

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09138

研究課題名(和文) 羊膜を用いた虚血性潰瘍治療法の開発

研究課題名(英文) Effects of Human Amniotic Membrane on Angiogenesis and Wound Healing in a Rat Ischemic Wound Model

研究代表者

小笠原 弘之(Ogasawara, Hiroyuki)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：90868118

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)：腹部虚血創ラットモデルを用いてヒト羊膜の虚血創における創傷治癒促進効果を検証した。ヒト羊膜を移植する「羊膜移植群」と移植しない「コントロール群」の2群間で比較検討した。術後、創傷の面積を測定し創傷の治癒率を2群で比較し、上皮化促進、血管新生促進、抗炎症の3つの観点から創傷治癒促進効果のメカニズムの検討を行った。その結果として、ヒト羊膜を使用することによる創傷治癒促進効果が確認され、さらに血管新生促進効果についても有意な結果が得られた。一方で、抗炎症効果は本研究では明らかとならず、現時点においては、ヒト羊膜が血管新生を促進することにより虚血性創傷の治癒を促進する可能性が示唆される結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新鮮ヒト羊膜の虚血性創傷に対する血管新生促進作用・創傷治癒促進作用を検証し、新鮮ヒト羊膜が虚血性創傷に対する有用な創傷被覆剤の1つになる可能性を明らかにした。これまで熱傷、皮膚欠損など非虚血性創傷におけるヒト羊膜の創傷治癒や血管新生の有効性が報告され、虚血性創傷に対しても創傷被覆剤として応用できる可能性は高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Using a rat model of abdominal ischemic wounds, we examined the effect of human amniotic membrane on wound healing in ischemic wounds. Comparison was made between two groups: "amniotic membrane transplantation group" with human amniotic membrane and "control group" without amniotic membrane. After surgery, the area of the wound was measured and the wound healing rate was compared between the two groups. The mechanism of the wound healing promotion effect was examined from the three viewpoints of epithelialization promotion, angiogenesis promotion, and anti-inflammation. As a result, the wound healing promotion effect of using human amniotic membrane was confirmed, and significant results were also obtained for the angiogenesis promotion effect. On the other hand, the anti-inflammatory effect was not clarified in this study, suggesting that human amniotic membrane may promote healing of ischemic wounds by enhancing angiogenesis.

研究分野：再生医療

キーワード：ヒト羊膜 血管新生促進作用 創傷治癒 虚血性創傷

1. 研究開始当初の背景

閉塞性動脈硬化症による潰瘍・壊死などの慢性虚血性創傷は、創処置だけでは治癒せず、バイパスや血管内治療などの血行再建を必要とする。しかし患者の多くは高齢者や透析患者で、全身状態や血管の性状が不良な場合が多く、血行再建が困難であることも多い。血行再建不能例では1年で8%しか創の改善がえられず、約30%で下肢切断が必要となる。(Moain A, et al. J Vasc Surg, 2015)。血行再建後もその創部に十分な血流増加が得られず、複数回の手術や創処置などが必要となり、創治癒に数ヶ月を要することも多く、治療中にADLを損なうことが多い。よって、血流の低下があっても治療可能な創傷被覆材が存在すれば、より低侵襲で慢性虚血性創傷の治癒が得られることになり、社会的に非常に有用である。

羊膜は胎盤の最表層を覆う薄膜で、コラーゲンやラミニンなどのタンパクの層から成る組織から構成される。羊膜には、platelet derived growth factor(PDGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF)などのgrowth factorを含み、線維芽細胞の増加、間葉系幹細胞の動員、上皮化、血管新生などを促進する。(Koob TJ, et al. Int. Wound J 2013) 角化細胞や線維芽細胞が分化したり接着したりするための足場となる。(Huang G, et al. Cell Transplant 2013, Mahmoudi-Rad M, et al. Clin Exp Dermatol 2013) 抗感染性を有し感染の危険性を低下させるだけでなく、抗菌性ペプチドであるbeta3-defensinを発現する。(Buhimschi IA, et al. Am J Obstet Gynecol 2004) 羊膜上皮細胞は高い多分化能を有しており、羊膜上皮細胞から放出されるサイトカイン (Transforming growth factor (TGF-), Tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and 2(TIMP-1,2) など) は抗炎症や組織リモデリング作用などによって創傷治癒を促進する (Franz MG, et al. Eplasty 2008, Payne WJ, et al. World J Surg, 2010), などの機能を有する。これまで熱傷、皮膚欠損など血流障害のない創傷での羊膜の使用や有効性が報告されてきた。羊膜の虚血性潰瘍における有効性は報告されていないが、その機能から虚血性潰瘍においても有効である可能性が高いと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、虚血性潰瘍に対して羊膜が創傷治癒を促進することを証明し、その促進効果のメカニズムを上皮化促進、血管新生促進、抗炎症作用の観点から検討することである。

3. 研究の方法

ラット虚血性潰瘍モデルを作製し、その虚血性潰瘍に対して羊膜を移植する群としない群、そして非虚血性潰瘍群の3群を用意し、上記の観点から創傷治癒促進効果を検討した。

(1) ラット虚血性潰瘍モデルの作製

Hofmannらが発表したラット虚血性潰瘍モデル (Hofmann A et al. TISSUE ENGINEERING: 2017) を参考にし、使用するラットモデルを構築した。

(2) ヒト羊膜の採取と凍結保存

東北大学病院産婦人科の協力の下、定期手術で行われる帝王切開手術時に娩出される胎盤から無菌的に羊膜を剥離する。滅菌 Phosphate-buffered saline(PBS)で十分に血液成分を洗浄後に2.5cmに分割してそれぞれ液体窒素内で、次の実験まで凍結保存する。

(3) 羊膜の虚血性創傷に対する創傷治癒への有効性の検討

虚血性潰瘍に対するヒト羊膜の創傷治癒促進効果について以下の方法で検討する。

ラット虚血性潰瘍モデルを作製し、虚血創に対してヒト羊膜を移植する「虚血創移植群」と移植しない「虚血創非移植群」そして「非虚血創群」の3群に分ける。それぞれの創はワセリンガーゼで被覆する。

術後0日目、7日目、14日目、21日目(予備実験の結果で変更あり)に、創傷の面積を測定して創傷の治癒率を3群で比較し、羊膜の創傷治癒に対する有効性を検討する。

術後21日目に適切な方法で安楽死させ、創周囲と筋肉を含む創を切除する。切除標本は5mm幅で分割して、A.上皮化促進、B.血管新生促進、C.抗炎症の3つの観点から創傷治癒促進効果のメカニズムの検討を行う。

A) 上皮化促進効果: 病理学的に、切除標本をヘマトキシリン染色し、創の再上皮化率(Doi H et al. Sci Rep 2016を参考)と新生上皮の厚さを3群間で比較する。

B) 血管新生促進効果: 免疫組織学的に、切除標本に抗CD34抗体を用いた染色を行い、肉芽組織内の新生血管を描出する。創面積あたりの新生血管数を測定し、3群間で比較する。また、3群の切除標本からTotal RNAを抽出して、逆転写しcDNAを採取する。そのcDNAを用いてVascular endothelial growth factor A(Vegfa)に対するReal-time PCRを行い、その発現量を両群で比較する。

C) 抗炎症効果: 3群の切除標本を冷PBS中でホモジナイズした後に、遠心し上清を採取する。その上清を用いて、炎症性・抗炎症性サイトカインに対するELISAを行い、そのサイトカイン量を比較して抗炎症効果を検討する。(炎症性サイトカイン: IL-1 β , IL-6, TNF- α , 抗炎症サイトカイン: IL-10, TGF- β 1, IGF-1)

4. 研究成果

(1) 創傷治癒促進効果の評価

ラット虚血性創傷モデル作成後5日目における創面積は、新鮮羊膜貼付群の平均値 335.4mm² (260–450mm²)、非羊膜貼付群の平均値 459mm² (306–570mm²) と、創傷治癒は新鮮羊膜貼付群で有意に良好であった ($p = 0.0051$)。

(2) 血管新生促進効果の評価

新鮮羊膜貼付群の MVD の平均値は 19.0 (10.4–24.6)、非羊膜貼付群の平均値は 15.1 (10.6–20.8) で、新生血管の増生に関して新鮮羊膜貼付群で統計学的に有意に高かった ($p = 0.0026$)。

(3) 拒絶反応の評価

抗 CD4 抗体と抗 CD8 抗体を用いた免疫染色では新鮮羊膜貼付群と非羊膜貼付群の双方でリンパ球の浸潤は認めなかった。また、抗 CD68 抗体を用いた免疫染色においても新鮮羊膜貼付群と非羊膜貼付群の双方でマクロファージの浸潤は認めなかった。

(4) 局所サイトカイン量の評価

研究方法のごとく、局所サイトカイン量を ELISA により測定した。炎症性サイトカインとして、IL-1 β 、IL-6、TNF- α を測定した。IL-1 β の測定結果は、新鮮羊膜貼付群の平均値は 47.8pg/ml (37.5–62.9pg/ml)、非羊膜貼付群の平均値は 48.6pg/ml (36.2–71.0pg/ml) と、2 群間で差を認めなかった ($p = 0.84$)。IL-6 の測定結果は、新鮮羊膜貼付群の平均値は 43.6pg/ml (9.0–107.1pg/ml)、非羊膜貼付群の平均値は 44.9pg/ml (12.9–56.6pg/ml) と、2 群間で差を認めなかった ($p = 0.13$)。TNF- α の測定結果は、新鮮羊膜貼付群の平均値は 69.0pg/ml (51.0–96.9pg/ml)、非羊膜貼付群の平均値は 81.6pg/ml (48.7–120.6pg/ml) と、2 群間で差を認めなかった ($p = 0.36$)。抗炎症サイトカインとして、IL-10、TGF- β 1、IGF-1 を測定した。IL-10 の測定結果は、新鮮羊膜貼付群の平均値は 56.8pg/ml (16.2–108.2pg/ml)、非羊膜貼付群の平均値は 50.4pg/ml (20.2–88.6pg/ml) と、2 群間で差を認めなかった ($p = 0.99$)。TGF- β 1 の測定結果は、新鮮羊膜貼付群の平均値は 456.3pg/ml (105.4–973.9pg/ml)、非羊膜貼付群の平均値は 431.5pg/ml (123.0–693.3pg/ml) と、2 群間で差を認めなかった ($p = 0.91$)。IGF-1 の測定結果は、新鮮羊膜貼付群の平均値は 34.2pg/ml (14.7–65.2pg/ml)、非羊膜貼付群の平均値は 28.1pg/ml (15.8–50.7pg/ml) と、2 群間で差を認めなかった ($p = 0.56$)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 佐藤将人、戸子台和哲、菅原宏文、今野裕司、田中美也子、岡田薫、小笠原弘之、菅原宏文、齋藤昌利、星合哲郎、宮城重人、後藤昌史、海野倫明、亀井尚
2. 発表標題 ヒト羊膜のラット虚血性潰瘍モデルにおける創傷治癒効果と血管新生促進効果の検討
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masato Sato, Kazuaki Tokodai, Hirofumi Sugawara, Miyako Tanaka, Hiroyuki Ogasawara, Takako Ito, Hitomi Okita, Masatoshi Saito, Tetsuro Hoshiai, Shigehito Miyagi, Michiaki Unno, Takashi Kamei, Masafumi Goto.
2. 発表標題 The use and efficacy of human amnion membrane in ischemia-impaired wound in a rat model
3. 学会等名 17th Congress of the Asian Society of Transplantation (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤将人、戸子台和哲、田中美也子、小笠原弘之、菅原宏文、齋藤昌利、星合哲郎、宮城重人、海野倫明、後藤昌史、亀井尚
2. 発表標題 ヒト羊膜のラット虚血性潰瘍モデルに対する創傷治癒効果の検討
3. 学会等名 第19回日本組織移植学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuaki Tokodai, Masato Sato, Hirofumi Sugawara, Miyako Tanaka, Hiroyuki Ogasawara, Masatoshi Saito, Tetsuro Hoshiai, Shigehito Miyagi, Michiaki Unno, Takashi Kamei and Masafumi Goto.
2. 発表標題 Angiogenesis promoting effects of human amnion membrane in ischemia-impaired wound in a rat model.
3. 学会等名 29th International Congress of The Transplantation Society (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究分担者	戸子台 和哲 (Tokodai Kazuaki) (50581641)	東北大学・大学病院・准教授 (11301)	
研究分担者	菅原 宏文 (Sugawara Hirofumi) (60451572)	東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師 (11301)	
研究分担者	齋藤 昌利 (Saito Masatoshi) (00451584)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	
研究分担者	星合 哲郎 (Hoshiai Tetsuro) (10569560)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	
研究分担者	宮城 重人 (Miyagi Shigehito) (00420042)	東北大学・大学病院・非常勤講師 (11301)	

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