

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16993

研究課題名（和文）皮膚深達性急性創傷に対する新たな局所療法の開発 間葉系幹細胞エクソソームの応用

研究課題名（英文）Development of a novel therapy for deep dermal wounds - application of mesenchymal stem cell exosomes.

研究代表者

佐藤 千草（Sato, Chigusa）

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：70893767

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：広範囲熱傷はいまだに致死率が高く、熱傷面積は予後に大きな影響を与える要因である。経時的に熱傷が進行するburn wound conversionという概念があり、ラットやブタなどの動物モデルを用いて基礎研究が行われてきた。本研究では、マウスを用いたburn wound conversionを模した動物モデルに対し、羊膜由来間葉系幹細胞エクソソームを投与することで、熱傷創に与える影響を検証した。羊膜由来間葉系幹細胞エクソソームを潰瘍など創傷に投与することで、創治癒促進効果が報告されていたが、本研究では、burn wound conversionの抑制効果が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Burn wound conversionによる熱傷創の拡大・深達化を抑制することができれば、広範囲熱傷による生存率改善に貢献しうる。また本研究によりburn wound conversionの病態生理のさらなる解明に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Severe burns continue to have a high mortality rate, and burn surface area is a factor that significantly affects prognosis. The concept of burn wound conversion, in which burns progress, widen and deepen over time, has been the subject of basic research using animal models such as rats and pigs. In this study, we investigated the effects of amnion-derived mesenchymal stem cell exosomes on burn wounds in an animal model of burn wound conversion using mice. While administration of amnion-derived mesenchymal stem cell exosomes to wounds such as ulcers has been reported to promote wound healing, this study suggests that administration of amnion-derived mesenchymal stem cell exosomes may also inhibit burn wound conversion.

研究分野：形成外科

キーワード：羊膜由来幹細胞 エクソソーム マウス 急性創傷 創傷治癒 熱傷

1. 研究開始当初の背景

細胞外小胞の一種であるエクソソームは、様々な mRNA や miRNA、蛋白質などの細胞内物質を別の細胞に運搬し受取先の細胞の性質を変化させる。このようにエクソソームは細胞に能動的に働きかけ、内包する物質がもつ総合的な効果で細胞の性質を変化させる。エクソソームは放出する細胞によってその特性が異なるが、特に間葉系幹細胞由来のエクソソームは糖尿病性潰瘍の創傷治癒に効果を示すなど新しい治療法として注目を集めている。エクソソームは細胞から採取できるが、細胞と異なりエクソソームは滅菌可能で、汎用的な製品として臨床応用しやすいという特徴がある。

形成外科医が日常診療で扱うことが多い、熱傷、化学熱傷、凍傷等の急性創傷では皮膚深部まで損傷されることも多く、治癒後の皮膚は健常皮膚に比べて伸展性に乏しく乾燥しやすいなど、機能面や整容面で大きく劣る。我々は組織再生促進作用と抗炎症作用をもつ羊膜由来間葉系幹細胞エクソソームに着目し、これらを皮膚の深達性急性創傷に作用させることで既存の治療よりも早期の治癒が得られるだけでなく、機能面や整容面でも勝る新規の局所治療法の開発を目指す。

2. 研究の目的

- (1) 皮膚深達性急性創傷の中でも、遭遇する機会の最も多い熱傷に焦点を当て、以下の2項目を目的とした。
- (2) 研究1 : Burn wound conversion を模したマウス動物モデルを作製すること。
- (3) 研究2 : 作製したモデルに対し、羊膜由来間葉系幹細胞エクソソームを投与し、burn wound conversion による熱傷創の拡大・深達化を抑制するか、効果を検証すること。

3. 研究の方法

(1) モデルの作成

8週齢 ICR マウス(雄)を用いて3つの群を作製した。Group1 5s群、Group2 15s群、Group3 25s群。真鍮で作成した金属コテを沸騰したお湯で十分温め、マウスの側腹部に接触させた(5s群 : 5秒間接触、15s群 : 15秒間接触、25s群 : 25秒間接触)。受傷後1週間まで観察し、各群でできる熱傷創のうち、burn wound conversion をもっとも示す群を、burn wound conversion を模した動物モデルとする。

(2) 羊膜由来間葉系幹細胞の培養とエクソソームの抽出

羊膜由来間葉系幹細胞を sub-confluent まで培養したあとに、培養液を除き、洗浄することで培養液中の血清と抗生物質を除去した。これに EV-Up™ MSC 専用エクソソーム産生用培地(富士フィルム和光製薬株式会社)を加え、正常酸素(21%酸素)下もしくは低酸素(1%酸素)下で120時間培養した。それぞれの培養上清を0.2µMのフィルターでろ過し、得たものを VIVASPIN 20(分画分子量100,000、フナコシ株式会社)で、限外ろ過し、20倍に濃縮した。オートフラクションコレクターAFC-V2A1(メイワフォーシス株式会社)と Gen2 qEV10/35(メイワフォーシス株式会社)を用いて、エクソソームが含まれる分画2、3を抽出した。正常酸素下で得た培養上清から抽出したエクソソームのうち、分画2をN2EV、分画3をN3EVとし、低酸素下で得た培養上清から抽出したエクソソームのうち分画2をH2EV、分画3をH3EVと名付けた。

(3) エクソソームの濃度測定

VIDEO DROP ナノ粒子イメージングアナライザー（メイワフォーシス株式会社）を用いて、抽出したエクソソームの濃度を測定した。

(4) 動物モデルへのエクソソームの投与

3. (1)で作製した動物モデルを以下のA-Iの9群に分けて、受傷直後、12時間後、24時間後、48時間後に、熱傷創周囲の皮下に(2)で抽出したエクソソームを投与した。

- (A) N2e7 群 : N2EV 0.2e⁷ particle
- (B) N2e8 群 : N2EV 0.2e⁸ particle
- (C) N3e7 群 : N3EV 0.2e⁷ particle
- (D) N3e8 群 : N3EV 0.2e⁸ particle
- (E) H2e7 群 : H2EV 0.2e⁷ particle
- (F) H2e8 群 : H2EV 0.2e⁸ particle
- (G) H3e7 群 : H3EV 0.2e⁷ particle
- (H) H3e8 群 : H3EV 0.2e⁸ particle
- (I) control 群 PBS (-) 0.2ml

(5) 生存面積の評価

受傷4日後に写真撮影を行い、ImageJソフトウェアを用いて、画像解析を行った。生存面積割合を以下の計算式のように定義した(図1)。

生存面積割合 = (B)生存面積 / (A)全体面積 × 100%

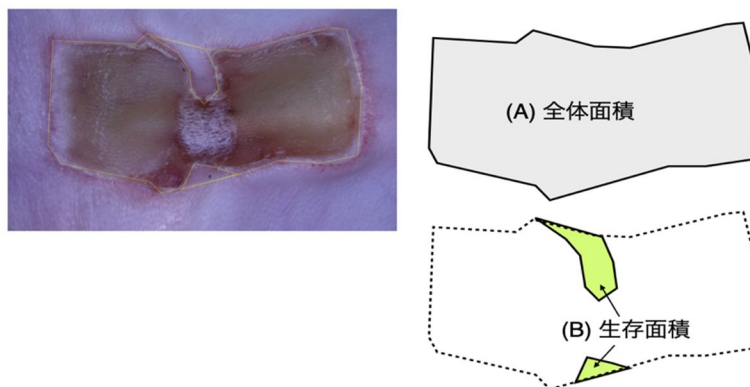


図1 生存面積割合の定義

4. 研究成果

(1) 動物モデル作製

受傷4日目に撮影した写真をImageJソフトウェアで生存面積割合を解析したところ、5s群では20.1% ± 0.6%、15s群では9.6% ± 0.6%、25s群では3.7% ± 0.8%の生存面積割合であった。この結果をTukey-Kramer検定したところ、いずれの群間でも両側5%水準で有意な差を認めた。5s群ではburn wound conversionがわずかにしか生じておらず、25s群ではほとんどの組織が壊死してしまっていたため、動物モデルとしては不適切であると判断した。15s群ではburn wound conversionが生じており、壊死する部分と救済された部分が混在していたため、burn wound conversionを模するモデルとして適切であると判断した。

(2) 生存面積割合

受傷4日目における生存面積割合を各群で比較したところ、control 群と比較し、N2e8 群と N3e7 群、N3e8 群で生存面積割合の増加が見られ、Tukey-Kramer 検定では N3e7 群と control 群の間に両側 5%水準で有意差が見られた (図2)。

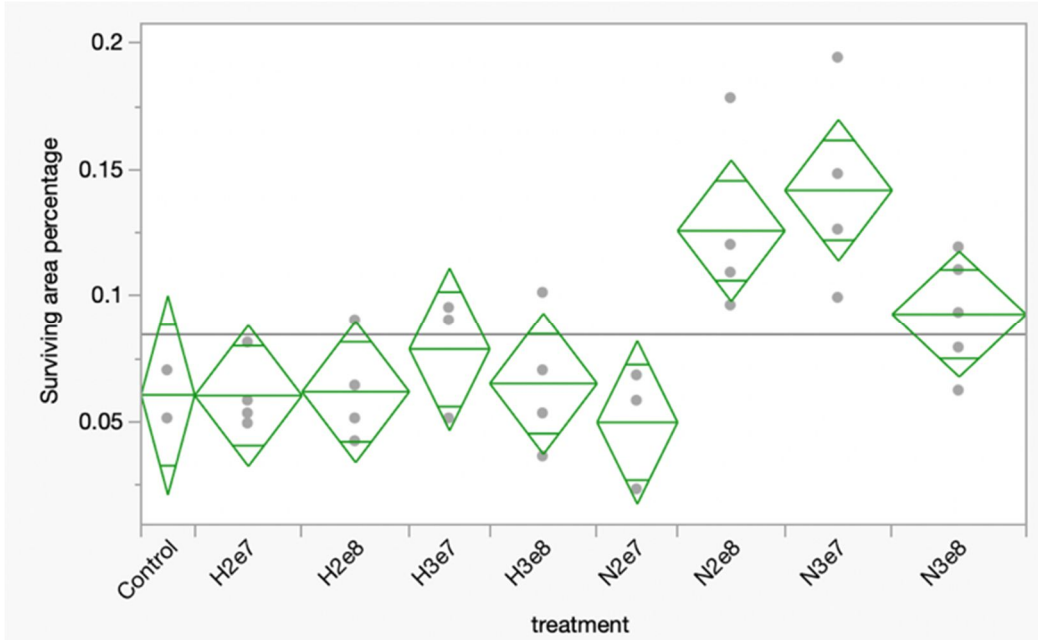


図2 各群の生存面積割合

(3) 考察

Burn wound conversion の病態生理に関してはこれまで報告されているが、その多くはラットを用いた研究であった^{1,2}。本研究ではマウスを用いるために、接触させる熱源のテンプレートをマウスの躰の大きさに合わせて調整した。受傷4日後に行った画像解析の結果は、15s 群で生存面積が $9.6\% \pm 0.6\%$ という結果であり、再現性を持って適切な研究モデルを作製することができた。マウスはラットと比べてより実験試薬が多く、遺伝子改変モデルも多いため³、burn wound conversion の研究にマウスを用いることで、より多面的な病態生理が解明される可能性が期待される。

羊膜由来間葉系幹細胞から抽出したエクソソームは創傷治癒を促進させることが知られているが⁴、burn wound conversion を模した本研究でも、burn wound conversion を抑制する効果を持つ可能性が示唆された。Burn wound conversion に間葉系幹細胞を投与した既報では、壊死領域を減少させ、アポトーシスや酸化ストレスを抑制し、血管新生を促進させることが報告されている^{5,6}。本研究では間葉系幹細胞から放出されたエクソソームを投与することで、壊死を減少させる可能性が示唆されており、既報で報告されていたアポトーシスや酸化ストレスの抑制効果をエクソソームが担っている可能性が考えられた。しかしながら本研究の範囲では、その詳細な機序の解明には至らなかった。

<引用文献>

1. Regas FC, Ehrlich HP. Elucidating the vascular response to burns with a new rat model. J Trauma, 32, 1992, 557-563
2. Tobalem M, Wettstein R, Tschanz E, Plock J, Lindenblatt N, Harder Y, Rezaeian

- F. The burn comb model revisited. *Burns*, 46, 2020, 675-681
3. Mieczkowski M, Mrozkiewicz-Rakowska B, Kowara M, Kleibert M, Czupryniak L. The problem of wound healing in diabetes-from molecular pathways to the design of an animal model. *Int J Mol Sci*, 23, 2022, 7930
 4. Zhao B, Zhang Y, Han S, Zhang W, Zhou Q, Guan H, Liu J, Shi J, Su L, Hu D. Exosomes derived from human amniotic epithelial cells accelerate wound healing and inhibit scar formation. *J Mol Histol*, 48, 2017, 121-132
 5. Tutak FN, Doğan F, Annaç E. The effect of mesenchymal stem cell lyophilizate on the recovery of the zone of stasis following thermal burns. *Burns*, 48, 2022, 1221-1229
 6. Abbas OL, Özatik O, Gönen ZB, Ögüt S, Özatik FY, Salkın H, Musmul A. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Dental Pulp as Sources of Cell Therapy for Zone of Stasis Burns. *J Invest Surg*, 32, 2019, 477-490

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松田識郁、佐藤千草
2. 発表標題 マウス熱傷モデルを用いた羊膜由来間葉系幹細胞の皮膚深達性急性創傷に対する効果検証
3. 学会等名 第46回北大形成外科アカデミー
4. 発表年 2023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
---------	---------