

Ⅲ度熱傷後の全層皮膚切除部位に対する被覆材としての
ハイパードライヒト乾燥羊膜の応用に関するマウスを用いた研究

Hyperdry human amniotic membrane application as a wound dressing for
a full thickness skin excision after a third-degree burn injury

2019

富山大学大学院 医学薬学教育部（博士課程）

生命・臨床医学専攻 危機管理医学講座

大場 次郎

目次

要約	1
----	---

はじめに	2
------	---

材料と方法	4
-------	---

1. 倫理的配慮
2. HD-AM の準備
3. 実験動物
4. 実験モデルマウスの作成
5. III度熱傷モデルの確認
6. HD-AM の実験への応用
7. 全層皮膚切除部位に新たに形成した組織の厚さの計測
8. 組織学的および免疫組織化学的評価
9. 線維芽細胞の増生と血管新生の評価
10. Quantitative Reverse-Transcription Polymerase Chain reaction (q RT-PCR) による mRNA の測定
11. 統計解析

結果	9
----	---

1. III度熱傷モデルマウスの決定
2. 肉芽組織形成部位の決定と経時的変化
3. 細胞浸潤
4. Quantitative Reverse-Transcription Polymerase Chain reaction (qRT-PCR) による mRNA の発現評価
 - 4.1 Growth factors (TGF- β 1, VEGF, α -SMA, PDGF), cell migration chemokine (CXCL-5), vascular endothelial marker (CD31), and COX-2
 - 4.2 Pro-inflammatory and anti-inflammatory markers
5. 免疫組織化学的評価
6. 肉芽組織内の線維芽細胞の増生と血管新生の画像解析

考察	22
----	----

結語	26
----	----

利益相反 27

謝辞 27

参考文献 28

要約

重傷熱傷患者の死因の **75%**が創感染などによる敗血症に由来する。重症熱傷患者の主な死因となる重症感染症は熱傷創部の局所感染から生じるため、創部局所の感染制御は重症熱傷の治療戦略として最重要といえる。最も深達度の深い**Ⅲ度熱傷**の局所治療としては、全身管理を行った後、なるべく早期に熱傷部位に対する全層皮膚切除を行い、同部位に植皮術を行うことが一般的である。しかし、植皮術を行うまでの間の全層皮膚切除部位への被覆材に関しては確立された物はない。したがって、同部位に早期に肉芽組織（移植床）形成を促すことが、早期植皮や閉創につながり、局所の感染制御に有効に働く。羊膜はこれまで難治性創傷に対する有用な被覆材として知られてきた。富山大学では、羊膜を特殊な方法で乾燥・滅菌し、保存可能なハイパードライヒト乾燥羊膜 (**HD-AM**) として、緊急性の高い臨床例にも応用できる道を拓いた。我々は**Ⅲ度熱傷モデルマウス**を作成し、全層皮膚切除後に **HD-AM** を用いて実験した。**HD-AM** を使用した場合は、早期に良好な肉芽組織（移植床）形成を促進した。**HD-AM**に残存するサイトカインや足場としての機能により、早期に細胞浸潤を促し、肉芽組織内に線維芽細胞の増生、血管新生を促進した。さらに、**HD-AM** が早期により強く炎症期を惹起した結果、より早くかつスムーズに増殖期に移行すると考えられ、創傷治癒過程での **HD-AM** の作用が早期に良好な肉芽組織（移植床）形成を促す一助となったと考えた。**HD-AM** は、**Ⅲ度熱傷**後の全層皮膚切除部位に対する新たな創傷被覆材として有用であり、重症熱傷患者の救命率向上に向けた治療技術となることが示唆された。

はじめに

重症熱傷では広範囲の皮膚が損傷するため重症感染症を併発しやすい¹。そのため、広範囲重傷熱傷患者の死因の 75 %が創感染などによる敗血症に由来する²。重症熱傷患者の主な死因となる重症感染症は熱傷創部の局所感染から生じるため、創部局所の感染制御は重症熱傷の治療戦略として最重要といえる。

重症熱傷の判定基準として Artz の基準およびその改変基準 (Moylan の基準) は最も広く臨床的に用いられている³。Artz の基準にも含まれる熱傷面積 (全体表面積に対するパーセンテージ: % TBSA) は、予後推定因子として最も基本的なものであり、推奨される指標である⁴。局所の重症度の指標としては、熱傷深度が用いられる。最重症はⅢ度熱傷であり、熱傷が皮膚全層あるいはそれ以上の深度で損傷したものと定義される。Artz の基準によると、重症熱傷の定義は、Ⅱ度熱傷が 30% TBSA 以上、Ⅲ度熱傷が 10% TBSA 以上となる。重症熱傷とは、広範囲かつ局所の熱傷深度がより深い熱傷であるといえる。

現在、重症熱傷患者の局所治療としては、全身管理を行った後に、なるべく早期にデブリドメントを行い被覆し、必要であれば植皮術を行う⁵。しかし、最重症であるⅢ度熱傷創は経過にて上皮化は望めないため、適応となる被覆材がなく、根治療法としては早期植皮術が必須となる。そのため、感染源となるⅢ熱傷部位を早期に全層皮膚切除した後、植皮術までの創部管理が重要となる。近年、全層皮膚欠損創に対する被覆材として人工真皮や Negative-pressure wound therapy : NPWT (陰圧閉鎖療法) の有用性に関する報告⁶は多い。しかし、受傷熱傷のように熱傷が広範囲に及ぶ場合は、創部からの浸出液が多いこと、正常な残存皮膚が少ないこと、感染に対する脆弱性などから局所創部の管理には適していない。重症熱傷患者のⅢ度熱傷に対する全層皮膚切除部位への確立された被覆方法はないが、同部位に早期に良好な肉芽組織 (移植床) 形成を促すことが、早期植皮や閉創につながり、創部局所の感染制御に有効に働くと考ええる。さらに、重症熱傷患者の救命率向上の一助となりうる。

我々はⅢ度熱傷後の全層皮膚切除部位への肉芽組織 (移植床) 形成を促進するための生体材料として羊膜に着目した。羊膜は細胞の足場としての創傷治癒機能^{7,8}、抗炎症作用、抗菌活性、水分保持機能、および低抗原性、低コストなどの特徴を持つ優れた生体材料である^{9,10,11,12}。以前、我々は羊膜由来細胞の特徴を報告した^{13,14,15}。生羊膜 (fresh AM : fAM) は外傷や熱傷に対する有用な被覆材料として以前から報告されてきた¹⁶が、必要なときにすぐに手に入らないこと、保存や取り扱いが煩雑であったことから実際の臨床では限定的な使用にとどまっていた。これらの問題を解決するために、我々はハイパードライヒト乾燥羊膜 (Hyperdry human amniotic membrane : HD-AM) を開発し、報告した¹⁷。HD-AM は fAM の持つさまざまな特徴を保持している。予定帝王切開のドナーから提供された後、遠赤外線、減圧、マイクロ波で乾燥させ、さらに γ 線照射により滅菌している。保管や取

り扱いが容易で必要時にいつでも使用できる。すでにさまざまな分野で臨床研究がなされており、人体使用に対する安全性も確保されている^{18,19,20}。

Ⅲ度熱傷後の全層皮膚切除部位に対する被覆材として **HD-AM** を使用した場合は、**HD-AM** に残存するサイトカインと足場としての機能や各種サイトカインやケモカインの誘導などの結果、早期に良好な肉芽組織（移植床）形成が得られた。本研究はマウスで動物実験モデルを作成し、重症熱傷の治療戦略として最重要といえる局所の感染制御のために、**HD-AM** がⅢ度熱傷後の全層皮膚切除部位に対して早期に良好な肉芽組織（移植床）形成を促し、新たな有用な創傷被覆材となりうるかを組織学的、免疫組織化学的、分子生物学的に検証し、重症熱傷患者の救命率向上に向けた革新的な治療技術を開発することを目的とした。

材料と方法

1. 倫理的配慮

ヒトおよび動物サンプルの使用を含むすべての実験手順は、富山大学倫理審査委員会の審査（整理番号：44）を経て承認されたプロトコールに基づき、ヘルシンキ宣言のガイドラインを遵守して実施した。

2. HD-AM の準備

HD-AM の作成についてはすでに以前報告しているとおりである¹⁷。要約すると、fAM は富山大学付属病院と高岡市民病院において、事前に説明し同意の得られた子宮帝王切開のドナーから得た。採取した fAM は乾燥装置（サクラ精機株式会社、東京、日本）を用いて連続遠赤外線照射、減圧、間欠マイクロ波照射により乾燥させ、適切な大きさに切断し、真空包装した後、 γ 線照射により滅菌した（25kGy）。

3. 実験動物

8 週齢雄の ICR マウス（体重 32-37g）を日本 SLC 株式会社（浜松、日本）から購入した。全てのマウスは富山大学生命科学研究センターにて、特定の病原体が存在しない環境下で、飼料および水を自由に与えて飼育した。富山大学動物実験倫理委員会の承認を受け、実施した(A2017MED-44、A2019MED-33)。

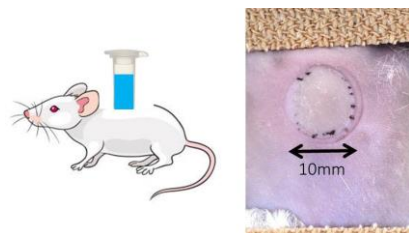
4. 実験モデルマウスの作成

塩酸メドメジン 0.3mg/kg、ミタゾラム 4.0mg/kg、酒石酸ブトルファール 5mg/kg の 3 種を混合（0.1ml/体重 10g）した麻酔薬を腹腔内注射し、マウスに全身麻酔を施行した後、背部の皮膚剃毛領域を脱毛した。同部位に底部を切断し改良した reaction tube 1.5ml

（Greiner Bio-One）を用い、直径 10mm の領域に 90 度 10 秒間の熱湯に暴露させ、Ⅲ度熱傷創を作製した²¹。創傷治癒過程の検討には、熱傷直後に同部位の全層皮膚を切除し、開放創を利用した（Figure 1a,b）。

Figure 1

(a)



(b)

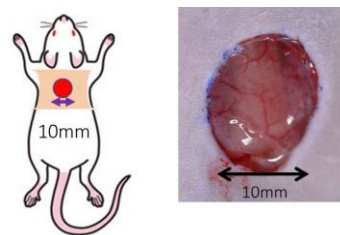


Figure 1.実験モデルマウス

(a)左: III度熱傷創作成の模式図。マウスの背面に約 10mm の範囲でIII度熱傷創を作成した。右:III度熱傷直後の肉眼的所見。III度熱傷部位の皮膚は白色に変化している。(b) 左:III度熱傷後の全層皮膚切除の模式図。右: III度熱傷直後の全層皮膚切除部位の肉眼的所見。全層皮膚切除部位には、出血は多く認めない。

5. III度熱傷モデルの確認

作成した熱傷モデルがIII度熱傷として適切かどうかを判断するため、熱傷深度と受傷後経過の相関を確認した。受傷後の熱傷部位の表皮、真皮および皮下組織の組織学的評価、受傷後 7 日目での表皮脱落部位における上皮化の有無および真皮層などの組織学的評価を行った。

6. HD-AM の実験への応用

HD-AM は単層の上皮層、薄い基底膜、結合組織の 3 層で構成されている。実験では HD-AM を 15×15 mm の大きさにカットし、上皮層を上になるようにおいた群 (HD-AM group と名づけた) と、対照として HD-AM を置かない群 (HD-AM(-)group と名づけた) の 2 群を作成した (Figure2a)。創部はすべてポリウレタンフォームの被覆材である Tegaderm™ Diamond transparent film® (3M Deutschland GmbH Health Care Business)を用いて被覆し、HD-AM や創傷被覆材がマウスの行動によって逸脱しないように、stainless mesh (0.06 mm Φ, 150m/s) でカバーした (Figure 2a,b)。各群 (HD-AM(-) group, HD-AM group) は 5 匹とし、術後 1 日 (POD1)、4 日 (POD4)、7 日 (POD7) に評価した (合計 30 匹)。前提として、POD1,4,7 において両群のマウスの飼育環境、体重変化に違いはなく、同条件下で経時的変化に観察可能であった。

Figure 2

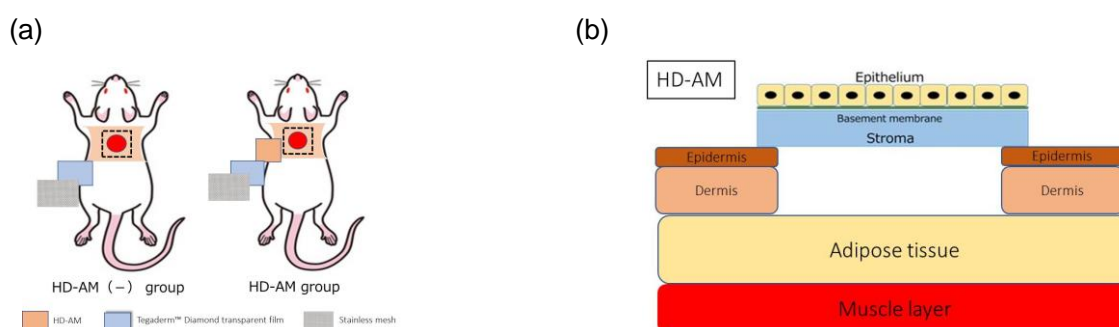


Figure 2.HD-AM の実験への応用

(a) 実験モデルマウス

左: HD-AM を置かない群；全層皮膚切除部位をポリウレタンフォームの被覆材と stainless mesh でカバーした。右: HD-AM を置いた群；全層皮膚切除部位に HD-AM の上皮側を上置き、同部位をポリウレタンフォームの被覆材と stainless mesh でカバーした。

(b) HD-AM を被覆した全層皮膚切除部位の模式図

7. 全層皮膚切除部位に新たに形成した組織の厚さを計測

アザン染色を用いて、コラーゲン線維とフィブリンの分布を明らかにした。新たに形成した組織の厚さを、Olympus CellSens イメージングプログラム（バージョン 1.7; Olympus Co., Tokyo, Japan）を用いて測定した。測定部位は、Figure 3 に示す 3 点とし、平均値を計算し比較した。①皮膚全層切除部位の断端、②全層皮膚切除部位の長径の中央、③①と②の間中点である（Figure 3a,b）。

Figure 3

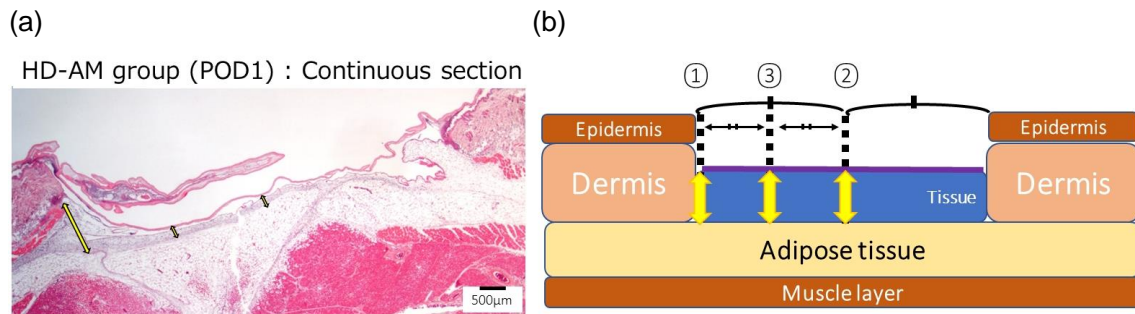


Figure3. 新たに生じた組織の厚さの測定

(a) HD-AM 群の全層皮膚切除部位の POD1 の組織像。連続切片。H&E 染色。x25。黄矢印部位の厚さを測定した。

(b) 全層皮膚切除部位に新たに生じた組織の厚さの測定部位の模式図。

8. 組織学的および免疫組織化学的評価

POD1,4,7 に皮膚全層切除部位に新たに形成されたすべての組織を各マウスから採取した。型の如くエタノール系列で脱水後、Hemo-De で透徹し、パラフィンに包埋した。厚さ 4μm の薄切切片を作製し、脱パラフィン後、ヘマトキシリン - エオジン (H&E) およびアザン染色を実施した。免疫組織化学染色も同様に POD1,4,7 のすべての検体について実施した。組織切片は脱パラフィン後、クエン酸緩衝液による抗原の賦活化を行い、CD163 (1 : 500, 10μg / ml, Abcam, Cambridge, UK) 、TGF-β1 (transforming growth factor beta-1 ; 1:200, 20μg / ml, Abcam, Cambridge, UK) 、VEGF (vascular endothelial growth factor ; 1 : 500, Abcam, Cambridge, UK) 、CD31 (1 : 50, Abcam, Cambridge, UK) 、α-SMA (alpha smooth muscle Actin ; 1 : 200, 4μg / ml, Abcam, Cambridge, UK) 、Iba1 (1 : 200, 1.5μg / ml, Abcam, Cambridge, UK) に対する一次抗体で翌朝までインキュベートし、HRP 結合抗マウス、抗ウサギもしくは抗ヤギ IgG 二次抗体 (Nichirei biosciences Inc., Tokyo, Japan) で処理した。発色は DAB キット (Nichirei biosciences Inc., Tokyo, Japan) で処理した。染色された組織を、Leica DMRBE 顕微鏡 (Leica, Wetzlar, Germany) および DP73 system (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。

9. 線維芽細胞の増生と血管新生の評価

両群の POD1,4,7 の免疫組織化学染色(α -SMA, CD31)を用いて、前述の新たに形成した組織の計測部位（①皮膚全層切除部位の断端、②全層皮膚切除部位の長径の中央、③①と②の中間点）にて、200 倍率の一視野あたりの CD31 陽性細胞数と α -SMA 陽性細胞数の平均値を計算し、統計学的に分析、比較した。

10. Quantitative Reverse-Transcription Polymerase Chain reaction (q RT-PCR) による mRNA の測定

mRNA を抽出するために、各試料から標的部位を選択的に採取した。採取する際には、皮膚全層切除部位が収まるように、一辺 10mm の正方形で、皮下組織ごと採取した。採取部位や範囲の差異に影響されないように解剖学的に可能な限り一定にするようにした。Isogen II (Nippon Gene Co. LTD., Tokyo, Japan) を使用して、製造元の指示に従って全 mRNA を組織から抽出した。その mRNA の一部 3 μ g を室温で 15 分間、デオキシリボヌクレアーゼ I (DNase I, Sigma-Aldrich, Inc., Tokyo, Japan) で処理した。Rever Tra Ace qPCR RT Kit (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いて 500ng の DN アーゼ I 処理 RNA を用いて cDNA を合成した。遺伝子発現は、Mx3000P 定量ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) システム (Stratagene; Agilent Technologies Japan Ltd, Japan) を用いて、Brilliant SYBR Green QRT-PCR Mix (Stratagene; Agilent Technologies Japan Ltd. Japan) でリアルタイム RT-PCR 分析により定量した。POD1,4,7 における各群 5 匹のマウスの mRNA を抽出し、成長因子である TGF- β 1²², VEGFA²³, α -SMA²⁴, PDGF²⁵、細胞遊走系ケモカインの CXCL-5²⁶、抗炎症性 M2 マクロファージのマーカーである CD163²⁷、抗炎症サイトカインの IL-10²⁸、炎症系サイトカインの IL-6²⁸、inducible nitric oxide synthase (iNOS)²⁹、血管内皮マーカーの CD31³⁰、血管新生に関与する PGE2 を誘導する COX-2³¹ について測定した。各 mRNA の発現量は GAPDH を内部コントロールとして補正し、Ⅲ度熱傷直後に採取した皮膚全層切除部位の組織を POD0 として (5 匹の平均値) 相対比較した。今回用いたプライマーは以下のとおりで、配列と annealing 温度を Table1 に示す。

Table 1 : PCR primer sequences の表

Mouse primer	Forward	Reverse	Annealing Temp(°C)
TGF-β1	CAACAATTCCTGGCGTTACCTTGG	GAAAGCCCTGTATTCCGTCTCCTT	60
VEGFA	CACAGCAGATGTGAATGCAG	TTTACACGTCTGCGGATCTT	60
α-SMA	CCCCTGAAGAGCATCGGACA	TGGCGGGGACATTGAAGGT	60
PDGF	TGTGCCCATTTCGAGGAAG	GAGGTATCTCGTAAATGACCGTC	56
CXCL-5	TTCATGAGAAGGCAATGCTG	CCCAGGCTCAGACGTAAGAA	56
iNOS	GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA	GTGGACGGGTCGATGTCAC	60
IL-6	CCTCTGGTCTTCTGGAGTACC	ACTCCTTCTGTGACTCCAGC	55
CD163	GGACAGATCTGGGGTGAAGA	ATCCCTGCTGTGGGTACAAG	56
IL-10	ATAACTGCACCCACTTCCCA	GGGCATCACTTCTACCAGGT	55
CD31	ATGCTCCTGGCTCTGGGACTCACG	GTGCTGAGACCTGCTTTTCGAGGT	60
COX-2	CAGACAACATAAACTGCGCCTT	GATACACCTCTCCACCAATGACC	53
GAPDH	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG	57

11. 統計解析

統計ソフトウェア(SPSS Statistics ver. 25 for Windows; IBM, Tokyo, Japan)を使用し、Student's t-test で検定した。P <0.01 の場合、有意差ありとした。

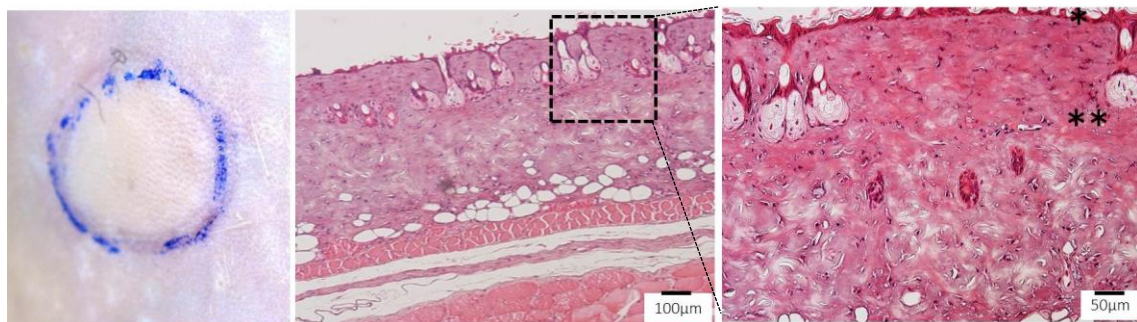
結果

1. III度熱傷モデルマウスの決定

90 度熱湯で 10 秒間曝露直後は、肉眼的に受傷部位は蒼白となり、組織学的には上皮層の一部欠損および真皮層における膠原線維のガラス様変化が顕著であった (Figure 4a)。受傷後 7 日目では、脱落した上皮の再生は全く見られず、真皮層の脱落、空洞化、細胞浸潤が顕著であり、肉芽形成は見られなかった (Figure 4b)。以上の所見から、本実験モデルを III 度熱傷モデルとした。この方法を用いることで、安価で、安定し、各深達度の熱傷を作成できた。

Figure 4

(a)



(b)

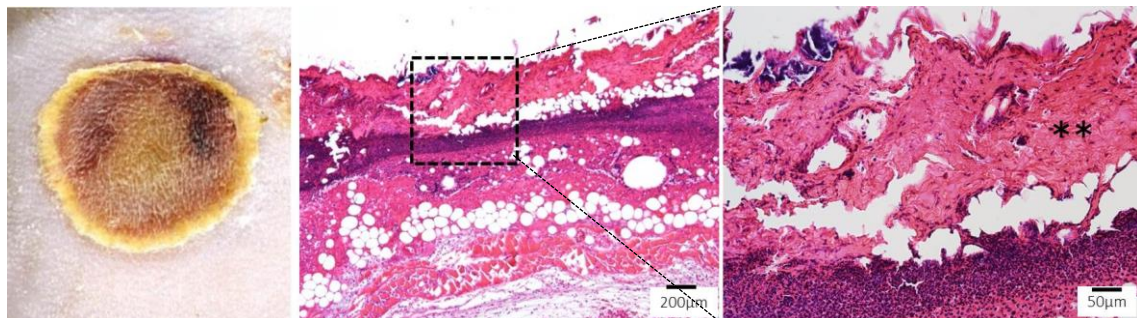


Figure 4.

III度熱傷部位の肉眼的所見と組織学的所見

(a) III度熱傷直後。左:肉眼的所見。III度熱傷部位の皮膚は白色に変化している。中、右:III度熱傷直後の組織学的所見。中: H&E 染色。X100。右: H&E 染色。中画像の点線部分の拡大。X200。(b)III度熱傷後 7 日目。左: 肉眼的所見。皮膚は壊死し、上皮化は認めない。中、右: III度熱傷後 7 日目の組織学的所見。中: H&E 染色。X50。右: H&E 染色。中画像の点線部分の拡大。X200。(*上皮、**真皮)。

2. 肉芽組織形成部位の決定と経時的変化

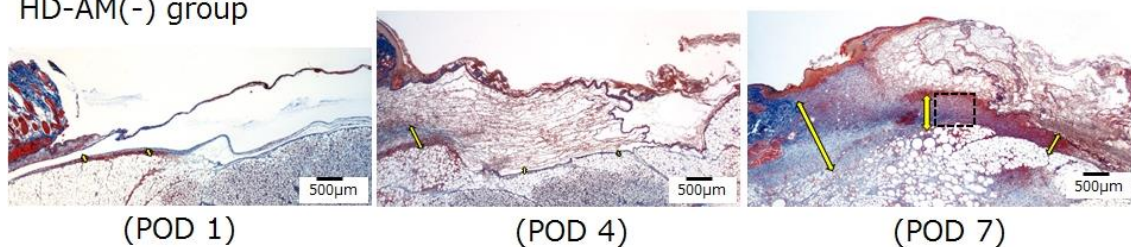
アザン染色を用いることで、**POD1**において受傷部位周囲の正常層からのびる薄い膠原線維の層が観察された。**HD-AM**群にて経時的に観察すると、この層を境界として上下に存在する層および**HD-AM**直下の層で浸潤する細胞などに形態的な変化が見られた。

時間経過とともに**HD-AM**直下は**POD4**を peak に薄くなった。膠原線維より上の組織は経時的に薄くなり、フィブリン塊となった。膠原線維より下の組織は厚くなり、線維芽細胞や血管新生を認め、肉芽組織が形成された (**Figure5b**)。したがって、全層皮膚切除部位に新たに生じた組織のうち肉芽組織の厚さを各群で測定し、経時的 (**POD1,4,7**) に検討した。**HD-AM**群は**HD-AM(-)**群と比較し、**POD1,4,7**いずれの時点においても肉芽組織層が有意に厚かった ($n = 5$, $**p < 0.01$) (**Figure 5a,c**)。

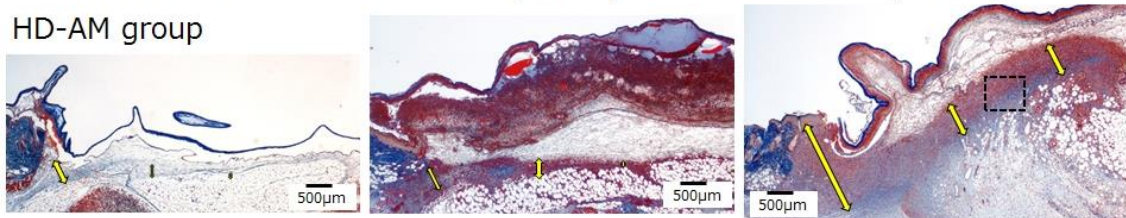
Figure 5

(a)

HD-AM(-) group



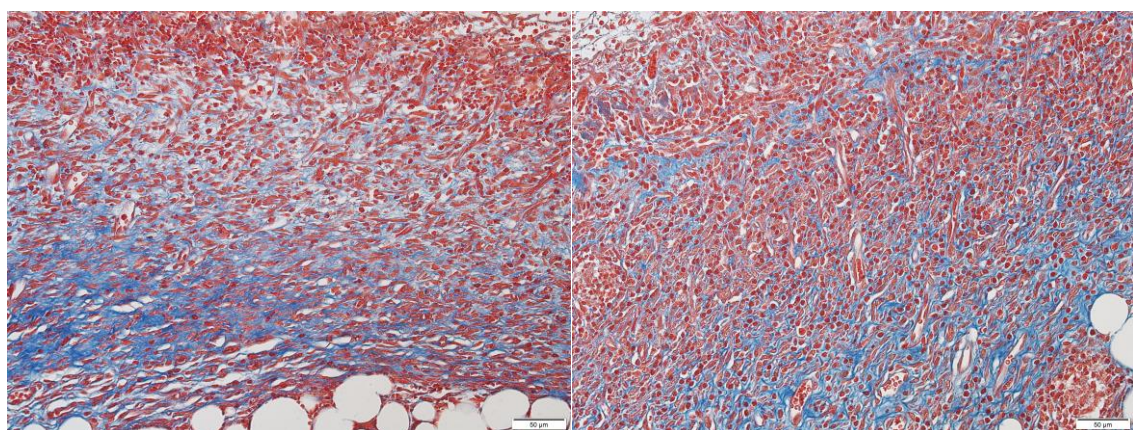
HD-AM group



(b)

HD-AM(-) group (POD7)

HD-AM group (POD7)



(c)

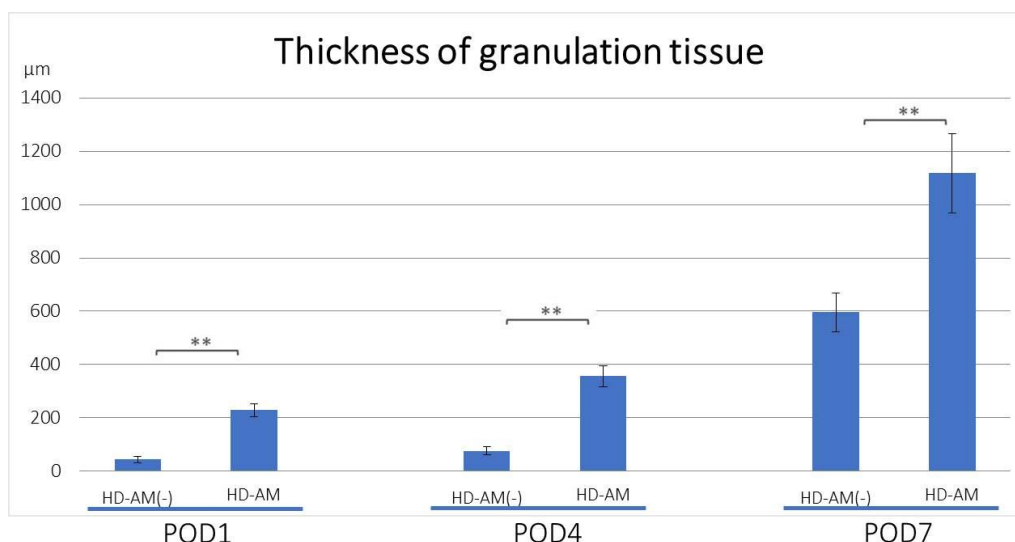


Figure 5. 肉芽組織の決定と経時的変化

(a) 両群の全層皮膚切除部位の組織学的変化。新たに生じた組織のうち、黄矢印部位の肉芽組織の厚さを測定した。Azan 染色。x 25。膠原線維より下の組織（肉芽組織）は厚くなった。(b) 両群の POD7（上段）の組織内の点線部分の拡大組織像。Azan 染色。x 200。膠原線維より下の組織内には線維芽細胞や血管新生を認め、肉芽組織が形成された。(c) 各群の肉芽組織の厚さの計測部位の平均値を比較し、統計学的に分析した。HD-AM 群の肉芽組織は、POD1,4,7 のいずれにおいても、HD-AM(-)群よりも有意に厚かった。
(n = 5, **p < 0.01).

3. 細胞浸潤

HD-AM 群では HD-AM(-)群と比較して、POD1 より全例において HD-AM 直下と膠原線維より下の組織により多くの細胞浸潤が観察された (Figure 6a)。HD-AM 群では、HD-AM 直下の細胞浸潤は POD7 まで継続して観察されたが、POD4 を peak として減少傾向が観察された (Figure 6b)。

Figure 6

(a)

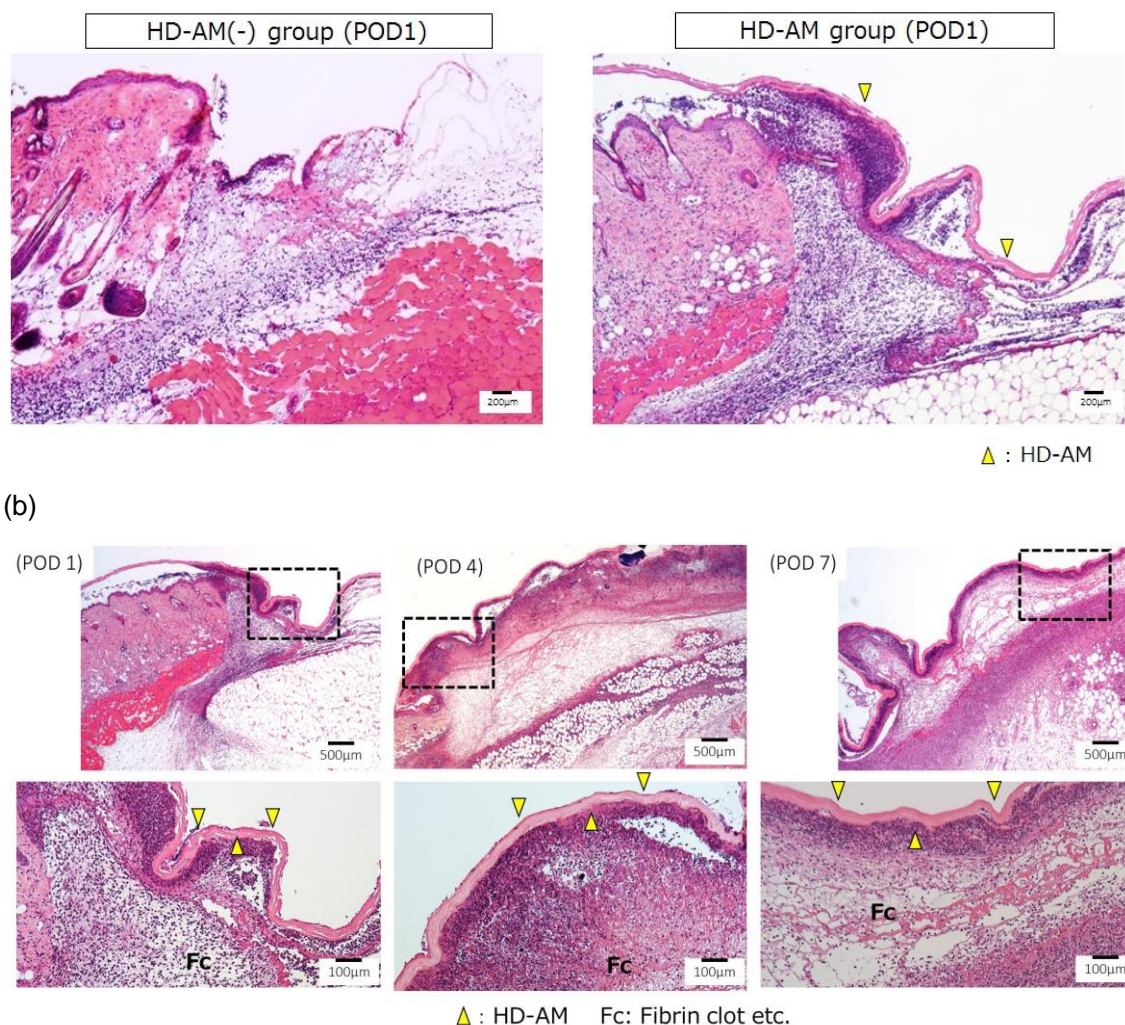


Figure 6. 細胞浸潤の組織学的所見

(a) 両群の POD1 の細胞浸潤の組織学的所見。H&E 染色。X50。黄色矢印が HD-AM。(b) HD-AM 群の組織学的所見の経時的変化。H&E 染色。X25。下段は上段の点線部分の拡大像。X100。HD-AM 直下の細胞浸潤は POD7 まで継続して観察されたが、POD4 を peak として減少傾向が観察された。

4. Quantitative Reverse-Transcription Polymerase Chain reaction (qRT-PCR) による mRNA の発現評価

4.1 Growth factors (TGF- β 1, VEGF, α -SMA, PDGF), cell migration chemokine (CXCL-5), vascular endothelial marker (CD31), and COX-2 (Fig 7a)

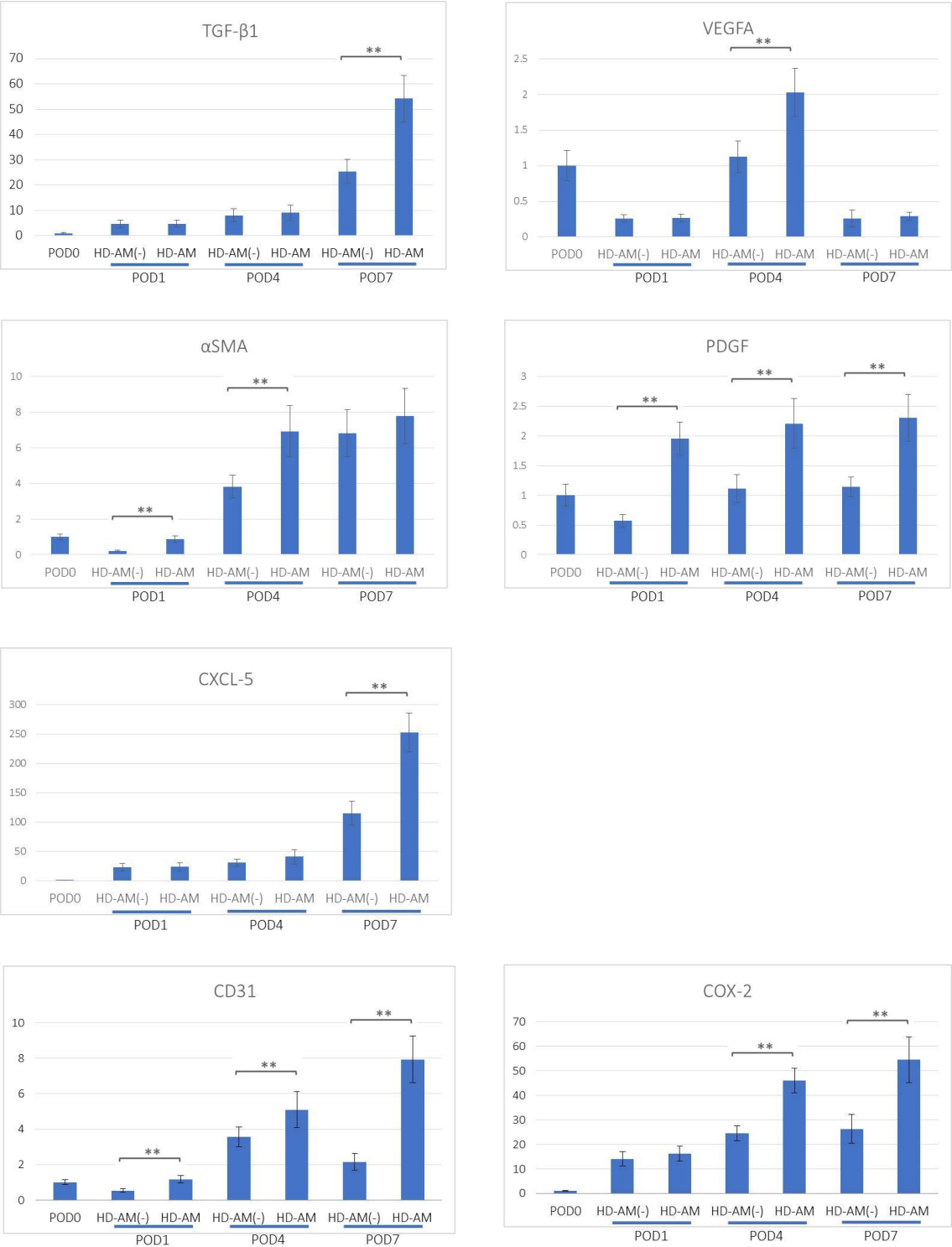
TGF- β 1 の発現は HD-AM の有無に関係なく、経時的に増加することが示唆された。また、POD7 では HD-AM 群での発現が有意に高かった。VEGF の発現は、POD4 がピークであり、HD-AM 群では HD-AM(-)群に比べ有意に高かった。 α -SMA の発現は、HD-AM の有無に関係なく経時的に増加する傾向が示唆され、POD1 および POD4 では HD-AM(-)群に比べ

HD-AM 群での発現が有意に高かった。POD7 では両群間に有意な差が認められなかった。PDGF の発現は、HD-AM(－)群では経時的にあまり大きな変化はないようであったが、POD1 では発現量が減少した。一方、HD-AM 群は POD1 から POD7 まで持続して発現量が POD0 の約 2 倍であり、いずれの時期においても HD-AM(－)群に対して発現は有意に高かった。CXCL-5 の発現は、HD-AM の有無に関係なく、経時的に増加することが示唆された。HD-AM 群は HD-AM(－)群と比べて、POD7 の発現量は約 2 倍となった。CD31 の発現は、HD-AM(－)群は POD4 がピークであった。一方、HD-AM 群は HD-AM(－)群と比べて POD1,4,7 にて有意に高く、発現量は経時的に増加する傾向が示唆された。COX-2 の発現は、いずれの群においても経時的に増加する傾向が示唆されたが、HD-AM 群における発現量は、HD-AM(－)群と比べて、POD4,7 において有意に高かった。

4.2 Pro-inflammatory and anti-inflammatory markers (Figure 7b)

iNOS の発現は、POD4,7 において HD-AM 群は HD-AM(－)群と比較して有意に高かった。IL-6 の発現は、POD1,4 において HD-AM 群は HD-AM(－)群と比較して有意に高かった。ただし、iNOS と IL-6 の発現は、POD4 を peak に POD7 では低下傾向が示唆された。CD163 と IL-10 の発現は、いずれの群においても経時的に増加する傾向が示唆され、かついずれの時点においても HD-AM 群の発現がより強かった。CD163 は、POD1,7 において HD-AM 群が有意に高く、IL-10 は、POD4,7 において有意に高いという結果であった。

Figure 7
(a)



(b)

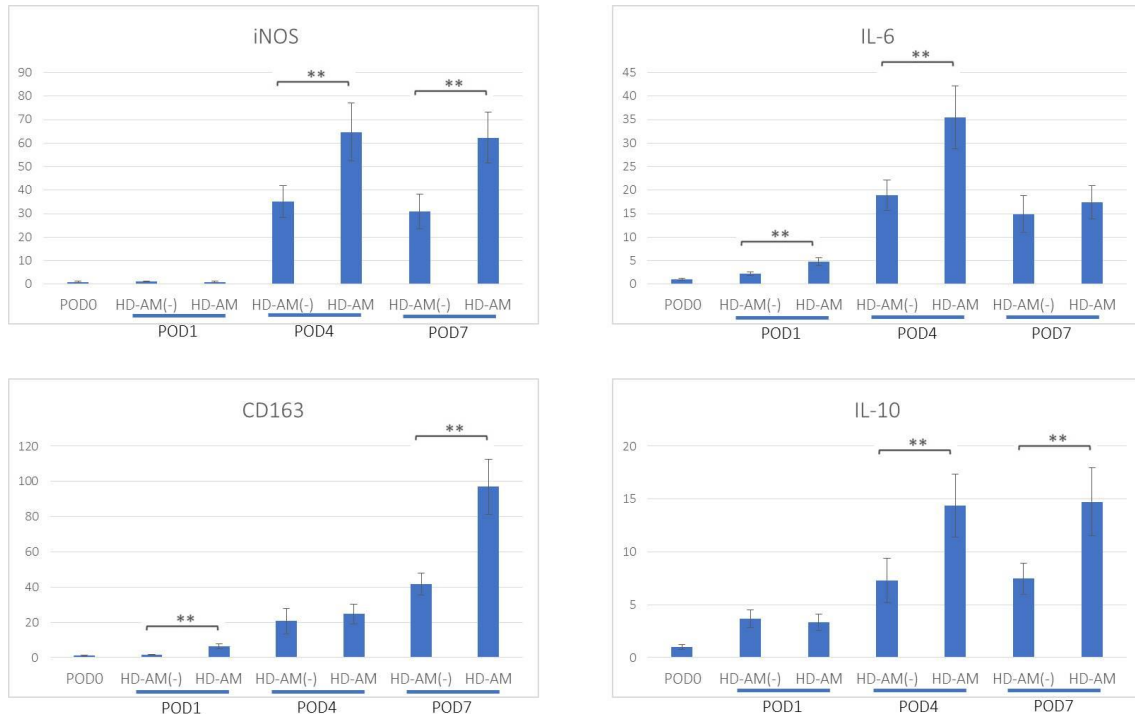


Figure 7. mRNA の発現

(a) Growth factors (TGF- β 1, VEGF, α -SMA, PDGF), cell migration chemokine (CXCL-5), vascular endothelial marker (CD31) and COX-2 .

(b) Pro-inflammatory and anti-inflammatory markers. 各 mRNA の発現量は GAPDH を内部コントロールとして補正し、POD0 の HD-AM(-)群の平均値を基準として相対比較した。(n = 5, **: p < 0.01).

5. 免疫組織化学的評価

HD-AM 群では POD1 より HD-AM 直下で TGF- β 1, VEGF, Iba が陽性であった。時間経過とともにフィブリン塊内、肉芽形成部位に瀰漫性に高度に陽性となった (Figure8A:a-c) 。 VEGF は POD4 に HD-AM 群のいずれの領域にも多く陽性となった。CD163 は HD-AM 群にて POD1 より陽性となり、POD7 では肉芽組織内に高度に陽性となった。ただし、HD-AM 直下には一切認めなかった (Figure8A:d) 。 POD7 の HD-AM 群にて Iba1 (M1,M2 マクロファージのマーカー) と CD163 (M2 マクロファージのマーカー) 陽性細胞を比較することにより、マクロファージのサブクラスの局在が明らかとなった (Figure8A:c,d) 。 CD31 は、POD7 の HD-AM 群の肉芽組織内に血管新生の像として高度に陽性となった。(Figure8B:a、矢印)。しかし、POD7 の HD-AM 直下の組織内には認めなかった。 α -SMA は、POD7 にお

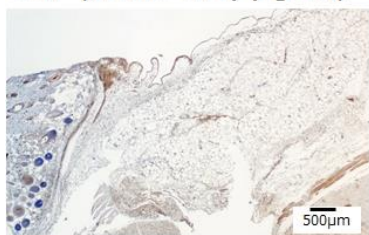
いて、両群の肉芽組織内により多くの線維芽細胞（矢印）に陽性を認めた（Figure8B:b、矢印）。また、CD31 同様、POD7 の HD-AM 直下の組織内には認めなかった。

Figure 8

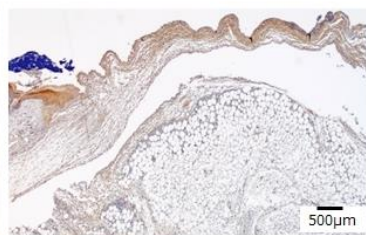
A

(a)

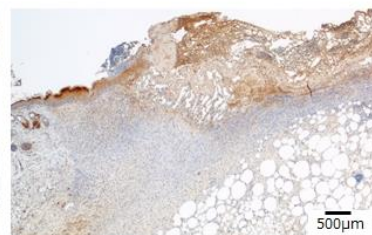
TGF- β 1:HD-AM(-) group



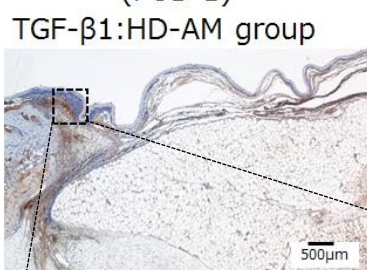
(POD 1)



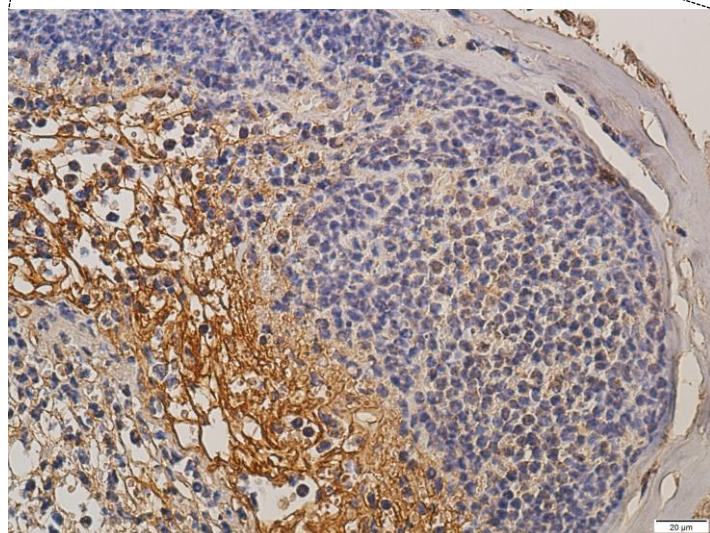
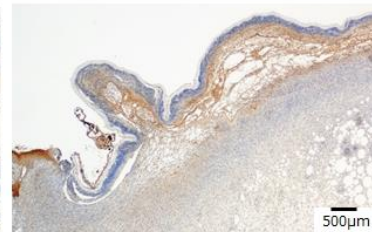
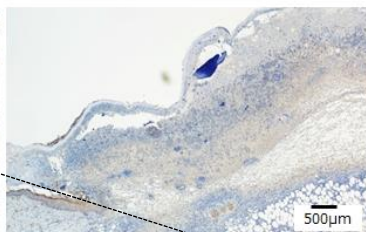
(POD 4)



(POD 7)

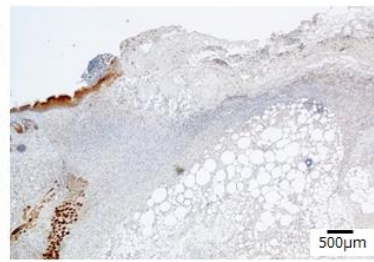
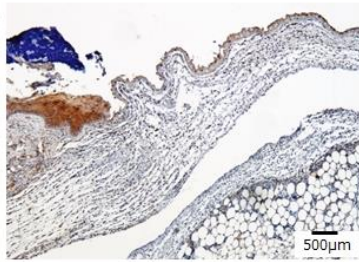
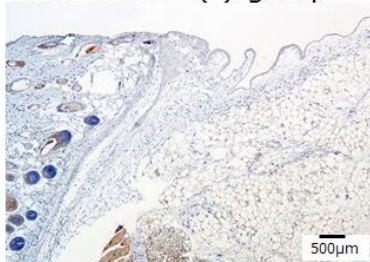


TGF- β 1:HD-AM group



(b)

VEGF:HD-AM(-) group

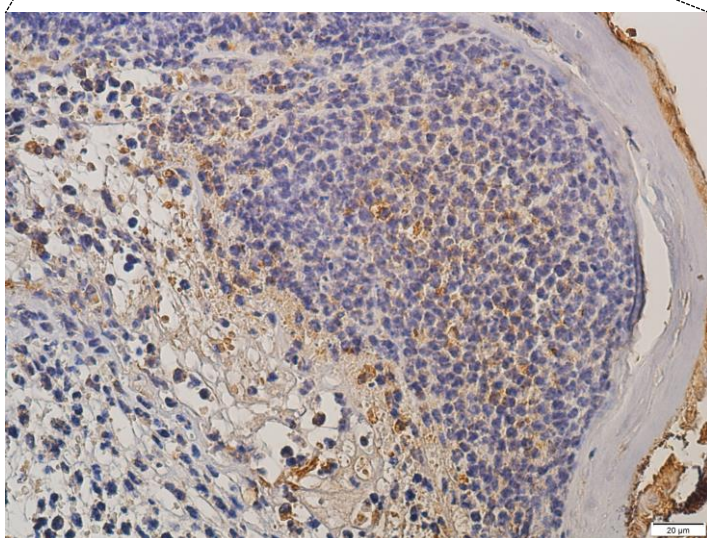
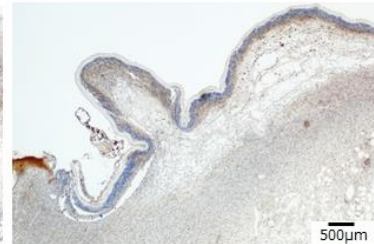
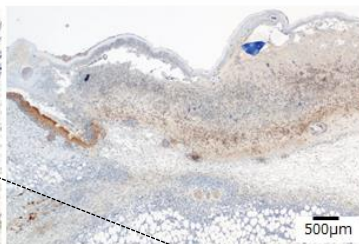
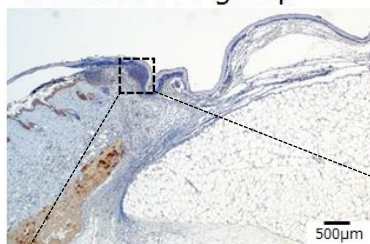


(POD 1)

(POD 4)

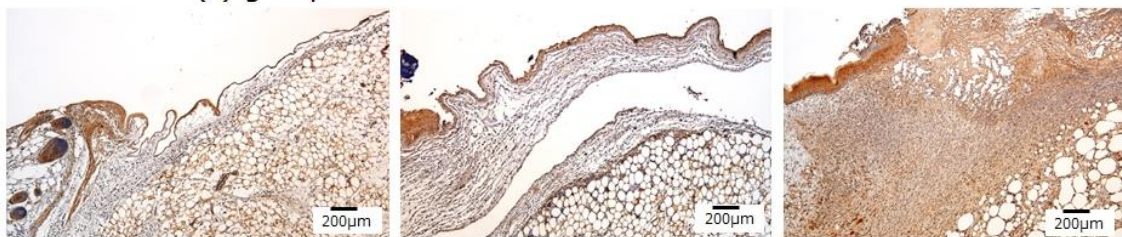
(POD 7)

VEGF:HD-AM group



(c)

Iba1:HD-AM(-) group

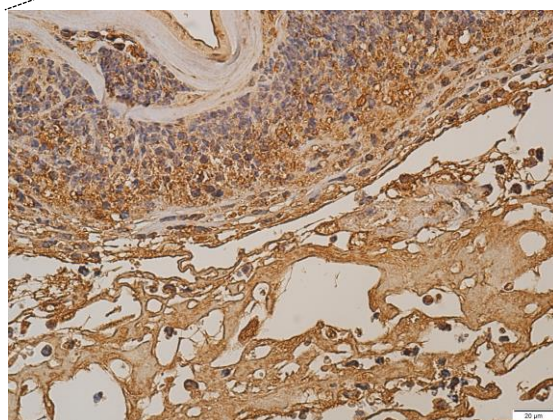
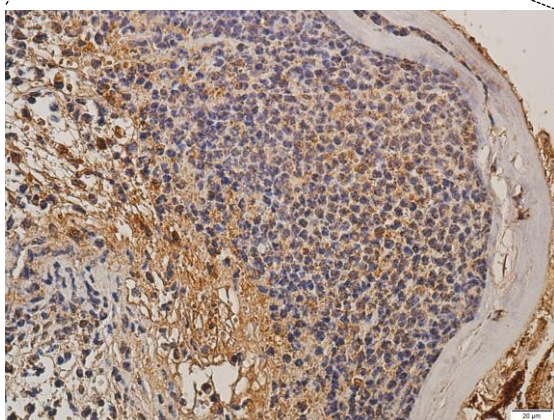
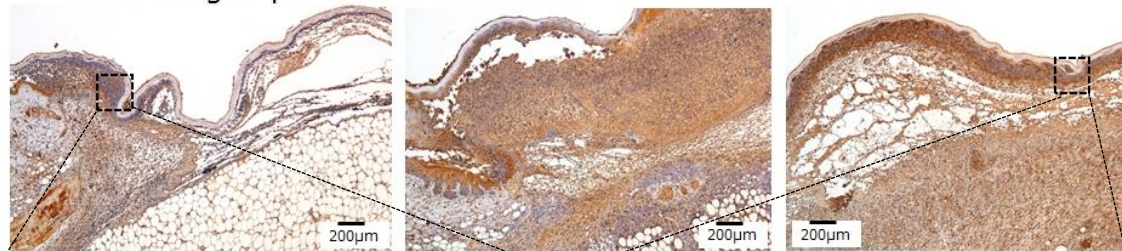


(POD 1)

(POD 4)

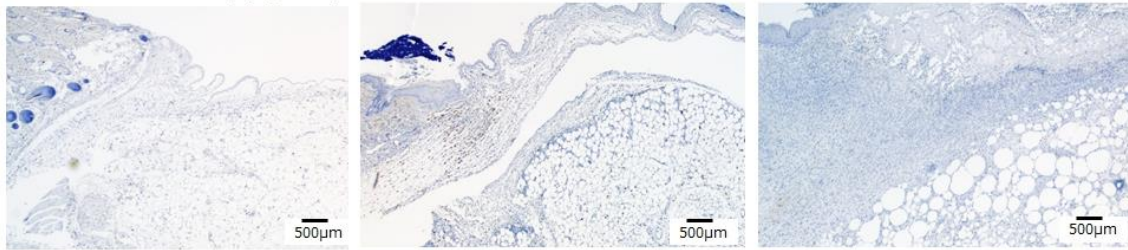
(POD 7)

Iba1:HD-AM group



(d)

CD163:HD-AM(-) group

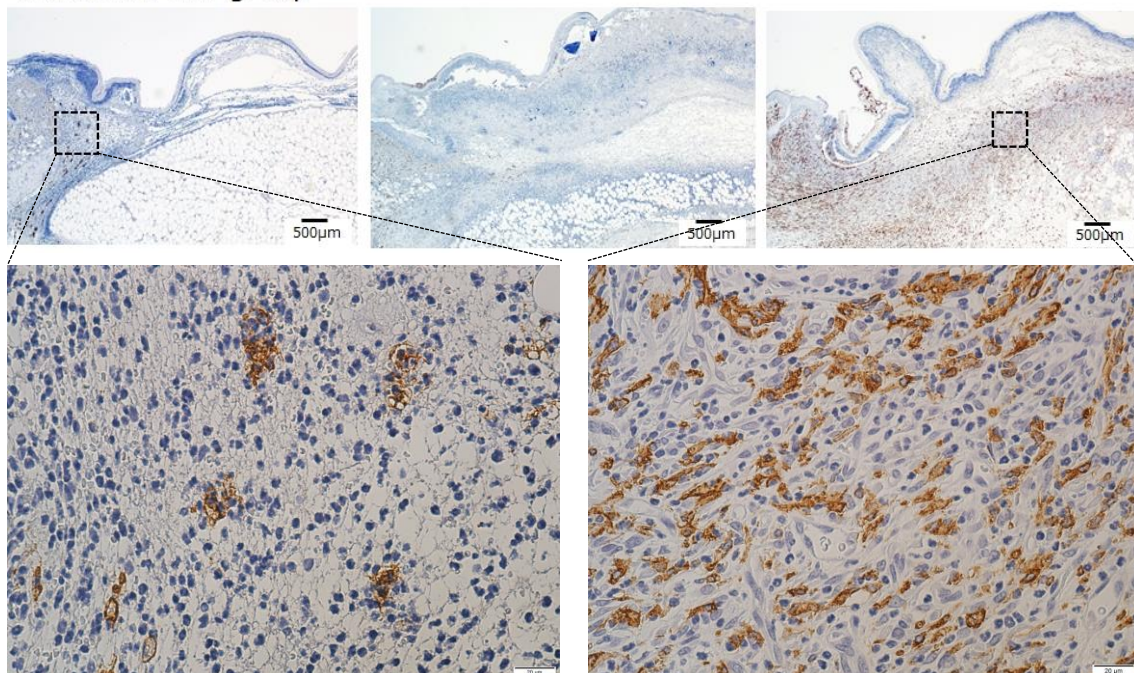


(POD 1)

(POD 4)

(POD 7)

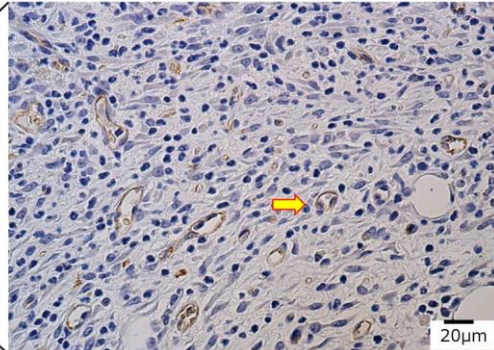
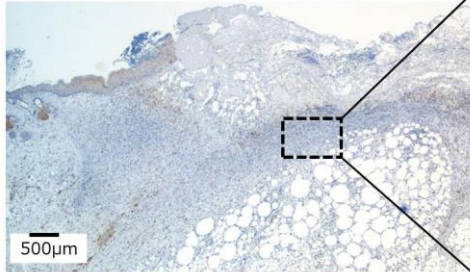
CD163:HD-AM group



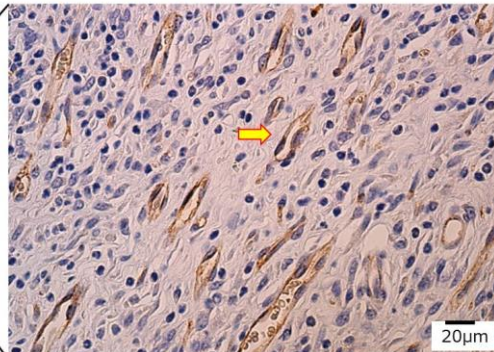
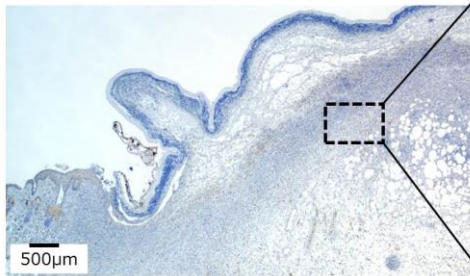
B

(a)

CD31:HD-AM(-) group (POD7)

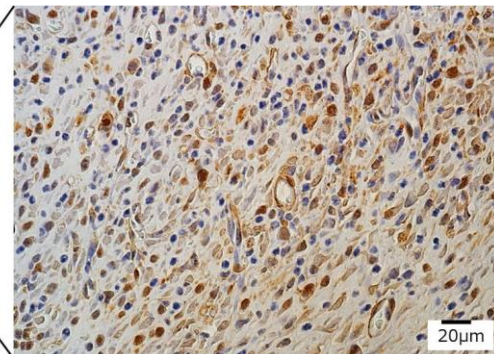
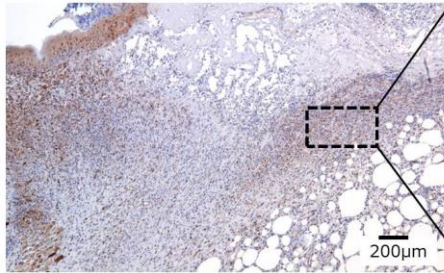


CD31:HD-AM group (POD7)



(b)

α -SMA:HD-AM(-) group (POD7)



α -SMA:HD-AM group (POD7)

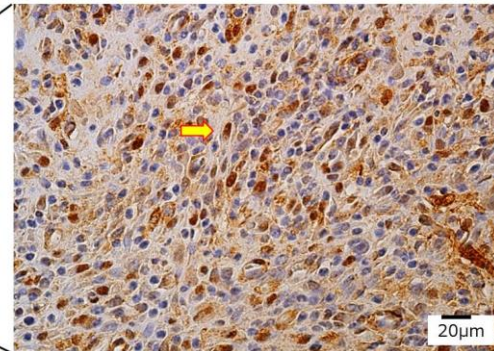
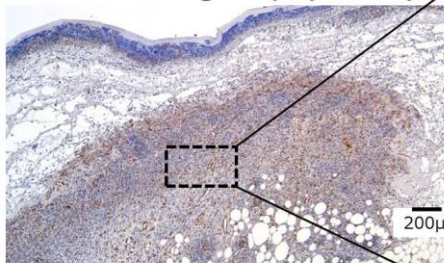


Figure 8. 免疫組織化学的所見

A:両群の POD1,4,7 における免疫組織化学的所見

(a)TGF- β 1 x25, (b)VEGF x25, (c)Iba1 x25,(d)CD163 x25。下段は、点線部分の拡大所見 x400。

B:両群の POD7 の肉芽組織内の免疫組織化学的所見

(a) CD31 x25。黄矢印は、血管新生像を示す。左は点線部分の拡大所見、x400。

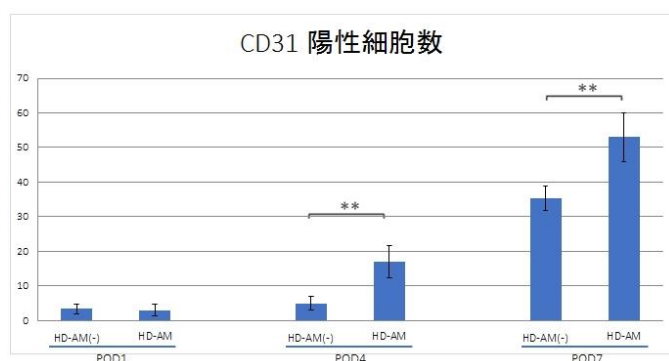
(b) α -SMA x25。黄矢印は、線維芽細胞を示す。左は点線部分の拡大所見、x400。

6. 肉芽組織内の線維芽細胞の増生と血管新生の画像解析

全層皮膚切除部位に新たに形成した組織のうち、**POD1** において受傷部位周囲の正常層からのびる薄い膠原線維の層より下の組織が経時的に観察すると肉芽組織となった。同部位の線維芽細胞の増生と血管新生を画像解析した。**CD31** 陽性血管内皮細胞数は、**HD-AM(-)**群と比べて **HD-AM** 群は **POD4,7** にて有意に多かった。 **α -SMA** 陽性線維芽細胞数は、**HD-AM(-)**群と比べて **HD-AM** 群は **POD4** にて有意に多かった。**POD7** には、細胞数に有意差は認めなかった。

Figure9.

(a)



(b)

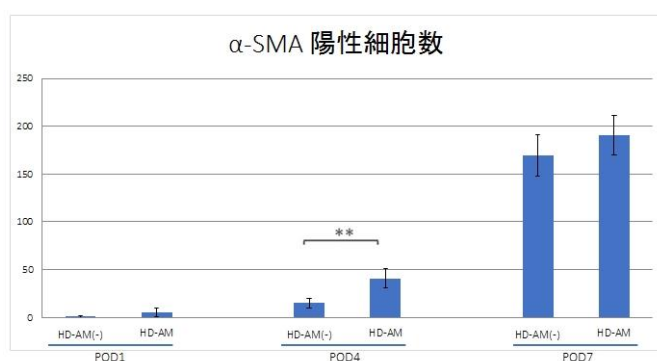


Figure9. 線維芽細胞の増生と血管新生に関する統計分析 (n = 3, **p < 0.01).

(a) CD31 陽性細胞数の経時的変化

(b) α -SMA 陽性細胞数の経時的変化

考察

我々が作成した熱傷モデルマウスは、受傷直後の熱傷深度として皮下組織全域に障害が到達していることおよび受傷後 7 日目でも上皮化が認められなかったことから、臨床現場でみられるⅢ度熱傷モデルとして適当であると判断した。従って、本マウスモデルをⅢ度熱傷後の全層皮膚切除部位の創傷治癒を評価するモデルとし、組織学的、免疫組織化学的および分子生物学的に研究をすすめた。

熱傷モデルの創傷治癒の場においては、質的に良好な肉芽組織（移植床）の形成が最重要である。本研究では形成された肉芽組織が質的に良好な肉芽組織であるかどうかに着目して研究をすすめた。良好な肉芽組織の質的評価として、炎症性細胞（マクロファージ、好中球、T リンパ球など）の集積、線維芽細胞の遊走と増殖、細胞外基質の蓄積、血管新生などが必要である^{32,33}。また、創傷治癒過程は炎症期、増殖期、再構築期という 3 つの過程から成る。最初の過程は炎症期で、創ができると血小板が凝集し創部を塞ぐとともに様々なサイトカインや細胞成長因子を分泌し好中球、マクロファージ、リンパ球などが創部に浸潤してくる。増殖期では、表皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞などが増殖し、その結果再上皮化、肉芽組織の形成が起こる。その後、いったん生じた瘢痕組織などを正常の組織構築に置き換える再構築期となる。炎症期が十分起こりそして早期に完結することによって、次の増殖期及び成熟期への引き継ぎも良好に行われ、良好な創傷治癒が得られる。しかし、炎症期が何らかの原因で障害されると、炎症期がいつまでも持続し、スムーズに増殖期に移行できない状態となり、このような創傷を慢性創あるいは難治創と呼ぶ³⁴。つまり、早期に良好な肉芽組織を形成するには、質的な構築のみならず、創傷治癒過程の進み方、すなわち適切な時期に適切な治癒過程に移行することも重要である。

HD-AM 群では、POD1 より肉芽組織内と HD-AM 直下に細胞浸潤があり、POD4 から肉芽組織内に HD-AM(一)群より多くの線維芽細胞の増生や血管新生を認めた。従って、HD-AM 群では質的にも早期から良好な肉芽組織（移植床）形成が得られた。HD-AM 群において、質的に良好な肉芽組織（移植床）を規定する各因子が早期に得られた理由について考察する。

1) HD-AM の細胞浸潤促進に及ぼす効果

羊膜の間質側は上皮側に比べて細胞遊走と接着機能が強く、この機能は肉芽組織の再生に重要な役割を果たすと報告されている³⁵。本研究で使用した HD-AM は、生羊膜と同様に組織再生時に足場として有効であると報告されている。さらに HD-AM には生体由来物質である TGF- β , IL-8, PDGF, VEGF, EGF, IL-6, IL-10 などが残存している。TGF- β 1 は肉芽形成を促進するために線維芽細胞やマクロファージに対する強い遊走活性を示し³⁶、インターロイキン 8 (IL-8) は好中球に対する細胞遊走性サイトカインである³⁷。これらの因子と HD-AM の足場としての機能が、HD-AM 直下に、POD1 より細胞浸潤を促進したと考える。免疫組織化学的染色により TGF- β 1, VEGF, Iba1 などの増殖因子が、POD1 から瀰漫性に発

現していたことは、HD-AM 直下に浸潤した細胞がフィブリン塊を介して、肉芽組織の形成に何らかの影響を与えたと考える。

さらに、CXCL-5 の発現が、HD-AM 群で POD4 より徐々に高くなり、POD7 においてはさらに高値であった。CXCL-5 は、強力な好中球移動および活性化能を有するケモカインである。好中球が創傷部位に集まり、創傷治癒および感染予防において重要な役割を果たすことが報告されている³⁸。重症熱傷患者の死因の 75 %が創感染などによる敗血症に由来するが、主因として受傷直後から細胞性免疫の低下があり 4~7 日で最低値になり、局所創部からの侵襲と共に受傷早期に全身感染症に容易に進行するためと考えられている²。組織修復において、好中球、マクロファージ、T 細胞などの炎症細胞が細菌や異物の除去といった局所免疫作用や炎症作用のほかサイトカインや細胞成長因子を放出することで重要な役割を担っている³⁹。以上のことから、炎症期から増殖期にかけて好中球の遊走を促進し、異物の進入に対する防御機構を向上する可能性が示唆された。今後、HD-AM 直下に浸潤した細胞の同定が必要であると考ええる。

2) HD-AM の線維芽細胞の増生に及ぼす効果

PDGF の発現は、HD-AM(一)群では POD0 よりも POD1 の発現量が低いにもかかわらず、HD-AM 群では常に POD0 の 2 倍以上の有意な発現があることから、HD-AM 群では受傷直後に損傷部位を切除したことによる血小板由来の PDGF の発現以上に、HD-AM に残存する PDGF に加え、HD-AM 直下に浸潤してきた細胞からの発現が盛んであることがあきらかである。PDGF (血小板由来増殖因子)は線維芽細胞やマクロファージを遊走させ、血漿中の EGF や IGF とともに細胞増殖を促す⁴⁰という報告と併せて考えると、PDGF が HD-AM 群で線維芽細胞を肉芽組織内に遊走させた起因物質の一つであると考えられた。

TGF- β 1 の発現は、経時的に増加し、POD7 において HD-AM 群で HD-AM(一)群に比較し有意に高かった。TGF- β 1 は、線維芽細胞を増殖させ、コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチンなどの合成を促進し、真皮に対する創傷治癒促進因子として評価される⁴¹。TGF- β 1 が徐々に増加することは、肉芽組織内への線維芽細胞の増生を緩徐にすすめたと考える。免疫組織化学的評価から、 α -SMA 陽性細胞は HD-AM 群にて POD4 より肉芽組織内に有意に発現しており、HD-AM 直下には発現が認められなかった。POD7 には、細胞数に有意差は認めなかった。また、 α -SMA の mRNA の発現は、POD1 より HD-AM 群で有意に高く、POD4 にはさらに高値であったが POD7 では有意差を認めなかった。これらのことは、PDGF や TGF- β 1 により早期に肉芽組織内に増生した線維芽細胞が無秩序に増殖するわけではなく、無処置の修復過程よりも早期に肉芽形成を終了したことを示唆したものと考えられた。

3) HD-AM の血管新生に及ぼす効果

肉芽形成において、VEGF を介する線維芽細胞と血管内皮細胞の相互作用が中心的な役割を果たしている。VEGF など様々なサイトカインや成長因子の作用により血管内皮細胞の増殖、血管の安定化、機能的な血管網の形成がなされる。TGF- β 1 や PDGF により増生が促

進された線維芽細胞は、これらのサイトカインにより VEGF の分泌をも増強する⁴²。VEGF は、POD7 に先立ち POD4 において HD-AM 群で一過性に有意に高い。また、HD-AM 群では Iba1 陽性細胞が、領域に関係なく POD1 から瀰漫性に存在していた。Iba1 は血管平滑筋細胞および T リンパ球の増殖を促進する⁴³ことから、受傷直後から血管新生に関与することが示唆された。HD-AM の影響下で、早期からの細胞浸潤や線維芽細胞の増生にともない、関連する様々な促進因子の影響で VEGF の分泌が増加し、POD4 での一過性の VEGF 発現増強が血管新生を誘発したと考えられる。結果として、免疫組織化学的評価において血管内皮マーカーである CD31 陽性の新生血管が POD4,7 において、HD-AM 群で有意に多く認めた。さらに、POD7 には基底側から上皮に向けて顕著に走行する血管像として観察された。

一方で、VEGF の過剰な発現および増殖の遷延は癒痕形成および線維症を引き起こすと言われている^{44,45,46}。また、正常のマウスでは創傷部に VEGF 発現が認められるのに対し、創傷治癒が遅延したマウスでは VEGF 発現は低下しているとの報告もあり、VEGF の一過性の発現を増強していることが、HD-AM の創傷治癒および癒痕抑制効果^{47,48}との関連が考えられるが、詳細については今後、さらに長期的な観察が必要である。

近年の創傷炎症環境での血管新生に prostaglandin E2 (PGE2) の産生上昇が関与するとの報告⁴⁹がある。PGE2 の分子生物学的評価が直接できないため、COX-2 の発現を調べた結果、POD4,7 において HD-AM 群で有意に高いという結果であった。PGE2 も肉芽組織内に血管新生を促進する起因为物質の一つであると考えられた。

4) HD-AM の創傷治癒過程に及ぼす効果

マクロファージは、主に 2 つのサブタイプに分類することができ、M1 マクロファージは創傷治癒の炎症期に働くが、M2 マクロファージは増殖期に働き、炎症を抑制し、組織を再構築する働きがある^{50,51}。炎症性サイトカインであり M1 マクロファージのマーカーとしても用いられる iNOS や IL-6 の発現は、iNOS は POD4,7、IL-6 は POD1,4 において、HD-AM 群で有意に高かった。ただし、iNOS と IL-6 は、POD4 を peak に POD7 では減少する傾向が示唆され、特に IL-6 は発現量が約半分に減少した。抗炎症性サイトカインであり M2 マクロファージのマーカーとしても用いられる CD163 や IL-10 の発現は、CD163 は POD1 より HD-AM 群にて有意に増加し、POD7 でさらに増加した。IL-10 は POD4,7 において HD-AM 群で有意に発現が増強された。

免疫組織化学的染色にて POD7 の HD-AM 群にて Iba1 (M1,M2 マクロファージのマーカー) と CD163 (M2 マクロファージのマーカー) の陽性細胞の局在を比較すると、M1 マクロファージは POD1 より HD-AM 直下、フィブリン塊内、肉芽組織内に瀰漫性に認められたが、M2 マクロファージは POD7 に肉芽組織内にのみ多く認めた。さらに、M2 マクロファージは POD1 より肉芽組織内に認めた。最近の研究で、羊膜が M2 マクロファージへの分化を調節することが明らかにされた²⁹。HD-AM も羊膜と同様の機能を有する可能性がある。HD-AM 群による早期の M2 マクロファージへの分化および、肉芽組織内への M2 マ

クロファージの早期浸潤を促すことは、抗炎症および組織修復のための重要な因子と考えられる。

TGF- β 1 の発現は、経時的に増加することが示唆されるも、POD7 において HD-AM 群で一気に発現が増強し有意となった。TGF- β 1 は、創傷治癒の初期段階において炎症細胞の増殖、遊走、分化など重要な機能を持つ成長因子である⁵²が、一方で、抑制作用を持つ生体の恒常性を維持する重要なサイトカインの一つであり、M2 マクロファージにも発現し創傷再構築にも重要な役割を担っている。本研究では、POD7 での TGF- β 1 の急激な発現は、炎症反応を軽減し終息させるための強力な抗炎症作用を発揮する M2 マクロファージの動きを示すものとする。羊膜は創傷治癒の早期に成長因子を有意に増加させるが、後期には抑制するように働くとの報告もある⁵³。HD-AM には IL-10 が残存していることから、生羊膜と同様の作用を示すと考えられる。

以上の様に、創傷治癒過程において、HD-AM が適切かつ有効的に作用することで、POD1 より強く炎症期を惹起し、かつ同時に増殖期の立ち上がりが認められた。さらに炎症期が漫然と継続するのではなく、スムーズに増殖期に移行したと考えられる。結果として、HD-AM が細胞浸潤、線維芽細胞の増生、血管新生を促し、良好な肉芽組織（移植床）をより早期に形成することに寄与したと考える。

我々の研究の limitation としては、実験対象がマウスであり、サンプルサイズが小さいことが挙げられる。また、創部を覆うドレッシング材による効果の違いや、再構築期における瘢痕形成についての検討など、ヒトへの実際的な臨床応用に際しては、さらなる研究が必要である。

結語

HD-AM は、早期に良好な肉芽組織（移植床）形成を促進した。**HD-AM**に残存するサイトカインや足場としての機能により、早期に細胞浸潤を促し、線維芽細胞の増生と血管新生を促した。さらに、早期により強く炎症期を誘導した結果、より早くかつスムーズに増殖期へと移行することが可能となり、結果として良質な肉芽組織（移植床）形成を促進した。**HD-AM** は、Ⅲ度熱傷後の全層皮膚切除部位に対する新たな創傷被覆材として有用であり、重症熱傷患者の救命率向上に向けた治療技術となることが示唆された。

利益相反

本研究に関して開示すべき利益相反は無い。

謝辞

本研究の機会を与え、4年間に渡るご指導およびご支援を下さいました危機管理医学講座の奥寺敬教授、並びに再生医学教室の二階堂敏雄教授、吉田淑子准教授、岡部素典助教、相古千加助教、および専門的な技術指導で実験を支えて頂きました古市恵津子さんに深く感謝いたします。

参考文献

1. Church, D., Elsayed, S., Reid, O., Winston, B. & Lindsay, R. Burn Wound Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 403–434 (2006).
2. Weber, J., McManus, A. & Nursing Committee of the International Society for Burn Injuries. Infection control in burn patients. *Burns* **30**, A16–A24 (2004).
3. Yoshino, Y. *et al.* The wound/burn guidelines - 6: Guidelines for the management of burns. *J. Dermatol.* **43**, 989–1010 (2016).
4. Meshulam-Derazon, S., Nachumovsky, S., Ad-El, D., Sulkes, J. & Hauben, D. J. Prediction of Morbidity and Mortality on Admission to a Burn Unit. *Plast. Reconstr. Surg.* **118**, 116–120 (2006).
5. Brusselaers, N. *et al.* Skin Replacement in Burn Wounds. *J. Trauma Inj. Infect. Crit. Care* **68**, 490–501 (2010).
6. Argenta, L. C. & Morykwas, M. J. Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment: clinical experience. *Ann. Plast. Surg.* **38**, 563–76; discussion 577 (1997).
7. Zheng, Y. *et al.* Topical administration of cryopreserved living micronized amnion accelerates wound healing in diabetic mice by modulating local microenvironment. *Biomaterials* **113**, 56–67 (2017).
8. Francisco, J. C. *et al.* Decellularized Amniotic Membrane Scaffold as a Pericardial Substitute: An In Vivo Study. *Transplant. Proc.* **48**, 2845–2849 (2016).
9. Gholipourmalekabadi, M. *et al.* Decellularized human amniotic membrane: more is needed for an efficient dressing for protection of burns against antibiotic-resistant bacteria isolated from burn patients. *Burns* **41**, 1488–1497 (2015).
10. Meller, D., Pauklin, M., Thomasen, H., Westekemper, H. & Steuhl, K.-P. Amniotic Membrane Transplantation in the Human Eye. *Dtsch Arztebl Int* **108**, 243–248 (2011).
11. Tauzin, H. *et al.* A skin substitute based on human amniotic membrane. *Cell Tissue Bank.* **15**, 257–265 (2014).
12. Tehrani, F. A., Ahmadiani, A. & Niknejad, H. The effects of preservation procedures on antibacterial property of amniotic membrane. *Cryobiology* **67**, 293–298 (2013).
13. Koike, C. *et al.* Characterization of Amniotic Stem Cells. *Cell. Reprogram.* **16**, 298–305 (2014).
14. Nagura, S. *et al.* Effect of Exogenous Oct4 Overexpression on Cardiomyocyte Differentiation of Human Amniotic Mesenchymal Cells. *Cell. Reprogram.* **15**, 471–480 (2013).

15. Otaka, S. *et al.* Selective Isolation of Nanog-Positive Human Amniotic Mesenchymal Cells and Differentiation into Cardiomyocytes. *Cell. Reprogram.* **15**, 80–91 (2013).
16. Fairbairn, N. G., Randolph, M. A. & Redmond, R. W. The clinical applications of human amnion in plastic surgery. *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg.* **67**, 662–675 (2014).
17. Okabe, M. *et al.* Hyperdry human amniotic membrane is useful material for tissue engineering: Physical, morphological properties, and safety as the new biological material. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **102**, 862–870 (2014).
18. Okabe, M. *et al.* Application of 2-octyl-cyanoacrylate for corneal perforation and glaucoma filtering bleb leak. *Clin. Ophthalmol.* **7**, 649–653 (2013).
19. Qi, F. *et al.* Construction and characterization of human oral mucosa equivalent using hyper-dry amniotic membrane as a matrix. *Arch. Oral Biol.* **65**, 26–34 (2016).
20. Tsuno, H. *et al.* Intraoral application of hyperdry amniotic membrane to surgically exposed bone surface. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* **117**, e83-7 (2014).
21. Saito, A. *et al.* Therapeutic efficacy of an antibiotic-loaded nanosheet in a murine burn-wound infection model. *Acta Biomater.* **8**, 2932–2940 (2012).
22. Li, S. W. *et al.* SARS coronavirus papain-like protease induces Egr-1-dependent up-regulation of TGF- β 1 via ROS/p38 MAPK/STAT3 pathway. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
23. He, C. *et al.* Vasoprotective effect of PDGF-CC mediated by HMOX1 rescues retinal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 14806–14811 (2014).
24. Veres-Székely, A. *et al.* Selective measurement of α smooth muscle actin: Why β -actin can not be used as a housekeeping gene when tissue fibrosis occurs. *BMC Mol. Biol.* **18**, (2017).
25. Johnston, A. P. W. *et al.* Dedifferentiated Schwann Cell Precursors Secreting Paracrine Factors Are Required for Regeneration of the Mammalian Digit Tip. *Cell Stem Cell* **19**, 433–448 (2016).
26. Mishra, P. J. Cell-free derivatives from mesenchymal stem cells are effective in wound therapy. *World J. Stem Cells* **4**, 35 (2012).
27. Charania, M. A. *et al.* Intestinal epithelial CD98 synthesis specifically modulates expression of colonic microRNAs during colitis. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* **302**, G1282–G1291 (2012).
28. Liu, T. *et al.* Vitamin D treatment attenuates 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS)-induced colitis but not oxazolone-induced colitis. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
29. Magatti, M. *et al.* Human amnion favours tissue repair by inducing the M1-to-M2 switch and enhancing M2 macrophage features. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **11**, 2895–2911 (2017).

30. Asahara, T. *et al.* Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science* (80-.). **275**, 964–966 (1997).
31. Majima, M. *et al.* Cyclo-oxygenase-2 enhances basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis through induction of vascular endothelial growth factor in rat sponge implants. *Br. J. Pharmacol.* **130**, 641–9 (2000).
32. Witte, M. B. & Barbul, A. General principles of wound healing. *Surg. Clin. North Am.* **77**, 509–28 (1997).
33. Martin, P. Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science* (80-.). **276**, 75–81 (1997).
34. Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. & Longaker, M. T. Wound repair and regeneration. *Nature* **453**, 314–321 (2008).
35. Perepelkin, N. M. J. *et al.* Cryopreserved amniotic membrane as transplant allograft: viability and post-transplant outcome. *Cell Tissue Bank.* **17**, 39–50 (2016).
36. Lyons, R. M. & Moses, I.-I. L. *Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation.* **187**, (1990).
37. Baggiolini, M., Dewald, B. & Moser, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* **55**, 97–179 (1994).
38. Theilgaard-Monch, K., Knudsen, S., Follin, P. & Borregaard, N. The Transcriptional Activation Program of Human Neutrophils in Skin Lesions Supports Their Important Role in Wound Healing. *J. Immunol.* **172**, 7684–7693 (2004).
39. Hübner, G. *et al.* DIFFERENTIAL REGULATION OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES DURING WOUND HEALING IN NORMAL AND GLUCOCORTICOID-TREATED MICE. *Cytokine* **8**, 548–556 (1996).
40. Falanga, V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* **366**, 1736–1743 (2005).
41. Quaglino, D., Nanney, L. B., Ditesheim, J. A. & Davidson, J. M. Transforming growth factor-beta stimulates wound healing and modulates extracellular matrix gene expression in pig skin: incisional wound model. *J. Invest. Dermatol.* **97**, 34–42 (1991).
42. Pertovaara, L. *et al.* Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 6271–4 (1994).
43. Fujisaka, S. *et al.* Regulatory Mechanisms for Adipose Tissue M1 and M2 Macrophages in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes* **58**, 2574–2582 (2009).
44. Gilbert, R., Vickaryous, M. & Vilorio-Petit, A. Signalling by Transforming Growth Factor Beta Isoforms in Wound Healing and Tissue Regeneration. *J. Dev. Biol.* **4**, 21 (2016).

45. Lu, S. W. *et al.* Clodronate liposomes reduce excessive scar formation in a mouse model of burn injury by reducing collagen deposition and TGF- β 1 expression. *Mol. Biol. Rep.* **41**, 2143–2149 (2014).
46. Palumbo-Zerr, K. *et al.* Orphan nuclear receptor NR4A1 regulates transforming growth factor- β signaling and fibrosis. *Nat. Med.* **21**, 150–158 (2015).
47. Mohammadi, A., Eskandari, S., Johari, H. & Rajabnejad, A. Using amniotic membrane as a novel method to reduce post-burn hypertrophic scar formation: a prospective follow-up study. *J. Cutan. Aesthet. Surg.* **10**, 13–17 (2017).
48. Zhao, B. *et al.* Exosomes derived from human amniotic epithelial cells accelerate wound healing and inhibit scar formation. *J. Mol. Histol.* **48**, 121–132 (2017).
49. Németh, K. *et al.* Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2–dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat. Med.* **15**, 42–49 (2009).
50. Leoni, G., Neumann, P. A., Sumagin, R., Denning, T. L. & Nusrat, A. Wound repair: Role of immune-epithelial interactions. *Mucosal Immunology* **8**, 959–968 (2015).
51. Shi, J., Wu, Z., Li, Z. & Ji, J. Roles of Macrophage Subtypes in Bowel Anastomotic Healing and Anastomotic Leakage. *J. Immunol. Res.* **2018**, 1–8 (2018).
52. Leydon, C., Imaizumi, M., Bartlett, R. S., Wang, S. F. & Thibeault, S. L. Epithelial cells are active participants in vocal fold wound healing: An in vivo animal model of injury. *PLoS One* **9**, (2014).
53. Song, M. *et al.* The repairing of full-thickness skin deficiency and its biological mechanism using decellularized human amniotic membrane as the wound dressing. *Mater. Sci. Eng. C* **77**, 739–747 (2017).