

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11362

研究課題名(和文)活性化大網培養上清を用いた難治性創傷治癒に与える影響に関する基礎的研究

研究課題名(英文)The effect of cultured activated omentum supernatant for wound healing

研究代表者

亀井 譲 (KAMEI, YUZURU)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10257678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：大網組織は異物に反応すると、肥厚して生理活性物質を数倍分泌(活性化大網)し、創傷治癒に関与することが報告されている。そこで本研究では、活性化大網培養上清を利用して、新たな放射線潰瘍・骨髄炎・糖尿暴政潰瘍・神経損傷の治療法開発を試みた。放射線潰瘍及び骨髄炎モデルを安定して作成する事ができず、活性化大網培養上清の影響を検討することができなかった。糖尿病性潰瘍モデルでは、活性化大網培養上清投与群では創閉鎖までの日数は変わらなかったが、早期での創閉鎖を促進していた。座骨神経欠損モデルでは、歩行解析で各群間に有意差を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在糖尿病を強く疑われる人と可能性を否定できない人は、約2210万人と推計され、成人の約2割に当たると報告されている。また糖尿病患者のうち25%が足部潰瘍を発症するとされており、医学的にも、また医療経済的にも糖尿病性潰瘍が大きな問題である事は明らかである。

本研究の結果、活性化大網培養上清は、糖尿病性潰瘍の初期の創傷治癒を促進する事を示した。活性化大網培養上清中の因子を解析して製剤化することにより、多くの糖尿病性潰瘍の治療に使用できる可能性があり、それにより医療経済的にもインパクトのある研究成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Omentum is useful tissue for some kind of diseases, such as radiation ulcer, osteomyelitis and head and neck cancer. It is activated with foreign body, and release many kinds of factors, related to wound healing. In this project, we analysed therapeutic use of cultured activated omentum supernatant for radiation ulcer, osteomyelitis, diabetic ulcer and nerve injury. In radiation ulcer and osteomyelitis model, we could not make stable animal model, therefore we could not proceed our research. In diabetic ulcer model, wound closed day was no statistically different among all groups, but wound area of day7 and 9 was statistically decreased in activated omentum group compared to other groups. In nerve injury model, sciatic functional index, gait length, maximal intensity and maximum contact area is no statistically different among all groups.

研究分野：形成外科学

キーワード：活性化大網培養上清 糖尿病性潰瘍 神経再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

形成外科では、日常の診療で組織欠損に対して組織移植や再建術を行っている。なかでも放射線潰瘍や糖尿病性潰瘍、骨髄炎は難治性創傷となることがしばしばあり、治療に難渋することがある。われわれは、これに対し、大網移植術を行い、良好な治療成績を収めてきた。また、基礎的研究においても、大網を用いた骨再生や感染創治癒・皮膚創傷治癒に関する研究を行ってきた。

大網は、豊富な血管網を持つこと、免疫機能を制御する乳斑(omental milky spot)が存在すること、移植にあたり血管径が非常に長く移植部位の制限があまりないこと、柔らかい組織なため複雑な欠損に対しても充填できるなどの特徴を持ち、難治性創傷の再建材料として非常に優れている。

Litbarg らの報告 (Cell Tissue Res 328:487-497,2007) では、polydextran を腹腔内注入し、1週間後大網を採取すると、組織肥厚・乳斑増大・血管密度増加を認め、FGF や VEGF 等の増殖因子や SDF-1、CXCR4,WT-1 など成体幹細胞マーカー、Nanog、Oct-4、SSEA-1 などの ES 細胞マーカーが豊富に発現するようになる (活性化大網: activated omentum)。

しかし、ドナーの犠牲、術後イレウスなどの合併症、腹腔内手術により既に大網が切除されている場合に利用できないなどの観点からドナー犠牲のない治療法の開発が必要であると考えている。

ドナーの犠牲が不要な再生医療、なかでも iPS 細胞などの幹細胞利用に注目が集まっているが、投与による肺梗塞、腫瘍化などの懸念がある。そのため、細胞培養上清による治療の報告が散見されるようになってきた (Hu G et al. Int J Biol Sci. 7:364-75, 2011.)。

以上の知見から、活性化大網培養上清の利用により、自家大網組織を利用せずに創傷治癒・組織再生の促進を行うことができるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、活性化大網培養上清の、放射線潰瘍・糖尿病性潰瘍の治療の可能性、および骨髄炎や神経損傷に関する治療法としての可能性を検討することである。具体的には、各疾患動物モデルを作成し、活性化大網培養上清、大網培養上清を投与し、その影響を解析することである。

3. 研究の方法

(1) 大網培養上清の回収

大網の活性化は、Litbarg NO らの報告 (Cell Tissue Res 328:487-497,2007) に従い、C57BL/6 マウスの腹腔内にポリデキストラン粒子 (Biogel P-60, 120 μ M; Biorad Laboratories) を注入して行う。マウス腹部より大網を採取し、Kahn SM らの報告 (Clin Exp Metastasis 27:185-196,2010) に従い、DMEM/F12 3mL を用い、24well culture inset 内で器官培養を行う。72 時間後に大網培養上清および活性化大網培養上清をそれぞれ回収した。

(2) 大網培養上清投与による放射線潰瘍の治療の検討

放射線潰瘍モデルは、Tsumano T らの報告 (J Plast Surg Hand Surg. 47(2):83-8,2013.) に従い、C57BL/6 マウス下肢に 15Gy の放射線を照射し、放射線潰瘍を作成した。大網培養上清投与法は潰瘍部への局所投与を行う。Control として、生理食塩水を局注する。経時的にデジタルカメラにて創部の写真撮影を行う。創傷面積を画像解析ソフト Scion Image にて測定し、潰瘍面積の経時的推移をコントロール群と比較する。

(3) 大網培養上清投与による骨髄炎の治療の検討

骨髄炎モデルは、Horst SA らの方法 (Am J Pathol 181:1206-1214,2012.) に従い、C57BL/6 尾静脈に黄色ブドウ球菌 6850 株 (53657; ATCC, Manassas, VA) 10^6 CFUs を投与すると、投与後 2 週までで急性期、30 日以降で慢性期の脛骨骨髄炎となる。大網培養上清投与法は潰瘍部への局所投与および尾静脈からの全身投与を行い、投与法・投与量の至適化を行う。Control として、生理食塩水を局注する。大網培養上清移植後 2、6 週で MRI 撮影を行い、骨の定量化を行い、対照群と比較検討を行う。MRI 撮影後サンプルを採取し、組織学的検討 (HE 染色・von Kossa 染色・免疫染色 (ALP 染色) など) を行う。

(4) 大網培養上清投与による糖尿病性皮膚潰瘍の治療の検討

Galiano らの報告 (Galiano RD et al. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. Wound Repair Regen. 12(4):485-92,2004.) に従い、糖尿病マウス (BKS-db/db, Jackson Laboratory) の背部皮膚に 8mm の皮膚全層欠損を 2 ヶ所作成し、内径 8mm のドーナツ型に成型し、シリコンシートをナイロン糸にて縫着したものを利用した。潰瘍周囲

と潰瘍の中心に活性化大網培養上清、大網培養上清を局所投与し、被覆材にて閉鎖療法を行う。コントロール群として培地を局注した。経時的にデジタルカメラにて創部の写真撮影を行う。創傷面積を画像解析ソフトにて測定し、潰瘍面積の経時的推移をコントロール群と比較した。

(5) 大網培養上清投与による神経再生治療の検討

C57BL/6 の坐骨神経に 5 mm の欠損を作成し、人工神経 (Nervridge) 内に大網上清を満たし置換する。比較対照群では生理食塩水で用いる。24 週間後に walking track test による下肢運動の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 大網培養上清投与による放射線潰瘍の治療の検討

放射線潰瘍モデルは 20Gy 照射して行ったが、放射線潰瘍にバラツキを認めた。また 50Gy 照射では相当数のマウスが死亡してしまった。その後 30, 40Gy 照射モデルも作成したが創部の状態があまりにも一定でないため、以降の実験を行わなかった。

(2) 大網培養上清投与による骨髓炎の治療の検討

研究期間中に、C57BL/6 尾静脈に黄色ブドウ球菌 6850 株を投与したが、骨髓炎が安定して確認できなかった。そのため、以降の実験は行えなかった。

(3) 大網培養上清投与による糖尿病性皮膚潰瘍の治療の検討 (図 1)

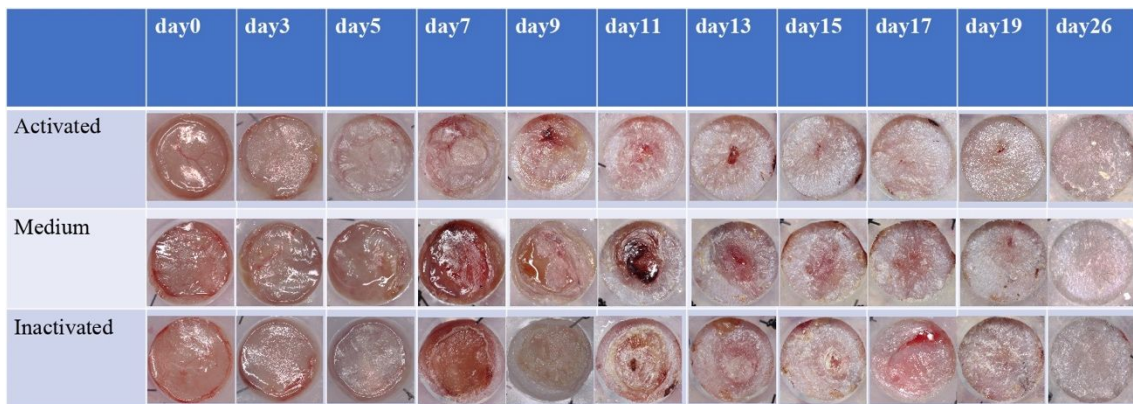


図 1 各群の代表的な経時的写真 上段：活性化大網培養上清群、中段：培地群、下段大網培養上清群

総閉鎖までに要した日数は、活性化大網群で 17.5 ± 2.7 日、大網培養上清群で 17.7 ± 1.9 日、培地群で 20.5 ± 1.2 であったが、各群間に統計学的有意差を認めなかった。

活性化大網群は Day7 と 9 で他群と比較し優位に創面積が減少していた。活性化大網培養上清は早期の総閉鎖を促進する事を確認した。(図 2)

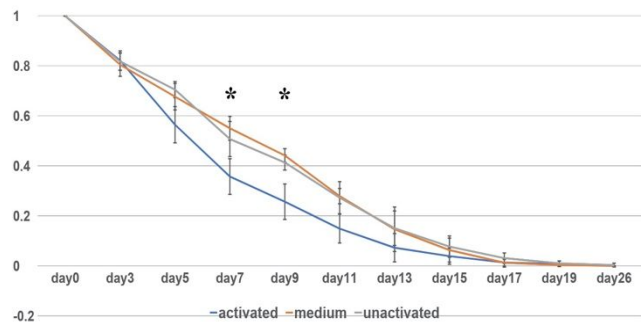


図 2 創面積の経時変化 (*p < 0.05)

(4) 大網培養上清投与による神経再生

活性化大網培養上清群、大網培養上清群、生食群で比較を行った。座骨神経機能指数・最大接触面積・最大強度などの項目を比較したが、全群間で統計学的有意差を認めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	蛭沢 克己 (EBISAWA KATSUMI) (20397459)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	
研究分担者	高成 啓介 (TAKANARI KEISUKE) (80378190)	名古屋大学・医学系研究科・准教授 (13901)	
研究分担者	神戸 未来 (KANBE MIKI) (50597862)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	