

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08292

研究課題名（和文）急性期褥瘡の病態解明と新規治療の開発：間葉系幹細胞由来エクソソームに着眼して

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenesis of acute-phase pressure ulcers and development of novel therapies: Focusing on mesenchymal stem cell-derived exosomes

研究代表者

茂木 精一郎 (Motegi, Sei-ichiro)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20420185

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、間葉系幹細胞（MSC）由来エクソソームによる急性期褥瘡の治療効果、及びその制御機構について検討した。我々は、皮膚虚血再灌流障害による皮膚潰瘍の大きさがMSC由来エクソソームによって縮小されることを見出した。さらに、酸化ストレス障害関連因子の発現にも影響を与えることを明らかにし、MSC由来エクソソームによるマウス褥瘡の改善効果の機序に酸化ストレス障害の改善が関わることが示唆された。今回の成果によって、圧迫による潰瘍の発生を予防、抑制する治療を開発できれば、患者のQOL向上、医療費や人件費、労働量の削減につながる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、皮膚潰瘍が生じた後の「慢性期褥瘡」に対する数多くの治療法（各種外用薬・貼付剤、陰圧吸引療法など）が開発されてきたが、皮膚潰瘍が生じる前の「急性期褥瘡」に対する治療法はあまり注目されておらず、ガイドライン上でも、除圧と創部の保護だけでありエビデンスレベルの高い治療法がない。せっかく皮膚潰瘍に至る前の褥瘡を早期に発見することができても、残念ながら、潰瘍になるまで観察していく以外に全く方法がない。今回の研究成果によって、急性期褥瘡の発生を予防、抑制する治療を開発できれば、患者のQOL向上、医療費や人件費、労働量の削減につながる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the therapeutic effects of mesenchymal stem cell (MSC)-derived exosomes on acute pressure ulcers and their regulatory mechanisms. We found that the size of skin ulcers caused by skin ischemia-reperfusion injury was reduced by MSC-derived exosomes. Furthermore, we found that MSC-derived exosomes affected the expression of factors related to oxidative stress disorder, suggesting that the amelioration of oxidative stress disorder is involved in the mechanism of the improvement effect of MSC-derived exosomes on pressure ulcers in mice. If we can develop a treatment that prevents or inhibits the development of pressure ulcers, it will lead to an improvement in patients' QOL and a reduction in medical costs, labor costs, and workload.

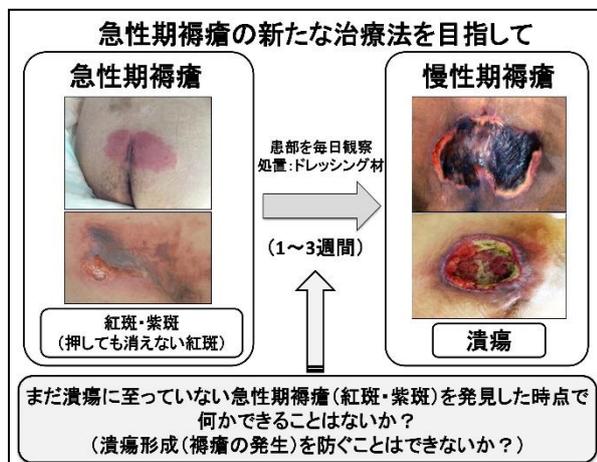
研究分野：創傷治癒

キーワード：急性期褥瘡 間葉系幹細胞 酸化ストレス障害 エクソソーム

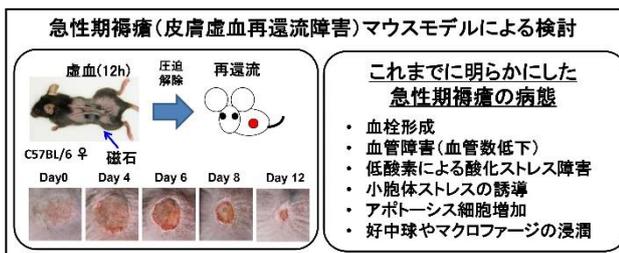
1. 研究開始当初の背景

「褥瘡」とは、患者が体動困難(寝たきり等)となり、硬いベッドなどによって皮膚が圧迫されて生じる皮膚病変(紅斑、紫斑、皮膚潰瘍)のことであり、一般には「床ずれ」と呼ばれる。加齢による様々な変化(脂肪・筋肉量の低下、骨突出、免疫能低下、知覚低下、創傷治癒力低下など)によって高齢者では褥瘡が生じやすく治りにくい。超高齢者社会の我が国においては、褥瘡患者数は増大し、褥瘡の予防・治療・管理の重要性が高まっている。

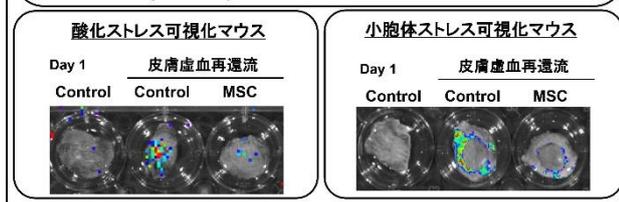
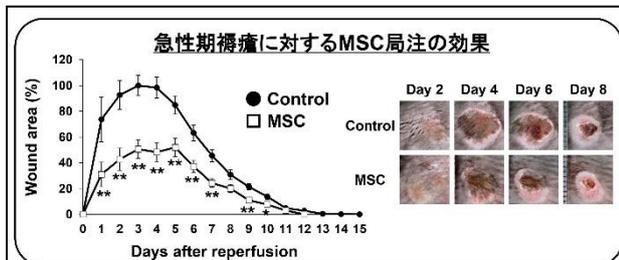
褥瘡は皮膚潰瘍が生じる前の「急性期褥瘡」と皮膚潰瘍が生じた後の「慢性期褥瘡」に分類される(右図)。褥瘡の発生直後は紅斑や紫斑を呈するが、組織壊死が進行し皮膚潰瘍が出現するまでには1~3週間かかり、この時期を「急性期褥瘡」と呼ぶ。急性期褥瘡を発見した時点では減圧・除圧以外に効果的なエビデンスのある治療法は確立されていない。この急性期褥瘡の機序を明らかにし、組織障害の進行を防ぐ治療法を開発できれば、その後の潰瘍の発生、拡大を防ぐことができる画期的な褥瘡治療・予防が期待できる。



褥瘡の発生機序として、持続的な圧迫による虚血に加えて、虚血に陥った組織に血液が再還流すると、活性酸素が発生し、血管内皮細胞や周囲の組織を傷害し、より広範囲に血流障害・組織障害を来すことも想定されている。これを「虚血再還流障害」と呼ぶ。そこで、我々は、皮膚虚血再還流障害によって皮膚潰瘍が生じる「急性期褥瘡モデルマウス」を作製し解析した(右図)。マウス背部皮膚をマグネットで挟んで圧迫し(虚血)、その後マグネットを外して再還流させると最初は紅斑を呈するが、次第に皮膚潰瘍を生じる。我々は、褥瘡部位に多数の血栓が生じ、血管障害による血管量の低下がおこり、低酸素による酸化ストレス、および小胞体ストレスが生じることを明らかにした(右図)。



近年、脳、肝臓、腎臓などの虚血再還流障害モデルにおいて MSC が症状を改善させることが報告されている。しかし、皮膚虚血再還流障害である急性期褥瘡における MSC の治療効果とその機序は不明であった。我々は、急性期褥瘡モデルマウスを用いて、MSC の皮下投与によって急性期褥瘡の後に生じる皮膚潰瘍の形成が抑制できることを見出した(右図)。また、酸化ストレス可視化マウスと小胞体ストレス可視化マウスを用いて検討を行い、MSC の皮下注入によって、急性期褥瘡部位の酸化ストレス、小胞体ストレスが抑制されることも見出した(右上図)。これらの結果より、MSC の皮下注入によって、急性期褥瘡部位に生じる血管傷害や低酸素による酸化ストレス、小胞体ストレスが抑制され、皮膚潰瘍の形成が抑制されることが示唆された。



しかし、MSC は皮下投与によって異常増殖し癌化する可能性も否定できない。そこで次に、MSC から分泌されるエクソソームに注目した。エクソソームは細胞から分泌される脂質2重膜を持つ小胞であり、様々な核酸物質や蛋白質が含まれている。分泌された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く。近年、MSC が分泌するエクソソームが血管新生を促進させ、腎、神経、心筋障害を改善することが示され新たな治療法として注目されている (Stem Cell Res 2010; 4: 214-22.)。そこで、本研究では、急性期褥瘡に対する MSC 由来エクソソームの治療効果を検討し、機序を解明したい。治療効果が得られれば創薬の実現に繋がる。

我々はこれまでに、創傷や腫瘍において、分泌蛋白質 MFG-E8 がインテグリン  $\alpha v \beta 3/5$  との

結合を介して血管新生作用、抗炎症作用、マクロファージ分化制御能を有することを明らかにしてきた。急性期褥瘡に関しては、MFG-E8 皮下注によって、アポトーシス細胞、炎症性サイトカイン、炎症性(M1)マクロファージが抑制され、皮膚潰瘍形成が抑制されることを見出した。興味深いことに、MSC 由来エクソソームは大量の MFG-E8 を含んでいることを見出した。これらの結果より、MFG-E8 が、MSC 由来エクソソームによる急性期褥瘡の治療効果を制御していると仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

次の2点を主な目的とした。

- ① MSC 由来エクソソームによる急性期褥瘡（皮膚虚血再還流障害）の治療効果と、その制御機構を明らかにする。（特に酸化ストレス、小胞体ストレスについて）
- ② MSC 由来エクソソームによる急性期褥瘡の制御における MFG-E8 の役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

- ① MSC 由来エクソソームによる急性期褥瘡（皮膚虚血再還流障害）の治療効果と、その制御機構を明らかにする。（特に酸化ストレス、小胞体ストレスについて）

マウスの背部皮膚を2つの磁石を用いて挟み、圧迫虚血させて12時間後に磁石を外す。紅斑のみで皮膚潰瘍に至っていない時点で MSC 由来エクソソームもしくはコントロールとして PBS を皮下に局注する。その後生じる皮膚潰瘍の面積を比較する。さらに機序を解明するため、潰瘍部を含む皮膚組織を用いて①血管傷害、低酸素量、②炎症細胞浸潤、③炎症性サイトカインの発現、④アポトーシス細胞数などについて免疫染色法や real time PCR 法を用いて比較を行う。我々は、酸化ストレス可視化マウスと小胞体ストレス可視化マウスを用いて、急性期褥瘡を起こしたところ、褥瘡部位の中央に酸化ストレスが強く生じ、褥瘡部位の辺縁に小胞体ストレスが生じることを見出している（前ページ右上図参照）。このマウスを用いて、MSC 由来エクソソーム注入による酸化/小胞体ストレスへの影響について検討する。酸化ストレス関連因子である HO-1, NOX2, NOX4, Trx2, Nrf2 の発現量、小胞体ストレス関連因子である Bip, CHOP の発現量をリアルタイム PCR 法や組織染色で解析する。エクソソームに含まれる microRNA の関与を調べるために、線維芽細胞由来エクソソームと MSC 由来エクソソームの microRNA の発現を網羅的に比較して、MSC 由来エクソソームに多く含まれる microRNA について検討した。

- ② MSC 由来エクソソームによる急性期褥瘡の制御における MFG-E8 の役割を明らかにする。

MFG-E8 WT マウスと MFG-E8 KO マウスから作成した骨髄由来 MSC からエクソソームを抽出して急性期褥瘡マウスに皮下投与し、効果を比較する。上記の検討と同じく、皮膚組織を用いて組織学的及び生化学的な検討を行う。また、酸化ストレス可視化マウスと小胞体ストレス可視化マウスを用いて、MSC 由来エクソソームにおける MFG-E8 の影響について検討する。MFG-E8 WT と KO マウスの MSC 由来エクソソームに内包している miRNA, mRNA などの核酸物質、蛋白質の発現変化をマイクロアレイ法で検討する。MFG-E8 WT/KO MSC 由来エクソソームによる血管新生能やマクロファージ分化への影響について in vitro の検討も行う。

## 4. 研究成果

我々は皮膚虚血再灌流障害（急性期褥瘡）による皮膚潰瘍の大きさが MSC 由来エクソソームの注入によって縮小されることを見出した。褥瘡部の皮膚を採取し、褥瘡による血管量低下やアポトーシス量の増加に対する MSC 由来エクソソームの注入の効果を検討したところ、MSC 由来エクソソームの注入によって抑制された。さらに、炎症性細胞の浸潤数や酸化ストレス障害関連因子の発現にも影響を与えることを明らかにした。これらの結果より、MSC 由来エクソソームによるマウス褥瘡の改善効果の機序に酸化ストレス障害の改善が関わっていることが示唆された。エクソソームに含まれる microRNA の関与を調べるために、線維芽細胞由来エクソソームと MSC 由来エクソソームの microRNA の発現を網羅的に比較して、MSC 由来エクソソームに多く含まれる microRNA について検討したところ、いくつかの microRNA が MSC 由来エクソソームに多く含まれることを見出した。この microRNA が血管内皮細胞や線維芽細胞、炎症性細胞に対して、様々な機能制御を行うことを見出している。現在ほどのような機序で MSC 由来エクソソームに含まれる microRNA が血管内皮細胞や線維芽細胞、炎症性細胞の機能を制御しているのかを解析している。

また、MFG-E8 WT マウスと MFG-E8 KO マウスから作成した骨髄由来 MSC からエクソソームを抽出して機能的な違いがないかを褥瘡マウスモデルを用いて検討している。さらに、MS MFG-E8 WT マウスと MFG-E8 KO マウスから作成した骨髄由来 MSC から産生されるエクソソームを用いて in vitro で血管新生能への影響についても検討を進めている。

これまでに、皮膚潰瘍が生じた後の「慢性期褥瘡」に対する数多くの治療法（各種外用薬・貼付剤、陰圧吸引療法など）が開発されてきたが、皮膚潰瘍が生じる前の「急性期褥瘡」に対する治療法はあまり注目されておらず、ガイドライン上でも、除圧と創部の保護だけでありエビデンスレベルの高い治療法がない。我々は院内で、医師、看護師、栄養士、薬剤師、理学療法士によ

る多職種の褥瘡チームを結成し、早期発見を目標に定期的な観察を行っているが、せつかく皮膚潰瘍に至る前の褥瘡を早期に発見することができても、残念ながら、潰瘍になるまで観察していく以外に全く方法がない。そこで、この急性期褥瘡の時期に注目し、その後の潰瘍の発生を予防、抑制する治療を開発できれば、患者のQOL向上、医療費や人件費、労働量の削減につながると考えられる。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------