

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17037

研究課題名(和文) 熱傷・褥瘡におけるS1P外用治療のマクロファージ活性および治癒促進効果

研究課題名(英文) Macrophage activity and accelerated healing of topical S1P treatment in burns and pressure ulcers.

研究代表者

柘植 琢哉 (Tsuge, Takuya)

日本医科大学・大学院医学研究科・研究生

研究者番号：40774352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：真皮深層レベルの熱傷(deep dermal burn: DDB)や褥瘡は、壊死組織を伴う皮膚の損傷であり、長期治療期間と多大な負担を要する。壊死組織除去、抗菌作用および創傷治癒促進を全て同時にできる治療は、現在のところ存在せず、新たな治療法の確立が求められる。スフィンゴシン1-リン酸(S1P)は、炎症、免疫、血管新生などに関与する重要な脂質メディエーターであり、マクロファージの動員や分化を調節する。創傷の治癒において、S1Pの有効性を検討し、創治癒や血管新生の促進を確認する事ができた。今後新たな治療薬としても期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラット熱傷モデルのスフィンゴシン1-リン酸外用による創治癒の比較や光超音波イメージングや免疫染色による治癒過程の血管新生の解析を行い、血管新生や壊死組織の融解を促進する事により治癒が促進される可能性が考えられた。さらに壊死組織融解にマクロファージM1分画の関与がある可能性をフローサイトメトリにより検討した。研究の内容は論文としてInternational Journal of Molecular Scienceに掲載された。

研究成果の概要(英文)：Deep dermal burn (DDB) and pressure ulcer are skin damage with necrotic tissue and require a long treatment period. There is currently no treatment capable of simultaneously removing necrotic tissue, antibacterial action, and promoting wound healing. A new treatment method is required to be established. Sphingosine 1-phosphate (S1P) is an important lipid mediator involved in inflammation, immunity and angiogenesis, and regulates macrophage recruitment and differentiation. The efficacy of S1P in wound healing was examined, and it was confirmed that wound healing and angiogenesis were promoted. It is expected as a new therapeutic method in the future.

研究分野：形成外科

キーワード：スフィンゴシン1-リン酸 deep dermal burn: DDB マクロファージ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

真皮深層レベルの熱傷(deep dermal burn: DDB)や褥瘡は、壊死組織を伴う皮膚の損傷であり、長期治療期間と多大な負担を要する。壊死組織除去、抗菌作用および創傷治癒促進を全て同時にできる治療は、現在のところ存在せず、壊死組織除去に長期間を要し、創傷治癒機転が阻害されることも多く、新たな治療法の確立が求められる。

### 2. 研究の目的

スフィンゴシン 1-リン酸(S1P)は、炎症、免疫、血管新生などに関与する重要な脂質メディエーターであり、マクロファージの動員や分化を調節する。特にリンパ球の動員には不可欠であり、マクロファージ亜型のシフトにも関与していると考えられ、壊死組織の自己融解や血管新生を促す事が予想され、新たな創傷治療薬として、その有効性を検討する。

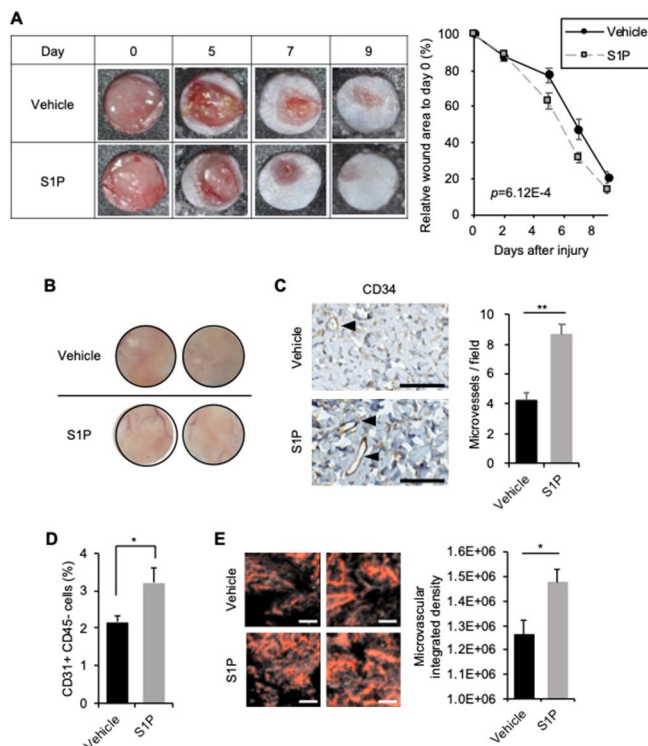
### 3. 研究の方法

S1P外用治療の有効性を、ラット DDB モデルを用いて検討した。F344 ラット雄(8週、約 200g)を対象とし、対照(4% BSA)、治療(S1P 群)を含有する軟膏(ワセリンベース)をそれぞれ作成し、ラットを 10mm 円形の穴をあけた熱傷治具に置き、78 °C のウォーターバスに 10 秒間つける事で、10mm 円形の上下・左右対称に、4 か所の DDB を作成した。左に BSA、右に S1P 軟膏を塗布し、フィルムドレッシング、包帯にて固定した。1 日おきに創部の写真を撮影し、軟膏を塗布した。評価として、画像解析ソフト ImageJ を用いて、熱傷エリア解析を行った。また、7 日目の創部をサンプルとして採取し、病理標本(H&E 染色)を作成し、壊死組織の量について ImageJ で解析を行った。血管新生についても、光超音波を用いた 3D 血管網画像を用いた評価を行った。

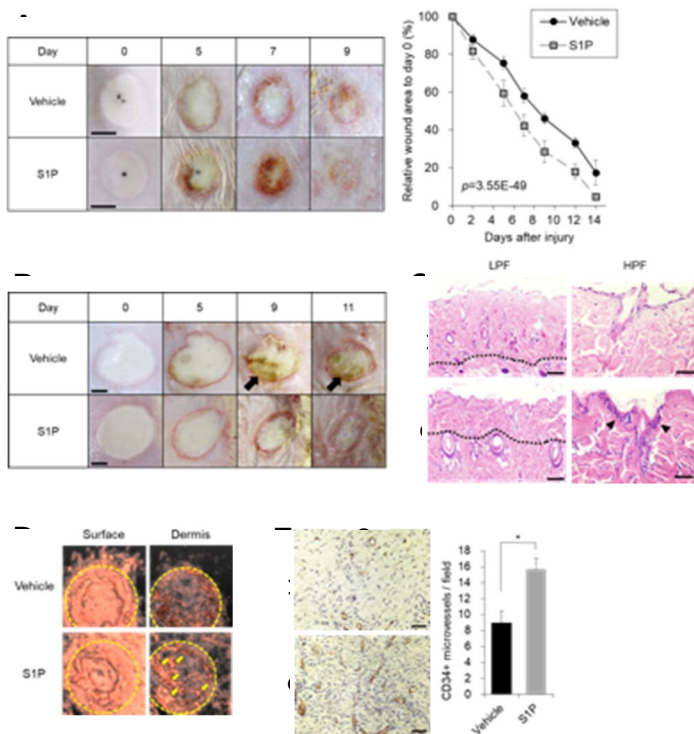
また、受傷後の創表面における壊死組織融解へのマクロファージの関与の検討として、受傷後 7 日目で熱傷組織を採取し、細胞を分離し、フローサイトメトリーを用いてマクロファージ分画の解析を行った。同時に、マクロファージのマーカーである F4/80 の免疫染色も行い解析中を行った。また、DDB モデルのみでなく、切除創モデルにおいても同様の研究を行った。

### 4. 研究成果

S1P 軟膏の外用は血管新生を増加させ、DDB と切除創の両者の治癒を促進した。創傷を 1  $\mu$ M の S1P 軟膏で局所的に治療を行い比較検討した。S1P 軟膏は切除創の閉鎖を大幅に促進した(図 1, A)。さらに、上皮形成の時点での創傷の全体の血管数によって示されるように、血管新生を促進した。(図 1, B)。血管新生の促進はその他の方法でも確認された。第一に、免疫組織化学では、CD34 発現の S1P 軟膏が 5 日目の微小血管密度を 2 倍にすることを示した(図 1, C)。第二に、フローサイトメトリー分析において、S1P 軟膏が 7 日目の創傷内の CD31 + CD45-細胞の数を有意に増加させることを示した(図 1, D)。第三に、6 日目の創傷の光超音波イメージングにより、S1P 軟膏は血管新生の尺度と考えられる微小血管の密度の上昇が示された。(図 1, E)。



S1P 軟膏は、直径 10mm の DDB の治癒を著しく促進した (図 2、A)。 S1P 軟膏も直径 20mm の DDB の治癒を促進し、壊死組織は S1P で処理された DDB で少ない可能性が示された (図 2、B)。 S1P を外用した DDB では損傷した組織が薄くなり、炎症細胞浸潤が増加することも組織学的に確認された (直径 20 mm、7 日目、図 2、C)。 光超音波イメージングでは、S1P 軟膏が微小血管の統合密度を有意に上昇させたことを示した (直径 20 mm、直径 14、図 2、D)。 免疫組織化学では、CD34 発現の S1P 軟膏が微小血管密度を約 2 倍にすることを示した (直径 10 mm、7 日目、図 2、E)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masayo Aoki , Hiroaki Aoki , Partha Mukhopadhyay , Takuya Tsuge , Hirofumi Yamamoto , Noriko M Matsumoto, Eri Toyohara, Yuri Okubo , Rei Ogawa , Kazuaki Takabe	4. 巻 20(14)
2. 論文標題 Sphingosine-1-Phosphate Facilitates Skin Wound Healing by Increasing Angiogenesis and Inflammatory Cell Recruitment with Less Scar Formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3381-3397
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20143381	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takuya Tsuge
2. 発表標題 Topical Application of Sphingosine-1-Phosphate Promotes Deep Dermal Burn Healing
3. 学会等名 12th Annual Academic Surgical Congress（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔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
研究協力者	青木 雅代  (Aoki Masayo)	日本医科大学  (32666)	