

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16529

研究課題名（和文）間葉系幹細胞及び培養上清を用いた新規重症熱傷治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel therapy for severe burns using mesenchymal stem cells and cultured supernatants

研究代表者

澤田 悠輔（Sawada, Yusuke）

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90805897

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：C57BL/6マウス（8-9週齢）を用いて、マウス骨髄由来間葉系幹細胞（MSC）を作成した。湯浴法による度熱傷モデルマウス（20%TBSA）に対して、MSC培養上清100μlを熱傷受傷直後から5日間連続して静注した。熱傷受傷から7・14・21日後に熱傷皮膚の肉眼的解析を行った。その結果、生理食塩水を静注したコントロール群と比較して、MSC培養上清投与群では、局所の熱傷皮膚病変が肉眼的に改善する傾向があることが明らかになった。MSC培養上清の投与によって、重症熱傷が早期に治癒できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症熱傷における全身の侵襲後免疫不全や炎症反応に対して画期的な治療法は未だに開発されていない。本研究成果は、重症熱傷症例に対して、骨髄由来間葉系幹細胞（MSC）そのものではなく、MSC培養上清のみを用いても治療効果があることを示唆している。MSCは体性幹細胞であり、倫理的な問題や安全性の問題が比較的少ないとされ、すでに他の疾患でも臨床応用されている。さらに、MSC培養上清だけでも重症熱傷に対して治療効果があるのであれば、治療が困難な熱傷患者に対して、より負担が少なく効果的な治療を行える可能性があり、その学術的意義や社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) were generated using C57BL/6 mice (8-9 weeks old). In a mouse model of severe burn injury (20% TBSA) using the hot water, 100 μl of MSC culture supernatant was injected intravenously for five consecutive days immediately after burn injury. Gross analysis of burn skin was performed 7, 14 and 21 days after burn injury. The results showed that localised burn skin lesions tended to improve grossly in the MSC culture supernatant-treated group compared to the saline-treated control group. It was suggested that the administration of MSC culture supernatant may allow early healing of severe burns.

研究分野：救急医学

キーワード：熱傷 間葉系幹細胞 間葉系幹細胞培養上清 創傷治癒

### 1. 研究開始当初の背景

重症熱傷患者の治療においては、局所治療と全身管理が重要である。局所の熱傷皮膚病変に対しては、早期の手術（デブリドマン及び皮膚移植）を行うことが一般的である。また、自家皮膚移植に加えて、自家培養表皮を用いた植皮術も行われるようになってきており、植皮範囲や回数に限界があるものの、局所の熱傷皮膚に対する治療法は、近年向上が見られている。

一方で、重症熱傷患者では、高度な侵襲によって、全身の免疫不全や炎症反応が活性化することに加えて、皮膚のバリア機能も破綻するために、全身が易感染状態となり、重症感染症が引き起こされることが多い。そのため、重症熱傷患者の主要な死因は、受傷早期のショック・臓器不全と感染であったとされている<sup>1)</sup>。

このように、重症熱傷患者の治療は、局所の皮膚熱傷の改善を目指すだけでなく、全身に起こる炎症反応や感染に対する管理が重要となるが、全身管理に対するブレイクスルーとなるような治療法は開発されていないのが現状である。

### 2. 研究の目的

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell; MSC) は、多分化能と抗炎症作用を保持している体性幹細胞である。そのため、①自家移植が可能②安全性が高い③他の疾患で既に臨床応用されている④少量の骨髓液から分離培養できるなどの特徴を持っている。また、MSC 培養上清には、抗炎症作用を有する液性因子が多数含まれており、MSC を投与するよりもさらに安全性を担保することができ、技術的にも簡便に全身の炎症反応や感染を制御できるような治療効果を期待できる。

本研究では、熱傷モデルマウスを作成し、MSC 培養上清を投与することにより、重症熱傷への治療に有効であることを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

既存の報告と同様の作成方法<sup>2)</sup>により、C57BL/6 マウス (8-9 週齢) を用いて、湯浴法 (90℃、10 秒) によるⅢ度熱傷モデルマウス (20%TBSA) を作成した。また、C57BL/6 マウス (8-9 週齢) を用いて作成したマウス骨髓由来 MSC から、MSC 培養上清を回収した。Ⅲ度熱傷モデルマウスに対して、熱傷受傷直後から 5 日間連続して、MSC 培養上清 100  $\mu$ l (MSC 培養上清群)、または、生理食塩水 100  $\mu$ l (コントロール群) を静注した (図 1)。また、熱傷受傷直後に写真を撮影して熱傷範囲を確認し、受傷から 7・14・21 日後に撮影した写真を用いて、肉眼的に皮膚が治癒している範囲を Image J を用いて測定し、熱傷皮膚の治癒率を解析し、MSC 培養上清群とコントロール群の 2 群間の肉眼的治癒率を比較した。

<b>Ⅲ度熱傷モデル</b>	<b>MSC培養上清静注</b>
マウス：C57BL/6マウス	投与方法：眼窩静脈叢から静注
8-9週齢、メス	投与量：
体重 20g以上	MSC培養上清群：MSC培養上清 100 $\mu$ l
TBSA：20%（背面）	コントロール群：生理食塩水 100 $\mu$ l
作成法：湯浴法	
90℃、10秒	



図 1 Ⅲ度熱傷モデルマウスの作成法と MSC 培養上清の静注

### 4. 研究成果

Ⅲ度熱傷モデルマウスに、熱傷受傷直後から MSC 培養上清を投与したところ、MSC 培養上清群 (n=6) では、受傷 7 日目で 19.4% $\pm$ 14.7%、受傷 14 日目で 50.6% $\pm$ 15.2%、受傷 21 日目で 76.9% $\pm$ 12.2%の肉眼的治癒率が得られた。一方で、生理食塩水を投与したコントロール群 (n=5) では、受傷 7 日目で 11.4% $\pm$ 2.72%、受傷 14 日目で 26.1% $\pm$ 6.6%、受傷 21 日目で 57.0% $\pm$ 6.4%の肉眼的治癒率が得られた。2 群間では受傷 7 日目には有意差は見られなかったものの、受傷 14 日目・21 日目には、MSC 培養上清群の肉眼的治癒率が、コントロール群よりも有意に高いことが明らか

になった (図 2)。

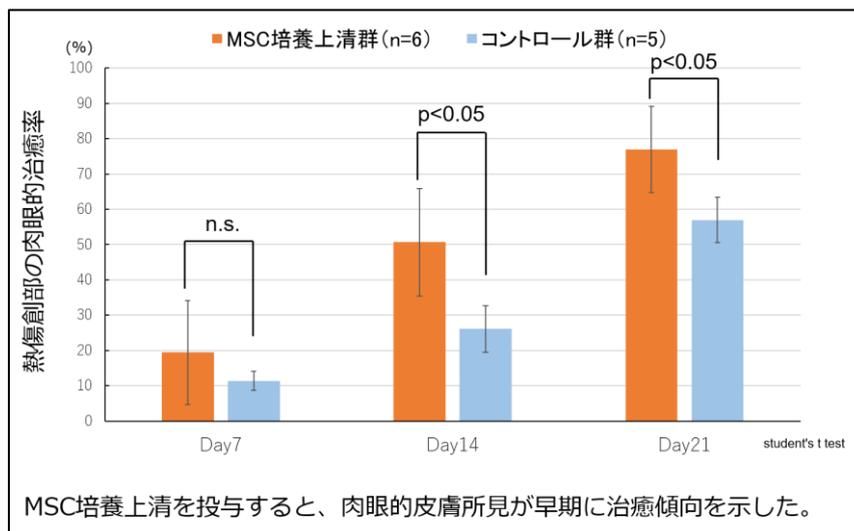


図 2 MSC 培養上清を投与した熱傷皮膚創部の肉眼的治癒率

これらの結果から、MSC 自体を使用しなくとも、MSC 培養上清の投与によって、局所の熱傷皮膚病変が早期に治癒する可能性があることが明らかになった。MSC 培養上清に重症熱傷の治療効果がある可能性が示唆されたが、さらに我々は、MSC から分泌されるエクソソームに着目している。エクソソームは細胞から分泌される脂質二重膜を持つ小胞であり、小胞内に様々な拡散物質やタンパク質を含んでいる。エクソソームは周囲の細胞に取り込まれ、細胞間シグナル伝達物質として働き、創傷治癒にも寄与することが報告されている。今後は、今回の研究結果を発展させ、MSC 由来のエクソソームによる重症熱傷の治療効果を検討する研究を継続していく。

#### <引用文献>

1. Williams FN, Herndon DN, Hawkins HK, et al. : The leading causes of death after burn injury in a single pediatric burn center. Crit Care 2009 ; 13 : R183.
2. Miyazaki H, Kinoshita M, Ono S, Seki S, Saitoh D. Burn-Invoked Reactive Oxygen Species Immediately After Injury are Crucial to Restore the Neutrophil Function Against Postburn Infection in Mice. Shock 2015; 44:252-7.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsujiimoto M, Makiguchi T, Nakamura H, Murata M, Sawada Y, Oshima K, Yokoo S.	4. 巻 2
2. 論文標題 Staphylococcal scalded skin syndrome caused by burn wound infection in an infant: A case report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Burns Open	6. 最初と最後の頁 139-143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.burnso.2018.05.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 菊池 悠希, 戸部 賢, 澤田 悠輔, 金本 匡史, 高澤 知規, 日野原 宏, 大嶋 清宏, 齋藤 繁.	4. 巻 44
2. 論文標題 気道熱傷による呼吸不全に対してveno-venous extracorporeal membrane oxygenation(V-V ECMO)導入により呼吸状態の改善が得られた1症例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 熱傷	6. 最初と最後の頁 125-130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 間葉系幹細胞培養上清を用いた重症熱傷治療法の開発
2. 発表標題 澤田 悠輔, 大嶋 清宏
3. 学会等名 第48回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 沼崎 あゆみ, 福島 一憲, 市川 優美, 一色 雄太, 澤田 悠輔, 中島 潤, 青木 誠, 村田 将人, 大嶋 清宏
2. 発表標題 多職種連携により良好な経過を辿った重症熱傷の1例
3. 学会等名 第47回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻本 賢樹, 牧口 貴哉, 中村 英玄, 桑原 有紀, 村田 将人, 澤田 悠輔, 大嶋 清宏, 横尾 聡.
2. 発表標題 気道熱傷後に遅発性声門狭窄をきたした1例
3. 学会等名 第44回日本熱傷学会総会・学術集会
4. 発表年 2018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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関