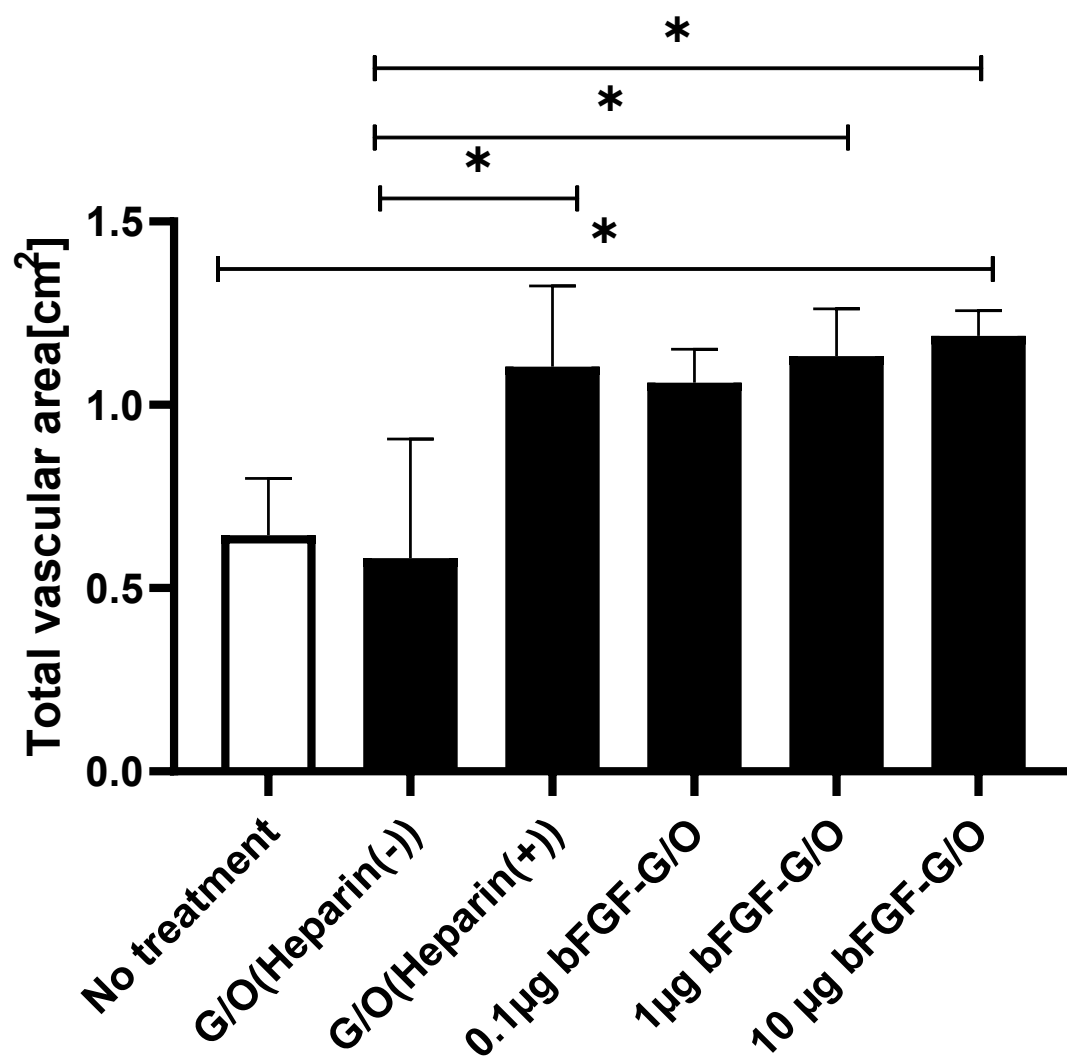


Fig. 4-7 Total vascular area. Bars represent the mean area value plus standard deviation, $n=3$,
* $p < 0.05$.

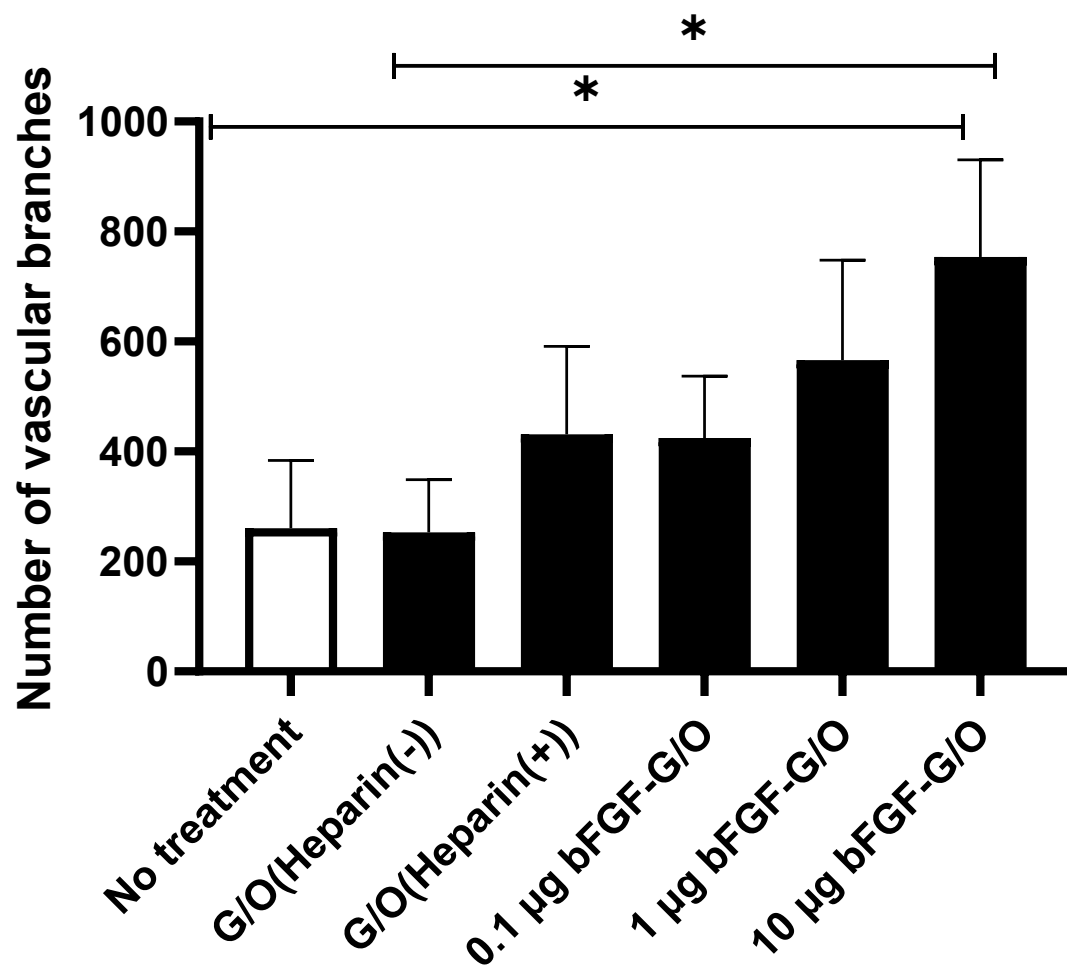


Fig. 4-8 Number of vascular branches. Bars represent the mean value plus standard deviation.
n= 3, * $p < 0.05$.

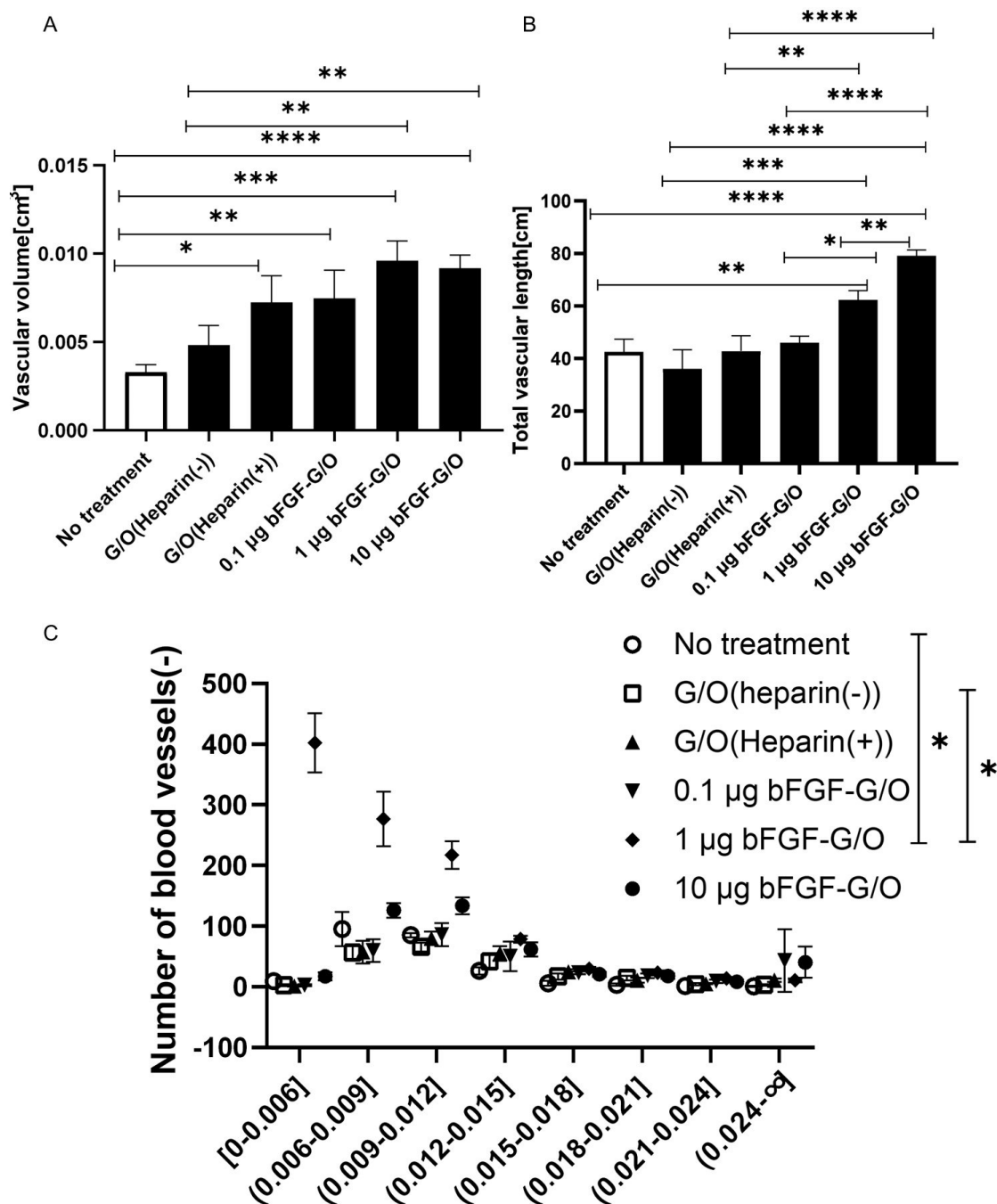


Fig. 4-9 Total vascular area at the site of G/O nanogel application. A: Bars graph showing the vascular volume in the different experimental conditions. B: Total blood vessel length in cm in the different groups. C: Mean diameter distribution of blood vessels formed in the different treatment groups. Data are presented as the mean plus or +/- the standard deviation. $n = 3$, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$.

4.3.4 本節のまとめ

本節では、血管画像解析を行なった。血管画像解析の結果、No treatment と G/O(Heparin(-)) の条件では、全体的な指標において違いは見られなかった。しかし、G/O(Heparin(+))の条件では血管新生が増加し、ヘパリンがその促進に寄与している可能性が示唆された。外因性増殖因子としての bFGF 固定化 G/O の投与においては、新生の血管は小さく、ヘモグロビン総量に大きな変化は見られなかった。この結果から、外因性増殖因子の投与が期待されたほどの効果を示さなかったことが分かり、内因性増殖因子の誘導がより有効である可能性が示唆された。また、Heparin の存在が内因性増殖因子の捕捉と誘導に寄与していることが重要であることが示唆された。したがって、これらの観察結果から、外因性および内因性増殖因子を組み合わせたアプローチが、血管新生の最適な誘導を実現する可能性があることが示唆された。

4.4 bFGF の添加量に伴う血管新生誘導効果実験(1 週間と 2 週間評価における比較)

4.4.1 実験目的

1 週間と 2 週間の間に異なる量の bFGF G/O を投与することが皮下血管生成に与える影響を検討する。bFGF G/O を投与することで、時間依存的な影響を評価し、投与の持続可能性を検討する。

4.4.2 実験方法

[1]bFGF 固定化 G/O の作製

4.2.2 の[1]と同様の方法。

Table 4-2 Conditions for mouse application

#1	No treatment
#2	G/O(Heparin(-))
#3	G/O(Heparin(+))
#4	*0.1 µg bFGF G/O
#5	*1 µg bFGF G/O
#6	*10 µg bFGF G/O

※ 一週間のテープ張替えでの総送達量

[2]血管新生マウスの作製

4.2.2 の[2]と同様の方法。

1 週間と 2 週間後、マウスの背中の皮膚全体の血管新生を定量的に分析した。

[3]血管の定量評価

4.3.2 の実験方法と同様である。

[4]免疫組織化学(IHC)

マウス背中皮膚を 10%ホルマリン緩衝液(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)中に浸して固定した。その後、H&E 染色(hematoxylin and eosin stain)、MT 染色(マッソントリクローム染色)、CD31(Abcam)染色を行なった。H&E 染色では、皮膚組織の構造と形態を観察する。MT 染色は、コラーゲン繊維や筋線維などの結合組織成分を染色し、組織の線維化の程度を評価する。CD31 染色は血管内皮細胞を標識するために行われ、血管形成や血管密度の研究に用いられる。

4.4.3 結果および考察

Fig. 4-10 では、G/O の投与後の Day 7 と Day 14 における異なる血管指標の評価結果が示された。血管面積の結果(**Fig. 4-10 A**)に基づいて、1 週間および 2 週間の実験の両方で一貫した傾向が観察された。No treatment と G/O(Heparin(-))の条件では違いが見られなかった。bFGF-G/O 治療条件の下では、no tret と比較して、血管面積が増加だった。ただし、bFGF 投与量の増加に伴い、血管面積には有意な変化は観察されなかった。血管枝分かれ数の結果(**Fig. 4-10 B**)から、G/O(Heparin(-))の枝分けは No treatment と一貫しており G/O(Heparin(+))の枝分け数は増加していることが観察された。1 週間の結果では、bFGF 投与量が増加するにつれて血管枝分けが増加した。しかし、2 週間の結果では、10 μ g bFGF が 1 μ g bFGF と比較して血管枝分けの能力が高いとは観察されなかった。血管長さの結果(**Fig. 4-10 C**)に基づいて、bFGF 投与量の増加に伴い、血管の長さが増加している。ただし、1 週間と 2 週間の結果の間には有意な差はなかった。

血管直径分布の結果(**Fig. 4-11**)に基づいて、Day 7 の結果(**Fig. 4-11 A**)に従って、bFGF-G/O 条件下で全ての血管直径範囲内で血管数が増加したことが観察された。同じ bFGF 投与条件では、より大きな血管直径範囲内で血管数が増加した(**Fig. 4-11 B**)。bFGF の投与量が増加すると、血管数も増加する。1 μ g bFGF-G/O および 10 μ g bFGF-G/O の条件下で、血管直径の増加が観察された。

全体の指標において、No treatment と G/O(Heparin(-))の条件では違いが見られなかったため、G/O(Heparin(-))には効果がないことが確認された。一方、G/O(Heparin(-))の条件よりも G/O(Heparin(+))の条件では血管新生がより多く見られたことから、Heparin 固定化基材が体内の増殖因子を捕らえることで内因性増殖因子が誘導された可能性が示唆された。また、0、0.1 μ g、1 μ g、10 μ g の bFGF を投与した G/O の条件を比較すると、枝分かれ数、長さ、体積の指標(**Fig. 4-8 B C D**)から bFGF の添加量を増やすとともに値が大きくなる傾向が得られた。しかし 10 μ g bFGF-G/O の条件は 1 μ g に比べて顕著に高い血管新生能力を示さなかった。この原因として、10 μ g の bFGF の投与量が血管新生の定常状態に達するためと考えられる。Day 14 後の結果では、Day 7 の結果と比較して、全条件で体積が明らかに増加していることが観察された。以上の結果から、G/O の効果は Heparin の存在によって促進され、さらに bFGF の投与量を増やすことで血管新生能力が増強されることが示唆された。また、塗布 Day 14 後には血管新生が増加していることが確認された。血管体積の結果に関しては、Day 14 条件で 1 週間よりも全体的な体積が増加していることが観察された。体積計算の式によれば、円柱の基底半径が増加すると体積も増加するため、体積は基底半径の二乗に比例しています。血管径分布の結果(**Fig. 4-9**)においても、Day 14 条件で血管の全体的な直径が 1 週間よりも大きくなっていることが観察された。したがって、Day 14 条件では全体的な体積が有意に増加した。

HE 染色の写真を示す(**Fig. 4-12**)。No treatment と比較して、G/O の条件では真皮層が厚くなっていることが観察された。No treatment の場合を除き、すべての条件で顕著な表皮増生(棘層増生)が観察された。具体的な真皮層の厚さの定量結果は **Fig. 4-12 C** に示された。1 週目と 2 週目の結果を見ると、No treatment と G/O(Heparin(-))の条件と比較して、真皮層は増加した。これは、ヘパリンがマウス自身の増殖因子を固定化し、それによって真皮層の厚さが増加していると考えられる。bFGF-G/O の条件では、真皮層の厚さが増加した。1 週間の結果では、bFGF 投与量の増加に伴い真皮層の厚さに明確な違いは見られなかったが、2 週間の

結果では、bFGF の増加に従って真皮層の厚さがより増加しているように見えた。皮膚中の bFGF は真皮層の血管密度を増加させることで、細胞がより多くの酸素と栄養を受け取り、真皮層の細胞の健康と増殖を促進することができるため、真皮層の細胞数が増加し、それによってある程度の真皮層の厚みが増すことがある。また、bFGF は皮膚の構造を構成する主要なタンパク質の一つであるコラーゲンの産生を調節することができる。コラーゲンの合成を増加させることは、真皮層の厚みを増し、皮膚の弾力性を向上させるのに役立つ[153,154]。

マッソントリクローム染色の結果は Fig. 4-13 に示される。Fig. 4-13 A は、治療後 1 週間後の皮膚組織の染色結果を示しており、Fig. 4-13 B は治療後 2 週間後の皮膚組織の結果を示す。青色の領域はコラーゲンを表した。MT 染色の定量結果を示した(Fig. 4-13 C D)。Fig. 4-13 C の平均光密度(Average Optical Density (AOD))は、組織サンプル内のすべてのピクセルの光密度値の平均値を表す。この値は、組織中染色の程度を定量的に表すのに使用される。一般的に、より高い光密度はより濃い染色を示し、組織中のその成分の含有量が高いことを示唆される。AOD の結果を見ると、bFGF-G/O の条件ではわずかに増加しているが、増加の程度は非常に小さいことが示唆された。スライスの厚さに潜在的な変動がある可能性を考慮して、同じ条件下で異なる個体から取得したスライス間で染色強度に違いが観察された。したがって、染色強度に基づいて、組織断面のコラーゲン含有量の定量的な分析を行なった(Fig. 4-13 D)。Fig. 4-13 D は組織中のコラーゲン含有量の割合を示しており、bFGF による明確な増加は見られなかった。したがって、本研究の結果に基づいて、G/O の使用によって健康な皮膚のコラーゲンの含有量が損なわれなかったと考えている。皮膚のコラーゲンが過剰に存在すると、皮膚の構造と機能が乱れ、さまざまな皮膚の問題が発生し、皮膚の健康を及ぼす可能性がある。従って、皮膚のコラーゲンタンパク質含有量を適切な健康な範囲に保つことは非常に重要である[155]。

回収した皮膚に対して CD31 の免疫染色を行なった。CD31 は細胞膜タンパク質であり、主に内皮細胞と血小板に発現し、内皮細胞のマーカーとして広く使用されている。CD31 の免疫染色を行うことで、組織切片や細胞培養中で CD31 タンパク質の存在と局在を検出することができる[156,157]。

結果は CD31 陽性細胞の位置と数量を観察した。染色された写真(Fig. 4-14 A B)からは、bFGF-G/O 条件下で真皮層に新しい血管生成が生じていることが確認できる。Fig. 4-14 C は CD31 陽性細胞のカウントの結果を示した。1 週間と 2 週間の結果は、No treatment 条件と比較して、G/O 条件では CD31 が増加していることを示した。しかし、bFGF-G/O 条件では、bFGF の増加に伴って CD31 の発現が顕著に増加していないように見える。さらに、2 週間後の結果では、CD31 陽性細胞数が 1 週間目よりも低い傾向が示されている。

血管生成の早期段階では、内皮細胞が血管壁から突出して新しい微小血管を形成する際、CD31 の発現が徐々に増加することが考えられる。これは、CD31 が細胞間接着分子であり、内皮細胞の結合と組織の緊密さを維持するのに役立つため、したがって、血管新生の初期段階では、CD31 の発現が増加する可能性がある。しかし、血管新生が進行するにつれて、新しく形成された微小血管はより成熟し、安定することがあり、それに伴って CD31 の発現が徐々に減少する可能性がある。これは、成熟した血管では CD31 が細胞間接着に必要なため、内皮細胞が安定した血管構造を形成している。したがって、時間の経過とともに、血管新生の過程で CD31 の発現水準が徐々に増加し、次に減少する傾向が見られる可能性がある。これは、血管新生に関連する特徴的な現象である[158,159]。ただし、CD31 免疫染色は

単なる指標の1つであり、CD31 発現だけを基に血管新生の全体のプロセスを解釈することは十分ではない。したがって、CD31 の結果を **Fig. 4-10** に示されたさまざまな血管パラメータの変化と統合することで、血管新生プロセスのより包括的な理解が得られる。**Fig. 4-10** のさまざまな血管パラメータの結果から、bFGF が増加するにつれてこれらのパラメータが増加する傾向が見られる。これは、血管新生の初期段階では CD31 発現が徐々に増加する可能性があるが、血管新生が進行し、血管が成熟すると、CD31 の発現が徐々に減少する可能性があることを示唆された。

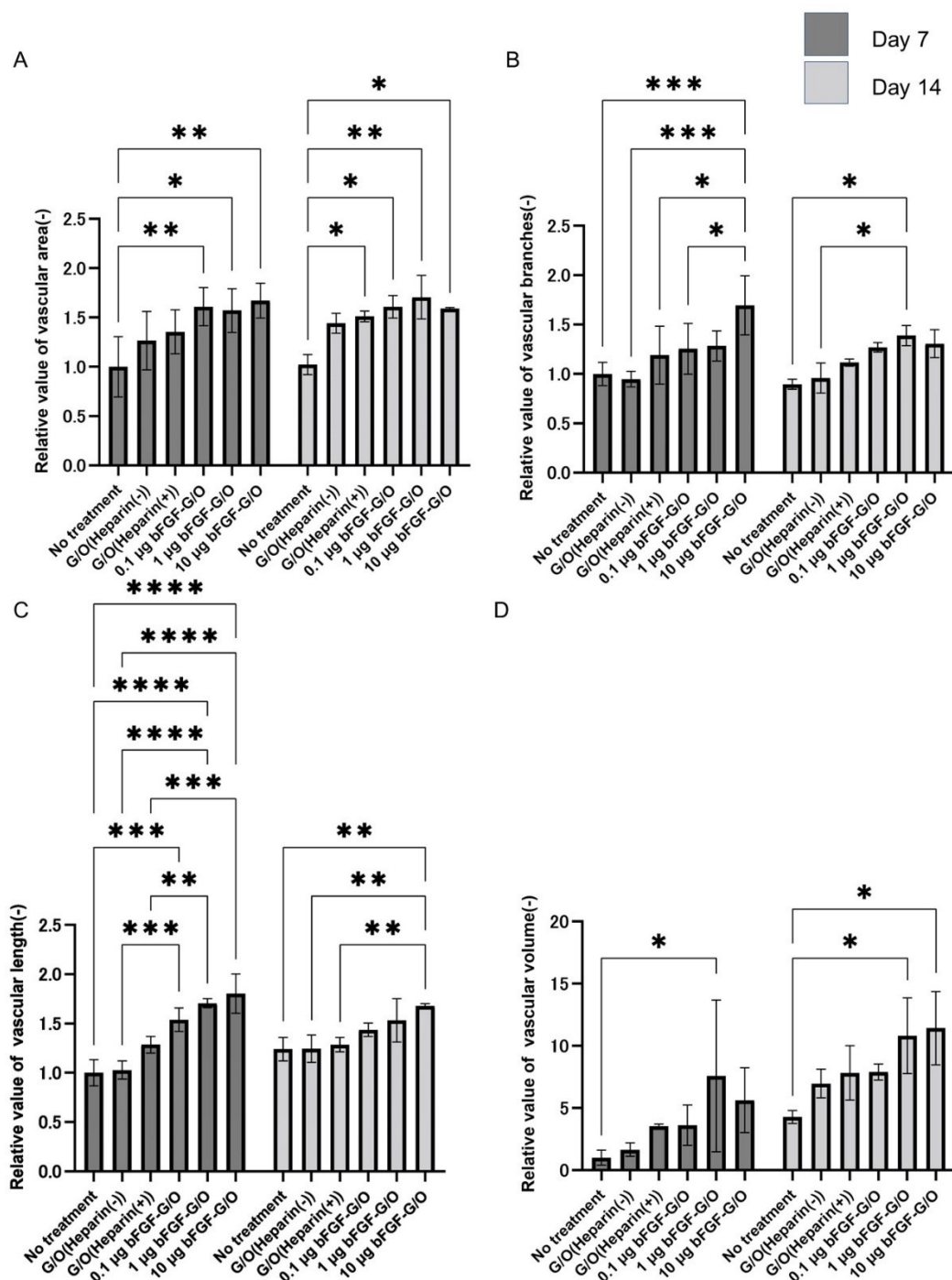
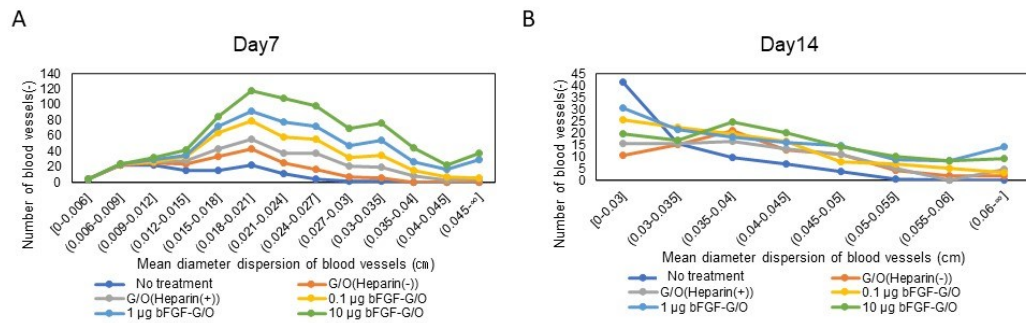


Fig. 4-10 The results of vascular indicators evaluation in the back of mice after one and two weeks of G/O assessment application. A: Relative value of vascular area(-) in the different experimental conditions. B: Relative value of vascular branches in the different groups. C: Relative value of vascular length in the different treatment groups. D: Relative value of vascular volume in the different experimental conditions. Data are presented as the mean plus or +/- the standard deviation. n= 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.



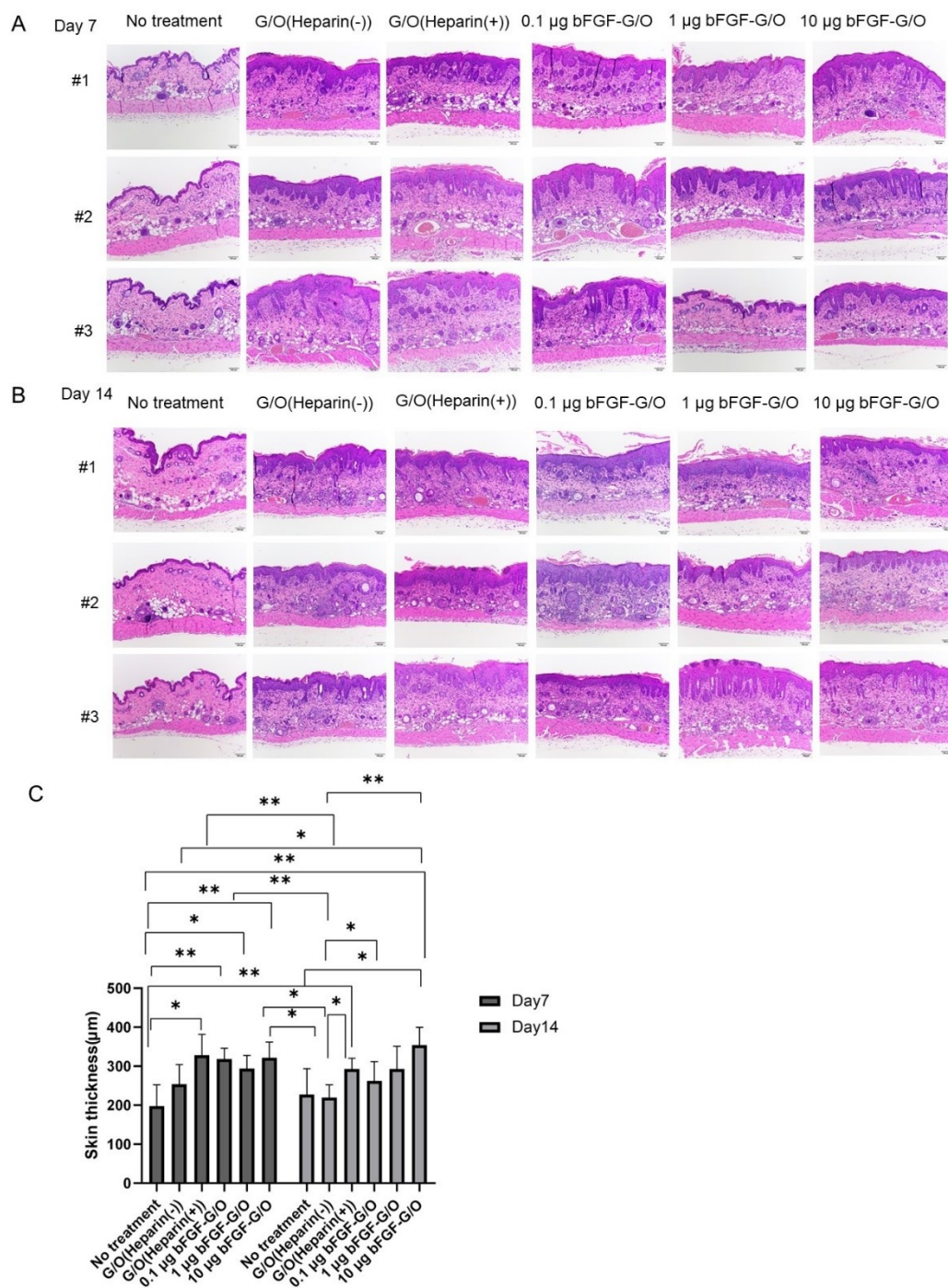


Fig. 4-12 Histological evaluation with HE staining. **A:** the skin tissues after one week application. **B:** the skin tissues after two week application. **C:** skin thickness. Data are presented as the mean plus or +/- the standard deviation. $n = 3$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Scale bar = 100 μ m.

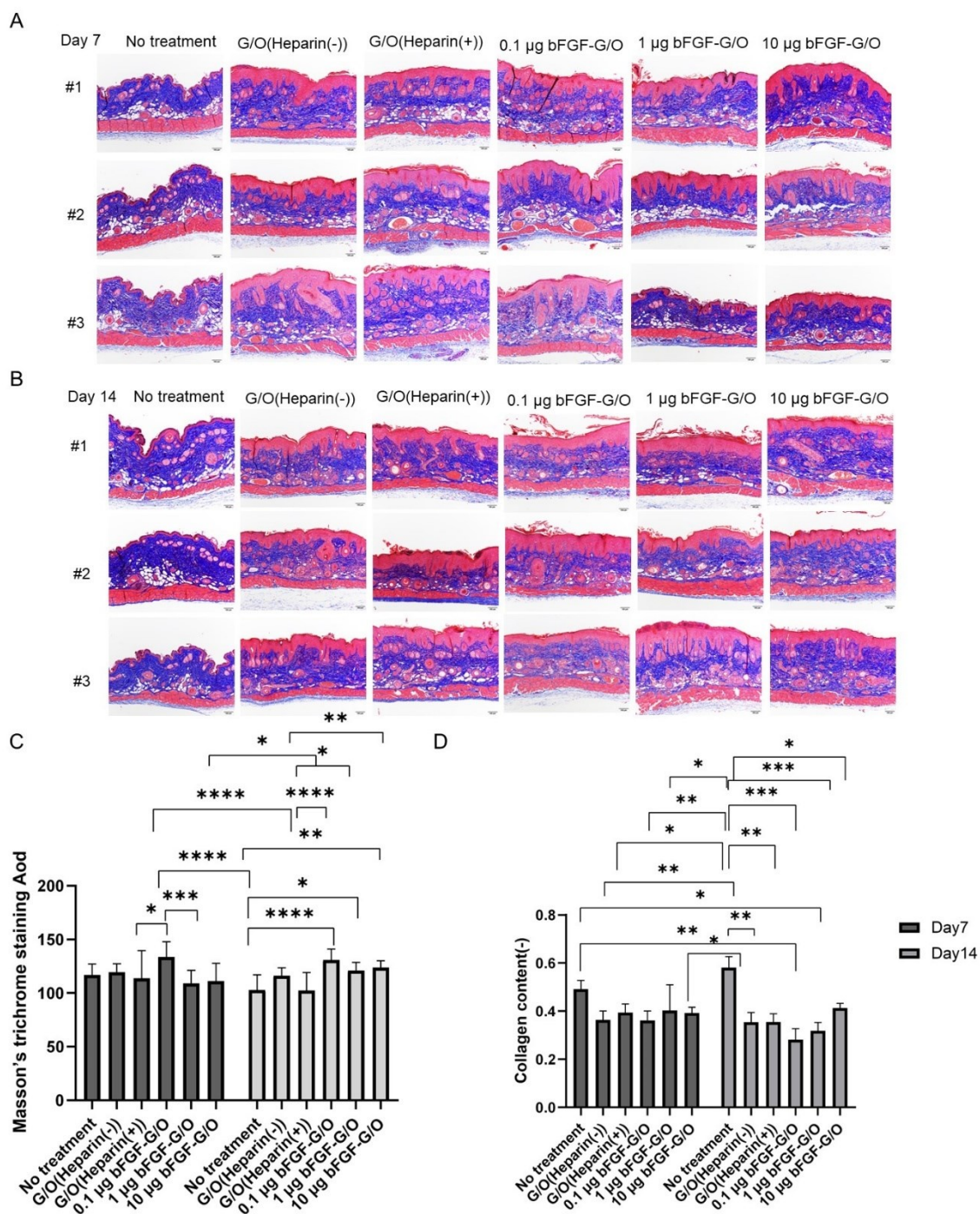


Fig. 4-13 Histological evaluation with MT staining. **A:** the skin tissues after one week application. **B:** the skin tissues after two week application. **C:** Masson's trichrome staining AOD. **D:** The content of collagen protein. Data are presented as the mean plus or +/- the standard deviation. $n=3$, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$. Scale bar = 100 μ m.

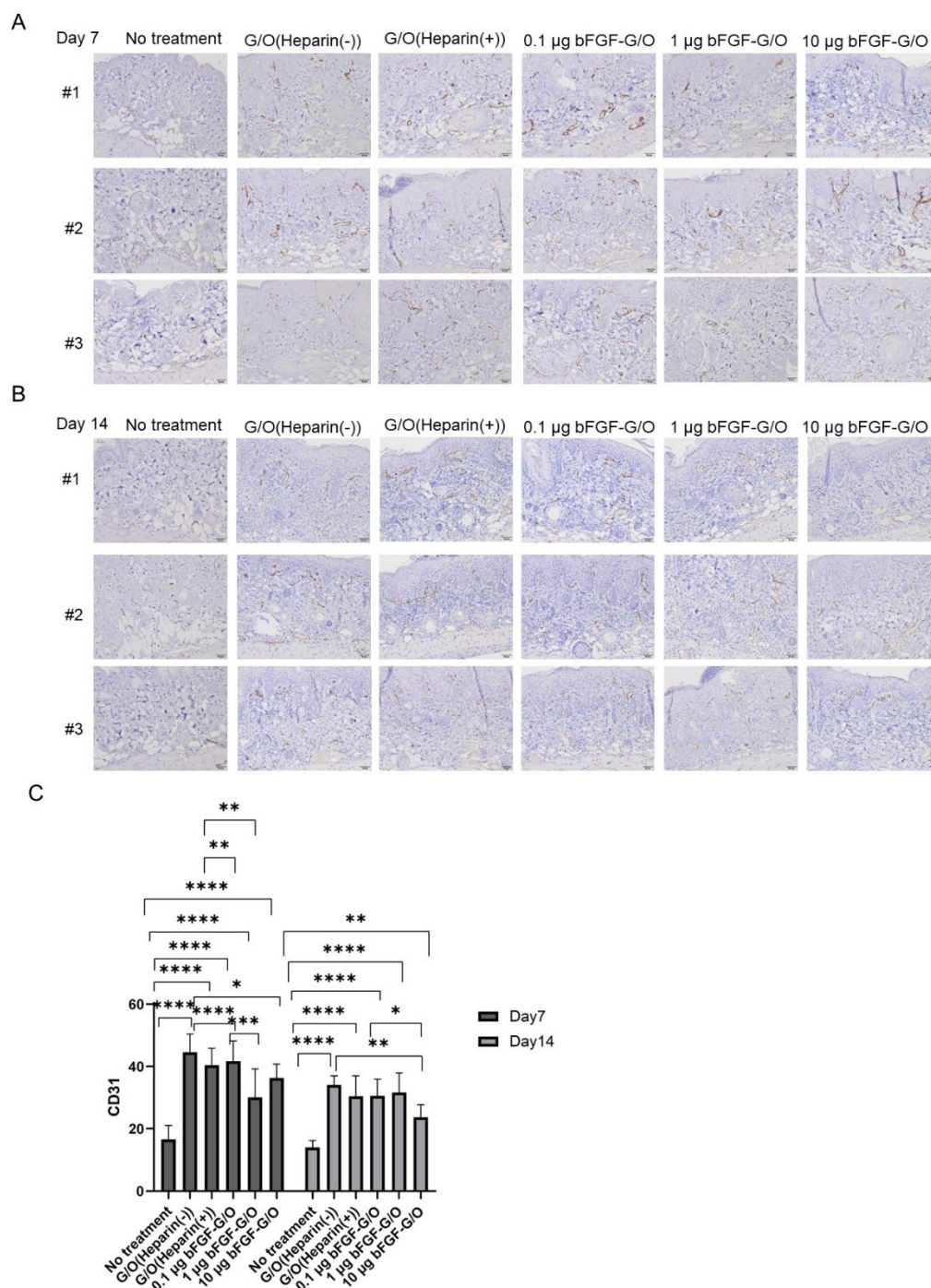


Fig. 4-14 Immunohistochemical staining of mouse dorsal skin tissue (CD31 positive). A: the skin tissues after one week application. B: the skin tissues after two week application. C: count of CD3-positive cells. Data are presented as the mean plus or +/- the standard deviation. $n = 9$, $*p < 0.05$, $p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$. Scale bar = 50 μ m.**

4.4.4 本節のまとめ

G/O の投与後の Day 7 と Day 14 における異なる血管指標のひかく評価結果が示され、これに基づいて以下の傾向が明らかになった。全体の指標において、G/O(Heparin(-))には効果がないことが確認された。G/O の効果は Heparin の存在によって促進され、さらに bFGF の投与量を増やすことで血管新生能力が増強されることが示唆された。Day 7 から Day 14 まで面積、枝分かれ数、総長の各指標の変化差がほとんどありません。体積が有意に増加していることが示唆された。

4.5 考察

増殖因子の TDDS 用の G/O を開発した。bFGF-G/O を塗布した後、新しい血管の形成が観察された(Fig. 4-7)。結果では血管の数が有意に増加し、ヘパリンが血管新生を誘導する効果を示唆された。既存の血管の数は大幅に増加しなかったが、G/O(Heparin(-))および G/O(Heparin(+))と比較して、bFGF-G/O(Heparin(+))では血管ネットワークが十分に発達した(Fig. 4-8)。bFGF が血管生成を促進することを示している[160]。bFGF は血管内皮細胞の増殖を促進し、さまざまなケモカインの上昇とともに血管新生を積極的に調節する[15]。さらに、ヘパリンに誘導された血管新生の存在下では、bFGF-G/O(1.5-2.0 ng)の皮膚面積単位の総ヘモグロビン含有量が増加することを示したが、bFGF 濃度には影響を与えないことを示した(Fig. 4-3)。一方、血管ネットワークは十分に発達したが、血管枝分かれ数と血液体積への寄与は小さかった(Fig. 4-8 および Fig. 4-9 A)。血管の画像は血管の樹状構造を取得するために使用され、血管形状が管状であることが観察された。しかし、一般的な画像分割アルゴリズム(エッジ検出や領域成長アルゴリズムなど)は血管の樹状構造の特徴を活用せず、分割が正確でない可能性がある[161]。現在、この樹状構造のセグメンテーション問題を解決するアルゴリズムは存在しなかった。閾値セグメンテーションアルゴリズムを使用して、背景組織から血管領域をセグメント化し、抽出した[162]。ピクセルの強度閾値を設定することで、周囲の組織から鮮やかな色の血管が正確に選択された(Fig. 4-4、Fig. 4-5 および Fig. 4-6)。この方法はノイズによって引き起こされるエッジポイントの不連続性を克服し、細かい血管を正確に区別できる。bFGF-G/O を塗布した後、新しい血管の形成が観察された(Fig. 4-7)。結果では血管の数が有意に増加し、ヘパリンが血管生成を誘導する役割を示唆している。既存の血管の数は大幅に増加しなかったが、G/O(Heparin(-))および G/O(Heparin(+))と比較して、bFGF-G/O(Heparin(+))では血管ネットワークが十分に発達した(Fig. 4-8)。

通常、血管の定量的な指標は、血管の空間的な分布と形態構造の特徴を反映される。例えば、これらの指標は血管疾患の程度を評価し、血管疾患の早期発見と診断に役立つ。この研究では、血管面積、血管枝分かれ数、総血管長、平均血管径分布、総血管体積などの血管の定量的指標を使用して、G/O の血管生成効率を評価した。これらの方法を使用することで、G/O(Heparin(-))が血管生成を誘導しないことが一貫して観察された。しかし、ヘパリンを加えると、これらの指標がすべて有意に増加し、ヘパリンと GFs との適切な相互作用が存在することを示唆している。実際、ヘパリンと GFs の結合は、その生物活性だけでなく、多くの場合 bFGF の安定性にも重要である[10]。

異なる濃度の bFGF が血管生成に与える影響を評価するために、血管数、血管周長指数、および血管枝分かれ数を計算した。血管の数は bFGF 濃度の増加とともに増加した。ただし、bFGF 用量の変化に伴い、血管面積には明らかな変化が見られなかった。この差異は、小さな血管と血管ネットワークによるものであり、既存の血管はまだ肥大していない可能性がある。さらに、明確な毛細血管形成はあるが、血管面積は 2 次元面上では明らかに増加していなかった。1 μg の bFGF 用量が最も大きな体積を示し、10 μg の bFGF 用量は期待される最大の効果には達しなかった。4 週齢のマウスでは、bFGF に結合するタンパク質トランスポーターが飽和した可能性があると考えられている[163]。そのため、bFGF の分泌量は高いが、タンパク質トランスポーターの数が不足している可能性がある。高用量の bFGF の血管生成指数は高くないことを示唆している。

G/O 治療の最適な持続時間を評価するために、1 週間と 2 週間の G/O 治療中の血管生成マーカーの結果を比較された(Fig. 4-10、Fig. 4-11)。全体的に、14 日目で観察された変化は、

7 日目の組内変化と一致している。血管面積、血管枝分かれ数および血管周長を含む指標に関して(**Fig. 4-10 A B C**)、14 日目は7 日目と比較して有意な増加していなかった。しかし、14 日目に血管新生が増加した。血管体積に関する結果では、1 週間と比較して 14 日目に血管容積が増加した。体積計算式によれば、円筒の底面の半径が大きくなると、体積も底面の半径の二乗に比例して増加した。したがって、14 日目の条件下で、総体積が明らかに増加した。これらの結果は、G/O が血管生成を持続的に促進することを証明した。

また、皮膚の切片に CD31 免疫染色を行なった。CD31 は、主に内皮細胞と血小板で発現する細胞膜タンパク質であり、内皮細胞のマーカーとして広く使用されている。CD31 免疫染色は、組織切片や細胞培養中の CD31 タンパク質の存在と位置を検出するために使用される。染色画像(**Fig. 4-14 A B**)から、bFGF-G/O の条件下で真皮に新しい血管が形成されたことがわかった。Fig. 14 C は CD31 陽性細胞の定量結果である。1 週間と 2 週間の結果は、G/O の条件下で CD31 が増加することを示した。しかし、bFGF-G/O の条件で CD31 の発現は、bFGF の増加とともに顕著に増加しないようになる。さらに、結果は、1 週間後と比較して 2 週間後に CD31 陽性細胞の数が減少していることさえ示唆された。血管生成の初期段階では、新しい内皮細胞組織の安定性をサポートするために CD31 の発現が増加する可能性がある。血管生成が進行するにつれて、新しい微小血管はより成熟し、安定する可能性があり、これにより CD31 の発現が徐々に減少するの要因だった。したがって、血管生成プロセスの進行に伴い、CD31 の発現レベルは増加から減少に変化する傾向があり、これは血管生成に関連する特徴的な現象の一部である[157,158]。

一般に知られているように、bFGF は線維芽細胞と血管内皮細胞に強力な作用を持っている[137]。bFGF を含む G/O は皮下の血管形成を促進し、真皮の線維芽細胞を活性化し、コラーゲンの生成を促進する。MT 染色と H&E 染色を使用してコラーゲンの生成と皮膚の厚さを評価した。結果は(**Fig. 4-12**、**Fig. 4-13**)。No treatment を除いて、すべてのサンプルで明らかな表皮増殖(棘増殖)が観察され、コラーゲンは明らかに増加していなかった G/O の使用が真皮の線維芽細胞を適度に活性化し、健康な皮膚のコラーゲンレベルを保持できると考えている[155]。

他の研究者たちは、増殖因子のデリバリーに適した一連のナノゲル材料を開発しており、天然重合体(ゼラチン[164]、アルギン酸塩、キトサン[165])および合成重合体(PEG およびポリプロピレン酸エステル[166])が含まれる。これらの材料は、優れた生体適合性と生体分解性を持っている。合成ナノスケールの電荷粒子は、軟骨修復増殖因子のキャリアとして使用される。研究者は、ゲルの架橋、重合体鎖密度、およびゲルの構造を制御することにより、幅広いリリースプロファイルを得られた[167]。ナノジェルディスペーションの増殖因子デリバリーは、骨組織再生、傷の治癒、神経修復の促進、腫瘍の成長と転移の抑制など、さまざまなアプリケーションで潜在的な可能性を示した。それらは持続的なリリースと局所的なデリバリーを提供することにより、増殖因子の治療効果を向上させることができる。ナノジェルディスペーションを使用した増殖因子デリバリーの研究は急速に進化しており、新しいナノゲル材料の探索、コントロールリリースシステムの開発、ターゲットデリバリーストラテジーの改良に取り組んだ。組織工学および皮下移植分野に関連する研究が行われる。Ramazanli 氏および Ahmadov 氏らは、オリーブ葉エキスをを使用して銀ナノ粒子を合成し、移植細胞の機能を向上させる潜在的な応用可能性があることを示した。この研究は天然エキスのナノ粒子合成への応用を行なって、組織工学技術の改善のための代替手法を提供した[168]。さらに、Khezri 氏らは、クルクミンを含むナノスキャフォールドを使用して間葉幹細胞

胞の骨分化を検討した。彼らの研究は、増殖因子を使用した組織工学の応用の重要性を証明した[169]。

これらの研究と比較して、本研究の焦点は、G/O を増殖因子の TDDS キャリアとして皮下の血管新生の限られた課題を克服することにある。G/O を使用して異なる量の bFGF をデリバリーする効果を示し、これにより強力な皮下の血管生成と機能的な血管ネットワークの構築が実現した。bFGF の活性を維持しながら局所的な TDDS を可能にする生分解性材料の開発を行なった。この方法は、従来の方法に関連する制約、例えば組織の炎症、内皮細胞の機能障害、および繰り返しのスキヤフォールド移植などを解決する潜在能力を持っている。

4.5 本章のまとめ

bFGF 固定化 G/O を皮膚に塗布することによって高い血管新生誘導効果があるから、G/O に固定された bFGF がゲルから放出され、細胞表面に到達し、かつ作用することが確認された。また、G/O は血管生成の持続的な促進作用を示しました。G/O の経皮送達は生体親和性があり、正常な皮膚のバランスを保たれた。

第5章 増殖因子固定化 G/O の経皮投与による UVB 誘発皮膚障害の予防・修復効果

5.1 本章の目的および概要

太陽光線や人工光源からの UV 放射線は、皮膚の損傷の主要な原因の一つであり、日焼け、黒ずみ、紅斑、皮膚癌などを引き起こす。三種類の異なる種類の紫外線の中で、UVB 線は中間波長を持ち、皮膚の表皮層を透過し、長期間露出すると日焼け、黒ずみ、水泡、黒色腫瘍などの原因となる。UVB ダメージに対する薬剤の経皮投与治療は、非常に注目されている分野である。経皮吸収型局所製剤の利点は、初回通過代謝と全身性副作用の低減であり、低用量で効果的な徐放効果により、治療費の削減と患者の生活の質の向上が期待できる[170]。TDDS であるナノエマルジョンの利点として、表皮の保湿効果、界面活性剤で皮膚透過性が高くなる、薬物の持続的な放出薬物の安定性の向上などが挙げられる[171]。増殖因子は皮膚損傷の治癒を促進することが報告されている[135]。しかし増殖因子の生物活性は短時間であるため、有効な局所濃度の長時間維持とその効果の効率的な発現は困難である[52]。一方、本研究室は G/O という新たな経皮送達システムを開発した。増殖因子との高い親和性を有するヘパリン導入ゼラチンゲルを油中にナノ分散させた G/O は、優れた経皮吸収性、内包した物質の生理活性の維持、徐放性が確認された[152]。

本研究は、皮膚損傷を予防および治療するための皮膚透過生体分子キャリアとしての G/O の効果を評価することを目的とする。さまざまな増殖因子(GFs)を G/O に内包し、このキャリアが UVB 誘発の皮膚損傷に対する効果を検討した。人工的な UVB 光を用いてヘアレスマウスの皮膚損傷を誘導し、5 つの GF(VEGF、bFGF、EGF、TGF-1、IGF- α)を固定化した G/O を皮膚に塗布した。そのうち、VEGF と bFGF は血管新生を促進し、EGF、TGF-1、IGF- α は損傷した細胞の修復と再生を促進する。結果は、G/O が紅斑、表皮の水分減少、炎症、真皮の増厚などの UVB による皮膚損傷を軽減する点で、ヘパリン固定化 G/O よりも優れていることを示す。さらに、G/O は UVB による卵胞の異常な増殖を予防および治療し、皮脂腺の修復の潜在能力を示す。総括すると、当研究の結果は、G/O の UVB 誘発皮膚損傷の治療における潜在的な可能性を示す。

5.2 UVB 皮膚損傷モデルマウス作製に関する検討

5.2.1 実験目的

紫外線照射で皮膚損傷モデルが作製可能か検討を行った。紫外線は波長によって、UVA (320-400 nm)、UVB (290-320 nm)、 UVC (200-290 nm) の3種類に分けられるが、本実験ではより急性な皮膚障害を引き起こすとされている UVB に着目した。照射時間は、文献を基に計算から条件を設定し、照射後1週間程度経過観察を行い Control と比較した。

5.2.2 実験方法

[1]UVB 皮膚損傷モデルの作製

UVB は地表に届く紫外線の1割程度を占めていると言われているが、エネルギー量が大きく急激な炎症を引き起こす。UVB が皮膚障害を引き起こす機構は X 線と類似しており、UVB が直接 DNA を破壊し、細胞分裂を阻害する。HR-1 マウス、6 週齢、オスを準備した。

マウス用のケージ(高さ約 12 cm)に黒幕を巻き付け、サングラスを着用した。UVB 照射ライト (funakoshi, 紫外線波長 302 nm, 8 W タイプ) をケージの上にセッティングした。黒幕を装置の上から被せ、Table 5-1 の条件で UVB を照射した。その後最大2週間程度経過観察を行い、2日に1度形態観察、体重測定、肌湿度測定を行った。一定期間の経過観察後、マウスをサクリファイスし、皮膚を摘出した。待ち針で発泡スチロールに固定し、10% 中性緩衝ホルマリン液に浸した。

Table 5-1 UVB Irradiation conditions

	UVB exposure time
#1	0 min (Control)
#2	4 min
#3	8 min
#4	16 min

5.2.3 結果および考察

Fig. 5-1 は UVB 照射の実験様子である。なお、UVB は人体にとっても非常に危険であるため、サングラスを着用して細心の注意を払って実施した。Fig. 5-2 より、4 min の条件で若干の赤い斑点が、8 min、16 min の条件では重度の肌荒れ、ただれが確認できた。この結果より、UVB 照射による皮膚障害モデルの作製に成功した。また、Fig. 5-3 より、体重の増減は Control と比較してほとんど変化がなく、生存の観点からモデルとして適していることが示された。また、Fig. 5-4 より、4 min 以上の条件で Control と比較して約5日目ドライスキン状態となった。今後、摘出した皮膚の組織学的評価(H&E 染色、CD68 免疫染色)を行う予定である。また、今回、照射部分にばらつきが確認されたため、マウスを張り付けの状態にするなどの改善を行っていく。



Fig. 5-1 The appearance of UV-B irradiation.

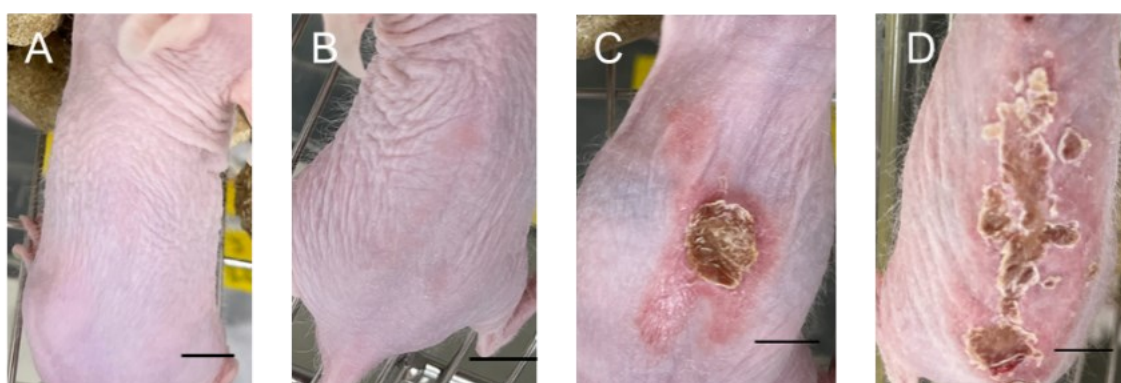


Fig. 5-2 Morphological observations on hairless mice (7 days after irradiation).

A: No UVB exposure (Control). B: UVB exposure for 4 min. C: UVB exposure for 8 min.
D: UVB exposure for 16 min. Bars:10 mm.

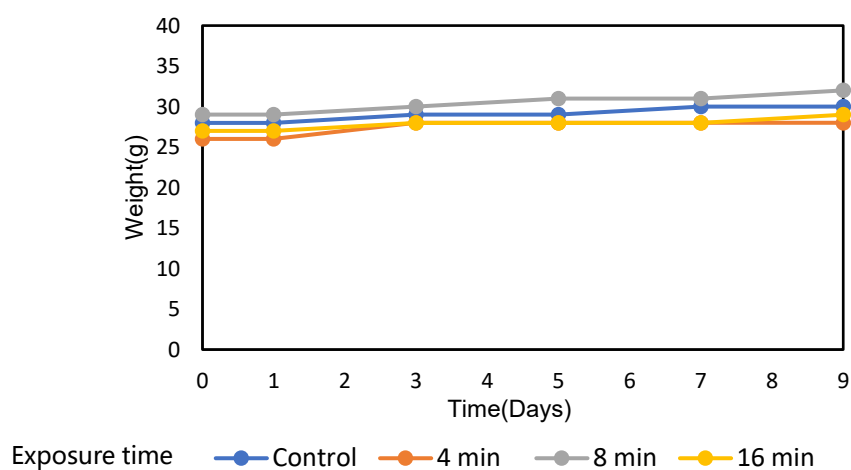


Fig. 5-3 Changes in mouse body weight over time.

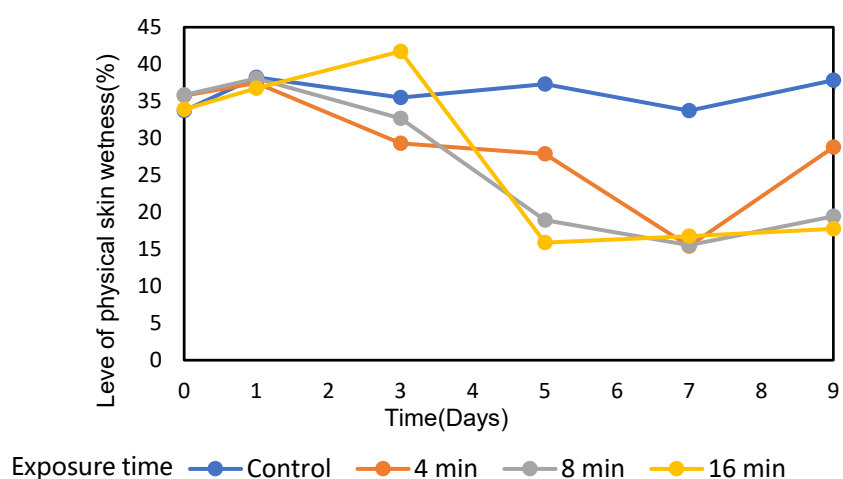


Fig. 5-4 Transcutaneous changes in skin humidity on the back of mice.

5.2.3 本節のまとめ

UVB 照射時間を 8 分にした場合が UVB 誘発性の皮膚損傷動物モデルを作製するのに適していることが示唆された。

5.3. 増殖因子カクテル G/O による UVB 照射に伴う皮膚障害の創傷治療

5.3.1 実験目的

検討 5.2 において UVB 照射に伴う皮膚障害モデルマウスの作製に成功し、照射時間 8 分以上で重度の皮膚障害が生じることが示された。そこで、UVB 照射を 8 分に設定し、増殖因子カクテル G/O の経皮吸収によって創傷治癒の有効性試験を行った。今回カクテル化に用いた増殖因子は、VEGF、EGF、bFGF、TGF-1、IGF- α の計 5 種類である。これらの増殖因子には、皮膚の形成や血管新生、損傷した細胞の再生を促す効果があるとされ、複数種の増殖因子をカクテル化することで、早期の創傷治癒を目指した。また今回は経皮投与のタイミングとして、UVB 照射直後から投与を行う予防と皮膚障害が生じてから投与を行う治療の 2 条件を検討した。

5.3.2 実験方法

[1]カクテル増殖因子-G/O の作製

選択された 5 つの増殖因子は、VEGF(血管再生に関連する糖タンパク質)、EGF(DNA 合成と細胞増殖に関連)、bFGF(神経系、肺、筋肉、骨、皮膚、血管増殖の発達に関連)、TGF-1(組織の発達、細胞の分化、胚の発生に関連)、IGF- α (損傷した細胞と皮膚の再生に関連)である。G/O は、4.2.2[1]で説明した方法と同じように油相 2000 μ L と水相 1000 μ L を混合した(水相：油相=1：2)。超音波ホモジナイザー(Sonifier 250, Branson Ultrasonics Co., Danbury, CT, USA)を用いて 3 分間処理した水相には上記の 5 つの増殖因子の混合物(0.5 ng ずつ)が含まれていた。ここで、高温による GF の変性を防ぐために、3 分間隔で 30 秒間のインターバルを挟んでで攪拌が行われた(Duty cycle: 70%, Output control: 7)。4°C に冷却し、粒子内の水相がゲル化した増殖因子カクテル G/O を調整した。

[2] UVB 照射に伴う皮膚障害モデルの作製

5.2.2[1]の方法において UVB 照射に伴う皮膚障害モデルマウスを作製した。具体的には、HR-1 マウス、6 週齢、オスを準備し、マウス用のケージに黒幕を巻き付け、実験者はサングラスを着用した。UVB 照射ライト(Funakoshi, 紫外線波長 302 nm, 8 W タイプ)をケージの上にセッティングした。黒幕を装置の上から被せ、イソフルランの麻酔下で 8 分間 UVB を照射した。

UVB 放射装置はケージの上部に配置され、UVB 光線は直接マウスの上に照射され、UVB 曝露強度は $220.1 \pm 1.7 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ である。光エネルギーの公式に従い、UVB 光エネルギー (mJ/cm^2) = UVB 強度 (mW/cm^2) $\times$ 照射時間 (秒) となる。照射された UVB 光の強度は $105.648 \pm 0.816 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ と計算された。

光エネルギーの公式:

$$\text{UVB 光エネルギー (mJ/cm}^2\text{)} = \text{UVB 強度 (mW/cm}^2\text{)} \times \text{照射時間 (s)}$$

[3]増殖因子カクテル G/O の UVB 照射に伴う皮膚障害への予防的および治療的効果の *in vivo* 評価

具体的な実験条件は Table 5-2 および Fig. 5-5 にリストされている。グループ I は非治療

対照グループで、グループ II は予防グループで、Day 0 に 8 分間の照射を受け、その後 6 日間は G/O の予防条件の未処理 UVB 照射が行われた。グループ III は短期治療グループで、Day 0 の照射に続いて、Day 3 には可視性の赤斑、水疱、剥離などの皮膚損傷反応があり、G/O の塗布を含む 3 日間の短期治療と未処理の対照が行われた。グループ IV は長期治療グループで、条件は 3 つのグループと同じで、ただし、6 日間の G/O の長期治療と非治療の対照が行われた。毎三日間に G/O を繰り返し塗布した。肌湿度と体重を毎日に測定した。皮膚を回収し、摘出した皮膚の写真を撮影した。待ち針で発泡スチロールに固定し、10%中性緩衝ホルマリン液に浸した。

Table 5-2 Experiment conditions

Group name	Types of treatment received
Group I: No treatment group	No treatment
Group II: Prevention group	UVB irradiation
	UVB irradiation + G/O (Heparin)
	UVB irradiation + G/O (GFs cocktail)
Group III: Short-term treatment group	UVB irradiation + G/O (Heparin)
	UVB irradiation + G/O (GFs cocktail)
Group IV: Long-term treatment group	UVB irradiation
	UVB irradiation + G/O (Heparin)
	UVB irradiation + G/O (GFs cocktail)

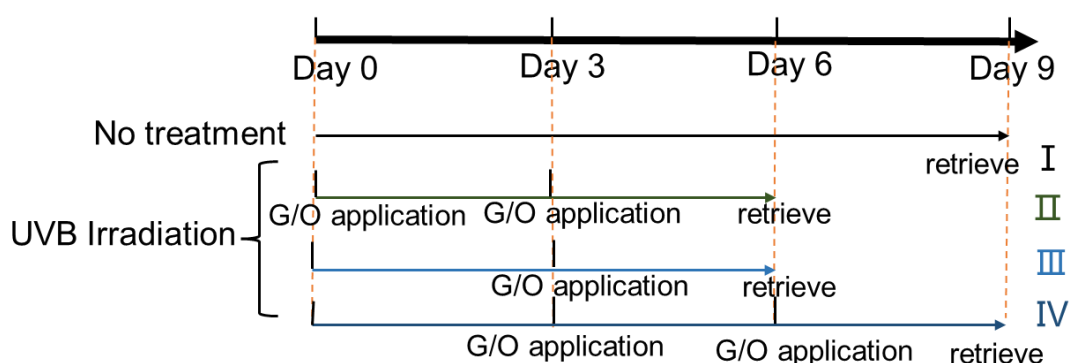


Fig. 5-5 The timeline of treatment

[4]組織組織学的な解析

マウスの背中からの皮膚は、UV 照射の 7 日目に組織学的な解析のために収集された。この処理された背側皮膚は、10%のフォーマリン中性緩衝液(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)に固定された。パラフィンに埋め込まれた別々のパラフィンセクションの

H&E 染色および CD68 抗体(Abcam)を用いたマクロファージの免疫組織化学染色を行った。

5.3.3 結果および考察

Fig. 5-6 A は、group II (prevention group)のマウスの背部の状態を時間の経過とともに示す No-treatment group with the UVB irradiation (no application)と比較すると、UVB 照射後 3 日でマウスの皮膚に明らかな紅斑が観察された。UVB 照射のみ、UVB irradiation + G/O (Heparin)、および UVB irradiation + G/O (GFs cocktail)条件を比較して、G/O の条件が皮膚の損傷を予防したことがわかった。同様に、**Fig. 5-6 B** は予防群の皮膚の水分レベルを示した。結果から、UVB 照射のみの条件が時間の経過とともに皮膚の水分レベルを約 33%から 20%に著しく減少させることがわかった。第 3 日の UVB irradiation + G/O (Heparin)および UVB irradiation + G/O (GFs cocktail)の皮膚水分レベルは、UVB 照射のみの条件よりもわずかに高かった。しかし、G/O (Heparin)および G/O(GFs cocktail)条件下の皮膚肌湿度は、理想的な皮膚状態と同じであった。皮膚肌湿度レベルにおいても類似の効果が得られたため、G/O は UVB 照射誘発の皮膚損傷による水分喪失を予防する効果があると考えられる。

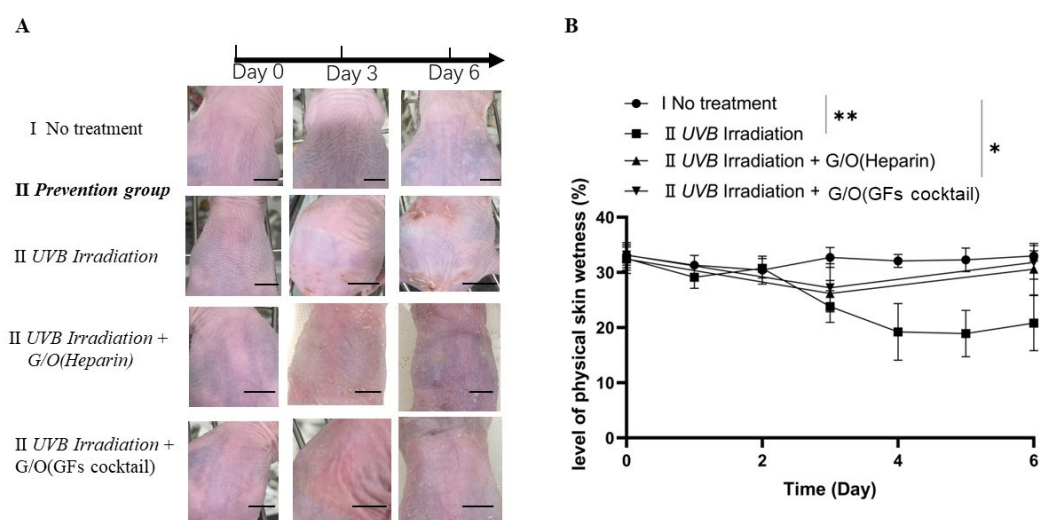


Fig. 5-6 Inhibition of skin erythema and dehydration using G/O in the prevention group.

A: Images of transtemporal changes on the back skin of mice after ultraviolet UVB irradiation and degree of skin damage with and without application of G/O.

B: Transcutaneous changes in skin humidity on the back of mice in the prevention group. Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation. $n = 4$, $*p < 0.05$,

$**p < 0.01$. Scale bar = 10 mm.

Fig. 5-7 A は group III (short-term treatment group)のマウスの背部の時間経過に伴う写真を示している。3 日間の照射後(Day3)、背部に明らかな紅斑が観察され、Day3 に傷口が治癒す

ると予想される。G/O (Heparin)および G/O (GFs cocktail)が両方とも第3日に適用されたため、3日後(Day 6)には紅斑が明らかに減少した。Fig. 5-7 B は group III の皮膚肌湿度結果を示しており、G/O (GFs cocktail)が短期治療期間内に G/O (Heparin)よりも皮膚肌湿を効果的に改善したことを示唆された。

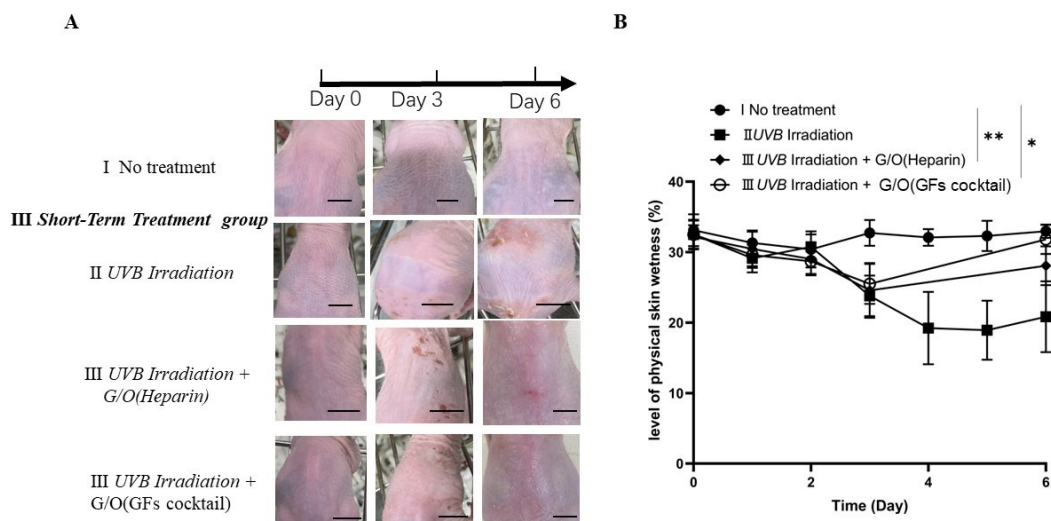


Fig. 5-7 Inhibition of skin erythema and dehydration using G/O in the short-term treatment group. A: Images of transtemporal changes on the back skin of mice after UVB irradiation and degree of skin damage with and without the application of G/O. B: Transcutaneous changes in skin humidity on the back of mice in the short-term treatment group. Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation. $n = 4$, $*p < 0.05$, $p < 0.01$. Scale bar = 10 mm.**

Fig. 5-8 A は、IV群 (long-term treatment group)のマウスの背部の時間とともに変化する写真を示しており、No treatment および UVB irradiation-only (no application)の状況を比較して、照射後 3 日(Day3)には明らかな紅斑が観察された。G/O の塗布後 3 日 (Day6)では、UVB irradiation + G/O (Heparin)および UVB irradiation + G/O (GFs cocktail)条件下で皮膚に明らかな損傷が見られず、6-9 日の UVB 照射の写真では、マウスの自己治癒作用により損傷部位が回復したが、G/O の塗布により回復速度が速くなった。Fig. 5-8 B はIV群の皮膚湿度の結果を示しており、UVB 照射のみ条件下での皮膚湿度が No treatment よりも低いことを確認し、UVB 照射とその他の条件による皮膚の乾燥を裏付けている。G/O (GFs cocktail)条件と比較して、G/O (Heparin) 条件下での皮膚湿度が高いことから、G/O (GFs cocktail) 治療の方が効果的であることが示された。

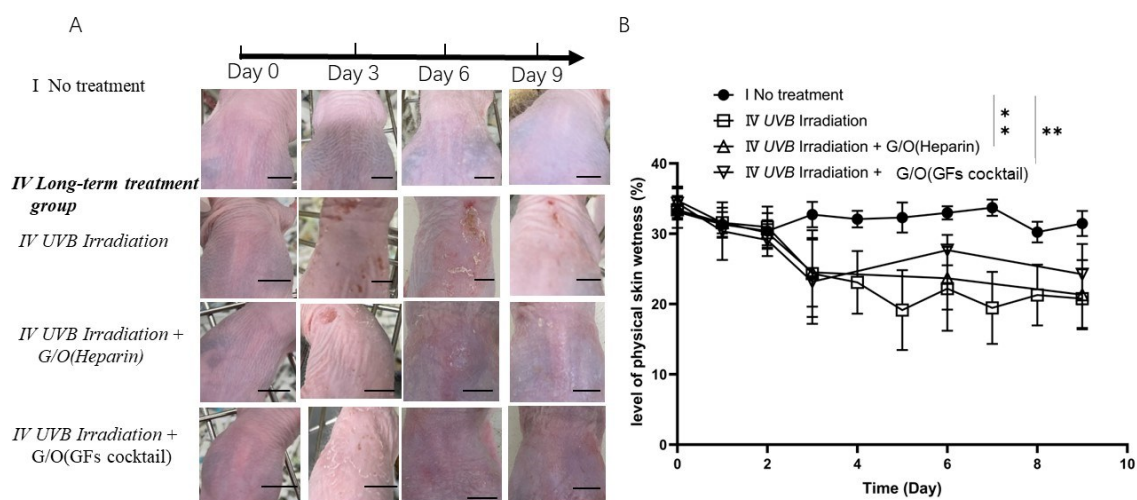


Fig. 5-8 Inhibition of skin erythema and dehydration using G/O in the long-term treatment group. A: Images of transtemporal changes on the back skin of mice after UVB irradiation and degree of skin damage with and without the application of G/O. B: Transcutaneous changes in skin humidity on the back of mice in the long-term treatment group. Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation. $n = 4$, $*p < 0.05$, $p < 0.01$. Scale bar = 10 mm.**

Fig. 5-9 に、CD68 染色後の皮膚の顕微鏡観察結果とマクロファージの定量結果を示す。予防グループの CD68 染色とマクロファージの定量結果 (**Fig. 5-9 A および D**)から、UVB 照射のみ条件下ではマクロファージマーカーが著しく増加し、マクロファージが損傷部位に集積していることが示された。対照的に、G/O (Heparin)および G/O (GFs cocktail) 条件下では、マクロファージの発現が UVB 照射条件のみよりも低いことから、G/O が損傷部位の炎症を予防していることが示唆された。短期治療群の CD68 染色結果(**Fig. 5-9 B E**) から、(GFs cocktail)のマクロファージマーカーが最も低いことが示され、G/O (GFs cocktail)治療が炎症の制御に効果的であり、G/O(Heparin)治療よりも優れていることが示唆された。長期治療群の結果を比較すると(**Fig. 5-9 C F**)、UVB 照射、G/O (Heparin)および G/O (GF cocktail)条件下でのマクロファージの数は同等であった。短期治療群の結果を比較すると、単独の照射条件下でのマクロファージ数の減少は、マウスの自己治癒によるものと考えられる。

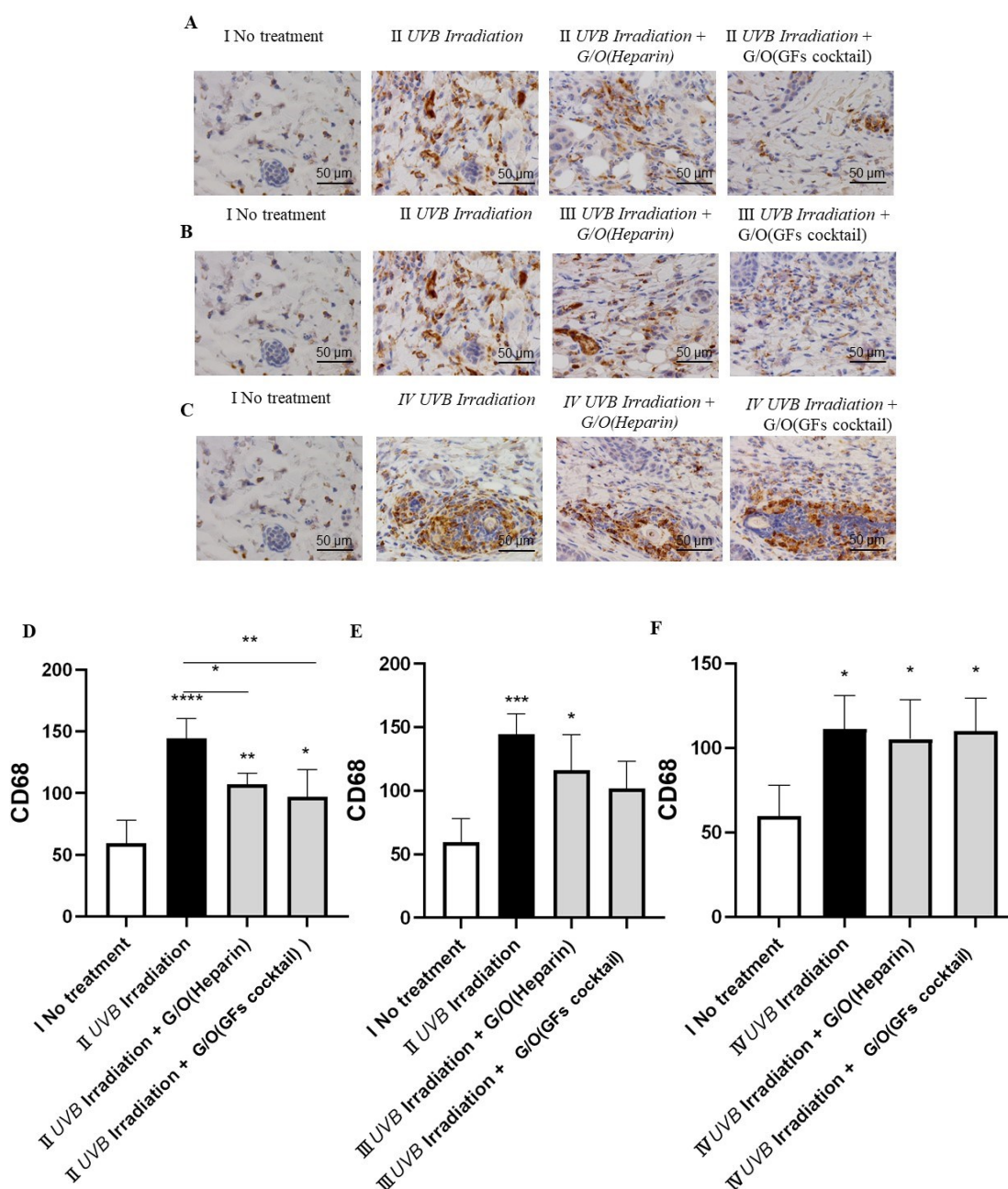


Fig. 5-9 CD68 staining of mouse dorsal skin tissue. A: Prevention, B: short-term treatment, C: long-term treatment groups. Macrophage counts in the D: prevention, E: short-term treatment, F: Long-term treatment groups. Data are presented as the mean± standard deviation. n = 4, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Scale bars: 50 μ m.

UVB 照射後の 7 日目に、マウスの背部皮膚に H&E 染色を行なった。No treatment のマウスの背部皮膚の H&E 染色画像(Fig. 5-10 A)を見て、UVB 照射による皮膚の変化を観察した。組織学的な分析では、皮膚の各種変化が観察され、表皮および真皮が顕著に肥大化し、皮膚組織が線維化(Fig. 5-10 B)、毛包数の増加(Fig. 5-10 C)、炎症が観察された (Fig. 5-10 D)。

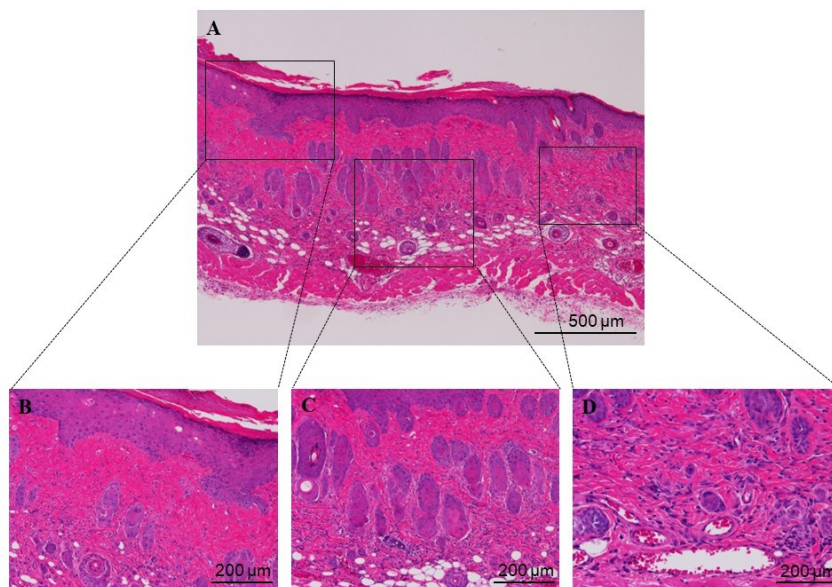


Fig. 5-10 Histological analysis of the mice skin in the No treatment group. **A:** H&E stained images of the dorsal skin of mice. **B:** Skin tissue fibrosis. **C:** Increased number of hair follicles. **D** Inflammation. Scale bar: **A** = 500 μ m; **B**, **C**, and **D** = 200 μ m.

予防群の H&E 染色結果 (**Fig. 5-11 A**) から、G/O(Heparin)および G/O (GFs cocktail) が UVB 照射による表皮と真皮の増厚に対して有効な予防効果を持つことが示唆された(**Fig. 5-11 B C**)。さらに、UVB 照射のみのグループでは毛包の数が顕著に増加していることが観察され (**Fig. 5-11 D**)、これは G/O 処理が毛包の異常な増加を抑制したことを示唆している。UVB 照射下では、G/O の使用の有無に関係なく皮脂腺の数量が減少していることが分かった(**Fig. 5-11 E**)。

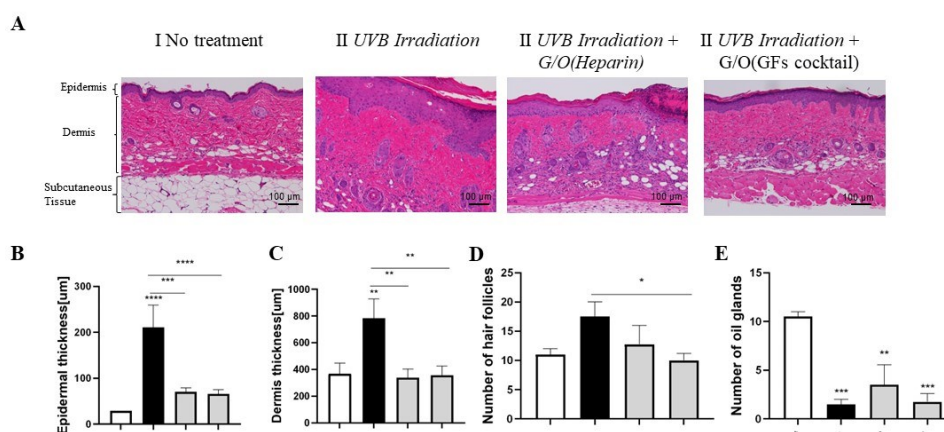


Fig. 5-11 Histological analysis of the mice skin in the prevention group. **A:** H&E stained images of the dorsal skin of mice. **B:** Epidermal thickness. **C:** Dermis thickness. **D:** Number of hair follicles. **E:** Number of sebaceous glands. Data are presented as the mean $\pm$

standard deviation. $n = 4$, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$. Scale bar: 100 μm .

短期治療群の H&E 組織学的分析 (Fig. 5-12 A)では、G/O(Heparin)および G/O(GFs cocktail)の使用が UVB 照射による表皮と真皮の増厚を効果的に改善することが示された (Fig. 5-12 B C)。毛包のカウントの結果から、UVB 照射のみが毛包の数を著しく増加させるのに対し、G/O の使用が毛包の数の増加を抑制したことが示された (Fig. 5-12 D)。脂腺の結果(Fig. 5-12 E)からは、G/O(GFs cocktail)条件下で皮膚の皮脂腺数が顕著に回復したことが示された。

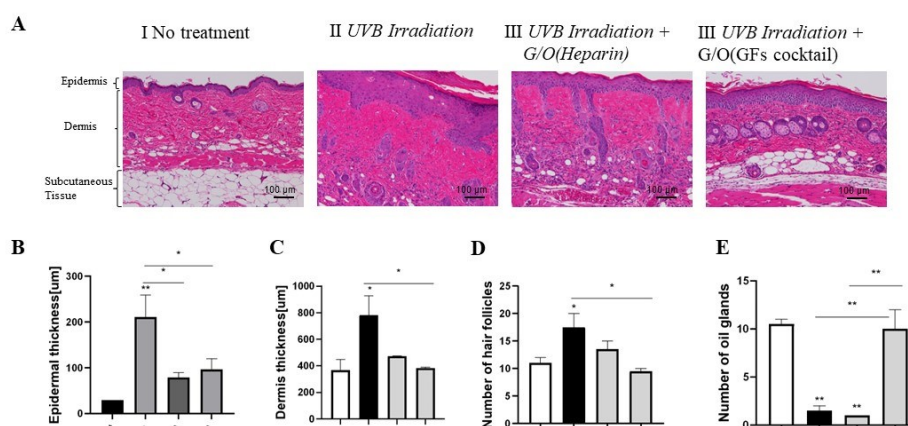


Fig. 5-12 Histological analysis of the mice skin in the short-term treatment group. A: H&E stained images of the dorsal skin of mice. B: Epidermal thickness. C: Dermis thickness. D: Number of hair follicles. E: Number of sebaceous glands. Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation. $n = 4$, $*p < 0.05$, $p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$. Scale bars: 100 μm .**

長期治療群の結果 (Fig. 5-13) では、G/O 治療が表皮の増厚を改善したことが示された(Fig. 5-13 B)。また、G/O、G/O(Heparin)および G/O(GFs cocktail)の存在または無しの場合、真皮の厚さには顕著な差異がなく (Fig. 5-13 C)、これはマウスの自発的な治癒作用に起因する可能性があると考えられる。毛包の数の結果から、UVB 照射のみが毛包の数を著しく増加させるのに対し、G/O の投与がこれを抑制したことが示された(Fig. 5-13 D)。さらに、G/O(GFs cocktail)条件下での皮脂腺の修復には影響がなかった(Fig. 5-13 E)。ただし、顕著な差異が見られないため、これは実験誤差に起因する可能性があると考えられる。

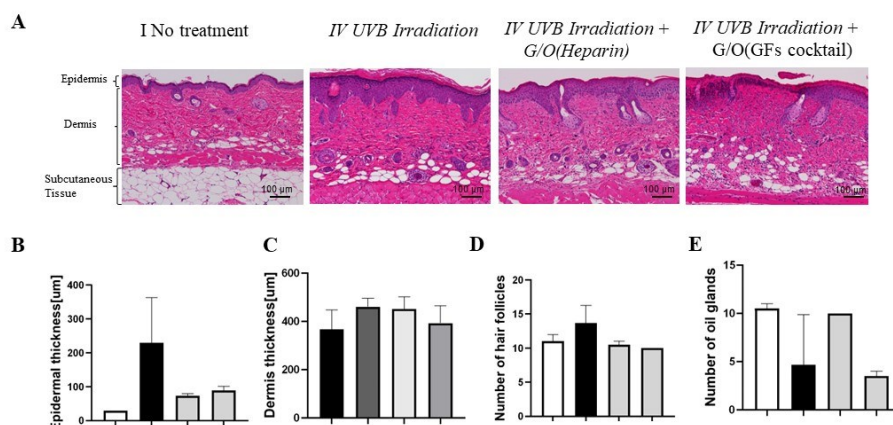


Fig. 5-13 Histological analysis of the mice skin in the long-term treatment group. A: H&E stained images of the dorsal skin of mice. B: Epidermal thickness. C: Dermis thickness. D: Number of hair follicles. E: Number of sebaceous glands. Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation. $n = 4$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Scale bars: 100 μm .**

5.3.4 本節のまとめ

この研究では、G/O が UVB 照射による皮膚損傷の予防および治療に有効であることが実験によって確認された。

G/O(GFs cocktail)は UVB 照射による皮膚損傷を有効に予防された。G/O は皮膚の水分を維持し、乾燥を防いだ。短期治療は皮膚の紅斑を軽減しました、特に GFs カクテルの効果が顕著だった。皮膚の湿度の改善は、G/O が炎症の制御に寄与していることを示唆された。長期治療は皮膚損傷の速やかな回復を促進した、特に GFs カクテル条件下での効果が優れていた。G/O の使用は炎症反応を抑制し、マクロファージの発現を減少させた。GFs カクテルは炎症制御で Heparin よりも優れていた。G/O は表皮と真皮の増厚を改善し、毛包の異常な増加を抑制した。一部の条件下で、G/O は皮脂腺の数に明確な影響を与えなかった。

総じて、G/O は UVB による皮膚損傷に対して優れた予防および治療効果を有し、特に GFs カクテルは優れた性能を示した。

5.4 考察

既往研究で本研究室は生体分子の経皮投与のための G/O を開発した。この G/O は、適切な粒子サイズを持ち、皮膚に容易に浸透し、薬物を皮膚の真皮層に徐放する適切な薬物送達キャリアとして提案された[152]。本研究では、G/O が皮膚損傷の治癒における役割を検討した。ヘアレスマウスを用いた UVB 誘発皮膚損傷モデルを用いて、G/O が 5 つの増殖因子のカクテルに内包された状態での適用が UVB 誘発の皮膚の炎症に影響を与えるかどうかを検討した。G/O の経皮投与は、UVB 誘発の皮膚損傷、例えば紅斑、皮膚の上皮の水分減少、炎症による上皮の増厚などを抑制するのを加速した。さらに、G/O は UVB 誘発の異常な毛包成長を抑制した。5 つの GFs を封入した G/O は、損傷した皮脂腺の迅速な短期修復も示した。したがって、この研究は UVB 誘発の皮膚損傷の治療に新たなアプローチを提供している。

この研究の結果、予防 (Fig. 5-6)、短期治療 (Fig. 5-7)、および長期治療 (Fig. 5-8) グループにおける皮膚損傷の程度と表皮の水分含有量の変化は、G/O の適用によって皮膚の保湿状態が回復したことを示している。以下の 3 つの理由を考えている。まず、現代の創傷治療理論は、湿潤な環境が創傷の脱水を防ぎ、コラーゲン合成と血管新生を増加させ、死細胞の分解を増加させ、酸素が必要であるため、創傷治癒を促進することを確認している[172–175]。G/O は、創傷治療のためのヘルメティックなバリアを提供し、汚染を防ぎ、湿潤な創傷治癒を可能にする。ナノヒドロゲルの柔らかい質感は、治療中に快適さを提供する。もう一つの理由は、ヘパリンの保湿効果である。ヘパリンは水分を吸着する多糖で、非常に保湿性が高いとされる[176,177]。ヘパリン良好な鎮痛作用と抗炎症作用を持ち、その保湿効果により皮膚の水分を回復させることができる[178]。三つ目の理由は、GFs が創傷治癒に与える影響である。この研究で使用された 5 つの GFs は、皮膚再生に貢献し、皮膚の水分を回復させる可能性がある[179–182]。

予防グループでは皮膚の水分損失はわずかに減少したが、統計的有意差はなかった。これらの結果から、皮膚の水分回復は G/O の使用後に急激に発生するのではなく、時間とともに徐々に発生することが示唆される。したがって、本実験では G/O の使用後の皮膚の水分回復は迅速ではなく、むしろ GF が創傷治癒に対する二次的な影響によるものである可能性が高いと考えるが、直接的な保湿作用ではないということである。しかし、G/O(Heparin)および G/O(GFs cocktail)の条件を比較すると、皮膚の水分レベルにわずかな差異があることが示された。これは、外部 GF と比較して、内部 GF がヘパリンとの結合が強いためかもしれない。ヘパリンは GF を捕捉し、創傷治癒に非常に効果的である。したがって、内因性 GF はヘパリンによって活性化され、内部 GF がヘパリンにアンカーされることで良好な創傷治癒が実現できる可能性がある。それにもかかわらず、外部 GF を導入することは意味がないとは考えていない。なぜなら、差異は顕著ではないが、G/O(GFs cocktail)条件下での皮膚の湿度は G/O(Heparin)条件よりも高いからである。これらの観察結果は外観と皮膚の湿度に基づいている。

UVB 照射による皮膚の損傷は多面的であり、皮膚表面に見られる傷口と表皮の水分含有量の変化だけでなく、表皮角化度、間質の増加、真皮血管拡張、毛包の数量の変化と関連している[183]。CD68 に対する免疫染色を使用して皮膚内のマクロファージの集積状態を評価した (Fig. 5-9)。非活性マクロファージは M0 マクロファージと呼ばれ、彼らの特徴的な表面マーカーには CD14、CD68、F4/80 が含まれる[184]。初期の刺激の後、マクロファージは異なるフェノタイプ、M1 と M2 を獲得する。M1 マクロファージは「クラシックアクティ

バージョン」と呼ばれ、CD80 と CD86 を特徴的な表面マーカーとし、主に炎症反応に関与し、組織再生には不利である。一方、M2 マクロファージは「選択的アクティベーションのマクロファージ」と呼ばれ、CD163 と CD206 を特徴的な表面マーカーとする。彼らは炎症を抑制し、免疫調節を介して組織再生、傷口治癒、組織再構築を促進する[185,186]。本研究の結果は、G/O(Heparin)および G/O(GFs cocktail) 処理が予防および治療グループの両方で UVB 誘導のマクロファージ発現を抑制できることを示した。G/O(Heparin)および G/O(GFs cocktail) 処理の比較では、差異は小さく、有意差はなかった。これは、マクロファージの CD68 染色が、M0 および M1 および M2 マクロファージのアクティベーション前後を含むからの可能性がある。もし G/O(GFs cocktail)処理において M2 マクロファージの数が増加した場合、CD68 の総合的な発現レベルは G/O(Heparin)処理の発現レベルに近づく可能性があると考えている。

予防グループ (Fig. 5-11 B, C)、短期治療グループ (Fig. 5-12 B, 7 C)、および長期治療グループ (Fig. 5-13 B, 8 C)では、UVB による皮膚損傷により、表皮および真皮の厚さが増加した。細胞増殖因子は真皮層を貫通する深部傷口治癒を促進できます。たとえば、EGF は真皮角質形成細胞の増殖を促進することにより、皮膚バリアの修復を実現する[187,188]。本研究では、G/O(GFs cocktail) が皮膚表面に作用すると、G/O は GF を皮膚内に送達し、皮膚再生を促進し、角質形成細胞内の炎症促進因子および増殖促進因子の分泌を抑制する。したがって、照射グループと比較して、G/O(Heparin)および G/O(GFs cocktail)投与グループでは、表皮および真皮の厚さが有意に減少した。これにより、UVB 誘導の光損傷が抑制された。

UVB による毛包の損傷に関するいくつかの研究では、紫外線は Wnt シグナル経路の発現を上昇させ、シグナル分子 Wnt10b が毛包の成長を促進することが知られている[189]。UVB は毛包サイクルを著しく延長し、これは体内の自己保護的なストレス応答と考えられている[190]。本研究では、G/O は UVB 誘発の損傷を抑制および治療したため、Wnt シグナル経路の発現が減少し、毛包の数は正常に保たれた。したがって、UVB 照射後の毛包サイクルでの著しい上昇を回避することができる。したがって、予防グループ(Fig. 5-11 D)、短期治療グループ(Fig. 5-12 D)、および長期治療グループ(Fig. 5-13 D)において、G/O(Heparin)および G/O(GFs cocktail) 投与後、毛包の数は未治療グループとほぼ同じであり、UVB 照射グループよりもはるかに低いことが示された。

脂腺は、表皮角質形成細胞と線維芽細胞との間の細胞間相互作用によって引き起こされる。したがって、表皮角質細胞と線維芽細胞の修復は皮脂腺の修復に不可欠である[13]。予防グループでは、G/O の有無にかかわらず、皮脂腺が減少したことが分かった(Fig. 5-11 E)。短期治療グループ(Fig. 5-12 E)では、G/O(GFs cocktail)処理が脂腺の数を有意に回復させた。一方、長期治療では、G/O(GFs cocktail) の状態が脂腺の修復に影響を与えなかったため、実験誤差によるものと考えられる。

5.5 本章のまとめ

この研究では、UVB に誘導された皮膚損傷、例えば紅斑、皮膚の水分減少、炎症、および表皮真皮層の増厚を、G/O の投与によって軽減できることを示した。また、G/O は UVB に誘導された毛包損傷による異常な毛包増殖を予防および治療することも示唆された。さらに、G/O は脂腺の修復の潜在能力も示した。したがって、この研究は、経皮的に GF 機能化された G/O ナノゲルの皮下移植新技術を提案し、創傷治療および再生医学の分野で重要

な意義を持っている。

第6章 増殖因子カクテル G/O の経皮送達による糖尿病褥瘡モデルの治療

6.1 本章の目的および概要

2000 年には 1.5 億人だった糖尿病患者は、2019 年には 4.6 億人と 3 倍に増加している。糖尿病の合併症では、神経障害や血液循環の悪化により、足に褥瘡ができることが多い[191]。褥瘡は、皮膚や皮下組織が長期間にわたって圧迫され、組織が損傷したり壊死したりすることで発生する。褥瘡は重症度によって分類され、ステージ 1 (皮膚の無傷の紅斑として現れる)からステージ 4 (皮膚と皮下組織の損傷を含む)までである[192]。糖尿病(高血糖)の影響は免疫細胞機能の低下、動脈硬化による血流障害、神経障害による皮膚バリア機能の低下などが創傷治癒の遅れにつながる[153]。糖尿病における創傷治癒の遅延メカニズムとして、有害な老化細胞が、血管新生と細胞再生を阻害することにより、傷の修復を阻害することを明らかにした[193]。治療には血行再建(血流を良くする治療)細胞修復などが不可欠である。そのため、増殖因子固定化した Nano gel emulsion で創傷治癒の促進し、難治性の糖尿病性褥瘡の治療法の開発が期待される。

そこで、本研究室では G/O という新たな経皮送達システムを開発した。G/O は、優れた経皮吸収性、内包した物質の生理活性の維持、徐放性が確認された。本研究では、糖尿病モデルマウスの構築を行った。また、褥瘡モデルの構築を行い、G/O による糖尿病褥瘡モデルの治療効果を検証した。

6.2 糖尿病マウスモデルの作製および褥瘡モデルの検討

6.2.1 目的

安定的な糖尿病マウスモデルの構築条件を検討する。糖尿病褥瘡モデルの作製条件を検討する。

6.2.2 実験方法

[1]クエン酸バッファの準備

0.1mol/L クエン酸は 21.01 g のクエン酸一水和物 (Citric Acid Monohydrate, $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, CAS No. 5949-29-1) を 800 mL の精製水に溶解し、精製水で全量を 1L にする。0.1 mol/L クエン酸ナトリウムは 29.41 g のクエン酸三ナトリウム二水和物 (Trisodium Citrate Dihydrate, $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$, CAS No. 6132-04-3) を 800 mL の精製水に溶解し、精製水で全量を 1L にした。室温か冷蔵で保管した。0.1 mol/L クエン酸と 0.1 mol/L クエン酸ナトリウムを下表 Table 6-1 に従って混合した。

Table 6-1 The composition of citrate buffer solution

pH	0.1mol/L citric acid mL	0.1mol/L sodium citrate mL
4.2	49.5	50.5

[2]糖尿病マウスモデルの作製

糖尿病マウスを誘導する方法は、一般的に以下の方法が使用される。

- 1: 化学的誘導:ストレプトゾトシン (STZ): STZ は糖尿病を誘導するために広く使用される化学物質である。STZ は高用量で単回または複数回投与され、膵島の β 細胞を破壊し、インスリン産生を減少させる。
- 2: 遺伝子操作:遺伝子組み換えマウス: 特定の遺伝子変異を導入することによって、糖尿病のモデルマウスを作成することができる。
- 3: 栄養制御:高脂肪食または高糖食: 高脂肪食や高糖食をマウスに与えることにより、肥満や2型糖尿病を誘導することができる。

STZ は膵島 β 細胞の迅速かつ不可逆的な細胞壊死を引き起こすため、1型糖尿病の実験的動物モデルを作製するのに広く使用される。操作が簡単で、薬物用量が少なく、膵島 B 細胞を特異的に損傷し、薬物毒性が低い等のメリットも有する。本検討では STZ 投与量の最適化検討を行なった。腹腔に低用量の STZ 注射して構築することを目指した。

Table 6-2 に注射条件を示した。No treatment、クエン酸緩衝液のみ、STZ in クエン酸緩衝 20、40 および 80 mg/kg(STZ の質量/マウスの体重)STZ の投与条件で検討を行った。

マウス(ICR、雄、7週齢)を 10-12 時間断食させた後、STZ in クエン酸緩衝液を腹腔内投与した。動物を保定し、刺入部位を消毒し注射針を刺入した。注射針(26 G)を皮下に 5 mm ほど進めた後注射針を立てて、腹腔内に針を進めた(二段階穿刺 **Fig. 6-1**)。内筒を引いて血液や黄褐色の液体(腸管内容物)などが入ってこないことを確かめてから薬液を注入し、針を回転させながら皮膚から抜いた。Day 3 に繰り返し注射を行なった。毎週断食後の体重、血糖を測定した。糖尿病モデル作製における目標は、グルコース値が 350 mg/dL 以上に維持していること、死亡率が低いこと、モデル化成功率が高いことである。床敷きや水入れを UV で消毒した。オートクレーブ処理した水道水および十分な量のえさを与えた。

Table 6-2 Injection condition

Injection condition (n=3)
Control
0.1mol/L sodium citrate buffer(SCB) (PH 4.2)
STZ in SCB (PH 4.2) 20 mg/kg
STZ in SCB (PH 4.2) 40 mg/kg
STZ in SCB (PH 4.2) 80 mg/kg

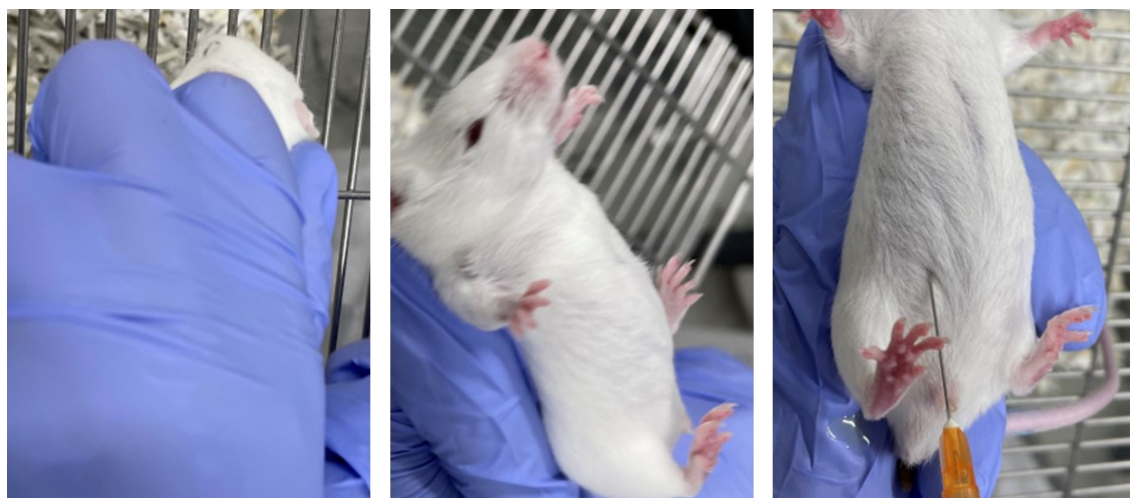


Fig. 6-1 Abdominal manipulation

[3]血糖値の測定

尾部から採血し、血糖値を測定した(**Fig. 6-2**)。具体的には、麻酔下にて実施し、尾根部から先端に向かってアルコール綿で尾をよくこすった。乾燥したガーゼでアルコールをよく拭きとり、尾の先端から 1 mm 部分の左右いずれかをカミソリで切った。手で血液を絞り出し、横からセンサーに血液 1 滴(> 0.4 μ L)をつけ、血糖値を測定した。

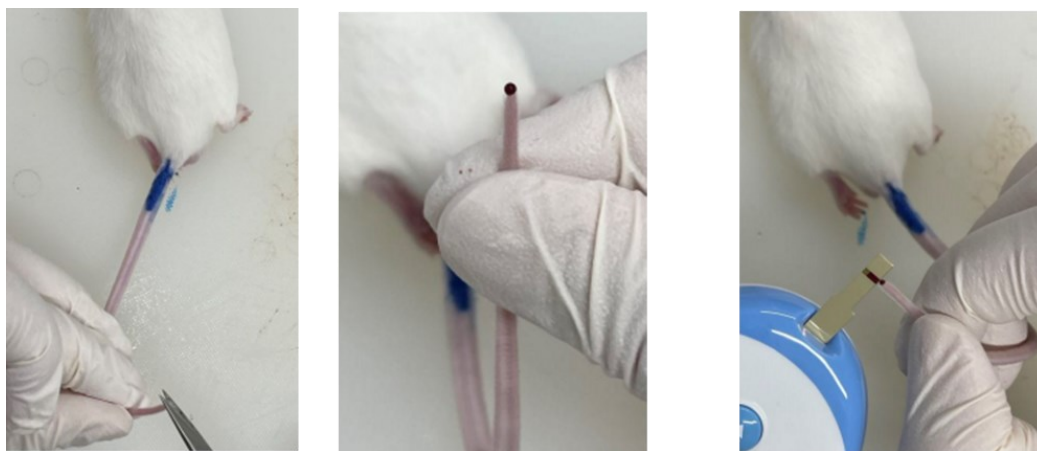


Fig. 6-2 The operation of blood glucose measurement.

[4]褥瘡モデルの作製

カミソリでマウス背中の毛を除去した。背中の両側皮膚をつまんで、2 つの磁石 (ネオジム磁石 $\phi 12 \times 1.5$ NE059 , 61-9934-04 0.02N) で 両側から挟んで 12 時間圧迫、12 時間解放を三回繰り返した。

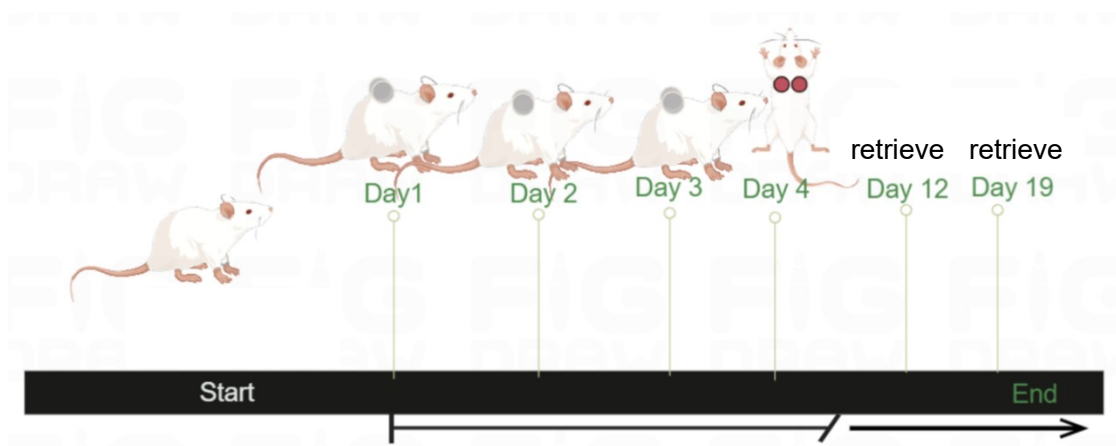


Fig. 6-3 Creation of a pressure ulcer model and detailed experimental schedule.

[5] 免疫組織化学(IHC)

皮膚標本は 10% のホルマリン中性緩衝液(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)で固定され、パラフィンに埋め込まれた。H&E 染色およびマッソントリクローム(MT)染色を行い、皮膚組織断片の解析を行った。また、CD31、CD68 (Abcam) の IHC を行い分析した。

[6] 遺伝子発現解析(RT-qPCR)

回収した皮膚試料からスピнкаラム(NucleoSpin RNA; Macherey-Nagel, Düren, Germany)を使用して Total RNA を抽出した。Total RNA から cDNA 逆転写キット(High capacity cDNA reverse transcription kit, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)を使用して cDNA を合成した。サンプルは PCR 処理まで -30°C で保存された。QuantStudio™3 リアルタイム PCR システムと TaqMan Gene Expression Assay Kit(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)を使用して PCR を行った。反応混合物には、 $1\ \mu\text{L}$ の cDNA サンプル、 $5\ \mu\text{L}$ の TaqMan Fast Advanced Master Mixsolution、および $4\ \mu\text{L}$ の Nuclease-free water が含まれており、これらは TaqMan Gene Expression Assay プローブで事前にディスペンスされたプレートに配置した(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)。40 回の増幅サイクルは、 95°C で 1 秒、 60°C で 20 秒で構成された。遺伝子発現レベルを定量するために比較サイクルタイム($\Delta\Delta\text{CT}$)法が使用された。発現レベルは Gapdh で正規化され、健康の皮膚の正常な動物をキャリブレーションサンプルとして使用した。

[7] 酵素連結免疫吸着法(ELISA)解析

創傷部および創傷周囲の背中の皮膚を回収し、 $600\ \mu\text{L}$ の PBS 溶液中で切り刻んだ。断片と溶液を遠心チューブに移し、 $300\times g$ で 5 分間遠心分離した。上清液を採取し、解析まで -80°C で保存した。IL-6、bFGF、および TGF- β 1 の濃度を、ELISA キット(R&D Systems)を使用して測定した。これらの炎症性サイトカインの濃度は標準曲線との相関から計算され、結果を上清液の体積当たりのサイトカインの量(pg)で表した。

6.2.3 結果および考察

80 mg/kg 群以外のグループは糖尿病の症状がなく、血糖値が 80-130 mg/dL の正常範囲内であった。80 mg/kg 群のマウスは、**Fig. 6-4 A** で体重が減少した。**Fig. 6-4 B** において 80 mg/kg 群のマウスは注射後 2 週間で血糖値の上昇を確認した。23 日時点で二匹のマウスの血糖値が回復した。さらに、STZ による膵島破壊グループでは、膵島から既存の大量のインスリンが放出され、短期的に血糖値が下がった[194]。その後、80 mg/kg 群の 3 匹のマウスはすべて 600 mg/dL を超える血糖値を維持した。これは、2 ヶ月にわたって血糖値が維持されていた。糖尿病マウスの死亡は発生しておらず、モデリング成功率は 100%であった。

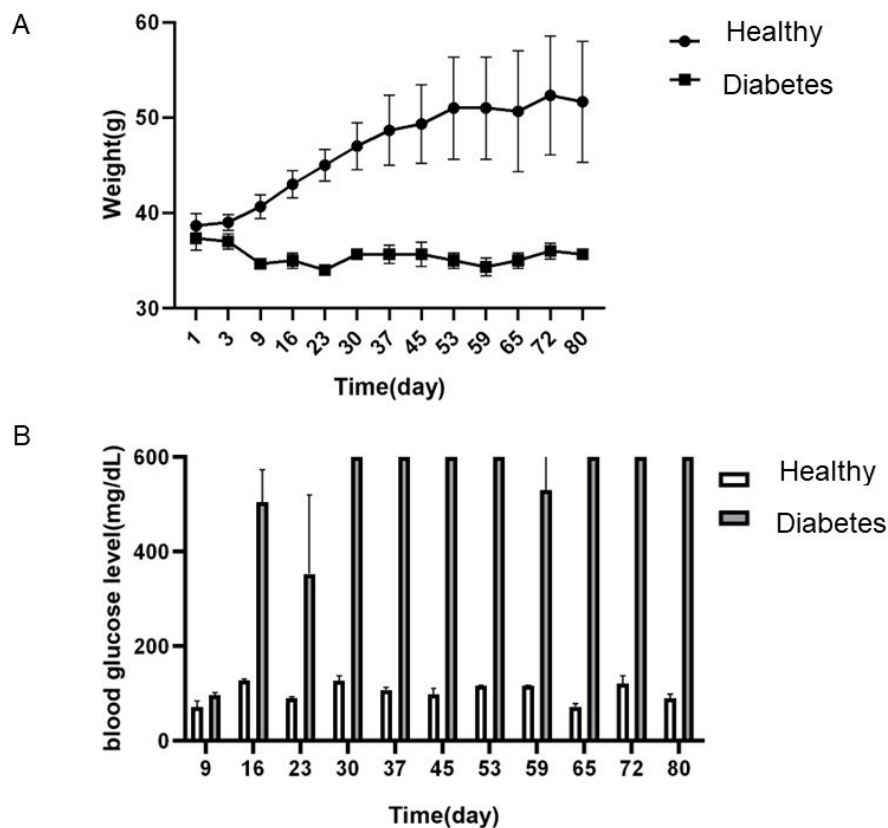


Fig. 6-4 Changes in body weight and blood glucose level with time in experimental mice.

A: Body weight. B: Blood glucose level. Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation. n = 4.

Fig. 6-5 A に褥瘡モデルの時間経過の結果を示した。正常マウスの褥瘡モデル条件では、かさぶたの形成が観察された。その後、かさぶたの組織が徐々に収縮し、18 日目には自然に脱落が観察された。一方、糖尿病マウスの褥瘡モデル条件では、時間の経過とともに皮膚の色が徐々に濃くなり、かさぶたの形成は観察されなかった。マウスの褥瘡の面積を測定したところ、褥瘡形成後の最初の 12 日間では、両条件の面積差はほとんどなかった (**Fig. 6-5 B**)。しかし、13 日目以降、通常のマウスの損傷面積は明らかに減少し、糖尿病マウスの褥瘡面積は明らかな変化が見られなかった。この結果から、通常のマウスの傷口の自己治癒能力が糖尿病マウスよりも高いことが示された。

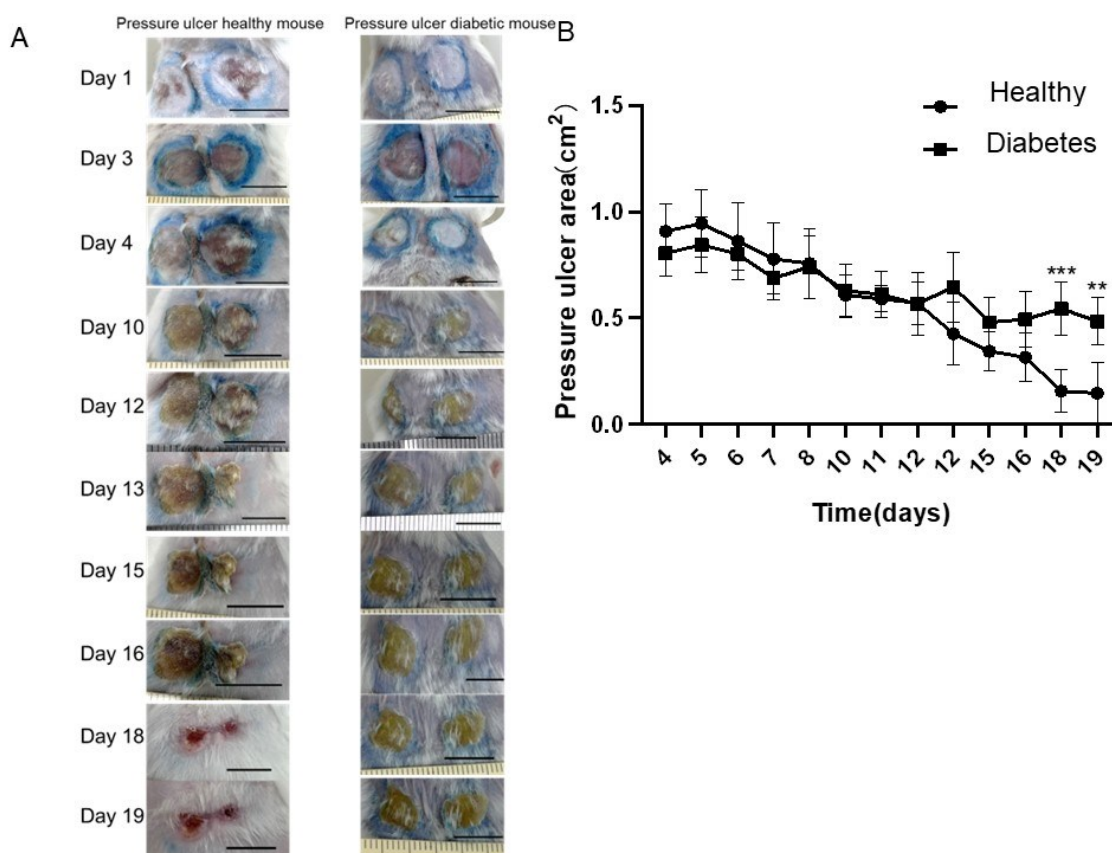


Fig. 6-5 Evaluation of the self-healing of pressure sores in healthy mice and diabetic mice.

A: The representative photos of the skin wounds at different time point.

B: Quantitative analysis of pressure ulcer area with time. Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation. $n = 2$, $**p < 0.01$, $***p < 0.005$. Scale bars: 10 mm.

Fig. 6-6 で H&E 染色の画像と定量分析の結果を示した。**Fig. 6-6 A** の染色写真から、正常褥瘡モデルと糖尿病性褥瘡モデルの両方で、褥瘡部位の皮膚構造が破壊されていることが観察された。糖尿病性褥瘡モデルでは、褥瘡の周辺の皮膚で毛包と血管の数が明らかに減少し、線維芽細胞の数も減少する。正常褥瘡モデルでは皮膚の付属器官が観察された。続いて、皮膚組織の定量分析を行った。

Fig. 6-6 B で褥瘡部位の皮膚厚さを示した。正常褥瘡と糖尿病マウスの褥瘡モデルの両方で、Day 12 から Day 19 まで褥瘡部位の皮膚厚さが増加していることが観察された。Day 12 から Day 19 までの真皮の厚さには大きな変化は見られなかったが、正常のマウスの褥瘡モデルでは健康なマウスの皮膚よりも真皮の厚さが高いことが観察され、一方で糖尿病マウスの褥瘡モデルは全体的に健康なマウスの真皮の厚さよりも低いことが示された(**Fig. 6-6 C**)。

表皮の厚さの結果から、褥瘡モデルの表皮の厚さは通常のマウスの表皮よりも厚いことが示された。Day 12 から Day 19 まで、糖尿病性褥瘡モデルでは表皮の厚さが減少しており、一方、通常のマウスの褥瘡モデルでは明らかな変化は見られなかった(**Fig. 6-6 D**)。

健康なマウスの褥瘡モデルでは毛包の数が健康なマウスの皮膚の毛包の数よりも多く、糖尿病マウスの褥瘡モデルでは毛包の数が最も少ないことが観察された。さらに、Day 12 から Day 19 まで、毛包の数に一定の増加が見られた(Fig. 6-6 E)。

褥瘡の条件下での皮脂腺の数は健康な皮膚よりも少なく、通常のマウスの褥瘡モデルでは糖尿病マウスの褥瘡モデルよりも高いことが示された(Fig. 6-6 F)。

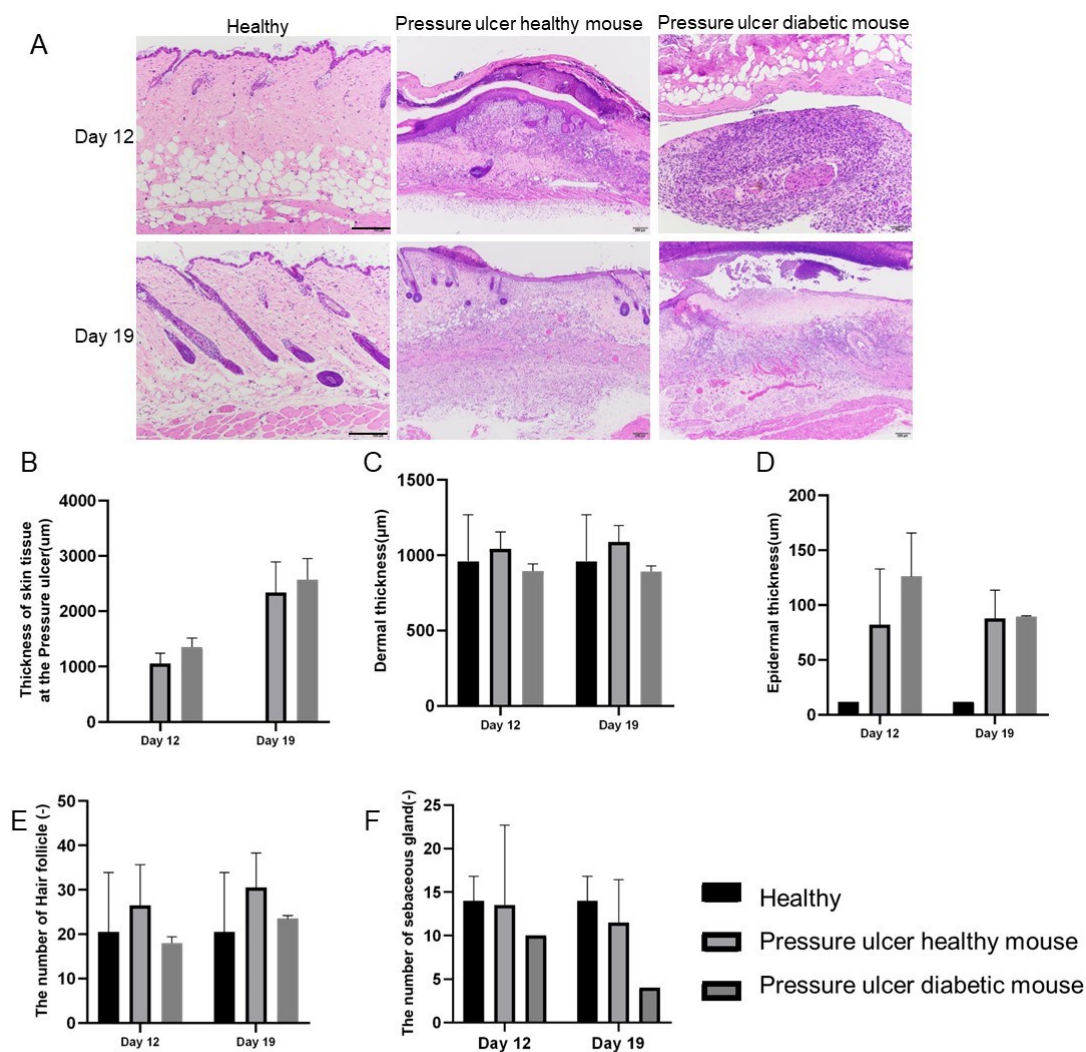


Fig. 6-6 Temporal changes of skin structure in pressure sore mice. A: Histological evaluation with H&E staining. **B:** Thickness of skin tissue at the pressure ulcer. **C:** Dermal thickness. **D:** Epidermal thickness. **E:** The number of Hair follicle. **F:** The number of sebaceous gland. Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation. $n = 2$, $*p < 0.05$. Scale bars: 200 μm .

Fig. 6-7 A の結果では、青い染色はコラーゲンを示す。健康皮膚と比較して、褥瘡モデル

ではコラーゲンの密度が低く、染色の色が薄く、コラーゲンの配列が乱れている。視覚的には、糖尿病モデルでは青色の深さと分布エリアが通常のマウスの褥瘡モデルよりも低いように見受けられた。

Fig. 6-7 Bでは、画像解析に基づくコラーゲン含有量の解析結果を示す。正常褥瘡モデルのコラーゲン含有量は健康なマウスの皮膚よりも低かった。Day 12 の段階では、正常マウスの褥瘡モデルは回復中に既に一部の自己修復能力を示している可能性があり、そのため Day 12 から Day 19 までの間にコラーゲン含有量に顕著な差が見られなかった。しかし、糖尿病では自己治癒能力が低いため、Day 12 から Day 19 までの間にコラーゲン含有量が増加する傾向が見られたが、全体的なコラーゲン含有量は通常のマウスの褥瘡モデルよりも低いままであった。

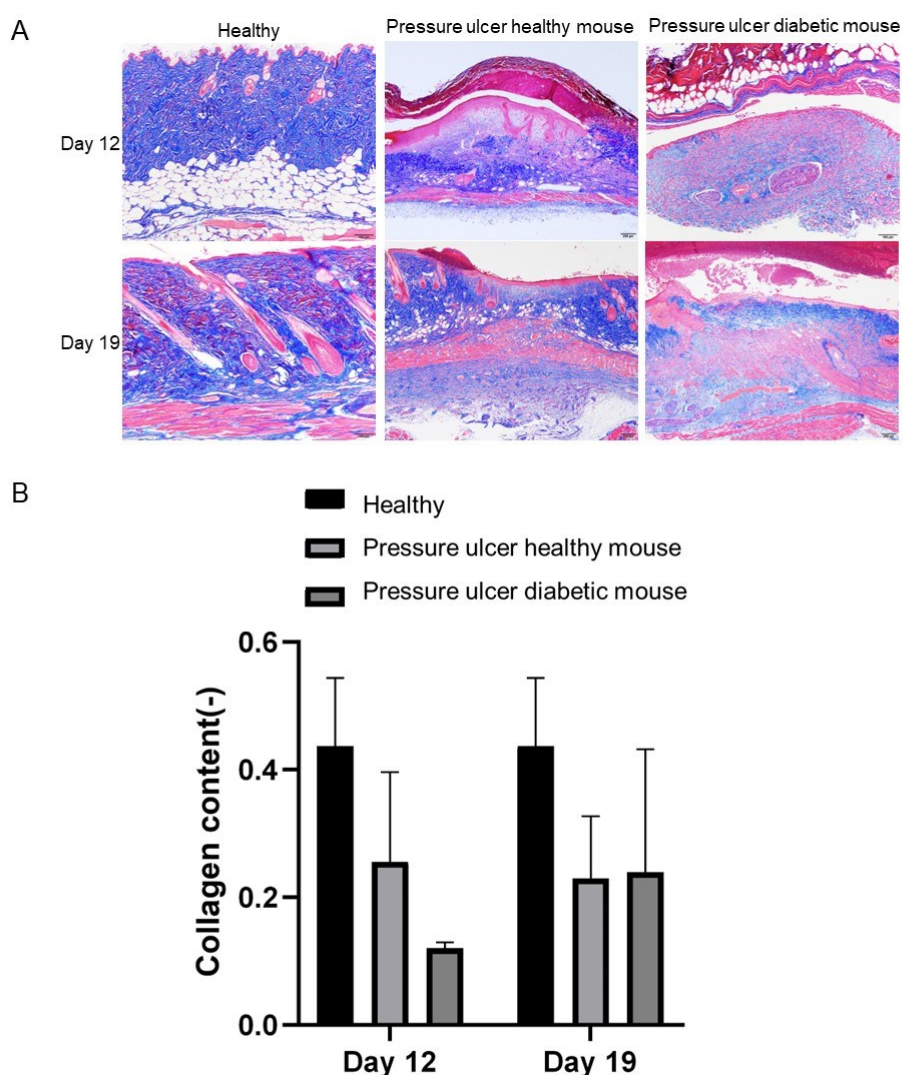


Fig. 6-7 Histological evaluation with Masson's trichrome staining. **A:** Skin collagen density. **B:** The content of collagen protein. Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation. $n = 3$, $*p < 0.05$. Scale bar: 200 μm .

CD68 の結果を見ると(**Fig. 6-8**)、Day 12 から Day 19 まで、正常褥瘡モデルでは CD68 のレベルが低下した。Day 19 までに、通常のマウスの褥瘡モデルの CD68 レベルは健康なマウスの皮膚に近づいた。一方、糖尿病マウスでは CD68 レベルが増加し続けており、これは糖尿病マウスの慢性的な炎症の特徴に起因する可能性がある。全体的に、糖尿病性褥瘡マウスの CD68 の発現は通常の褥瘡モデルのものよりも高かった。

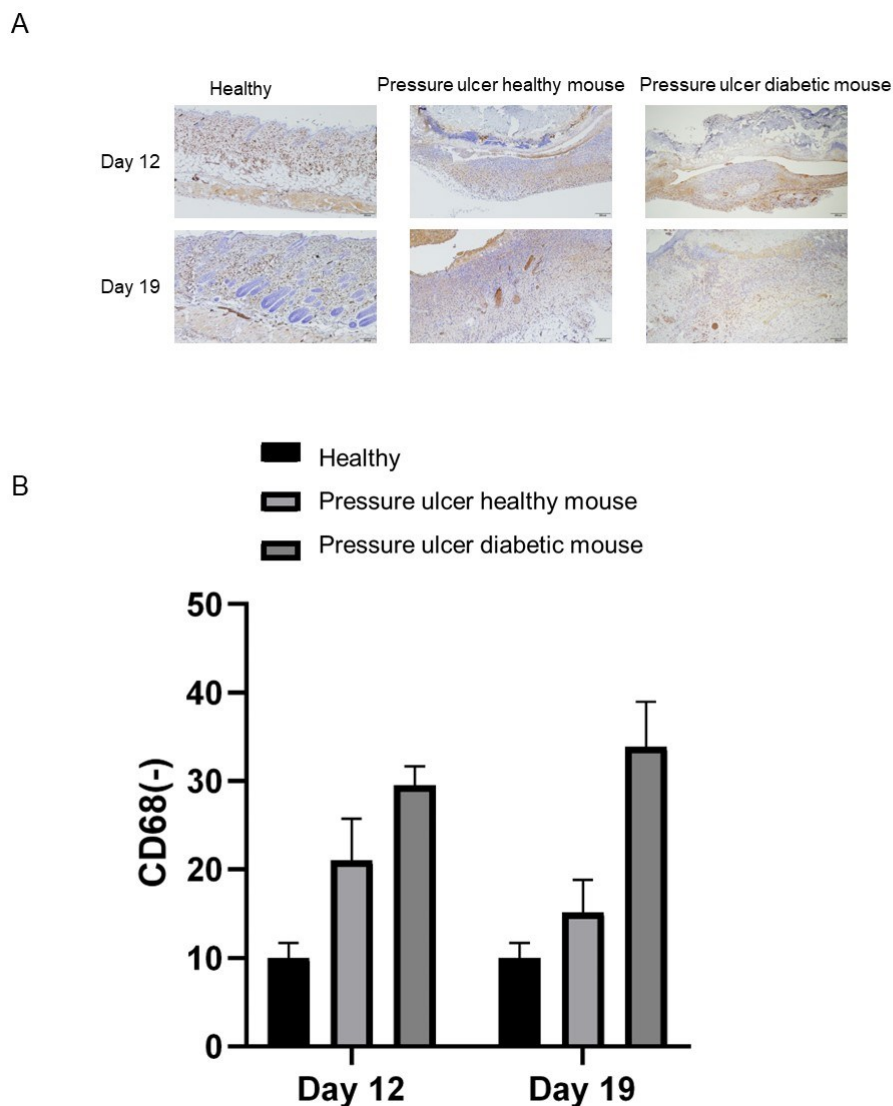


Fig. 6-8 CD68 staining of the mouse dorsal skin tissue. A: The skin tissues. B: The number of CD68. Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation. $n = 3$, $*p < 0.05$. Scale bars: 200 μ m.

CD31 は主に血管内皮細胞と血小板(血小板ディスク)で発現する細胞膜タンパク質であり、血管内皮細胞のマーカーとして広く使用される。CD31 の結果から(**Fig. 6-9**)、褥瘡モデルでは CD31 の発現が健康な皮膚よりも高い。Day 12 から Day 19 まで、正常なマウスの褥瘡モデルと糖尿病マウスの褥瘡モデルの両方で CD31 の発現が減少した。ただし、正常なマウスの褥瘡モデルでの減少幅は糖尿病マウスのモデルよりも大きかった。

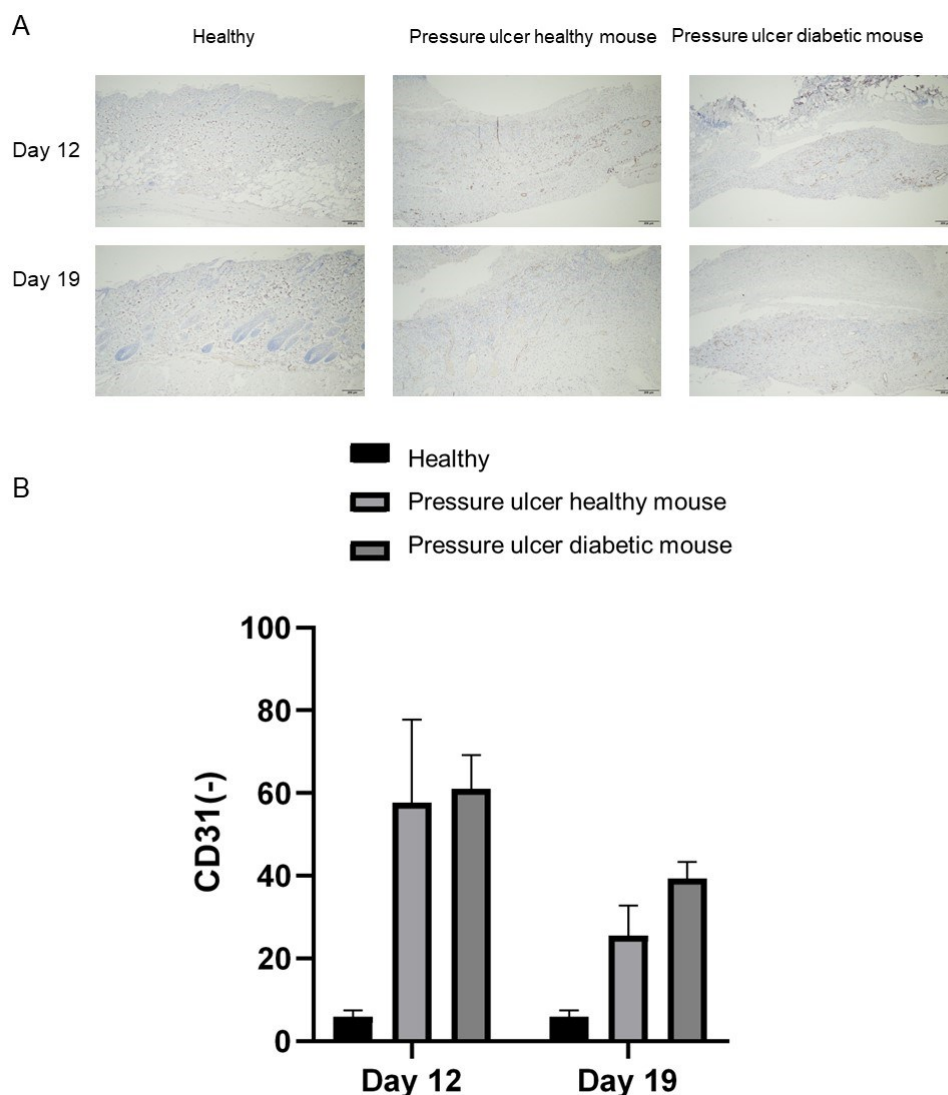


Fig. 6-9 CD31 staining of the mouse dorsal skin tissue. A: The skin tissues. B: The number of CD31. Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation. $n=3$, $*p < 0.05$. Scale bars: 200 μm .

Fig. 6-10 は皮膚の炎症因子と血管因子の RT-qPCR 結果である。IL-6 の結果(**Fig. 6-10 A**)によれば、健康の皮膚と比較して、正常な褥瘡モデルと糖尿病褥瘡モデルの IL-6 遺伝子発現が上昇した。時間の経過と共に、褥瘡モデルでは IL-6 の減少が観察されたが、正常なマウスの方が糖尿病患者の方が減少が大きいかった。これは糖尿病患者の代謝異常が長期間続いているため、炎症細胞のアポトーシスが遅れ、全身的な低レベルの炎症を引き起こす可能性がある。

bFGF は血管新生に関連する因子で、遺伝子発現の結果(**Fig. 6-10 B**)から、正常なマウスと褥瘡モデルのマウスを比較すると、Day 12 では両条件で差がなかったが、Day 19 では褥瘡モデルのマウスの bFGF の発現量が正常なマウスよりも低いことが確認された。これは、糖尿病モデルのマウスの血管修復能力が正常なマウスよりも低いことを示唆された。

TGFb1 の発現は、正常な褥瘡モデルと糖尿病褥瘡モデルの両方で上昇し、Day 12 から Day 19 までの期間で上昇が観察された(Fig. 6-10 C)。

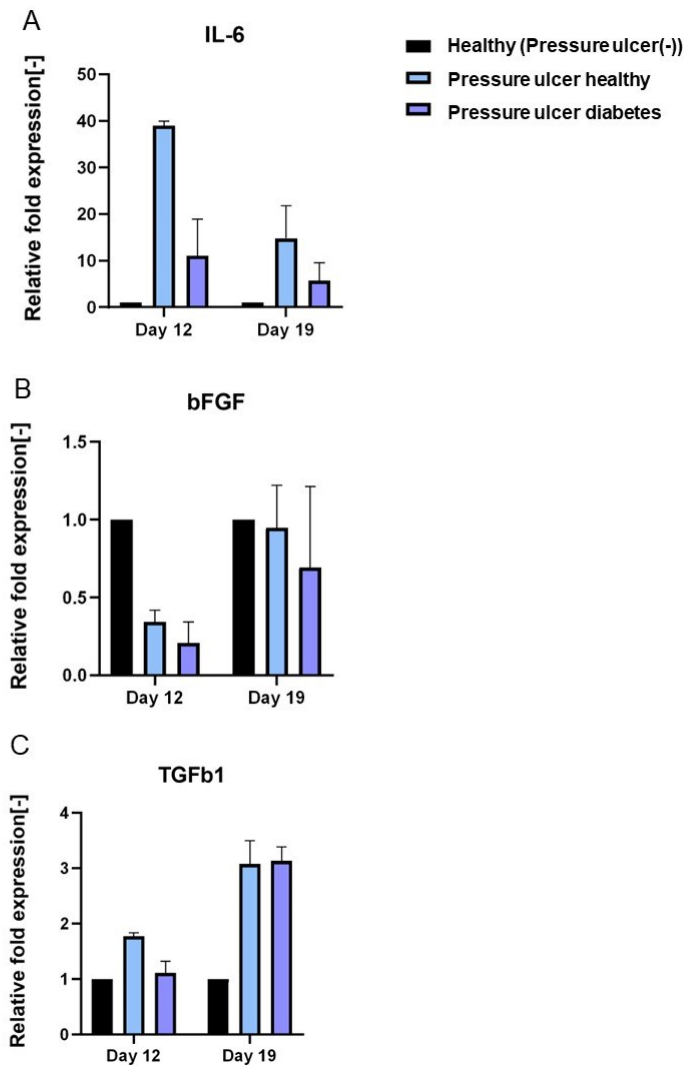


Fig. 6-10 The expressions of IL-6, bFGF and TGFb1 purified from the skin wound tissue were determined by RT-qPCR. A: IL-6. B: bFGF. C: TGFb1. Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation. n=2.

Fig. 6-11 は皮膚均質組織の ELISA 結果である。Day 12 から Day 19 の期間中、褥瘡条件下での炎症因子 IL-6 の分泌が増加傾向を示し、糖尿病マウスの IL-6 値が正常な褥瘡マウスよりも高いことが示された(Fig. 6-11 A)。

bFGF に関しては、結果(Fig. 6-11 B)から、Day 12 から Day 19 までの期間で、正常なマウスの褥瘡モデルの bFGF が上昇傾向にある。一方、糖尿病の褥瘡モデルでは bFGF の分泌が減少傾向にあることが示された。正常なマウスは血管修復能力を示した。一方、糖尿病マウスは bFGF の分泌が減少しており、血管修復が行われていないことが示唆された。

TGFb1 に関しては、結果(Fig. 6-11 C)から褥瘡モデルでは TGFb1 が正常なマウスよりも高く、TGFb1 の増加が観察されたが、糖尿病の増加は顕著ではないことが示された。モデルでは TGFb1 が正常なマウスよりも高く、TGFb1 の増加が観察された。

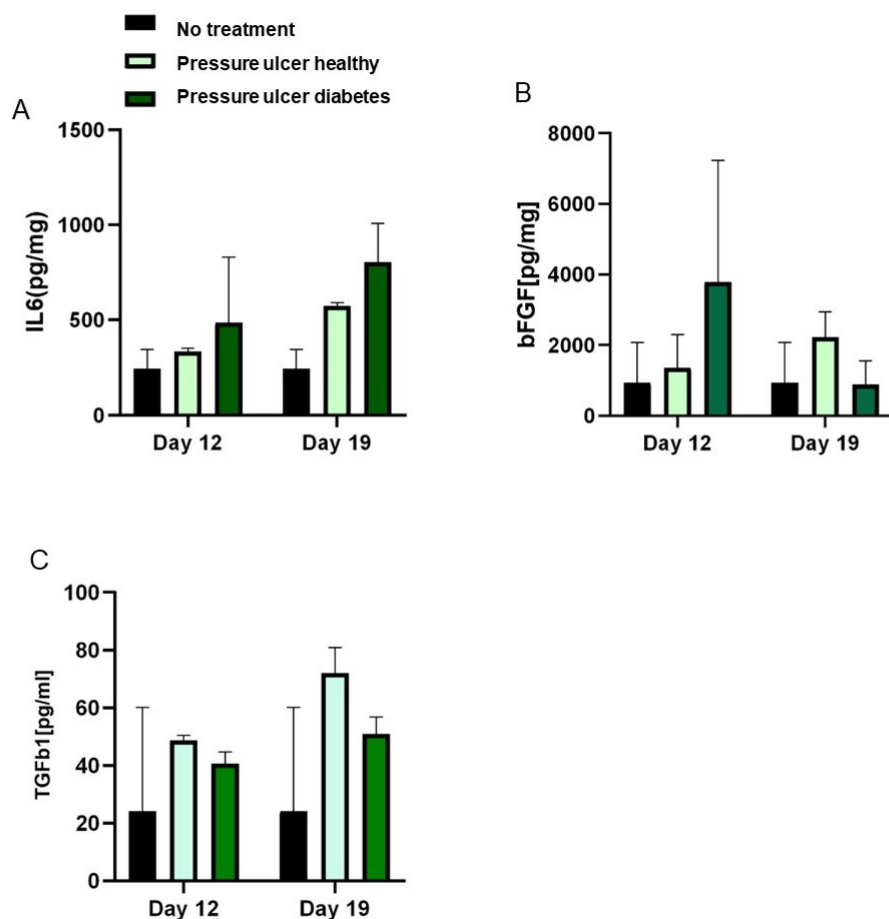


Fig. 6-11 Levels of cytokines in wound homogenates measured using ELISA, including A: IL-6, B: bFGF and C: TGFb1. Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation. n=2.

6.2.4 本節のまとめ

80 mg/kg の投与で糖尿病症状が現れ、血糖値が 2 ヶ月以上 600 mg/dL 以上を維持した。モデルの死亡はなく、モデリング成功率は 100% だった。糖尿病モデルでは健康なモデルよりも治癒が遅れた。糖尿病モデルでは皮膚組織の損傷が顕著で、毛包や血管の減少が観察された。モデルでは皮膚組織の褥瘡部位の皮膚厚さが増加し、コラーゲン密度が低下。糖尿病モデルでは炎症マーカー(CD68)が正常マウスよりも高く、血管新生(CD31)が低下す

ることが示唆された。IL-6 および TGF- β 1 の発現が増加し、bFGF の発現が低下、IL-6 分泌が増加し、糖尿病モデルでは bFGF の分泌が減少することが示唆された。糖尿病褥瘡の損傷面積の減少が遅い、M1 が長期間的に存在する、また、ラーゲンの含有量が低下、血管の自己修復能力が低いことが示唆された。これは糖尿病性創傷の特徴と一致する。

6.3 増殖因子カクテル G/O の経皮送達による糖尿病褥瘡モデルの治療

6.3.1 目的

難治性糖尿病性慢性潰瘍は、多くの糖尿病患者にとって破壊的な疾患であり、その罹患率と発症率は増加している。難治性糖尿病性慢性潰瘍の複雑な病理生理学的環境は、有効な治療法を見つけることを難しい。局所生体材料の利用が注目されている。ここでは、増殖因子を局所的に透皮的に投与できる G/O を提供し、正常のマウスの床ずれ傷と糖尿病のマウスの床ずれ傷にそれぞれ治療を行い、マクロな外観と床ずれ面積の変化を観察した。皮膚の組織切片から皮膚の構造とコラーゲンの変化を観察した。免疫染色切片から CD68 および CD31 のレベルを測定した。RT-qPCR および ELISA を使用して IL-6、bFGF、および TGF β 1 の発現と合成を分析した。

6.3.2 実験方法

6.2.2[1]-[7]と同様の方法で実験を実施した。

[8]増殖因子カクテルの G/O の作製

50 mM MES buffer にヘパリン、EDC、NHS を質量比でそれぞれ 10 : 10 : 6 となるように添加し(ボルテックス)、ヘパリン濃度が 10 mg/mL のヘパリン/EDC/NHS 溶液を作製後、30 分間冷蔵庫内で静置した。IPM に ER-290 を 50 mg/mL となるように溶解させた。PBS[-]1.8 mL にゼラチン粉 0.105 g をインキュベーター内で溶解させた(架橋剤を加えたときにゼラチンが終濃度 5%となるようにした)。超音波処理の直前に増殖因子(VEGF、EGF、bFGF、TGF β 1、IGF- α 、PDGF)を水相に添加し十分にピペッティングを行った。油相 2000 μ L と水相 1000 μ L を混合した(水相 : 油相 = 1 : 2)。超音波ホモジナイザー(Sonifier 250, Branson Ultrasonics Co., Danbury, CT, USA)を用いて 3 分間処理した(Duty cycle: 70%, Output control: 7, インターバル : 30 秒間)。4°C下で冷却した。

[9]褥瘡マウスの治療

増殖因子固定化 G/O をサンプルチューブに当量ずつ分け、5000 rpm で 7 分間遠心分離した後、上澄み液を 200 μ L 吸引除去した。2.5 $\times$ 3.0 cm²に切った滅菌済みガーゼを医療用テープの中央に固定し、抗菌剤(フェニバックス、5 mg/mL)を含んだ滅菌水約 250 μ L を染み込ませ、作製した G/O をガーゼに塗布した。マウスの背中にサージカルテープを巻き、その上から粘着性布伸縮包帯で巻き付けた。3 日後に塗布の作業を繰り返した。G/O 治療 7 日後の褥瘡の皮膚を回収した。皮膚中のサイトカインを評価するために ELISA および RT-qPCR を行った。各条件の経皮投与を行ったヘアレスマウスの塗布部位(背中皮膚)を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液で組織を固定した(過固定防止のため固定後 PBS で置換

した)。その際、摘出した皮膚が丸まらないように、発砲スチロールの台座に待ち針で 3 または 4 隅刺した状態で浸した。免疫染色(CD31、CD68)とマッソントリクローム染色と H&E 染色を行なった。

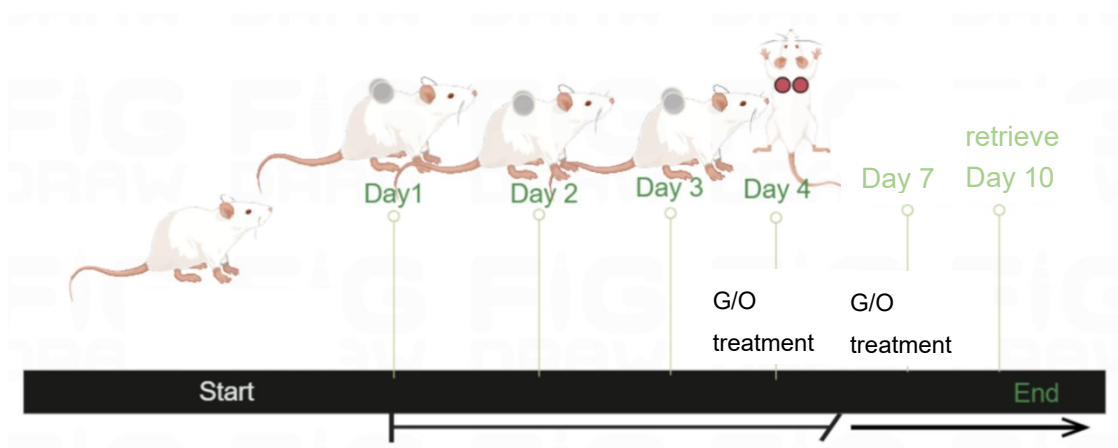


Fig. 6-12 Creation of a pressure ulcer model and detailed experimental schedule.

Table 6-3 Experimental conditions

	G/O application	
Healthy mouse	a -	
Pressure ulcer healthy mouse	b -	c +
Pressure ulcer diabetic mouse	d -	e +

6.3.3 結果および考察

増殖因子カクテル G/O の慢性の褥瘡に対する修復効果を研究するために、通常のマウスの褥瘡モデルと糖尿病のマウスの褥瘡モデルを使用して実験を行った。マウスは 5 つのグループに分けられ、健康なマウスの皮膚を対照群として使用した。残りのマウスを通常のマウスの褥瘡群(未治療)、通常のマウスの褥瘡モデル(G/O 治療)、糖尿病のマウスの褥瘡モデル(未治療)、および糖尿病のマウスの褥瘡モデル(G/O 治療)に分類した。治療後の 4 日、7 日、および 10 日に写真を撮影してこれらのグループの傷の治癒進行を記録した。未治療の褥瘡グループと比較して、G/O 治療グループでは褥瘡のサイズが小さくなったことが観察された(Fig. 6-13 A)。褥瘡の面積の結果(Fig. 6-13 B)から、糖尿病性褥瘡(治療なし)の面積の減少能力が最も低かった。正常褥瘡と糖尿病の褥瘡において、G/O 治療条件下で傷の面積の治癒率が約 50%に達した。

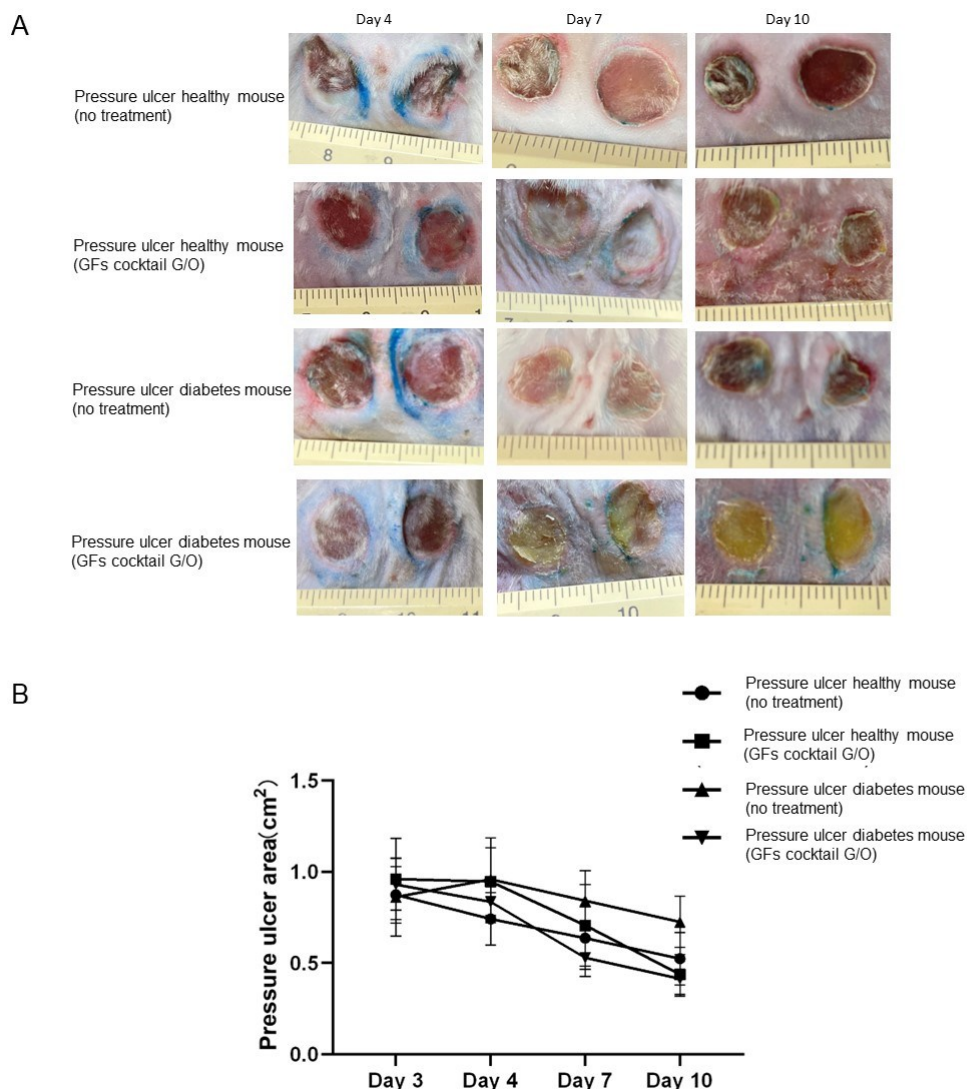


Fig. 6-13 Evaluation of chronic wound healing in different groups. A: The representative photos of the skin wounds during the treatment. B: Quantitative analysis of the wound closure under different conditions. Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation. $n = 3$.

H&E 染色を通じて、褥瘡の治癒の病理学的変化、皮膚構造と皮膚付属器官の定量評価を行なった(**Fig. 6-14**)。褥瘡状態の厚さは増加し、G/O 治療された条件では未処理条件と比較して褥瘡部位の皮膚の厚さが増加した。ただし、糖尿病のマウスの褥瘡条件の総厚さは正常マウスの褥瘡モデルよりも低かった(**Fig. 6-14 B**)。真皮と表皮の厚さは、未治療グループと比較して、G/O 治療の Pressure ulcer healthy mouse(GFs cocktail G/O)および Pressure ulcer diabetic mouse(GFs cocktail G/O)の条件で減少した(**Fig. 6-14 C D**)。 Pressure ulcer healthy mouse(GFs cocktail G/O)の毛包数は、未治療の Pressure ulcer healthy mouse(No treatment)と比較して増加したが、Pressure ulcer diabetic mouse(GFs cocktail G/O)は Pressure ulcer diabetic mouse(No treatment)と比較して減少した(**Fig. 6-14 E**)。脂腺に関して、Pressure ulcer healthy

mouse(GFs cocktail G/O)および Pressure ulcer diabetic mouse(GFs cocktail G/O)の両方が未治療の褥瘡条件と比較して減少した(Fig. 6-14 F)。

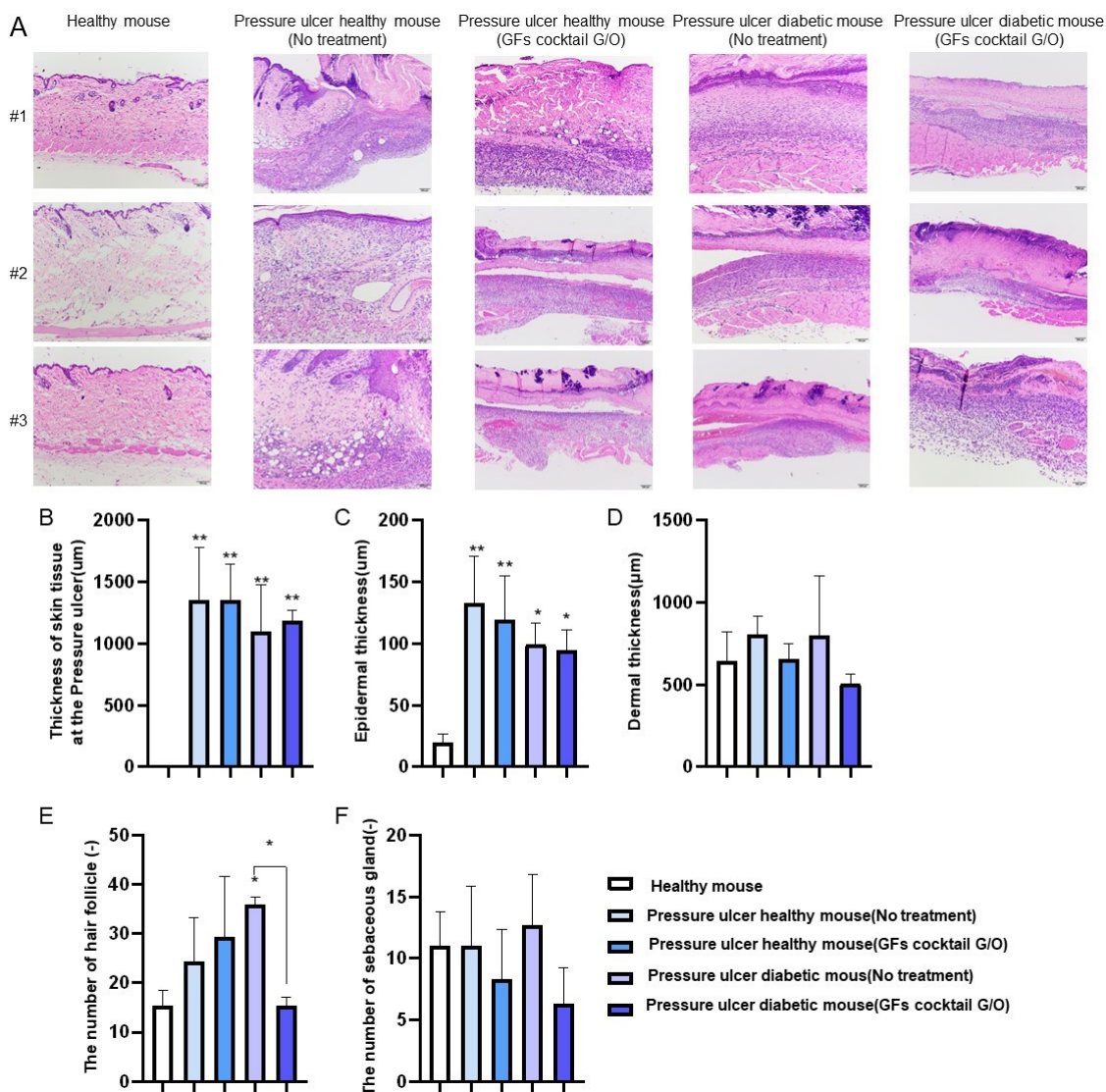


Fig. 6-14 Temporal changes of skin structure in pressure sore mice. A: Histological evaluation with HE staining. B: Thickness of skin tissue at the pressure ulcer. C: Dermal thickness. D: Epidermal thickness. E: The number of hair follicle. F: The number of sebaceous gland. Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation. $n = 2$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Scale bars: 200 μm .

マッソントリクローム染色の写真から褥瘡モデルではコラーゲンの配置が乱れ、変形し、減少した(青色が薄い)(Fig. 6-15 A)。コラーゲン含有量の結果を見ると(Fig. 6-15 B)、正常マウスおよび糖尿病のマウスの褥瘡モデルの両方で、G/O 治療群のコラーゲン含有量は未治療群よりも高かったことから、増殖因子G/Oが皮膚のコラーゲン修復に対する効果があり、難治性の皮膚損傷にも修復効果があることが示唆された。

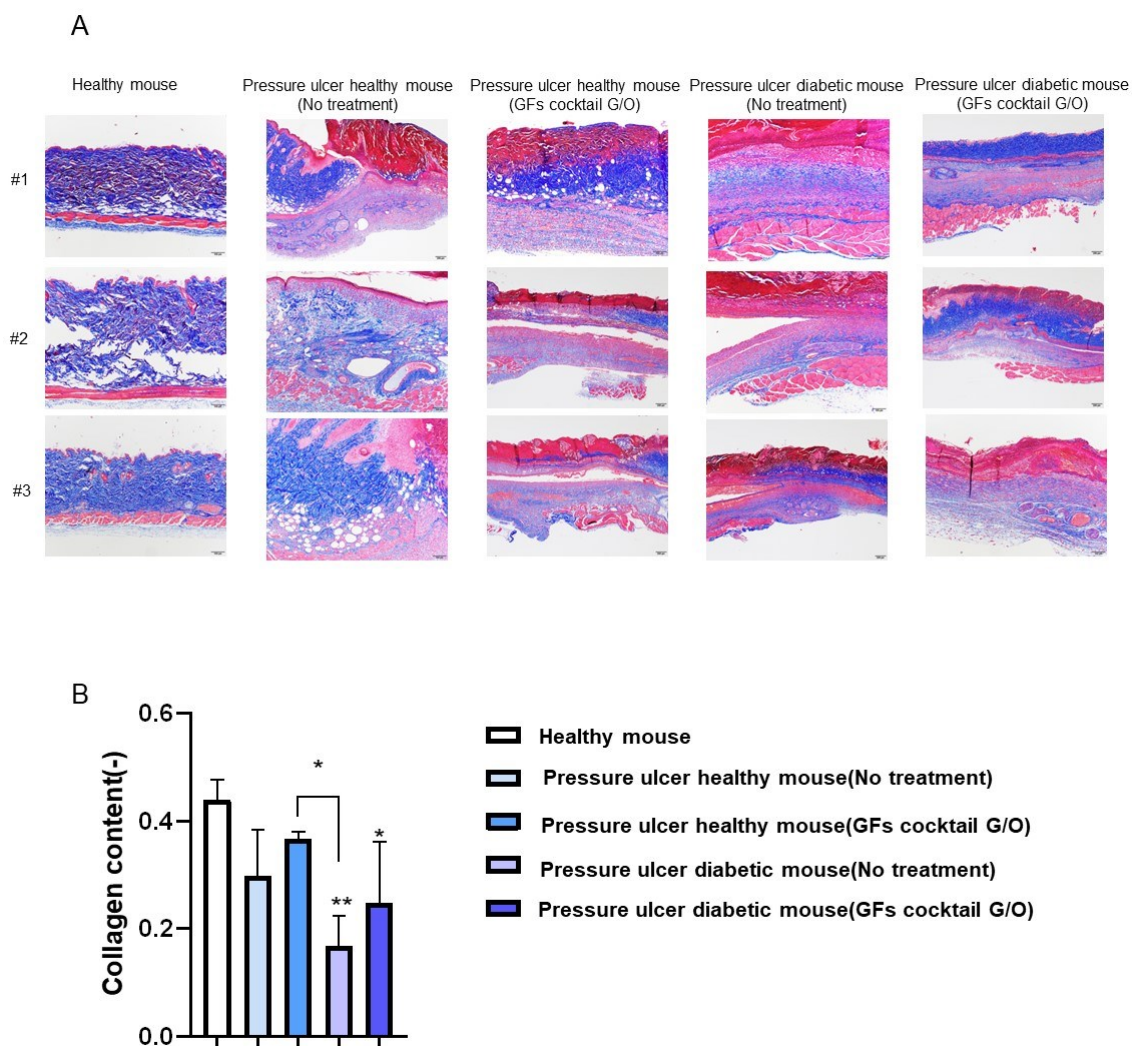


Fig. 6-15 Histological evaluation with Masson's trichrome staining. **A:** the skin tissues.

B: The content of collagen protein. Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation. $n = 3$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Scale bars: 200 μm .

Fig. 6-16 で、G/O の治療条件が正常および糖尿病マウスの褥瘡モデルの傷口領域における CD68 のレベルを示した。褥瘡マウスでは CD68 レベルが正常なマウスの健康な皮膚と比較して明らかに増加した。それぞれの未治療の対照と比較して、G/O 治療グループでは CD68 レベルが低下していることが示された(**Fig. 6-16 B**)。

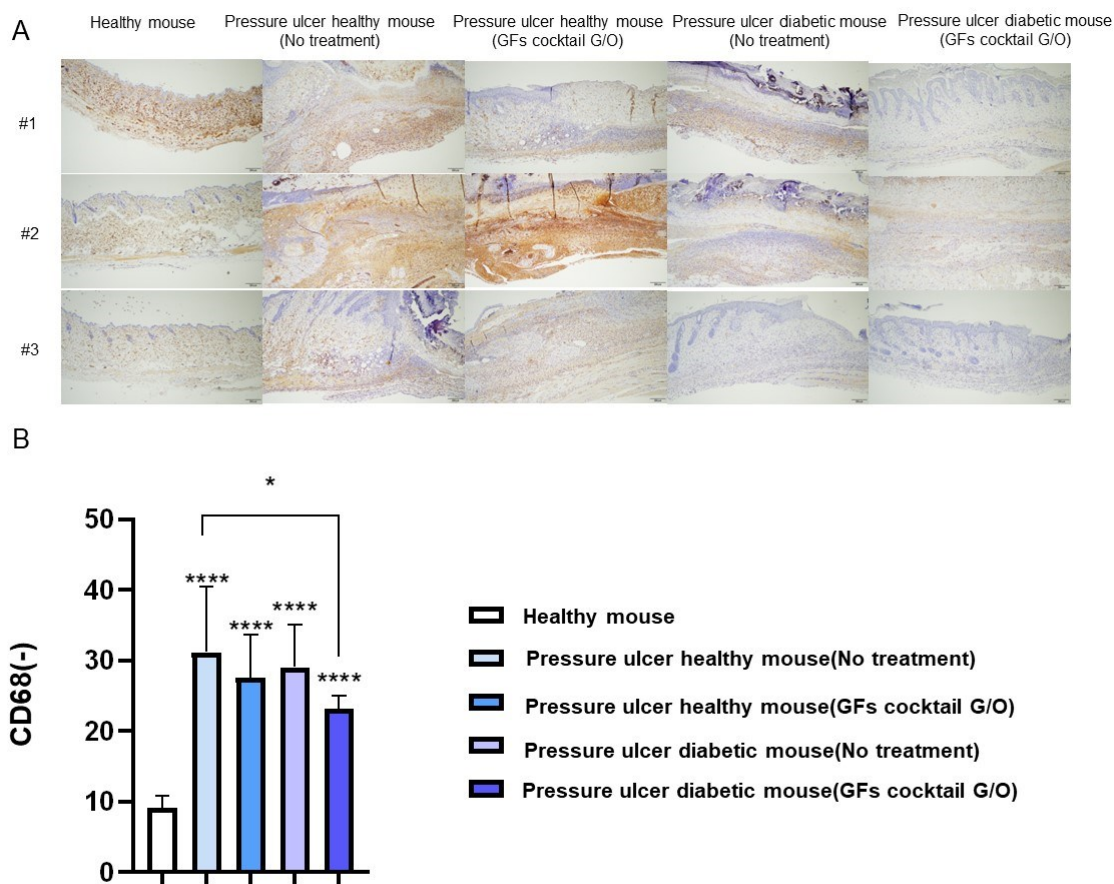


Fig. 6-16 CD68 staining of the mouse dorsal skin tissue. A: The skin tissues. B: Amount of CD68 at different groups. Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation. $n = 3$, $*p < 0.05$, $**p < 0.001$. Scale bars: 200 μ m.**

CD31 は血管と内皮細胞を追跡する典型的なマーカーである。この研究の結果から、健康なマウスの皮膚と比較して、褥瘡を持つマウスの CD31 のレベルが著しく上昇していることが示された。各々の未治療の対照群と比較して、G/O 治療群の CD31 のレベルが減少した (Fig. 6-17 B)。

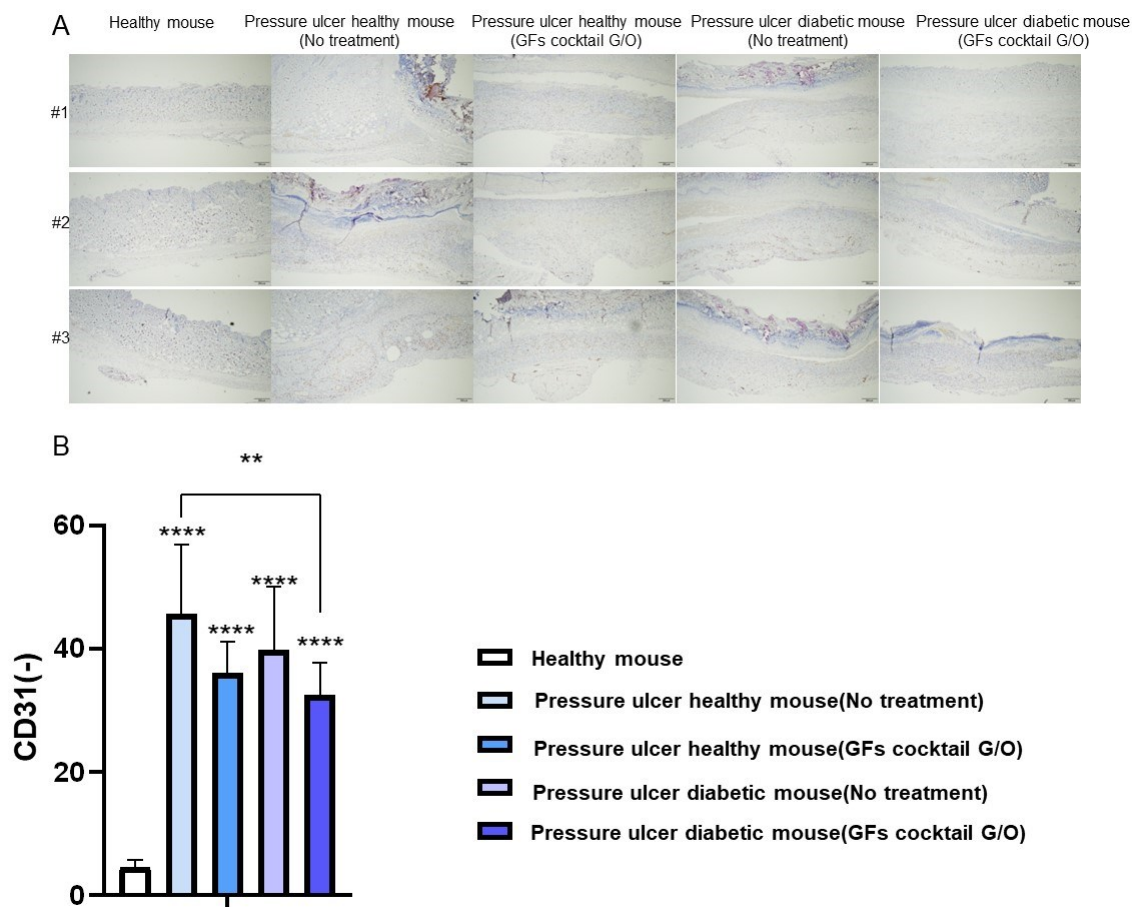


Fig. 6-17 CD31 staining of the mouse dorsal skin tissue. **A:** The skin tissues. **B:** Amount of CD31 at different groups. Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation. $n = 2$, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $****p < 0.001$. Scale bars: 200 μm .

Fig. 6-18 で創傷部位のサイトカインの mRNA 発現を示した。正常褥瘡モデル(治療なし)と比較して、GF カクテル G/O を受けた正常褥瘡モデルでは IL6 が上昇した。糖尿病条件下では、G/O の治療の有無に関係なく、IL6 の発現に明らかな変化はなかった(**Fig. 6-18 A**)。bFGF の発現は、GF カクテル G/O を受けた正常褥瘡モデルと治療を受けていない正常褥瘡モデルと比較して上昇した。しかし、GF カクテル G/O を受けた糖尿病褥瘡マウスでは、治療を受けていない圧力性潰瘍の糖尿病マウスと比較して bFGF の発現が低下した(**Fig. 6-18 B**)。TGF β 1 の発現は、GF カクテル G/O を受けた正常褥瘡モデルと治療を受けていない正常褥瘡モデルと比較して上昇した。一方、GF カクテル G/O を受けた糖尿病褥瘡マウスでは、治療を受けていない糖尿病褥瘡マウスと比較して TGF β 1 の発現が低下した(**Fig. 6-18 C**)。

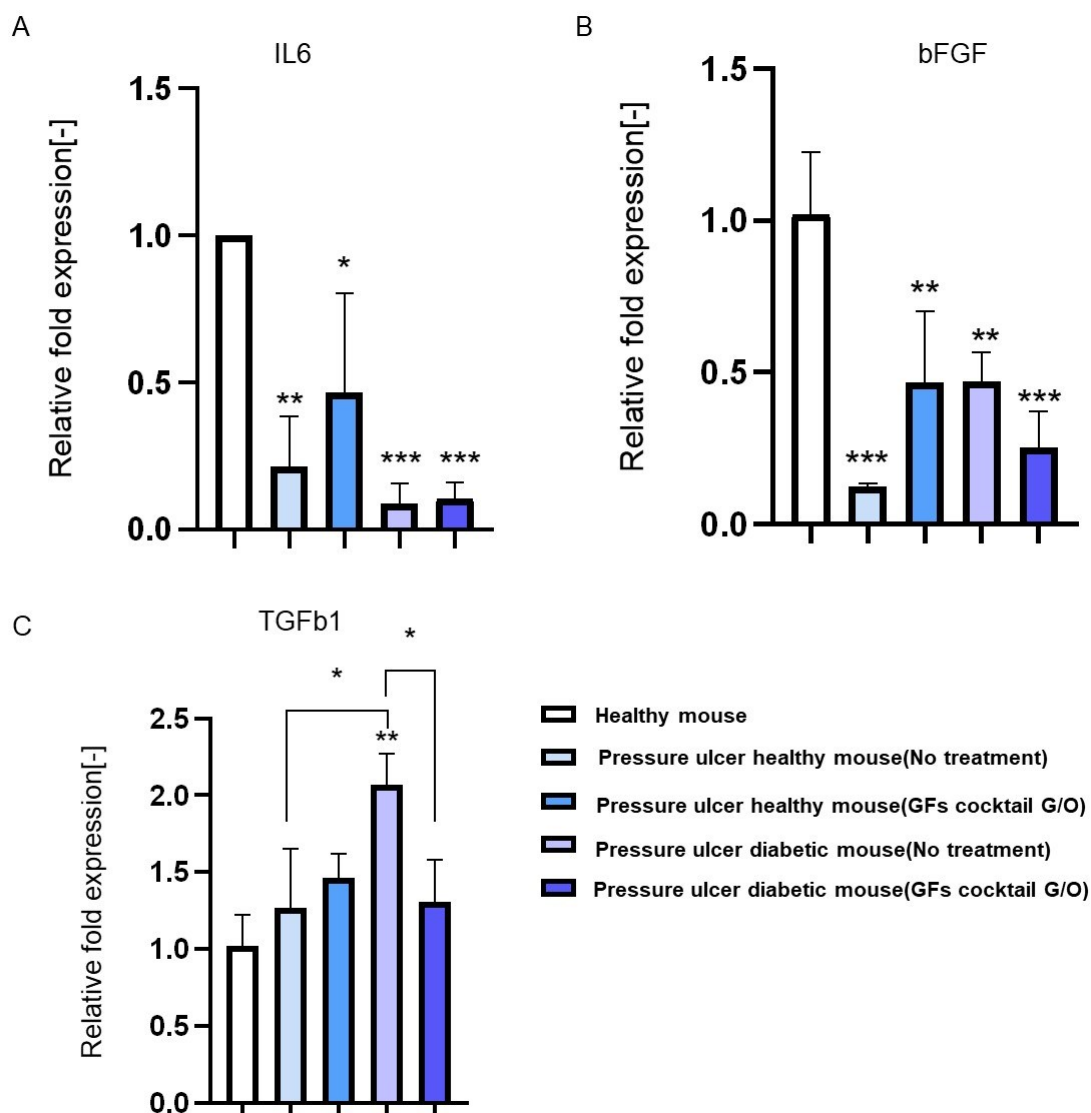


Fig. 6-18 The expressions of different cytokines at wound site determined by RT-qPCR. **A:** IL-6. **B:** bFGF. **C:** TGFb1. Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation. $n = 3$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Fig. 6-19 は皮膚組織の ELISA 結果である。Pressure ulcer healthy mouse (GFs cocktail G/O) および Pressure ulcer diabetic mouse (GFs cocktail G/O) は、それぞれの未治療の対照条件と比較して炎症因子 IL-6 の分泌が増加した。ただし、Pressure ulcer diabetic mouse の IL-6 の分泌は全体的に Pressure ulcer healthy mouse よりも低い傾向にあった (**Fig. 6-19 A**)。bFGF の分泌に関しては、Pressure ulcer healthy mouse (No treatment) と Pressure ulcer healthy mouse (GFs cocktail G/O) には明らかな違いがなかった。ただし、Pressure ulcer healthy mouse (GFs cocktail G/O) は Pressure ulcer healthy mouse (No treatment) と比較して bFGF の分泌が上昇していることが観察された (**Fig. 6-19 B**)。Pressure ulcer healthy mouse (GFs cocktail G/O) および Pressure ulcer diabetic mouse (GFs cocktail G/O) は、それぞれの未治療の対照条件と比較して炎症因子 TGFb1 の分泌が増加した。

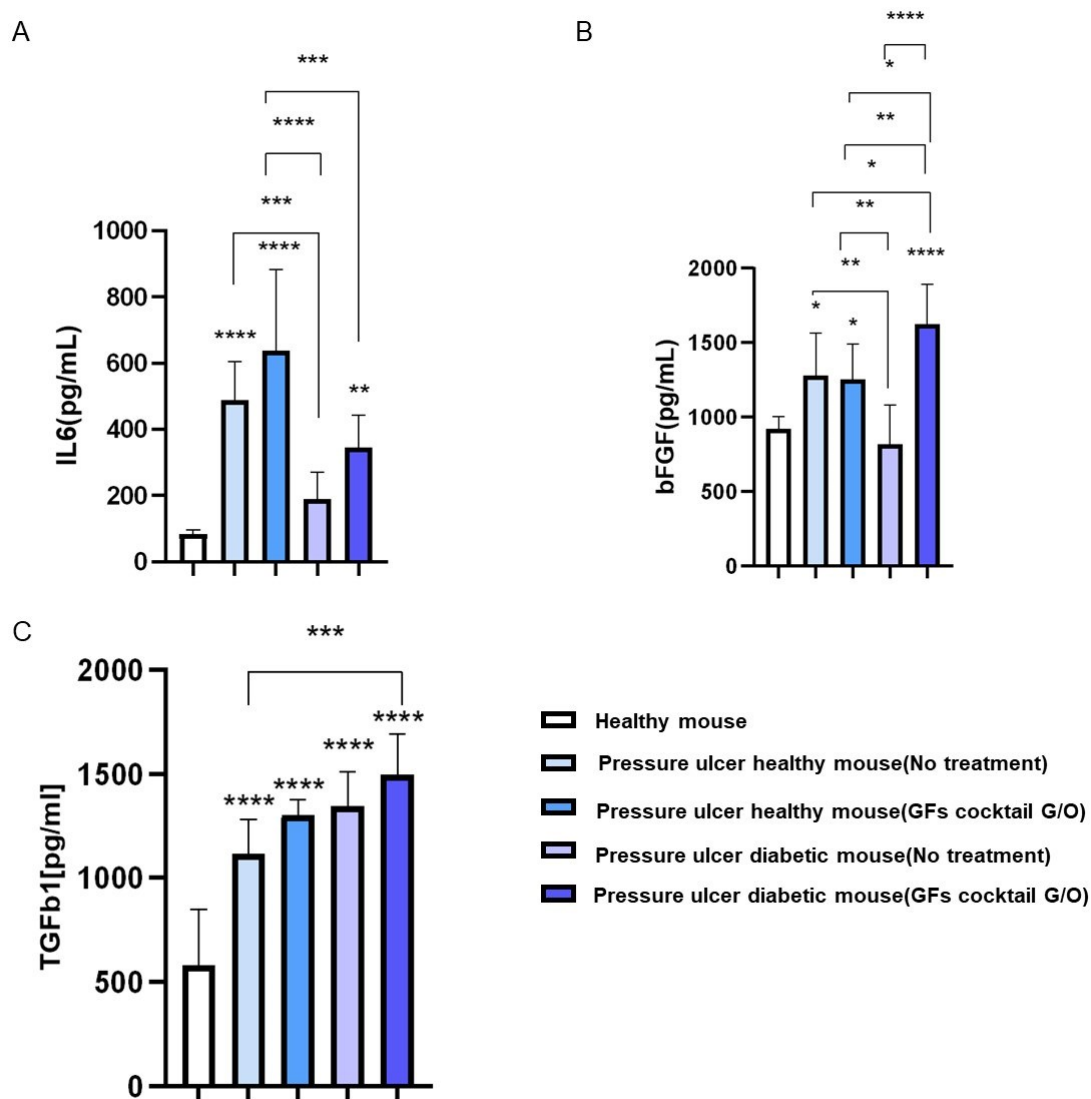


Fig. 6-19 Levels of cytokines in wound homogenates measured using ELISA. A: IL-6, B: bFGF, C: TGFb1. Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation. $n=3$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.**

6.3.4 本節のまとめ

本研究では、増殖因子カクテル G/O によって難治性糖尿病褥瘡の治療を期待しています。正常褥瘡の M1 の抑制、M2(修復・再生)の促進することが示唆された。糖尿病の場合、M1 は抑制されるが、M2 の促進作用は観察されなかった。G/O は正常褥瘡の血管、毛包、脂腺、コラーゲの修復能力を示唆された。難治性の褥瘡に対して増殖因子カクテル化 G/O の長期的投与によって組織の修復、治療プロセス、血管の修復を促進することが期待された。

6.4 考察

理論的には、正常な傷口の治癒は複雑なプロセスであり、異なる細胞タイプ、ECM、サイトカイン、および増殖因子の間には動態な相互作用が存在する。正常な傷口治癒反応の特徴は、凝固の形成から炎症段階、修復段階、最後に再構築への進展する。凝血プロセスでは、傷口部位に最初に到達する細胞は血小板であり、これらは PDGF、TGF β 1、EGF、および FGF などを放出し、炎症プロセスをサポートする[132,195]。炎症段階は止血後すぐに発生し、その特徴は血管が炎症物質を運び、細胞が損傷部位に移動する。血管新生と透過性の刺激により、血流中の細胞と分子が傷口部位に進入する[196]。中性球は微生物感染と巨噬細胞に対抗し、TGF β 1、VEGF、および FGF の分泌により血管新生を刺激し、TNF- α を生成し、壊死組織を分解し、線維芽細胞の増殖を促進してコラーゲンを生成する[197]。皮膚傷口は 2 週間後に収縮を開始する。角質形成細胞の移動、分化、および増殖に伴い、傷口表面領域に沿って層状の表皮が形成され、上皮再形成が発生し、新しい組織に覆いかぶさる[198]。傷口治癒プロセスの最後の段階(6-24 ヶ月継続)は傷口再構築である。この段階では、肉芽組織が形成され、同時に PDGF および TGF β 1 によって仲介される I 型コラーゲン(III 型コラーゲンに置き換えられる)によって ECM が置き換えられる。

糖尿病性慢性傷口では、巨噬細胞の機能の乱れにより炎症段階が延長され、これが進行を妨げる[199]。糖尿病状態では M1 巨噬細胞の食食速度が通常の状態よりも 5 倍以上遅くなり、これにより傷口の壊死組織とアポトーシス細胞のクリアランス速度が減少し、炎症因子が持続的に放出される可能性がある。M1 表現型から M2 表現型への転換が阻害され、抗炎症サイトカインおよび増殖因子の分泌不足により、正常な組織形成が失敗し、最終的に糖尿病の治癒時間が延長する[200]。

正常褥瘡と糖尿病褥瘡の自己治癒プロセスの多くの指標の比較について議論した。その後、増殖因子カクテル化 G/O の塗布投与が通正常褥瘡モデルと糖尿病褥瘡マウスに対する 1 週間の治療効果についても議論した。

Fig. 6-5 の褥瘡モデルの損傷面積の自己治癒の変化の結果は、通常のマウスの褥瘡の面積が糖尿病褥瘡マウスよりも速く減少することを示した。糖尿病は傷口の治癒を妨げる可能性があり、なぜならばそれは線維芽細胞の分布、表皮細胞の成長、血管新生、および組織の成熟を遅らせ、さらに傷口の収縮と再上皮化を減少させるからである[201]。一方で

Fig. 6-13 の治療群の面積結果では、増殖因子カクテル化 G/O の 1 週間の塗布治療において、正常褥瘡と糖尿病褥瘡の損傷面積の減少速度が加速したことが示された。これは増殖因子カクテル化 G/O が傷口治療において潜在的な効果を持っていることを示している。送達される 6 つの増殖因子には、VEGF、EGF、bFGF、TGF β 1、IGF- α 、および PDGF-BB が含まれる。VEGF は治癒に重要な影響を与え、血管新生をサポートする。VEGF は糖尿病傷口の毛細血管密度を増加させ、損傷した組織の血液灌漑と代謝を改善する。これは傷口部位の血流再構築と通透性の主要な調節因子であり、肉芽組織の形成にも関与する。局所の傷口での VEGF レベルの相対的な低さは、糖尿病によって傷口治癒が損なわれているためである[202]。EGF は表皮細胞、細胞運動、細胞移動、間質再生、血管新生、および細胞増殖を促進する[203]。IGF- α は細胞粒子形成および上皮再生、内皮細胞の化学性刺激、および角質形成細胞および線維芽細胞の増殖を通じて傷口治癒を促進する[9]。報告によれば、糖尿病動物および人間の傷口組織では、IGF- α および TGF- β 1 のレベルが低下し、傷口治癒プロセスが遅延する可能性がある[204]。血小板は PDGF を放出し、これは線維芽細胞の成熟を誘導し、マトリックスの生成と結合組織の成熟を促進する。PDGF はコラーゲンの合成を促進する。これは傷口治癒プロセスで線維芽細胞の移動と増殖、肉芽組織のタンパク質生成、および一時

的な ECM と血管新生の鍵となる媒体として機能する。PDGF を使用したさまざまな臨床研究は、治癒時間を短縮できる可能性があることを示す[136]。そのため、血管新生を制御し、それによって肉芽組織の形成に影響を与えることは、糖尿病性損傷の傷口治癒を治療するための戦略として期待される。

自己治癒実験では、組織学的な観点から肉芽組織の充実状況が観察された。皮膚構造の定量的な結果では、糖尿病褥瘡のグループでは大量の炎症細胞が浸潤している。糖尿病マウスは治癒が遅れ、真皮は弛緩し、新しい血管と炎症細胞が線維芽細胞に埋め込まれているように見えた。褥瘡の皮膚の厚さが増すのは皮膚充血のためで、新生肉芽組織が生成された(**Fig. 6-6 A**)。真皮の厚さは正常褥瘡が糖尿病褥瘡よりも高いことが示された(**Fig. 6-6 B**)。これはコラーゲンの沈着に起因しており、マッソントリクローム染色法によるコラーゲンの可視化の結果もこれを裏付ける。自己治癒実験では、正常褥瘡のコラーゲン蛋白の修復速度が糖尿病マウスよりも高いことが確認された(**Fig. 6-7**)。研究によれば、糖尿病の傷口治癒はコラーゲンの減少、新生肉芽組織の数量減少、線維芽細胞の移動および増殖の減少など、さまざまな生理学的要因の影響を受ける[201]。表皮の厚さについては、褥瘡の存在により、正常褥瘡と糖尿病褥瘡の違いが観察されなかった(**Fig. 6-6 D**)。皮膚の毛包と皮脂腺の結果からは、正常褥瘡の修復能力が糖尿病褥瘡よりも高いことが示された(**Fig. 6-6 E F**)。

治療実験(**Fig. 6-14**)の結果では、正常褥瘡と糖尿病褥瘡の治療グループはそれぞれの未治療グループと比較して、炎症細胞の浸潤が改善され、治療グループの潰瘍の厚さには差が見られなかった(**Fig. 6-14 B**)。ただし、表皮と真皮の厚さは治療グループで異常な肥厚が抑制されていることが観察された(**Fig. 6-14 C D**)。正常褥瘡の治療グループでは毛包の修復効果が観察されたが、糖尿病モデルのマウスでは治療グループの毛包の数が対照群よりも低かった。正常褥瘡と糖尿病褥瘡の治療グループでは、皮脂腺の異常な増殖が抑制されていることが観察された。この実験の褥瘡モデルは部分的に損傷したモデルであるため、皮膚の毛包と脂腺は皮膚に留まるが、既に壊死が発生している可能性がある。EGF が皮脂腺および毛包中の EGF 受容体 (EGF-R) と結合し、毛包および皮脂腺を修復し、毛包および皮脂腺を成長サイクルに活性化させるとの報告がある[205]。したがって、増殖因子の送達による治療効果により、褥瘡治療グループの毛包と脂腺は正常な成長サイクルに入るため、未治療グループよりも数が少なくなる可能性がある(**Fig. 6-14 E F**)。マッソントリクローム染色法によるコラーゲン可視化の結果は(**Fig. 6-15**)、対照傷口と比較して、正常褥瘡でも糖尿病褥瘡でも、コラーゲン繊維の形成が著しく増加していることを示した。EGF は、角質形成細胞、上皮細胞、内皮細胞、および線維芽細胞など、さまざまなタイプの細胞の増殖と移動を刺激することにより、傷口治癒に重要な役割を果たすと報告される。EGF はより良い真皮再生を促進し、傷口治癒に関連する傷口収縮の水準を加速させる。コラーゲンの沈着と筋線維芽細胞の増殖を誘導された。EGF などの多くの成長因子の分解は、難治性の糖尿病潰瘍性傷口を引き起こす可能性がある。多くの研究が EGF 治療が糖尿病傷口モデルに対して有益であることを示す。Zhang らは、EGF が糖尿病傷口治癒を改善する以下の方法を発見した：肉芽組織の形成の増加、コラーゲンの均一性および細胞外基質の増加、線維芽細胞の数の増加および線維芽細胞の形態の改善および傷口内の毛細血管の数の増加した。EGF はまた、炎症細胞を傷口から移動させ、傷口の微細な環境と組織の栄養状態を改善することができる[206]。Tsang らは、EGF が傷口治癒を促進し、傷口治癒時間を短縮する可能性があることを発見した[207]。

血管新生のトレーニング中に直面する重要な問題は、慢性傷口の治療である。これはまた、

糖尿病患者にとっても臨床的に重大な問題であり、臨床試験では血管形成を改善する治療法が深刻な皮膚傷口および糖尿病性潰瘍患者の予後を改善できることが示される。糖尿病傷口の環境では、機能の障害が傷口治癒のすべての段階に影響を与え、糖尿病傷口は完全に修復の段階に進展することができない[204]。以前の研究では、DFU の治癒不良の原因として、微生物の侵入、上皮細胞の破壊、免疫機能の損傷など、いくつかの要因が特定されている[208]。すべての糖尿病潰瘍に影響を与える潜在的な要因の 1 つは、血管循環の損傷であり、これが不十分な治癒をもたらす可能性がある。CD31 の結果によると、圧瘡モデルでは、時間の経過とともに、正常褥瘡と糖尿病褥瘡の CD31 の結果が低下していることが示された (Fig. 6-9)。CD31 の低下の主な原因には 3 つの可能性がある。1 つは血管の損傷または退化であり、CD31 は通常、内皮細胞上で発現し、血管の構造と機能を維持するために使用される。血管が退化または損傷すると、CD31 の発現が低下する可能性がある。2 つ目の可能性は、炎症反応が CD31 の発現の減少を引き起こす可能性がある。炎症プロセスでは、免疫細胞と炎症性媒体の放出が内皮細胞上の CD31 の発現の減少をもたらす可能性がある。3 つ目の可能性は、血管の成熟によるもので、CD31 の発現が低下する可能性がある。血管新生を促進する因子 bFGF の mRNA 発現と ELISA によるタンパク質分泌の結果を組み合わせると (Fig. 6-10 B, 6-11 B)、正常褥瘡は上昇傾向にあるが、糖尿病モデルのマウスでは bFGF の分泌が減少する。炎症を特徴づける CD68 の染色結果 (Fig. 6-8 B) も、正常褥瘡の炎症が経時的に CD68 が減少し、糖尿病の CD68 が経時的に増加することを示す。また、糖尿病が炎症段階をさらに延長する可能性があることが報告されている[209]。したがって、本研究では、正常褥瘡傷口は炎症反応の減少により、成熟した血管が成長因子を安定して分泌できるため、CD31 の発現が低下する可能性があると考えられる。糖尿病傷口は長期にわたる炎症の間、血管が損傷されるため、CD31 の発現が低下し、bFGF の分泌も減少した。したがって、糖尿病潰瘍に影響を与える潜在的な要因の 1 つは、血管循環の損傷であり、これが不十分な治癒をもたらす可能性がある。

治療グループの結果 (Fig. 6-17) では、正常褥瘡と糖尿病褥瘡の治療グループは、それぞれの対応する治療対照グループと比較して CD68 (Fig. 6-16) および CD31 が低下することが示唆された (Fig. 6-17)。糖尿病褥瘡傷口の治療グループでは bFGF の分泌が増加する (Fig. 6-19)。G/O 治療が糖尿病損傷の改善に寄与していることが示された。

糖尿病は炎症段階をさらに延長する可能性がある[210]。実際、炎症段階は治癒プロセス中に促炎性サイトカインの発現/合成を増強する。したがって、傷口治癒プロセスでは、促炎性サイトカインが組織損傷を抑制し、炎症を延長する可能性がある[211,212]。一方で、以前の研究では促炎性サイトカインが早期の傷口治癒を加速する可能性があることが示された[210,211]。本研究の自然治癒研究の結果によると (Fig. 6-10A, 6-11A)、時間の経過とともに、正常褥瘡モデルの IL-6 遺伝子発現が減少し、糖尿病は長期にわたる慢性炎症なので、糖尿病の IL-6 遺伝子発現は大きな変化がなかった。正常褥瘡と糖尿病褥瘡の IL-6 タンパク質の合成は増加し、糖尿病傷口の IL-6 合成は通常の傷口よりも大きいである。研究によれば、糖尿病ラットは健康なラットと比較して促炎性サイトカインの合成が増加し、これが傷口治癒プロセスの遅延につながる可能性がある[212]。さらに、高血糖は促炎性サイトカインを増加させ、酸化と炎症ストレスをさらに悪化させる可能性がある[135,213]。これは本研究結果と一致する。治療結果では、対応する未治療グループと比較して、正常褥瘡では IL-6 の合成と発現が増加した。糖尿病傷口治療グループでは IL-6 の発現がわずかに上昇し、IL-6 の分泌が顕著に増加した (Fig. 6-18, 6-19 A)。IL-6 は促炎性サイトカインであり、治療グルー

プでの上昇は G/O が慢性褥瘡の治癒プロセスを促進する可能性が示唆された。

自己治癒実験の結果(Fig. 6-10 C, 6-11 C)では、通常の傷口と糖尿病の傷口の TGF β 1 の発現が上昇するが、正常褥瘡では TGF β 1 の分泌と発現が一致して上昇しており、糖尿病褥瘡では明らかな TGF β 1 の増加は見られなかった。TGF β 1 は炎症と免疫調節において複雑で多様な役割を果たす。TGF β 1 は特定の炎症細胞(マクロファージや T 細胞など)の活性化を抑制し、炎症反応を軽減することができる。TGF- β 1 は免疫バランスを維持し、過剰な炎症反応や自己免疫疾患の発生を防ぐのに役立つ。ただし、TGF β 1 には促炎的作用もあり、炎症細胞の活性化や炎症性サイトカインの産生を促進する。したがって、通常のマウスは増殖期に入っている可能性があるが、糖尿病のマウスはまだ炎症期にある。

治療実験の結果(Fig. 6-18 C, 6-19 C)では、正常褥瘡治療グループでは TGF β 1 の発現と合成が未治療のグループよりも高くなった。G/O 治療により、TGF β 1 の発現が減少したが、合成は増加した。これは G/O 治療が通常の圧疮傷口の治療プロセスを加速できることを示す。また、G/O 治療が糖尿病褥瘡における異常な細胞因子の発現を改善できる可能性がある。

6.5 本章のまとめ

この研究では、正常褥瘡と糖尿病褥瘡の自己治癒速度の違いを証明した。糖尿病マウスは長期間にわたり炎症状態にあるため、治癒と修復が遅れる。私たちが開発した精緻な投与キャリアである G/O は、六つの増殖因子を搭載し、正常褥瘡モデルと糖尿病性褥瘡傷口に対して処理を行なった。結果は、難治性の褥瘡に対して、増殖因子カクテルである G/O が促進作用を示すことを示唆された。正常褥瘡だけでなく、糖尿病性の傷口に対しても調節および促進作用を示す。この研究は、局所治療が主に炎症を減少させることによって治癒を促進する新しいアプローチへつながるものである。

第7章 結論と未来の展望

7.1 結論

本論文の研究から、増殖因子の TDDS としての G/O の開発を行った。また、G/O を用いて急性皮膚損傷と慢性皮膚損傷の治療を行った。第3章により、増殖因子の効果的な輸送を可能にする G/O が開発され、治療の実現可能な手段が提供された。第4章のさらなる研究において、G/O の経皮送達方式を用いて bFGF が送達され、その結果、皮下での血管新生が誘導されることが確認され、これが虚血性疾患の治療において新しいアプローチを提供した。第5章と第6章では、増殖因子カクテル G/O が創傷の治療と予防において果たす役割について検討した。UVB 誘発の急性皮膚損傷の予防と修復に使用され、皮膚の健康を保護する潜在力を示した。また、増殖因子カクテル G/O が糖尿病性褥瘡の治療に応用され、糖尿病慢性の皮膚損傷に対する新しい治療法が提供された。

以下に各章で得られた結果をまとめた。

第3章:

増殖因子の効果的な送達を可能に TDDS 薬物送達システムとして、G/O を開発した。調整されたナノゲル粒子は W/O よりも相対的に固く、内水相がゲル化した G/O エマルションの開発が示唆された。ゼラチンを油中にナノサイズで分散させた G/O の作製が可能であり、その粒子径は約 120 nm で高い粒子安定性を有することから TDDS キャリアとしての応用が可能であることが期待された。また、粒子表面が疎水性界面活性剤で被覆され油中に分散していることから親水性薬物の皮膚浸透性を向上することができ、経皮吸収基材として有望なキャリアであることが示された。

第4章:

bFGF の濃度を変えるだけで、そしてそれにより血管密度を制御できることを示した。また、繰り返しコーティングすることによって血管密度を高めることも可能である。bFGF 固定化 G/O を皮膚に塗布することによって高い血管新生誘導効果があるから、G/O に固定された bFGF がゲルから放出され、細胞表面に到達し、かつ作用することが確認された。また、G/O は血管生成の持続的な促進作用を示した。G/O の経皮送達は生体親和性があり、正常な皮膚のバランスを保たれた。

第5章:

この研究では、UVB に誘導された皮膚損傷、例えば紅斑、皮膚の水分減少、炎症、および表皮真皮層の増厚を、G/O の投与によって軽減できることを示した。また、G/O は、UVB に誘導された毛包損傷による異常な毛包増殖を予防および治療することもできる。さらに、G/O は皮脂腺の修復の潜在能力も示す。したがって、この研究は、経皮的に GF 機能化された G/O ナノゲルの皮下移植新技术を提案し、創傷治療および再生医学の分野で重要な意義を有する。

第6章:

この研究では、正常褥瘡と糖尿病褥瘡の自己治癒速度の違いを証明した。糖尿病マウスは長期間にわたり炎症状態にあるため、治癒と修復が遅れる。私たちが開発した精緻な投与キャリアである G/O は、六つの増殖因子をカクテルし、正常褥瘡モデル傷口と糖尿病性褥瘡

傷口に対して処理を行なった。結果は、難治性の褥瘡傷口に対して、増殖因子カクテルである G/O が促進作用を示すことを示唆された。正常褥瘡だけでなく、糖尿病性の傷口に対しても調節および促進作用を示す。この研究は、局所治療が主に炎症を減少させることによって治癒を促進する新しいアプローチを提案する。

7.2 将来の展望

本論文の研究結果を総合すると、G/O の有する増殖因子の TDDS として有効性を示した。多様な皮膚問題の治療に優れた可能性を示した。この革新的な薬物送達システムは、血管新生の促進、紫外線損傷の修復、糖尿病性褥瘡の治療などにおいて新しい有効な手段を提供する。しかし、将来の研究はそのメカニズムの探究、性能の最適化、より包括的でシステムの安全性評価に焦点を当てる必要がある。これにより、G/O が将来の皮膚治療手段としての革新的で安全な選択肢となることが期待される。

これらの研究は期待される成果を上げるが、さらなる研究と改良が必要である。まず第一に、G/O の薬物放出のメカニズムをさらに探究し、より精密な薬物送達と放出速度の制御を実現するための研究が必要である。次に、異なる種類の成長因子や薬物に対して、この送達システム内での最適な組み合わせと濃度を詳細に研究し、治療効果を向上させる。さらに、このシステムの長期使用における生体適合性と安全性の評価を強化し、臨床応用の実現可能性を確認すべきである。

将来の研究では、以下の方向に焦点を当て、この分野をさらに推進することが期待される：

長期的な安全性の研究：これらの TDDS システムの長期的な安全性に関する深い研究を進め、臨床応用での信頼性と安全性を確保する。

マルチファクターの組み合わせ治療の探求：G/O 送達におけるマルチファクターの組み合わせ治療の研究を進め、治療効果を向上させるとともに、特に複雑な疾患や慢性病例に対応する。

ナノテクノロジーと生物学のクロスオーバー研究：ナノテクノロジーと生物学のクロスオーバー研究を進め、これらの新しい送達システムと生体との相互作用メカニズムを深化させ、より精密な治療に理論的なサポートを提供する。

将来の研究では、このシステムの広範な応用可能性を確認するために、異なる疾患モデルでの適用を強化することができる。同時に、光療法や他の薬物など、他の治療手段と組み合わせ、このシステムの治療範囲を拡大することが考えられる。最終的には、臨床試験の進展が、この治療法の実際の適用に対するより直接的で信頼性のある証拠を提供する。臨床に新たな展望をもたらすことが期待される。

[参考文献]

- [1] Y.-Q. Yu, X. Yang, X.-F. Wu, Y.-B. Fan, Enhancing Permeation of Drug Molecules Across the Skin via Delivery in Nanocarriers: Novel Strategies for Effective Transdermal Applications, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9 (2021). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.646554> (accessed December 9, 2023).
- [2] A. Zaid Alkilani, M.T.C. McCrudden, R.F. Donnelly, Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the stratum corneum, *Pharmaceutics* 7 (2015) 438–470. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics7040438>.
- [3] D.S. Masson-Meyers, L. Tayebi, Vascularization strategies in tissue engineering approaches for soft tissue repair, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 15 (2021) 747–762. <https://doi.org/10.1002/term.3225>.
- [4] J. Chen, R. Zhou, Y. Feng, L. Cheng, Molecular mechanisms of exercise contributing to tissue regeneration, *Signal Transduct. Target. Ther.* 7 (2022) 1–24. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01233-2>.
- [5] N. A., L. Kovooru, A.K. Behera, K.P.P. Kumar, P. Srivastava, A critical review of synthesis procedures, applications and future potential of nanoemulsions, *Adv. Colloid Interface Sci.* 287 (2021) 102318. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102318>.
- [6] M.N. Yukuyama, D.D.M. Ghisleni, T.J.A. Pinto, N.A. Bou-Chacra, Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics – a review, *Int. J. Cosmet. Sci.* 38 (2016) 13–24. <https://doi.org/10.1111/ics.12260>.
- [7] S. Yamakawa, K. Hayashida, Advances in surgical applications of growth factors for wound healing, *Burns Trauma* 7 (2019) 10. <https://doi.org/10.1186/s41038-019-0148-1>.
- [8] N. Yamamoto, T. Oyaizu, M. Enomoto, M. Horie, M. Yuasa, A. Okawa, K. Yagishita, VEGF and bFGF induction by nitric oxide is associated with hyperbaric oxygen-induced angiogenesis and muscle regeneration, *Sci. Rep.* 10 (2020) 2744. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59615-x>.
- [9] P. Bhatnagar, J.X. Law, S.-F. Ng, Delivery systems for platelet derived growth factors in wound healing: A review of recent developments and global patent landscape, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 71 (2022) 103270. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103270>.
- [10] A. Joshi, Z. Xu, Y. Ikegami, K. Yoshida, Y. Sakai, A. Joshi, T. Kaur, Y. Nakao, Y. Yamashita, H. Baba, S. Aishima, N. Singh, H. Ijima, Exploiting synergistic effect of externally loaded bFGF and endogenous growth factors for accelerated wound healing using heparin functionalized PCL/gelatin co-spun nanofibrous patches, *Chem. Eng. J.* 404 (2021) 126518. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126518>.
- [11] S. Nour, R. Imani, G.R. Chaudhry, A.M. Sharifi, Skin wound healing assisted by angiogenic targeted tissue engineering: A comprehensive review of bioengineered approaches, *J. Biomed. Mater. Res. A* 109 (2021) 453–478. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37105>.
- [12] M.M. Oliveira, B.A. Ratti, R.G. Daré, S.O. Silva, M. da C.T. Truiti, T. Ueda-Nakamura, R. Auzély-Velty, C.V. Nakamura, Dihydrocaffeic Acid Prevents UVB-Induced Oxidative Stress Leading to the Inhibition of Apoptosis and MMP-1 Expression via p38 Signaling Pathway, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019 (2019) 2419096. <https://doi.org/10.1155/2019/2419096>.

- [13] S. Ojima, N. Akimoto, H. Sugimoto, S. Tanaka, M. Hirayama, Y. Takenaka, Y. Tsunemi, M. Kawashima, T. Sato, The distinct effect of UVB and near-infrared radiation on sebum secretion in differentiated hamster sebocytes, *J. Dermatol. Sci.* 84 (2016) e170. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2016.08.503>.
- [14] J. Wu, L.-H. Chen, S.-Y. Sun, Y. Li, X.-W. Ran, Mesenchymal stem cell-derived exosomes: The dawn of diabetic wound healing, *World J. Diabetes* 13 (2022) 1066–1095. <https://doi.org/10.4239/wjd.v13.i12.1066>.
- [15] M. Nakamichi, Y. Akishima-Fukasawa, C. Fujisawa, T. Mikami, K. Onishi, Y. Akasaka, Basic Fibroblast Growth Factor Induces Angiogenic Properties of Fibrocytes to Stimulate Vascular Formation during Wound Healing, *Am. J. Pathol.* 186 (2016) 3203–3216. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.08.015>.
- [16] P. Vega-Vásquez, N.S. Mosier, J. Irudayaraj, Nanoscale Drug Delivery Systems: From Medicine to Agriculture, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2020). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.00079> (accessed December 7, 2023).
- [17] C. Li, J. Wang, Y. Wang, H. Gao, G. Wei, Y. Huang, H. Yu, Y. Gan, Y. Wang, L. Mei, H. Chen, H. Hu, Z. Zhang, Y. Jin, Recent progress in drug delivery, *Acta Pharm. Sin. B* 9 (2019) 1145–1162. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.08.003>.
- [18] M.C. Peña-Juárez, O.R. Guadarrama-Escobar, J.J. Escobar-Chávez, Transdermal Delivery Systems for Biomolecules, *J. Pharm. Innov.* 17 (2022) 319–332. <https://doi.org/10.1007/s12247-020-09525-2>.
- [19] W. Leppert, M. Malec-Milewska, R. Zajackowska, J. Wordliczek, Transdermal and Topical Drug Administration in the Treatment of Pain, *Mol. Basel Switz.* 23 (2018) 681. <https://doi.org/10.3390/molecules23030681>.
- [20] A.R.J. Hutton, M.T.C. McCrudden, E. Larrañeta, R.F. Donnelly, Influence of molecular weight on transdermal delivery of model macromolecules using hydrogel-forming microneedles: potential to enhance the administration of novel low molecular weight biotherapeutics, *J. Mater. Chem. B* 8 (2020) 4202–4209. <https://doi.org/10.1039/D0TB00021C>.
- [21] X. Zhou, Y. Hao, L. Yuan, S. Pradhan, K. Shrestha, O. Pradhan, H. Liu, W. Li, Nano-formulations for transdermal drug delivery: A review, *Chin. Chem. Lett.* 29 (2018) 1713–1724. <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2018.10.037>.
- [22] H.X. Nguyen, A.K. Banga, Electrically and Ultrasonically Enhanced Transdermal Delivery of Methotrexate, *Pharmaceutics* 10 (2018) 117. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030117>.
- [23] J. Dermol-Černe, E. Pirc, D. Miklavčič, Mechanistic view of skin electroporation - models and dosimetry for successful applications: an expert review, *Expert Opin. Drug Deliv.* 17 (2020) 689–704. <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1745772>.
- [24] J. Lim, D. Tahk, J. Yu, D.-H. Min, N.L. Jeon, Design rules for a tunable merged-tip microneedle, *Microsyst. Nanoeng.* 4 (2018) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41378-018-0028-z>.
- [25] J.H. Jung, S.G. Jin, Microneedle for transdermal drug delivery: current trends and fabrication, *J. Pharm. Investig.* 51 (2021) 503–517. <https://doi.org/10.1007/s40005-021-00512-4>.
- [26] F.M.R. Witjas, B.M. van den Berg, C.W. van den Berg, M.A. Engelse, T.J. Rabelink, Concise Review: The Endothelial Cell Extracellular Matrix Regulates Tissue Homeostasis and Repair, *Stem Cells Transl. Med.* 8 (2019) 375–382. <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0155>.

- [27] D.R. Grimes, C. Kelly, K. Bloch, M. Partridge, A method for estimating the oxygen consumption rate in multicellular tumour spheroids, *J. R. Soc. Interface* 11 (2014) 20131124. <https://doi.org/10.1098/rsif.2013.1124>.
- [28] W. Song, A. Chiu, L.-H. Wang, R.E. Schwartz, B. Li, N. Bouklas, D.T. Bowers, D. An, S.H. Cheong, J.A. Flanders, Y. Pardo, Q. Liu, X. Wang, V.K. Lee, G. Dai, M. Ma, Engineering transferrable microvascular meshes for subcutaneous islet transplantation, *Nat. Commun.* 10 (2019) 4602. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12373-5>.
- [29] J. Trovik, Å. Vikanes, Hyperemesis Gravidarum is associated with substantial economic burden in addition to severe physical and psychological suffering, *Isr. J. Health Policy Res.* 5 (2016) 43. <https://doi.org/10.1186/s13584-016-0099-y>.
- [30] E. Picarda, S. Bézie, L. Boucault, E. Autrusseau, S. Kilens, D. Meistermann, B. Martinet, V. Daguin, A. Donnart, E. Charpentier, L. David, I. Anegon, C. Guillonnet, Transient antibody targeting of CD45RC induces transplant tolerance and potent antigen-specific regulatory T cells, *JCI Insight* 2 (2017) e90088. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.90088>.
- [31] D.A. Gough, L.S. Kumosa, T.L. Routh, J.T. Lin, J.Y. Lucisano, Function of an Implanted Tissue Glucose Sensor for More than One Year in Animals, *Sci. Transl. Med.* 2 (2010) 42ra53. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001148>.
- [32] R. Rodriguez, R. Rubio, P. Menendez, Modeling sarcomagenesis using multipotent mesenchymal stem cells, *Cell Res.* 22 (2012) 62–77. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.157>.
- [33] S. Fukuda, S.G. Yabe, J. Nishida, F. Takeda, K. Nashiro, H. Okochi, The intraperitoneal space is more favorable than the subcutaneous one for transplanting alginate fiber containing iPS-derived islet-like cells, *Regen. Ther.* 11 (2019) 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2019.05.003>.
- [34] D.H. Janssens, C.-Y. Lee, It takes two to tango, a dance between the cells of origin and cancer stem cells in the Drosophila larval brain, *Semin. Cell Dev. Biol.* 28 (2014) 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.006>.
- [35] C. Chen, J. Neumann, F. Kühn, S.M.L. Lee, M. Drefs, J. Andrassy, J. Werner, A.V. Bazhin, T.S. Schiergens, Establishment of an Endoscopy-Guided Minimally Invasive Orthotopic Mouse Model of Colorectal Cancer, *Cancers* 12 (2020) 3007. <https://doi.org/10.3390/cancers12103007>.
- [36] A. Le Friec, A.-S. Salabert, C. Davoust, B. Demain, C. Vieu, L. Vaysse, P. Payoux, I. Loubinoux, Enhancing Plasticity of the Central Nervous System: Drugs, Stem Cell Therapy, and Neuro-Implants, *Neural Plast.* 2017 (2017) 2545736. <https://doi.org/10.1155/2017/2545736>.
- [37] W. Xiao, T.I.P. Green, X. Liang, R.C. Delint, G. Perry, M.S. Roberts, K.L. Vay, C.R. Back, R. Ascione, H. Wang, P.R. Race, A.W. Perriman, Designer artificial membrane binding proteins to direct stem cells to the myocardium, *Chem. Sci.* 10 (2019) 7610–7618. <https://doi.org/10.1039/C9SC02650A>.
- [38] M. Quarta, M. Cromie, R. Chacon, J. Blonigan, V. Garcia, I. Akimenko, M. Hamer, P. Paine, M. Stok, J.B. Shrager, T.A. Rando, Bioengineered constructs combined with exercise enhance stem cell-mediated treatment of volumetric muscle loss, *Nat. Commun.* 8 (2017) 15613. <https://doi.org/10.1038/ncomms15613>.
- [39] P.W. Burridge, G. Keller, J.D. Gold, J.C. Wu, Production of De Novo Cardiomyocytes: Human Pluripotent Stem Cell Differentiation and Direct Reprogramming, *Cell Stem Cell* 10 (2012) 16–28. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.12.013>.

- [40] D. Hanjaya-Putra, V. Bose, Y.-I. Shen, J. Yee, S. Khetan, K. Fox-Talbot, C. Steenbergen, J.A. Burdick, S. Gerecht, Controlled activation of morphogenesis to generate a functional human microvasculature in a synthetic matrix, *Blood* 118 (2011) 804–815. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-327338>.
- [41] H. Komatsu, N. Gonzalez, F. Kandeel, Y. Mullen, Intermittent normobaric oxygen inhalation enhances subcutaneous prevascularization for cell transplantation, *Microvasc. Res.* 132 (2020) 104070. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2020.104070>.
- [42] A.R. Pepper, B. Gala-Lopez, R. Pawlick, S. Merani, T. Kin, A.M.J. Shapiro, A prevascularized subcutaneous device-less site for islet and cellular transplantation, *Nat. Biotechnol.* 33 (2015) 518–523. <https://doi.org/10.1038/nbt.3211>.
- [43] H. Komatsu, J. Rawson, A. Barriga, N. Gonzalez, D. Mendez, J. Li, K. Omori, F. Kandeel, Y. Mullen, Posttransplant oxygen inhalation improves the outcome of subcutaneous islet transplantation: A promising clinical alternative to the conventional intrahepatic site, *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 18 (2018) 832–842. <https://doi.org/10.1111/ajt.14497>.
- [44] L. Nm, I. H, Long-term allogeneic islet graft survival in prevascularized subcutaneous sites without immunosuppressive treatment, *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 14 (2014). <https://doi.org/10.1111/ajt.12739>.
- [45] Y. Zhao, J. Zhou, D. Liu, F. Dong, H. Cheng, W. Wang, Y. Pang, Y. Wang, X. Mu, Y. Ni, Z. Li, H. Xu, S. Hao, X. Wang, S. Ma, Q. Wang, G. Xiao, W. Yuan, B. Liu, T. Cheng, ATF4 plays a pivotal role in the development of functional hematopoietic stem cells in mouse fetal liver, *Blood* 126 (2015) 2383–2391. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-03-633354>.
- [46] A.E. Vlahos, N. Cober, M.V. Sefton, Modular tissue engineering for the vascularization of subcutaneously transplanted pancreatic islets, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) 9337–9342. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619216114>.
- [47] A.E. Vlahos, S.M. Kinney, B.R. Kingston, S. Keshavjee, S.-Y. Won, A. Martyts, W.C.W. Chan, M.V. Sefton, Endothelialized collagen based pseudo-islets enables tuneable subcutaneous diabetes therapy, *Biomaterials* 232 (2020) 119710. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119710>.
- [48] J.-S. Kim, Y. Jung, S.H. Kim, J.-S. Shin, S.H. Kim, C.-G. Park, Vascularization of PLGA-based bio-artificial beds by hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells for subcutaneous xenogeneic islet transplantation, *Xenotransplantation* 26 (2019) e12441. <https://doi.org/10.1111/xen.12441>.
- [49] L. Aloe, Rita Levi-Montalcini: the discovery of nerve growth factor and modern neurobiology, *Trends Cell Biol.* 14 (2004) 395–399. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.05.011>.
- [50] W. Wu, Q. Zheng, X. Guo, J. Sun, Y. Liu, A programmed release multi-drug implant fabricated by three-dimensional printing technology for bone tuberculosis therapy, *Biomed. Mater. Bristol Engl.* 4 (2009) 065005. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/4/6/065005>.
- [51] Perivascular and intravenous administration of basic fibroblast growth factor: vascular and solid organ deposition. - PMC, (n.d.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC45904/> (accessed October 12, 2023).
- [52] D.F. Lazarous, M. Scheinowitz, M. Shou, E. Hodge, S. Rajanayagam, S. Hunsberger, W.G.

- Robison, J.A. Stiber, R. Correa, S.E. Epstein, Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast growth factor on collateral development in the canine heart, *Circulation* 91 (1995) 145–153. <https://doi.org/10.1161/01.cir.91.1.145>.
- [53] G. Cianciolo, S. Stefoni, F. Zanchelli, S. Iannelli, L. Coli, L.C. Borgnino, L.B. De Sanctis, V. Stefoni, A. De Pascalis, E. Isola, G. La Hanna, PDGF-AB release during and after haemodialysis procedure, *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 14 (1999) 2413–2419. <https://doi.org/10.1093/ndt/14.10.2413>.
- [54] Temperature-induced unfolding of epidermal growth factor (EGF): insight from molecular dynamics simulation - PMC, (n.d.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2923262/> (accessed October 12, 2023).
- [55] K. Itooka, K. Takahashi, Y. Kimata, S. Izawa, Cold atmospheric pressure plasma causes protein denaturation and endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102 (2018) 2279–2288. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8758-2>.
- [56] S. Vemuri, I. Beylin, V. Sluzky, P. Stratton, G. Eberlein, Y.J. Wang, The stability of bFGF against thermal denaturation, *J. Pharm. Pharmacol.* 46 (1994) 481–486. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1994.tb03831.x>.
- [57] H. Santana, Y. González, P.T. Campana, J. Noda, O. Amarantes, R. Itri, A. Beldarraín, R. Páez, Screening for stability and compatibility conditions of recombinant human epidermal growth factor for parenteral formulation: effect of pH, buffers, and excipients, *Int. J. Pharm.* 452 (2013) 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.04.054>.
- [58] M.W. King, M.J. Moore, Novel HOX, POU and FKH genes expressed during bFGF-induced mesodermal differentiation in *Xenopus*., *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 3990–3996.
- [59] L. Ling, S. Gu, Y. Cheng, L. Ding, bFGF promotes Sca-1+ cardiac stem cell migration through activation of the PI3K/Akt pathway, *Mol. Med. Rep.* 17 (2018) 2349–2356. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8178>.
- [60] C. Zhang, G. Yang, D. Lu, Y. Ling, G. Chen, T. Zhou, Expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in acute rejection reaction following rat orthotopic liver transplantation, *Exp. Ther. Med.* 8 (2014) 483–487. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1779>.
- [61] U. Cavallaro, M. Tenan, V. Castelli, A. Perilli, N. Maggiano, E.G. Van Meir, R. Montesano, M.R. Soria, M.S. Pepper, Response of bovine endothelial cells to FGF-2 and VEGF is dependent on their site of origin: Relevance to the regulation of angiogenesis, *J. Cell. Biochem.* 82 (2001) 619–633. <https://doi.org/10.1002/jcb.1190>.
- [62] M. Jin, Y. Chen, Y. Zhou, Y. Mei, W. Liu, C. Pan, X. Hua, Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells expressing elastin alleviates pelvic floor dysfunction, *Stem Cell Res. Ther.* 7 (2016) 51. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0308-1>.
- [63] T. Ikeda, K. Ikeda, K. Yamamoto, H. Ishizaki, Y. Yoshizawa, K. Yanagiguchi, S. Yamada, Y. Hayashi, Fabrication and Characteristics of Chitosan Sponge as a Tissue Engineering Scaffold, *BioMed Res. Int.* 2014 (2014) e786892. <https://doi.org/10.1155/2014/786892>.
- [64] A. Zbinden, S. Browne, E.I. Altiok, F.L. Svedlund, W.M. Jackson, K.E. Healy, Multivalent conjugates of basic fibroblast growth factor enhance in vitro proliferation and migration of endothelial cells, *Biomater. Sci.* 6 (2018) 1076–1083. <https://doi.org/10.1039/C7BM01052D>.
- [65] M.C. Munisso, N. Morimoto, S.C. Notodihardjo, T. Mitsui, N. Kakudo, K. Kusumoto,

- Collagen/Gelatin Sponges (CGSs) Provide Both Protection and Release of bFGF: An *In Vitro* Study, *BioMed Res. Int.* 2019 (2019) e4016351. <https://doi.org/10.1155/2019/4016351>.
- [66] S.L. Kelly, M.J. Krafcik, K.A. Erk, Synthesis and Characterization of Superabsorbent Polymer Hydrogels Used as Internal Curing Agents: Impact of Particle Shape on Mortar Compressive Strength, in: M.M.R. Taha (Ed.), *Int. Congr. Polym. Concr. ICPIC 2018*, Springer International Publishing, Cham, 2018: pp. 91–97. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78175-4_9.
- [67] M. Hamidi, A. Azadi, P. Rafiei, Hydrogel nanoparticles in drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1638–1649. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.08.002>.
- [68] H.K. Makadia, S.J. Siegel, Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier, *Polymers* 3 (2011) 1377–1397. <https://doi.org/10.3390/polym3031377>.
- [69] G. Bhakta, B. Rai, Z.X.H. Lim, J.H. Hui, G.S. Stein, A.J. van Wijnen, V. Nurcombe, G.D. Prestwich, S.M. Cool, Hyaluronic acid-based hydrogels functionalized with heparin that support controlled release of bioactive BMP-2, *Biomaterials* 33 (2012) 6113–6122. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.030>.
- [70] K.Y. Lee, M.C. Peters, D.J. Mooney, Comparison of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in SCID mice, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 87 (2003) 49–56. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(02\)00349-8](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(02)00349-8).
- [71] J. Li, E. Weber, S. Guth-Gundel, M. Schuleit, A. Kuttler, C. Halleux, N. Accart, A. Doelemeyer, A. Basler, B. Tigani, K. Wuersch, M. Fornaro, M. Kneissel, A. Stafford, B.R. Freedman, D.J. Mooney, Tough Composite Hydrogels with High Loading and Local Release of Biological Drugs, *Adv. Healthc. Mater.* 7 (2018) e1701393. <https://doi.org/10.1002/adhm.201701393>.
- [72] Y. You, Y. Xie, Z. Jiang, Injectable and biocompatible chitosan-alginate hydrogels, *Biomed. Mater.* 14 (2019) 025010. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aaff3d>.
- [73] S. Chaterji, I.K. Kwon, K. Park, Smart Polymeric Gels: Redefining the Limits of Biomedical Devices, *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 1083–1122. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.018>.
- [74] X. Wang, E. Wenk, X. Hu, G.R. Castro, L. Meinel, X. Wang, C. Li, H. Merkle, D.L. Kaplan, Silk coatings on PLGA and alginate microspheres for protein delivery, *Biomaterials* 28 (2007) 4161–4169. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.05.036>.
- [75] L. Meinel, E. Zoidis, J. Zapf, P. Hassa, M.O. Hottiger, J.A. Auer, R. Schneider, B. Gander, V. Luginbuehl, R. Bettschart-Wolfisberger, O.E. Illi, H.P. Merkle, B. von Rechenberg, Localized insulin-like growth factor I delivery to enhance new bone formation, *Bone* 33 (2003) 660–672. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(03\)00207-2](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(03)00207-2).
- [76] J.S. Golub, Y. Kim, C.L. Duvall, R.V. Bellamkonda, D. Gupta, A.S. Lin, D. Weiss, W. Robert Taylor, R.E. Guldberg, Sustained VEGF delivery via PLGA nanoparticles promotes vascular growth, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 298 (2010) H1959–1965. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00199.2009>.
- [77] M. Morille, T. Van-Thanh, X. Garric, J. Cayon, J. Coudane, D. Noël, M.-C. Venier-Julienne, C.N. Montero-Menei, New PLGA–P188–PLGA matrix enhances TGF- β 3 release from pharmacologically active microcarriers and promotes chondrogenesis of mesenchymal stem cells, *J. Controlled Release* 170 (2013) 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.04.017>.
- [78] H. Sun, L. Mei, C. Song, X. Cui, P. Wang, The in vivo degradation, absorption and excretion of

- PCL-based implant, *Biomaterials* 27 (2006) 1735–1740. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.09.019>.
- [79] T. Limongi, A. Rocchi, F. Cesca, H. Tan, E. Miele, A. Giugni, M. Orlando, M. Perrone Donnorso, G. Perozziello, F. Benfenati, E. Di Fabrizio, Delivery of Brain-Derived Neurotrophic Factor by 3D Biocompatible Polymeric Scaffolds for Neural Tissue Engineering and Neuronal Regeneration, *Mol. Neurobiol.* 55 (2018) 8788–8798. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1022-z>.
- [80] S.M. Ward, M. Skinner, B. Saha, T. Emrick, Polymer–Temozolomide Conjugates as Therapeutics for Treating Glioblastoma, *Mol. Pharm.* 15 (2018) 5263–5276. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00766>.
- [81] A. Nojoomi, E. Tamjid, A. Simchi, S. Bonakdar, P. Stroeve, Injectable polyethylene glycol-laponite composite hydrogels as articular cartilage scaffolds with superior mechanical and rheological properties, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 66 (2017) 105–114. <https://doi.org/10.1080/00914037.2016.1182914>.
- [82] S.I. Jeong, M.D. Krebs, C.A. Bonino, S.A. Khan, E. Alsberg, Electrospun alginate nanofibers with controlled cell adhesion for tissue engineering, *Macromol. Biosci.* 10 (2010) 934–943. <https://doi.org/10.1002/mabi.201000046>.
- [83] J.Y. Park, J.-H. Shim, S.-A. Choi, J. Jang, M. Kim, S.H. Lee, D.-W. Cho, 3D printing technology to control BMP-2 and VEGF delivery spatially and temporally to promote large-volume bone regeneration, *J. Mater. Chem. B* 3 (2015) 5415–5425. <https://doi.org/10.1039/C5TB00637F>.
- [84] M.C. Phipps, Y. Xu, S.L. Bellis, Delivery of Platelet-Derived Growth Factor as a Chemotactic Factor for Mesenchymal Stem Cells by Bone-Mimetic Electrospun Scaffolds, *PLOS ONE* 7 (2012) e40831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040831>.
- [85] L. Cao, Y. Yu, J. Wang, J.A. Werkmeister, K.M. McLean, C. Liu, 2-N, 6-O-sulfated chitosan-assisted BMP-2 immobilization of PCL scaffolds for enhanced osteoinduction, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 74 (2017) 298–306. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.004>.
- [86] R. Sasisekharan, G. Venkataraman, Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4 (2000) 626–631. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(00\)00145-9](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00145-9).
- [87] G. Li, P. Yang, W. Qin, M.F. Maitz, S. Zhou, N. Huang, The effect of coimmobilizing heparin and fibronectin on titanium on hemocompatibility and endothelialization, *Biomaterials* 32 (2011) 4691–4703. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.025>.
- [88] Y. Ikegami, H. Mizumachi, K. Yoshida, H. Ijima, Heparin-conjugated collagen as a potent growth factor-localizing and stabilizing scaffold for regenerative medicine, *Regen. Ther.* 15 (2020) 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2020.10.002>.
- [89] A.K. Jha, A. Mathur, F.L. Svedlund, J. Ye, Y. Yeghiazarians, K.E. Healy, Molecular weight and concentration of heparin in hyaluronic acid-based matrices modulates growth factor retention kinetics and stem cell fate, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 209 (2015) 308–316. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.04.034>.
- [90] N.J. Trengove, H. Bielefeldt-Ohmann, M.C. Stacey, Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing and healing chronic leg ulcers, *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* 8 (2000) 13–25. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475x.2000.00013.x>.

- [91] L.F. Brown, K.T. Yeo, B. Berse, T.K. Yeo, D.R. Senger, H.F. Dvorak, L. van de Water, Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing, *J. Exp. Med.* 176 (1992) 1375–1379. <https://doi.org/10.1084/jem.176.5.1375>.
- [92] C.J. Powers, S.W. McLeskey, A. Wellstein, Fibroblast growth factors, their receptors and signaling, *Endocr. Relat. Cancer* 7 (2000) 165–197. <https://doi.org/10.1677/erc.0.0070165>.
- [93] C.A. Russo, C. Steiner, W. Spector, Hospitalizations Related to Pressure Ulcers Among Adults 18 Years and Older, 2006, in: *Healthc. Cost Util. Proj. HCUP Stat. Briefs*, Agency for Healthcare Research and Quality (US), Rockville (MD), 2006. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54557/> (accessed October 11, 2023).
- [94] Q. Zhao, R. Lin, C. Liu, J. Zhao, G. Si, L. Song, J. Meng, Quantitative analysis on in vivo tumor-microvascular images from optical-resolution photoacoustic microscopy, *J. Biophotonics* 12 (2019) e201800421. <https://doi.org/10.1002/jbio.201800421>.
- [95] J. Missbach-Guentner, J. Hunia, F. Alves, Tumor blood vessel visualization, *Int. J. Dev. Biol.* 55 (2011) 535–546. <https://doi.org/10.1387/ijdb.103229jm>.
- [96] M.P. Pusztaszeri, W. Seelentag, F.T. Bosman, Immunohistochemical Expression of Endothelial Markers CD31, CD34, von Willebrand Factor, and Fli-1 in Normal Human Tissues, *J. Histochem. Cytochem.* 54 (2006) 385–395. <https://doi.org/10.1369/jhc.4A6514.2005>.
- [97] T. Shearer, R.S. Bradley, L.A. Hidalgo-Bastida, M.J. Sherratt, S.H. Cartmell, Three-dimensional visualisation of soft biological structures by X-ray computed micro-tomography, *J. Cell Sci.* 129 (2016) 2483–2492. <https://doi.org/10.1242/jcs.179077>.
- [98] P.C.M. van Zijl, S.M. Eleff, J.A. Ulatowski, J.M.E. Oja, A.M. Uluğ, R.J. Traystman, R.A. Kauppinen, Quantitative assessment of blood flow, blood volume and blood oxygenation effects in functional magnetic resonance imaging, *Nat. Med.* 4 (1998) 159–167. <https://doi.org/10.1038/nm0298-159>.
- [99] T. Matsumoto, S. Sugita, T. Yaguchi, Biomechanics of Blood Vessels: Structure, Mechanics, and Adaptation, in: M. Niinomi, T. Narushima, M. Nakai (Eds.), *Adv. Met. Biomater. Tissues Mater. Biol. React.*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2015: pp. 71–98. https://doi.org/10.1007/978-3-662-46836-4_4.
- [100] A.R. Pries, B. Reglin, T.W. Secomb, Remodeling of Blood Vessels, *Hypertension* 46 (2005) 725–731. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000184428.16429.be>.
- [101] A.R. Pries, T.W. Secomb, Chapter 1 - Blood Flow in Microvascular Networks, in: R.F. Tuma, W.N. Durán, K. Ley (Eds.), *Microcirc. Second Ed.*, Academic Press, San Diego, 2008: pp. 3–36. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374530-9.00001-2>.
- [102] R. Chaudhry, J.H. Miao, A. Rehman, Physiology, Cardiovascular, in: *StatPearls*, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493197/> (accessed January 4, 2024).
- [103] R. Sharma, S. Sharma, Physiology, Blood Volume, in: *StatPearls*, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526077/> (accessed January 4, 2024).
- [104] H. Rossiter, U. König, C. Barresi, M. Buchberger, M. Ghannadan, C.-F. Zhang, V. Mlitz, R. Gmeiner, S. Sukseree, D. Födinger, L. Eckhart, E. Tschachler, Epidermal keratinocytes form a

- functional skin barrier in the absence of Atg7 dependent autophagy, *J. Dermatol. Sci.* 71 (2013) 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.04.015>.
- [105] R.P. Feehan, L.M. Shantz, Molecular Signaling Cascades Involved in Non-melanoma Skin Carcinogenesis, *Biochem. J.* 473 (2016) 2973–2994. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160471>.
- [106] M. Croft, C.A. Benedict, C.F. Ware, Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies, *Nat. Rev. Drug Discov.* 12 (2013) 147–168. <https://doi.org/10.1038/nrd3930>.
- [107] V. Madan, J.T. Lear, R.-M. Szeimies, Non-melanoma skin cancer, *The Lancet* 375 (2010) 673–685. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61196-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61196-X).
- [108] S. Gabros, T.A. Nessel, P.M. Zito, Sunscreens and Photoprotection, in: StatPearls, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537164/> (accessed October 13, 2023).
- [109] A. Garre, M. Narda, P. Valderas-Martinez, J. Piquero, C. Granger, Antiaging effects of a novel facial serum containing L-Ascorbic acid, proteoglycans, and proteoglycan-stimulating tripeptide: ex vivo skin explant studies and in vivo clinical studies in women, *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 11 (2018) 253–263. <https://doi.org/10.2147/CCID.S161352>.
- [110] A. Svobodová, J. Vostálová, Solar radiation induced skin damage: Review of protective and preventive options, *Int. J. Radiat. Biol.* 86 (2010) 999–1030. <https://doi.org/10.3109/09553002.2010.501842>.
- [111] E. Proksch, J.M. Brandner, J.-M. Jensen, The skin: an indispensable barrier, *Exp. Dermatol.* 17 (2008) 1063–1072. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x>.
- [112] J. D’Orazio, S. Jarrett, A. Amaro-Ortiz, T. Scott, UV Radiation and the Skin, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 12222–12248. <https://doi.org/10.3390/ijms140612222>.
- [113] M.J. Osmond, M.J. McCall, Zinc oxide nanoparticles in modern sunscreens: An analysis of potential exposure and hazard, *Nanotoxicology* 4 (2010) 15–41. <https://doi.org/10.3109/17435390903502028>.
- [114] R.P. Singh, R. Agarwal, Cosmeceuticals and silibinin, *Clin. Dermatol.* 27 (2009) 479–484. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.05.012>.
- [115] M. Ali Karami, B. Sharif Makhmalzadeh, M. Pooranian, A. Rezai, Preparation and optimization of silibinin-loaded chitosan–fucoidan hydrogel: an in vivo evaluation of skin protection against UVB, *Pharm. Dev. Technol.* 26 (2021) 209–219. <https://doi.org/10.1080/10837450.2020.1856871>.
- [116] W. Min, X. Liu, Q. Qian, B. Lin, D. Wu, M. Wang, I. Ahmad, N. Yusuf, D. Luo, The Effects of Baicalin Against UVA-Induced Photoaging in Skin Fibroblasts, *Am. J. Chin. Med.* 42 (2014) 709–727. <https://doi.org/10.1142/S0192415X14500463>.
- [117] L.F. Rodella, G. Favero, R. Boninsegna, B. Buffoli, M. Labanca, G. Scari, L. Sacco, T. Batani, R. Rezzani, Growth factors, CD34 positive cells, and fibrin network analysis in concentrated growth factors fraction, *Microsc. Res. Tech.* 74 (2011) 772–777. <https://doi.org/10.1002/jemt.20968>.
- [118] S. Mirković, T. Djurdjević-Mirković, T. Puškar, Application of concentrated growth factors in reconstruction of bone defects after removal of large jaw cysts – The two cases report, *Vojnosanit. Pregl.* 72 (2015). <https://doi.org/10.2298/4756>.
- [119] C.H.A. Boakye, R. Doddapaneni, P.P. Shah, A.R. Patel, C. Godugu, S. Safe, S.K. Katiyar,

- M. Singh, Chemoprevention of Skin Cancer with 1,1-Bis (3'-Indolyl)-1-(Aromatic) Methane Analog through Induction of the Orphan Nuclear Receptor, NR4A2 (Nurr1), PLOS ONE 8 (2013) e69519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069519>.
- [120] R. Rajan, S. Jose, V.P.B. Mukund, D.T. Vasudevan, Transferosomes - A vesicular transdermal delivery system for enhanced drug permeation, J. Adv. Pharm. Technol. Res. 2 (2011) 138–143. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.85524>.
- [121] A. Ascenso, S. Raposo, C. Batista, P. Cardoso, T. Mendes, F.G. Praça, M.V.L.B. Bentley, S. Simões, Development, characterization, and skin delivery studies of related ultradeformable vesicles: transfersomes, ethosomes, and transethosomes, Int. J. Nanomedicine 10 (2015) 5837–5851. <https://doi.org/10.2147/IJN.S86186>.
- [122] S.M. Meeran, T. Punathil, S.K. Katiyar, RETRACTED: IL-12 Deficiency Exacerbates Inflammatory Responses in UV-Irradiated Skin and Skin Tumors, J. Invest. Dermatol. 128 (2008) 2716–2727. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.140>.
- [123] Retraction, Carcinogenesis 39 (2018) 738. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy027>.
- [124] X. Yao, D. Chen, B. Zhao, B. Yang, Z. Jin, M. Fan, G. Tao, S. Qin, W. Yang, Q. He, Acid-Degradable Hydrogen-Generating Metal-Organic Framework for Overcoming Cancer Resistance/Metastasis and Off-Target Side Effects, Adv. Sci. Wein. Baden-Wurt. Ger. 9 (2022) e2101965. <https://doi.org/10.1002/advs.202101965>.
- [125] X. Wei, B. Shao, Z. He, T. Ye, M. Luo, Y. Sang, X. Liang, W. Wang, S. Luo, S. Yang, S. Zhang, C. Gong, M. Gou, H. Deng, Y. Zhao, H. Yang, S. Deng, C. Zhao, L. Yang, Z. Qian, J. Li, X. Sun, J. Han, C. Jiang, M. Wu, Z. Zhang, Cationic nanocarriers induce cell necrosis through impairment of Na(+)/K(+)-ATPase and cause subsequent inflammatory response, Cell Res. 25 (2015) 237–253. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.9>.
- [126] Y. Mi, C.T. Hagan, B.G. Vincent, A.Z. Wang, Emerging Nano-/Microapproaches for Cancer Immunotherapy, Adv. Sci. Wein. Baden-Wurt. Ger. 6 (2019) 1801847. <https://doi.org/10.1002/advs.201801847>.
- [127] Q. Yin, A. Pan, B. Chen, Z. Wang, M. Tang, Y. Yan, Y. Wang, H. Xia, W. Chen, H. Du, M. Chen, C. Fu, Y. Wang, X. Yuan, Z. Lu, Q. Zhang, Y. Wang, Quantitative imaging of intracellular nanoparticle exposure enables prediction of nanotherapeutic efficacy, Nat. Commun. 12 (2021) 2385. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22678-z>.
- [128] H. Sun, P. Saeedi, S. Karuranga, M. Pinkepank, K. Ogurtsova, B.B. Duncan, C. Stein, A. Basit, J.C.N. Chan, J.C. Mbanya, M.E. Pavkov, A. Ramachandran, S.H. Wild, S. James, W.H. Herman, P. Zhang, C. Bommer, S. Kuo, E.J. Boyko, D.J. Magliano, IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045, Diabetes Res. Clin. Pract. 183 (2022) 109119. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109119>.
- [129] E. Everett, N. Mathioudakis, Update on management of diabetic foot ulcers, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1411 (2018) 153–165. <https://doi.org/10.1111/nyas.13569>.
- [130] Health Care Service and Outcomes Among an Estimated 6.7 Million Ambulatory Care Diabetic Foot Cases in the U.S. | Diabetes Care | American Diabetes Association, (n.d.). <https://diabetesjournals.org/care/article/40/7/936/30154/Health-Care-Service-and-Outcomes-Among-an> (accessed October 19, 2023).
- [131] M.A. Nosenko, S.G. Ambaryan, M.S. Drutskaya, Proinflammatory Cytokines and Skin

- Wound Healing in Mice, *Mol. Biol.* 53 (2019) 653–664. <https://doi.org/10.1134/S0026893319050121>.
- [132] L. Cañedo-Dorantes, M. Cañedo-Ayala, Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review, *Int. J. Inflamm.* 2019 (2019) e3706315. <https://doi.org/10.1155/2019/3706315>.
- [133] S.A. Eming, P. Martin, M. Tomic-Canic, Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation, *Sci. Transl. Med.* 6 (2014) 265sr6. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009337>.
- [134] J.S. Boateng, K.H. Matthews, H.N.E. Stevens, G.M. Eccleston, Wound healing dressings and drug delivery systems: a review, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 2892–2923. <https://doi.org/10.1002/jps.21210>.
- [135] S. Barrientos, O. Stojadinovic, M.S. Golinko, H. Brem, M. Tomic-Canic, PERSPECTIVE ARTICLE: Growth factors and cytokines in wound healing, *Wound Repair Regen.* 16 (2008) 585–601. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x>.
- [136] J. Guo, Z. Hu, F. Yan, S. Lei, T. Li, X. Li, C. Xu, B. Sun, C. Pan, L. Chen, Angelica dahurica promoted angiogenesis and accelerated wound healing in db/db mice via the HIF-1 α /PDGF- β signaling pathway, *Free Radic. Biol. Med.* 160 (2020) 447–457. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.08.015>.
- [137] M.R. Akl, P. Nagpal, N.M. Ayoub, B. Tai, S.A. Prabhu, C.M. Capac, M. Gliksman, A. Goy, K.S. Suh, Molecular and clinical significance of fibroblast growth factor 2 (FGF2 /bFGF) in malignancies of solid and hematological cancers for personalized therapies, *Oncotarget* 7 (2016) 44735–44762. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8203>.
- [138] R. Savari, M. Shafiei, H. Galehdari, M. Kesmati, Expression of VEGF and TGF- β Genes in Skin Wound Healing Process Induced Using Phenytoin in Male Rats, *Jundishapur J. Health Sci.* 11 (2019). <https://doi.org/10.5812/jjhs.86041>.
- [139] J. Costales, A. Kolevzon, The therapeutic potential of insulin-like growth factor-1 in central nervous system disorders, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 63 (2016) 207–222. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.01.001>.
- [140] D.R. Clemmons, Role of IGF Binding Proteins in Regulating Metabolism, *Trends Endocrinol. Metab.* 27 (2016) 375–391. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.03.019>.
- [141] J. Boucher, A. Kleinridders, C.R. Kahn, Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6 (2014) a009191. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009191>.
- [142] C. Herder, E.J. Brunner, W. Rathmann, K. Strassburger, A.G. Tabák, N.C. Schloot, D.R. Witte, Elevated levels of the anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist precede the onset of type 2 diabetes: the Whitehall II study, *Diabetes Care* 32 (2009) 421–423. <https://doi.org/10.2337/dc08-1161>.
- [143] I.-T. Lampropoulou, M. Stangou, A. Papagianni, T. Didangelos, F. Iliadis, G. Efstratiadis, TNF- α and Microalbuminuria in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus, *J. Diabetes Res.* 2014 (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/394206>.
- [144] S.M. Ayuk, H. Abrahamse, N.N. Houreld, The Role of Matrix Metalloproteinases in Diabetic Wound Healing in relation to Photobiomodulation, *J. Diabetes Res.* 2016 (2016) 2897656. <https://doi.org/10.1155/2016/2897656>.

- [145] M.B. Dreifke, A.A. Jayasuriya, A.C. Jayasuriya, Current wound healing procedures and potential care, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 48 (2015) 651–662. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.068>.
- [146] Current concepts in the physiology of adult wound healing, *Plast. Aesthetic Res.* 2 (2015) 250–256. <https://doi.org/10.4103/2347-9264.158851>.
- [147] D.K. Mishra, V. Pandey, R. Maheshwari, P. Ghode, R.K. Tekade, Chapter 15 - Cutaneous and Transdermal Drug Delivery: Techniques and Delivery Systems, in: R.K. Tekade (Ed.), *Basic Fundam. Drug Deliv.*, Academic Press, 2019: pp. 595–650. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00015-7>.
- [148] M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani, M.R. Mozafari, Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems, *Pharmaceutics* 10 (2018) 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>.
- [149] R. Su, W. Fan, Q. Yu, X. Dong, J. Qi, Q. Zhu, W. Zhao, W. Wu, Z. Chen, Y. Li, Y. Lu, Size-dependent penetration of nanoemulsions into epidermis and hair follicles: implications for transdermal delivery and immunization, *Oncotarget* 8 (2017) 38214–38226. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17130>.
- [150] E.C. Jung, H.I. Maibach, Animal Models for Percutaneous Absorption, in: V.P. Shah, H.I. Maibach, J. Jenner (Eds.), *Top. Drug Bioavailab. Bioequivalence Penetration*, Springer, New York, NY, 2014: pp. 21–40. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1289-6_2.
- [151] H. Todo, Transdermal Permeation of Drugs in Various Animal Species, *Pharmaceutics* 9 (2017) 33. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9030033>.
- [152] J. Fardous, E. Yamamoto, Y. Omoso, S. Nagao, Y. Inoue, K. Yoshida, Y. Ikegami, Y. Zhang, N. Shirakigawa, F. Ono, H. Ijima, Development of a gel-in-oil emulsion as a transdermal drug delivery system for successful delivery of growth factors, *J. Biosci. Bioeng.* 132 (2021) 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.03.015>.
- [153] K.E. Johnson, T.A. Wilgus, Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair, *Adv. Wound Care* 3 (2014) 647–661. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0517>.
- [154] A. Guerra, J. Belinha, R.N. Jorge, Modelling skin wound healing angiogenesis: A review, *J. Theor. Biol.* 459 (2018) 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2018.09.020>.
- [155] G.G. Gauglitz, H.C. Korting, T. Pavicic, T. Ruzicka, M.G. Jeschke, Hypertrophic Scarring and Keloids: Pathomechanisms and Current and Emerging Treatment Strategies, *Mol. Med.* 17 (2011) 113–125. <https://doi.org/10.2119/molmed.2009.00153>.
- [156] D. Graesser, A. Solowiej, M. Bruckner, E. Osterweil, A. Juedes, S. Davis, N.H. Ruddle, B. Engelhardt, J.A. Madri, Altered vascular permeability and early onset of experimental autoimmune encephalomyelitis in PECAM-1-deficient mice, *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 383–392. <https://doi.org/10.1172/JCI13595>.
- [157] K. El Gehani, L. Al-Kikhia, N. Mansuri, K. Syrjänen, O. Al-Fituri, A. Elzagheid, Angiogenesis in urinary bladder carcinoma as defined by microvessel density (MVD) after immunohistochemical staining for Factor VIII and CD31, *Libyan J. Med.* 6 (2011). <https://doi.org/10.3402/ljm.v6i0.6016>.

- [158] D. Wang, C.R. Stockard, L. Harkins, P. Lott, C. Salih, K. Yuan, D. Buchsbaum, A. Hashim, M. Zayzafoon, R.W. Hardy, O. Hameed, W. Grizzle, G.P. Siegal, Immunohistochemistry in the evaluation of neovascularization in tumor xenografts, *Biotech. Histochem. Off. Publ. Biol. Stain Comm.* 83 (2008) 179–189. <https://doi.org/10.1080/10520290802451085>.
- [159] H. Kim, H.-J. Cho, S.-W. Kim, B. Liu, Y.J. Choi, J. Lee, Y.-D. Sohn, M.-Y. Lee, M.A. Houge, Y. Yoon, CD31+ cells represent highly angiogenic and vasculogenic cells in bone marrow: novel role of nonendothelial CD31+ cells in neovascularization and their therapeutic effects on ischemic vascular disease, *Circ. Res.* 107 (2010) 602–614. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.218396>.
- [160] K. Lee, E.A. Silva, D.J. Mooney, Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments, *J. R. Soc. Interface* 8 (2011) 153–170. <https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0223>.
- [161] T. Alderliesten, P.A.N. Bosman, W.J. Niessen, Towards a real-time minimally-invasive vascular intervention simulation system, *IEEE Trans. Med. Imaging* 26 (2007) 128–132. <https://doi.org/10.1109/TMI.2006.886814>.
- [162] S. Yuheng, Y. Hao, Image Segmentation Algorithms Overview, (2017). <https://doi.org/10.48550/arXiv.1707.02051>.
- [163] T. Saito, Y. Tabata, Preparation of gelatin hydrogels incorporating low-molecular-weight heparin for anti-fibrotic therapy, *Acta Biomater.* 8 (2012) 646–652. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.10.025>.
- [164] T. Buie, J. McCune, E. Cosgriff-Hernandez, Gelatin Matrices for Growth Factor Sequestration, *Trends Biotechnol.* 38 (2020) 546–557. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.12.005>.
- [165] A.-G. Niculescu, A.M. Grumezescu, Applications of Chitosan-Alginate-Based Nanoparticles-An Up-to-Date Review, *Nanomater. Basel Switz.* 12 (2022) 186. <https://doi.org/10.3390/nano12020186>.
- [166] N.J. Shah, B.C. Geiger, M.A. Quadir, M.N. Hyder, Y. Krishnan, A.J. Grodzinsky, P.T. Hammond, Synthetic nanoscale electrostatic particles as growth factor carriers for cartilage repair, *Bioeng. Transl. Med.* 1 (2016) 347–356. <https://doi.org/10.1002/btm2.10043>.
- [167] S.P. Zustiak, J.B. Leach, Characterization of protein release from hydrolytically degradable poly(ethylene glycol) hydrogels, *Biotechnol. Bioeng.* 108 (2011) 197–206. <https://doi.org/10.1002/bit.22911>.
- [168] V.N. Ramazanli, I.S. Ahmadov, SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES BY USING EXTRACT OF OLIVE LEAVES, *Adv. Biol.* (2022).
- [169] K. Khezri, S. Maleki Dizaj, Y. Rahbar Saadat, S. Sharifi, S. Shahi, E. Ahmadian, A. Eftekhari, E. Dalir Abdolahinia, F. Lotfipour, Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells via Curcumin-Containing Nanoscaffolds, *Stem Cells Int.* 2021 (2021) e1520052. <https://doi.org/10.1155/2021/1520052>.
- [170] W. Nan, L. Ding, H. Chen, F.U. Khan, L. Yu, X. Sui, X. Shi, Topical Use of Quercetin-Loaded Chitosan Nanoparticles Against Ultraviolet B Radiation, *Front. Pharmacol.* 9 (2018). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2018.00826> (accessed October 8, 2023).
- [171] M. Zagórska-Dziok, P. Kleczkowska, E. Olędzka, R. Figat, M. Sobczak, Poly(chitosan-

- ester-ether-urethane) Hydrogels as Highly Controlled Genistein Release Systems, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 3339. <https://doi.org/10.3390/ijms22073339>.
- [172] A. Żywicka, D. Peitler, R. Rakoczy, A.F. Junka, K. Fijałkowski, Wet and Dry Forms of Bacterial Cellulose Synthetized by Different Strains of *Gluconacetobacter xylinus* as Carriers for Yeast Immobilization, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 180 (2016) 805–816. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2134-4>.
- [173] A. Sood, M.S. Granick, N.L. Tomaselli, Wound Dressings and Comparative Effectiveness Data, *Adv. Wound Care* 3 (2014) 511–529. <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0401>.
- [174] S. Purnamawati, N. Indrastuti, R. Danarti, T. Saefudin, The Role of Moisturizers in Addressing Various Kinds of Dermatitis: A Review, *Clin. Med. Res.* 15 (2017) 75–87. <https://doi.org/10.3121/cmr.2017.1363>.
- [175] J.P.E. Junker, R.A. Kamel, E.J. Caterson, E. Eriksson, Clinical Impact Upon Wound Healing and Inflammation in Moist, Wet, and Dry Environments, *Adv. Wound Care* 2 (2013) 348–356. <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0412>.
- [176] F.A. Hamza, A.A.-E. Salim, H.N.R. Mohammed, Evaluation of the Effect of Topical Heparin on the Treatment of Facial Burn, *Egypt. J. Hosp. Med.* 77 (2019) 5455–5460.
- [177] M. Labetoulle, A. Rousseau, M. M'Garrech, G. Kaswin, B. Dupas, C. Baudouin, E. Barreau, T. Bourcier, F. Chiambaretta, Efficacy of a Topical Heparan Sulfate Mimetic Polymer on Ocular Surface Discomfort in Patients with Cogan's Epithelial Basement Membrane Dystrophy, *J. Ocul. Pharmacol. Ther. Off. J. Assoc. Ocul. Pharmacol. Ther.* 35 (2019) 359–365. <https://doi.org/10.1089/jop.2019.0015>.
- [178] Ceramides as Natural Moisturizing Factors and Their Efficacy in Dry Skin, (n.d.). <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.3109/9780203908235-18/ceramides-natural-moisturizing-factors-ef%EF%AC%81cacy-dry-skin-genji-imokawa> (accessed October 11, 2023).
- [179] A.I. Markowska, F.-T. Liu, N. Panjwani, Galectin-3 is an important mediator of VEGF- and bFGF-mediated angiogenic response, *J. Exp. Med.* 207 (2010) 1981–1993. <https://doi.org/10.1084/jem.20090121>.
- [180] Z. Lou, Z. Lou, Y. Jiang, Z. Chen, FGF2 and EGF for the Regeneration of Tympanic Membrane: A Systematic Review, *Stem Cells Int.* 2021 (2021) 2366291. <https://doi.org/10.1155/2021/2366291>.
- [181] T. Zhou, X. Li, G. Li, T. Tian, S. Lin, S. Shi, J. Liao, X. Cai, Y. Lin, Injectable and thermosensitive TGF- β 1-loaded PCEC hydrogel system for in vivo cartilage repair, *Sci. Rep.* 7 (2017) 10553. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11322-w>.
- [182] C.-F. Hsu, H.-S. Huang, P.-C. Chen, D.-C. Ding, T.-Y. Chu, IGF-axis confers transformation and regeneration of fallopian tube fimbria epithelium upon ovulation, *EBioMedicine* 41 (2019) 597–609. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.01.061>.
- [183] C.T. Oh, D. Lee, K. Koo, J. Lee, H.S. Yoon, Y.M. Choi, T.-R. Kwon, B.J. Kim, Superoxide dismutase 1 inhibits alpha-melanocyte stimulating hormone and ultraviolet B-induced melanogenesis in murine skin, *Ann. Dermatol.* 26 (2014) 681–687. <https://doi.org/10.5021/ad.2014.26.6.681>.
- [184] P. Krzyszczyk, R. Schloss, A. Palmer, F. Berthiaume, The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes, *Front.*

- Physiol. 9 (2018) 419. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00419>.
- [185] A. Castoldi, C. Naffah de Souza, N.O.S. Câmara, P.M. Moraes-Vieira, The Macrophage Switch in Obesity Development, *Front. Immunol.* 6 (2015) 637. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00637>.
- [186] C. Atri, F.Z. Guerfali, D. Laouini, Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 1801. <https://doi.org/10.3390/ijms19061801>.
- [187] M. Piipponen, D. Li, N.X. Landén, The Immune Functions of Keratinocytes in Skin Wound Healing, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 8790. <https://doi.org/10.3390/ijms21228790>.
- [188] C. Berry-Kilgour, J. Cabral, L. Wise, Advancements in the Delivery of Growth Factors and Cytokines for the Treatment of Cutaneous Wound Indications, *Adv. Wound Care* 10 (2021) 596–622. <https://doi.org/10.1089/wound.2020.1183>.
- [189] Z. Wu, Y. Zhu, H. Liu, G. Liu, F. Li, Wnt10b promotes hair follicles growth and dermal papilla cells proliferation via Wnt/ β -Catenin signaling pathway in Rex rabbits, *Biosci. Rep.* 40 (2020) BSR20191248. <https://doi.org/10.1042/BSR20191248>.
- [190] X. Zhai, M. Gong, Y. Peng, D. Yang, Effects of UV Induced-Photoaging on the Hair Follicle Cycle of C57BL6/J Mice, *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 14 (2021) 527–539. <https://doi.org/10.2147/CCID.S310487>.
- [191] S. Wang, M. Mo, J. Wang, S. Sadia, B. Shi, X. Fu, L. Yu, E.E. Tredget, Y. Wu, Platelet-derived growth factor receptor beta identifies mesenchymal stem cells with enhanced engraftment to tissue injury and pro-angiogenic property, *Cell. Mol. Life Sci.* 75 (2018) 547–561. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2641-7>.
- [192] D. Kaigler, J.A. Cirelli, W.V. Giannobile, Growth factor delivery for oral and periodontal tissue engineering, *Expert Opin. Drug Deliv.* 3 (2006) 647–662. <https://doi.org/10.1517/17425247.3.5.647>.
- [193] X. Wei, M. Li, Z. Zheng, J. Ma, Y. Gao, L. Chen, Y. Peng, S. Yu, L. Yang, Senescence in chronic wounds and potential targeted therapies, *Burns Trauma* 10 (2022) tkab045. <https://doi.org/10.1093/burnst/tkab045>.
- [194] L.M. Karabatas, C. Pastorale, L.F. de Bruno, F. Maschi, O.H. Pivetta, Y.B. Lombardo, H. Chemes, J.C. Basabe, Early manifestations in multiple-low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice, *Pancreas* 30 (2005) 318–324. <https://doi.org/10.1097/01.mpa.0000161888.02244.7a>.
- [195] A.T. Nurden, Platelets, inflammation and tissue regeneration, *Thromb. Haemost.* 105 (2011) S13–S33. <https://doi.org/10.1160/THS10-11-0720>.
- [196] S.J.M. Yussof, E. Omar, D.R. Pai, S. Sood, Cellular events and biomarkers of wound healing, *Indian J. Plast. Surg.* 45 (2012) 220–228. <https://doi.org/10.4103/0970-0358.101282>.
- [197] L. Van De Water, S. Varney, J.J. Tomasek, Mechanoregulation of the Myofibroblast in Wound Contraction, Scarring, and Fibrosis: Opportunities for New Therapeutic Intervention, *Adv. Wound Care* 2 (2013) 122–141. <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0393>.
- [198] C.D. Marshall, M.S. Hu, T. Leavitt, L.A. Barnes, H.P. Lorenz, M.T. Longaker, Cutaneous Scarring: Basic Science, Current Treatments, and Future Directions, *Adv. Wound Care* 7 (2018) 29–45. <https://doi.org/10.1089/wound.2016.0696>.
- [199] S.J. Wolf, W.J. Melvin, K. Gallagher, Macrophage-mediated inflammation in diabetic

- wound repair, *Semin. Cell Dev. Biol.* 119 (2021) 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.06.013>.
- [200] Y. Hao, L. Yang, Y. Liu, Y. Ye, J. Wang, C. Yu, H. Yan, Y. Xing, Z. Jia, C. Hu, H. Zuo, Y. Li, mmu-miR-145a-5p Accelerates Diabetic Wound Healing by Promoting Macrophage Polarization Toward the M2 Phenotype, *Front. Med.* 8 (2021). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.775523> (accessed November 7, 2023).
- [201] S. Patel, S. Srivastava, M.R. Singh, D. Singh, Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing, *Biomed. Pharmacother.* 112 (2019) 108615. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108615>.
- [202] S.-C. Wei, L. Chang, C.-C. Huang, H.-T. Chang, Dual-functional gold nanoparticles with antimicrobial and proangiogenic activities improve the healing of multidrug-resistant bacteria-infected wounds in diabetic mice, *Biomater. Sci.* 7 (2019) 4482–4490. <https://doi.org/10.1039/C9BM00772E>.
- [203] H. Zhan, B. Peng, J. Ma, K. Lin, K. Xu, J. Lin, P.J. Yong, P.C.K. Leung, M.A. Bedaiwy, J. Lin, Epidermal growth factor promotes stromal cells migration and invasion via up-regulation of hyaluronate synthase 2 and hyaluronan in endometriosis, *Fertil. Steril.* 114 (2020) 888–898. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.05.005>.
- [204] R. Wan, J.P. Weissman, K. Grundman, L. Lang, D.J. Grybowski, R.D. Galiano, Diabetic wound healing: The impact of diabetes on myofibroblast activity and its potential therapeutic treatments, *Wound Repair Regen.* 29 (2021) 573–581. <https://doi.org/10.1111/wrr.12954>.
- [205] Y. Xia, X.-E. You, H. Chen, Y.-J. Yan, Y.-C. He, S.-Z. Ding, Epidermal growth factor promotes mesenchymal stem cell-mediated wound healing and hair follicle regeneration, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 10 (2017) 7390–7400.
- [206] S.H. Shin, Y.G. Koh, W.G. Lee, J. Seok, K.Y. Park, The use of epidermal growth factor in dermatological practice, *Int. Wound J.* 20 (2022) 2414–2423. <https://doi.org/10.1111/iwj.14075>.
- [207] S.S. Mathew-Steiner, S. Roy, C.K. Sen, Collagen in Wound Healing, *Bioengineering* 8 (2021) 63. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8050063>.
- [208] U.A. Okonkwo, L. Chen, D. Ma, V.A. Haywood, M. Barakat, N. Urao, L.A. DiPietro, Compromised angiogenesis and vascular Integrity in impaired diabetic wound healing, *PLoS ONE* 15 (2020) e0231962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231962>.
- [209] S. Tsalamandris, A.S. Antonopoulos, E. Oikonomou, G.-A. Papamikroulis, G. Vogiati, S. Papaioannou, S. Deftereou, D. Tousoulis, The Role of Inflammation in Diabetes: Current Concepts and Future Perspectives, *Eur. Cardiol. Rev.* 14 (2019) 50–59. <https://doi.org/10.15420/ecd.2018.33.1>.
- [210] A. Daemi, M.R. Farahpour, A. Oryan, S. Karimzadeh, E. Tajer, Topical administration of hydroethanolic extract of *Lawsonia inermis* (henna) accelerates excisional wound healing process by reducing tissue inflammation and amplifying glucose uptake, *Kaohsiung J. Med. Sci.* 35 (2019) 24–32. <https://doi.org/10.1002/kjm2.12005>.
- [211] M. Modarresi, M.-R. Farahpour, B. Baradaran, Topical application of *Mentha piperita* essential oil accelerates wound healing in infected mice model, *Inflammopharmacology* 27 (2019) 531–537. <https://doi.org/10.1007/s10787-018-0510-0>.
- [212] L. Pradhan, X. Cai, S. Wu, N.D. Andersen, M. Martin, J. Malek, P. Guthrie, A. Veves, F.W.

- LoGerfo, Gene Expression of Pro-Inflammatory Cytokines and Neuropeptides in Diabetic Wound Healing, *J. Surg. Res.* 167 (2011) 336–342. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2009.09.012>.
- [213] O.M. Ighodaro, Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus, *Biomed. Pharmacother.* 108 (2018) 656–662. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.058>.

謝辞

研究室配属当初からの4年間、井嶋 博之 教授には本研究を進める上でのご指導を賜り、その高度な学問的視点と多岐にわたるアプローチに感謝申し上げます。教授のご教示により、研究者としての姿勢を向上させ、研究における喜びと楽しさを垣間見ることができました。また、さまざまな課題への挑戦を通じて、研究者としての能力を向上させ、研究に関する専門的なアドバイスにより、人間的な成長を促進していただきました。九州大学大学院工学研究院化学工学部門 井嶋 博之 教授には、心より深く感謝いたします。

本論文の審査に際し、ご多忙な中で審査を快諾していただき、さらには種々の貴重で有益なご助言を賜りました九州大学大学院工学研究院応用化学部門 後藤 雅宏 教授、九州大学大学院工学研究院機械工学部門 山西 陽子 教授に深く感謝申し上げます。

共同研究を進めるにあたって、組織染色の知識にいたるまで多大なご協力およびご指導をしていただきました、九州大学大学院医学研究院構造病態病理学分野 相島 慎一 教授に深く感謝申し上げます。

本研究に対し、多方面からのご意見を賜り、多大なるお力添えを頂きました九州大学大学院工学研究院化学工学部門 堺 裕輔 准教授に深く感謝申し上げます。

本研究を行う上での貴重なご意見とご指導を賜るとともに、研究者として活動していく上でのノウハウなど様々な面でご指導いただきました九州大学大学院工学研究院化学工学部門 池上 康寛 助教に心より感謝いたします。

日々の研究室生活において、たくさんの貴重なご意見とご協力を賜りました化学工学部門の諸先生方ならびに事務室の方々に深く感謝いたします。

本研究グループとして多大なる貢献をしていただいた Department of Pharmacy Comilla University Jannatul Fardous 准教授、山本 恵美子氏、重栖 佑次氏、井上 雄太氏、武 利春氏、周 愉氏、土井 亨太氏、廣田 祐也氏、胡 笏氏、川崎 教史氏ならびに研究室内を明るく盛り上げ心の支えとなっていた第八講座の皆様に感謝いたします。

最後に、長い学生生活を温かく見守り、支えてくれた家族に心から感謝申し上げます。

令和 6 年 1 月
張 怡