

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09862

研究課題名(和文) III度熱傷後難治性潰瘍に皮膚ユニットを再生させるための新規細胞治療の開発

研究課題名(英文) Application of regenerative therapy to skin ulcer caused by deep dermal burn for scarless healing

研究代表者

岡野 純子 (Okano, Junko)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：50447968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：筋膜も切除された深い創の場合、スキャフォールド留置群(GS+)では創作成15日目では対照群(GS-)より上皮化した面積が有意に小さかったものの、創作成30日後ではGS-群より有意に上皮化していた。組織学解析にて、GS+群では血管新生が多数見られた他、毛包の再生も見られたのに対し、GS-群では厚いコラーゲン線維の形成が見られた。

また15日までの治癒過程ではGS+群ではほぼlocalな細胞集団ではなく、スキャフォールドに遊走した骨髄細胞が主となり組織再生を担うことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの全身熱傷の場合、分層植皮が利用されるが、治癒しても皮膚が薄いため

拘縮をきたし、さらに皮膚付属器は再生されない。この問題を解決するため、本研究では創に組織再生をもたらすスキャフォールドの開発を目指し、動物モデルにて皮膚付属器を含めた皮膚、軟部組織の再生に成功した。次はヒトへの外挿を目指す。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we determined that the application of GS in deep injury made vasculogenesis possible by bone marrow-derived cells (BMDCs), leading to regeneration of the fascia as well as the skin with appendages and less contracture deformities compared with control wounds. Furthermore, the Y-chromosome analyses were utilized to clarify the contribution of BMDCs in the homeostasis of the epidermis in the skin. Consequently, it is worthwhile to note BMDC-derived keratinocytes are significantly detected in GS (+) rats, which were sporadically present in GS (-) rats. It appears that the microenvironments provided by GS are suitable for BMDCs transdifferentiation into keratinocytes.

研究分野：形成外科学

キーワード：創傷治癒 骨髄細胞 組織再生 スキャフォールド

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本邦における熱傷は重症患者は減少傾向にあるが、高齢者の熱傷は増加傾向にあり依然形成外科医が日常的に遭遇する疾患である。皮膚全層が焼ける広範囲 III 度熱傷に対しては、多くは自家組織を利用した植皮が施行されてきた。多くの全身熱傷の場合、分層植皮が利用されるが、治癒しても皮膚が薄いためしばしば潰瘍を生じる。この問題を解決するため、主として i) 創傷被覆材の開発、ii) 液性因子の開発、iii) 再生医療を利用した創閉鎖、と 3つのカテゴリーに分けられた研究が精力的になされてきた結果、従来助からなかったような広範囲熱傷の患者も救命できるようになり、それほど重症でない小範囲の III 度熱傷患者でも治療の短縮化が可能になった。従って、現在ではさらに QOL の向上を目指した治療が求められている。というのは、現状の治療では機能的・整容的再建面から考えると治療者、患者ともに満足できる状態ではないからである。すなわち、分層植皮では拘縮をきたしやすい結果、醜状瘢痕を残しやすい。全層植皮でも、汗腺や脂腺まで完全に再現できるわけではなく、機能面、整容面双方において受傷前の皮膚に劣る。自家培養表皮は経費や時間が相当かかる上に生着成績が一定しないのが問題である。

### 2. 研究の目的

1 の問題は、現在行われている治療では「皮膚」とは似て非なる「瘢痕」を生み出していることに集約される。つまり、皮膚は真皮と表皮だけではなく、真皮を栄養する血管や、汗腺や感覚受容器等の付属器からなる一つのユニットであり、このユニットを現行の治療では再生できないことによる。

申請者はこの問題を解決するため、再生医療を最大限に活用した皮膚ユニットの再生を熱傷治療に持ち込むことを計画した。申請者はこれまで、皮膚「局所」で修復できないような大きなエネルギーのかかった傷害皮膚では、骨髄細胞が一時的に皮膚に遊走し、分化転換したり、一時的に傷害された皮膚の修復の「手伝い」をする現象を見出し、その解析を行ってきた。申請者の経験から III 度熱傷の病態を理論構築すると、血管を含む皮膚組織がすべて熱で焼けたことにより、遊走すべき骨髄細胞が到達できない状態にある。従って、まず骨髄由来細胞による血管新生を創部に持ち込むことが必要条件であり、その為には何もない創部に niche を作るようなスキャフォールドを留置すればいいと考えて、以下の実験を行った。

### 3. 研究の方法

本研究では、III 度熱傷創において自家骨髄細胞を用いた再生医療を計画した。しかし、熱傷ラットモデルは熱傷創の深さの再現性が困難であり、マウスでは治療に必要な III 度熱傷を受傷させると生存率が悪く以降の実験に支障をきたした。そこで III 度熱傷創は皮膚全層、軟部組織が欠損することに着目して、ラットで皮膚・軟部組織欠損創のモデルを作成することにした。

(1) ラット背部に 2cmx2cm の皮膚全層および軟部組織、筋膜欠損創を作成後、予備実験でいくつかの素材を埋入し、定量解析および組織学的解析を行い、最適なスキャフォールドを決定した。(2) 野生型ラットに 9Gy の放射線を照射して骨髄細胞を払拭させた後、GFP ラットの骨髄細胞を移植した骨髄移植ラットを用いて (1) と同じ創を作成し、骨髄細胞の挙動を観察した。

(3) 骨髄細胞の分化運命をより詳細に解析するために、GFP より感度のよい Y-クロモソーム染色を試みた。すなわち、野生型メスラットに 9Gy の放射線を照射して骨髄細胞を払拭させた後、GFP オスラットの骨髄細胞を移植することで、基底細胞から分化していく有棘細胞、顆粒細胞、角化細胞にも骨髄由来の細胞があるかを解析した。

### 4. 研究成果

(1) 臨床に様々な目的ですでに使用されている素材を試したが、ゼラチンスポンジ(GS)を留置した場合にもっとも良い創治癒が得られた。筋膜も切除された深い創の場合、GS+群では創作成 15 日目では GS-群より上皮化した面積が有意に小さかったものの、創作成 30 日後では GS-群より有意に上皮化していた。組織学解析にて、GS+群では血管新生が多数見られた他、毛包の再生も見られたのに対し、GS-群では厚いコラーゲン線維の形成が見られた。Masson-Trichrome 染色では、GS-群では膠原線維が染まる青が皮下組織および皮膚全層に渡って広く分布していたのに対し、GS+群では皮下組織に薄く膠原線維が染まるにすぎず、組織解析の結果を裏付けた。また、GS+群では齧歯類に特有の Panniculus carnosus の再生が認められ、これが瘢痕拘縮の予防となり創作成 15 日目では上皮化面積が GS-群と比べて小さかったと考えられた。(2) GS+群では、創作成 15 日目には GFP 細胞集団がスキャフォールド全体に密に分布し、深部から隆起するような像が観察された。これは、深部創の場合筋膜がスキャフォールドとなって筋膜創から apical 層まで隆起して生体が作った「スキャフォールド」によって創傷治癒が進む、という従来とは異なった新説を唱えた Correa-Gallegos et al., (2019) *Nature* の現象を、本研究では筋膜が欠損しても適切なスキャフォールドを留置することによって得られたと解釈できた。また、15 日までの治癒過程では GS+群ではほぼ local な細胞集団ではなく、スキャフォールドに遊走した骨

髓細胞が主となり組織再生を担うことが明らかになった。具体的には、骨髄由来の血管内皮細胞、GS+群ではGS-群より有意に多く観察された。またGS+群では骨髄由来の周皮細胞が観察されたが、GS-群ではほとんど観察されなかった。この結果は、GS+群で新生された血管が収縮可能な、機能する血管であることを示唆している。一方、周皮細胞はGS-群ではほとんど観察されなかった。この実験結果は、GS 群では骨髄由来細胞の遊走環境が整ったことにより、骨髄由来細胞によって血管が新生された結果、vascular niche の形成が可能になって癒痕かつ癒痕拘縮の少ない創治癒が実現できたと考えられる。(3) 従来、表皮細胞は骨髄由来細胞はほとんどなく、基底細胞や毛包に存在する epidermal stem cell から全てが分化すると考えられている。しかし、骨髄移植モデルではドナーに GFP マウスを使用することが多いが、GFP プロモーターは高度に分化していく表皮細胞内では不活化してしまい、偽陰性となっている可能性がある。この点ではY-クロモソームは問題ないが、染色範囲が小さいため、検出しにくい。それでもGS-群でY-クロモソーム陽性の基底細胞、有棘細胞、顆粒細胞を創作成後30日に観察でき、さらにGS+群では有意に多く観察できた。この結果は、骨髄由来幹細胞もスキヤフォールド留置によって表皮再生に関与することが可能になることを示した。すなわち、本結果はスキヤフォールドを留置することにより、局所の幹細胞だけでなく骨髄由来幹細胞も皮膚再生に寄与することにより癒痕の少ない組織再生が可能になった、というメカニズムを明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yuuki Shirai, Junko Okano, Takahiko Nakagawa, Miwako Katagi, Yuki Nakae, Atsuhiko Arakawa, Shinya Koshinuma, Gaku Yamamoto, Hideto Kojima	4. 巻 12
2. 論文標題 Bone marrow-derived vasculogenesis leads to scarless regeneration in deep wounds with periosteal defects	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-24957-1	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 -
1. 著者名 Junko Okano, Jun Arata, Atsuhiko Arakawa, Shuichi Ogino, Teruyo Yamashita	4. 巻 11
2. 論文標題 A Case of Super-giant Basal Cell Carcinoma Initially Diagnosed as Multiple Traumas	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plastic Reconstructive Surgery Global Open	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/GOX.0000000000004812	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 -
1. 著者名 Junko Okano, Takahiko Nakagawa, Miwako Katagi, Hideto Kojima	4. 巻 23
2. 論文標題 diabetic mice Impaired circadian rhythm may disturb epithelialization in the wound healing of the skin in	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygyno.2016.04.081	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 -
1. 著者名 Ohashi Natsuko, Terashima Tomoya, Katagi Miwako, Nakae Yuki, Okano Junko, Suzuki Yoshihisa, Kojima Hideto	4. 巻 11
2. 論文標題 GLT1 gene delivery based on bone marrow-derived cells ameliorates motor function and survival in a mouse model of ALS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12803
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-92285-x	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 Katagi Miwako, Terashima Tomoya, Ohashi Natsuko, Nakae Yuki, Yamada Akane, Nakagawa Takahiko, Miyazawa Itsuko, Maegawa Hiroshi, Okano Junko, Suzuki Yoshihisa, Fujino Kazunori, Eguchi Yutaka, Kojima Hideto	4. 巻 4
2. 論文標題 Malfunctioning CD106-positive, short-term hematopoietic stem cells trigger diabetic neuropathy in mice by cell fusion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1, 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02082-5	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 Okano Junko, Nakae Yuki, Nakagawa Takahiko, Katagi Miwako, Terashima Tomoya, Nagakubo Daisuke, Nakayama Takashi, Yoshie Osamu, Suzuki Yoshihisa, Kojima Hideto	4. 巻 11
2. 論文標題 A novel role for bone marrow-derived cells to recover damaged keratinocytes from radiation-induced injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84818-1	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 Ogino Shuichi, Yamada Atsushi, Kambe Yusuke, Nakano Takashi, Lee Sunghee, Sakamoto Michiharu, Kato Yuki, Okumura Saki, Okano Junko, Yamauchi Koji, Suzuki Yoshihisa, Yamaoka Tetsuji, Morimoto Naoki	4. 巻 2
2. 論文標題 Preliminary report of de novo adipogenesis using novel bioabsorbable implants and image evaluation using a porcine model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Artificial Organs	6. 最初と最後の頁 1, 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10047-022-01313-8	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 -

1. 著者名 岡野純子、鈴木義久、荒川篤宏、荻野秀一、他	4. 巻 35
2. 論文標題 Superchargeを付加した腹直筋皮弁を用いた乳房再建	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 滋賀医大雑誌	6. 最初と最後の頁 1,6
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 -

1. 著者名 Okano Junko, Nakae Yuki, Nakagawa Takahiko, Katagi Miwako, Terashima Tomoya, Nagakubo Daisuke, Nakayama Takashi, Yoshie Osamu, Suzuki Yoshihisa, Kojima Hideto	4. 巻 11
2. 論文標題 A novel role for bone marrow-derived cells to recover damaged keratinocytes from radiation-induced injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84818-1	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 -

1. 著者名 Okano Junko, Arakawa Atsuhiko, Ogino Shuichi, Suzuki Yoshihisa	4. 巻 2020
2. 論文標題 Bilateral plantar fibromatosis complicated by Dupuytren's contracture	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Case Reports	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jscr/rjz402	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 -

1. 著者名 Takamura Hiroshi, Terashima Tomoya, Mori Kanji, Katagi Miwako, Okano Junko, Suzuki Yoshihisa, Imai Shinji, Kojima Hideto	4. 巻 17
2. 論文標題 Bone-Marrow-Derived Mononuclear Cells Relieve Neuropathic Pain after Spinal Nerve Injury in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Methods & Clinical Development	6. 最初と最後の頁 657 ~ 665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtm.2020.03.020	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 -

1. 著者名 Kobashi Shuhei, Terashima Tomoya, Katagi Miwako, Nakae Yuki, Okano Junko, Suzuki Yoshihisa, Urushitani Makoto, Kojima Hideto	4. 巻 28
2. 論文標題 Transplantation of M2-Deviated Microglia Promotes Recovery of Motor Function after Spinal Cord Injury in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 254 ~ 265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2019.09.004	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15件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡野純子
2. 発表標題 キズアトができない外科手術
3. 学会等名 超異分野学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡野純子、白井悠貴、小島秀人
2. 発表標題 胎児特有のscarless wound healingを臨床に持ち込むための試み
3. 学会等名 日本先天異常学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡野純子、荒川篤宏、荒田順、白井悠貴、小島秀人
2. 発表標題 ラット皮質骨露出創における組織再生
3. 学会等名 日本形成外科基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡野 純子、鈴木 義久、樫 美和子、中江 由希、小島 秀人
2. 発表標題 放射線照射により傷害された表皮に遊走する骨髄細胞の役割（第2報）
3. 学会等名 第30回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡野 純子、鈴木 義久、荒川 篤宏、荻野 秀一
2. 発表標題 滋賀医科大学形成外科開設よりゲル充填人工乳房を用いた乳房再建術の総括
3. 学会等名 第64回日本形成外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒川篤宏、岡野純子、荻野秀一、鈴木義久、白井悠貴、小島秀人
2. 発表標題 scaffoldを用いた広範囲皮膚軟部組織欠損創における組織再生の試み
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荻野秀一、李成姫、神戸裕介、坂本道治、岡野純子、山内康治、山岡哲二、森本尚樹
2. 発表標題 新規乳房再建材料の開発
3. 学会等名 第63回日本形成外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺島智也、小橋修平、櫻美和子、中江由希、岡野純子、大橋夏子、鈴木義久、小島秀人
2. 発表標題 IL-4 誘導ミクログリア細胞移植による脊髄損傷への治療戦略
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高血糖は造血幹細胞に病的記憶を残す
2. 発表標題 小島 秀人、櫻 美和子、大橋 夏子、寺島 智也、岡野 純子、中江 由希、鈴木 義久
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荻野秀一、坂本道治、李成姫、奥村早紀、山内康治、神戸裕介、山岡哲二、岡野純子、森本尚樹
2. 発表標題 脂肪組織を形成する吸収性人工材料(人工脂肪)の開発
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡野純子、中江由希、櫻美和子、寺島智也、荻野秀一、鈴木義久、小島秀人
2. 発表標題 放射線傷害を受けた皮膚の修復機構
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒川篤宏、岡野純子、鈴木義久、荻野秀一
2. 発表標題 腹壁ヘルニア再建後広範囲にメッシュが露出したものの保存的治療で治癒が得られた1例
3. 学会等名 第12回創傷外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡野純子、荻野秀一、荒川篤宏、鈴木義久
2. 発表標題 自家組織を用いた乳房再建術直後に右下腿痛を生じ、筋挫傷と判明した1例
3. 学会等名 第126回関西形成外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡野純子、櫻美和子、中江由希、寺島智也、鈴木義久、小島秀人
2. 発表標題 放射線照射により傷害された表皮に遊走する骨髄細胞の役割
3. 学会等名 第29回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒川篤宏 岡野純子 荻野秀一 鈴木義久
2. 発表標題 ラットの皮膚欠損創に対してSpongeIをScaffoldとして用いた骨髄由来幹細胞による皮膚ユニット再生の試み
3. 学会等名 第29回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kelly M. Harrell、Ronald W. Dudek、塩田 浩平	4. 発行年 2020年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 534
3. 書名 イラストレイテッド解剖学	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 皮膚再生を可能にする足場製剤	発明者 岡野純子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、110000796	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------