

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20369

研究課題名(和文) 難治性皮膚潰瘍に対する新たな治療法確立を目指す炭酸ガスレーザーの創傷治癒効果解析

研究課題名(英文) The effect of a carbon dioxide laser on wound healing for intractable skin ulcer

研究代表者

上森 友樹 (Kamimori, Tomoki)

順天堂大学・医学部・助手

研究者番号：70773836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：炭酸ガスレーザーの低出力照射治療により、ヒト皮膚線維芽細胞の増殖能及び遊走能が促進され、またその過程にAkt, ERK, JNKといったシグナル伝達分子の活性化が大きく関わっていると示唆された。本研究により、炭酸ガスレーザー照射が創傷治療の新たな選択肢として検討されるべき根拠となる重要な結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Although Low-level laser therapy (LLLT) with a carbon dioxide (CO2) laser was also reported to promote wound healing, the underlying mechanisms at the cellular level have not been previously described. Herein, we investigated the effect of LLLT with a CO2 laser on fibroblast proliferation and migration.

In MTS and cell migration assays, fibroblast proliferation and migration were promoted after LLLT with a CO2 laser at 1.0 J/cm². Western blot analysis revealed that Akt, ERK, and JNK activities were promoted in fibroblasts after LLLT with a CO2 laser at 1.0 J/cm². Moreover, inhibition of Akt, ERK, or JNK significantly blocked fibroblast proliferation and migration. These findings suggested that LLLT with a CO2 laser would accelerate wound healing by promoting the proliferation and migration of fibroblasts. Activation of Akt, ERK, and JNK was essential for CO2 laser-induced proliferation and migration of fibroblasts.

研究分野：形成外科

キーワード：炭酸ガスレーザー 低出力照射治療 線維芽細胞 創傷治癒 シグナル伝達分子

1. 研究開始当初の背景

現在、様々な医療分野にて多種の医療用レーザーが使用されている。長波長の赤外線である炭酸ガスレーザー (CO₂レーザー) は、出力波長が水に吸収されやすく、組織に照射した際に熱を生じることから、組織の切開、凝固等の作用をもつメスレーザーとして広く使用されている。

CO₂レーザーの低出力照射治療 (Low Level Laser Therapy: LLLT) が皮膚創傷治癒を促進させる効果があると知られているが、その詳細なメカニズムはわかっていなかった。我々は予備実験において、CO₂レーザーの低出力照射が、創傷治癒の過程において大きな役割を持つ皮膚線維芽細胞の増殖能及び遊走能を促進することを確認した。

CO₂レーザーの LLLT による創傷治癒促進効果のメカニズムを解明し、臨床現場で効果的に使用することで、CO₂レーザーは皮膚創傷治療の有効なツールとなり、さらには近年増加している糖尿病性皮膚潰瘍をはじめとする難治性皮膚潰瘍に対する治療の選択肢のひとつとなる可能性がある。

2. 研究の目的

CO₂レーザーの LLLT による皮膚創傷治癒促進効果の細胞生物学的なメカニズムを解明することを目的とし、難治性潰瘍における低出力炭酸ガスレーザー治療法の開発を目指した基盤研究である。そのため、CO₂レーザーの LLLT が、創傷治癒に大きく関わる主要な細胞の一つである皮膚線維芽細胞に与える影響を検証する。

創傷治癒の過程において、皮膚線維芽細胞の増殖および遊走が大きな役割を果たしており、CO₂レーザーの LLLT がその増殖および遊走といった細胞動態にどのように関与するのかを解明する。さらに、PI3-kinase/Akt 経路や MAP キナーゼ経路として代表的な ERK、JNK は、細胞の増殖、遊走に大きく関与しているといわれている。CO₂レーザーの LLLT により、線維芽細胞の pathway がどう活性化するかを解明し、メカニズムのさらなる理解を深める。

具体的には、以下のことを明らかにすることとした。

- (1) CO₂レーザーの LLLT による皮膚線維芽細胞の増殖能力の変化を MTS assay を用いて明らかにする。
- (2) CO₂レーザーの LLLT による皮膚線維芽細胞の遊走能力の変化を scratch assay を用いて明らかにする。
- (3) CO₂レーザーの LLLT が創傷治癒におけるシグナル伝達経路に与える影響を Western blotting 解析を用いて解明する。
- (4) (3) で検証したシグナル伝達分子に関しそれぞれの阻害剤を使用した状態で、CO₂レーザーの LLLT が皮膚線維芽細胞の増殖能

および遊走能に与える影響の変化を検証する。

3. 研究の方法

培養ヒト皮膚線維芽細胞 (American Type Culture Collection, VA, USA) を実験に使用した。炭酸ガスレーザーは発振波長 10.6 μm である Opelaser Pro (吉田製作所) を連続発振モードで使用した。またレーザーのハンドピース部にはホモジナイザーを装着し、35 mm 計のスポットにレーザー光が均一に照射されるように調整し実験に使用した。レーザーは以下のような様々な出力条件で照射した 0.1 J/cm² (52.08 mW/cm², 2 秒)、0.5 J/cm² (52.08 mW/cm², 10 秒)、1.0 J/cm² (52.08 mW/cm², 20 秒)、2.0 J/cm² (52.08 mW/cm², 40 秒)、5.0 J/cm² (520.83 mW/cm², 10 秒)。

(1) 細胞増殖能に与える影響について
線維芽細胞 (3 5 継代、96 well プレートに 2000 個/well) を播種した翌日に複数の出力条件 (0.1 J/cm², 0.5 J/cm², 1.0 J/cm², 2.0 J/cm², 5.0 J/cm²) でレーザーを照射し、48 時間後に MTS assay を行った。

(2) 細胞遊走能に与える影響について
線維芽細胞 (3 5 継代、96 well プレートに 8000 個/well) を播種した翌日に、コンフルエントとなった状態の細胞に WoundMaker device (Essen BioScience, MI, USA) を使用して傷をつけた。その後、複数の出力条件 (0.1 J/cm², 0.5 J/cm², 1.0 J/cm², 2.0 J/cm², 5.0 J/cm²) でレーザーを照射し、6、12、24 時間後に傷の幅を測定し、細胞遊走能の評価をした。

(3) シグナル伝達分子に与える影響について
線維芽細胞 (3 5 継代、2.0 × 10⁵ 個/100 mm ディッシュ) を播種した 48 時間後に細胞を回収し実験に使用した。上記二つの実験で細胞増殖能及び遊走能を最も促進した 1.0 J/cm² の出力でレーザーを照射した線維芽細胞で Western blotting 解析を行い、Akt、ERK、JNK といったシグナル伝達分子の活性を検証した。

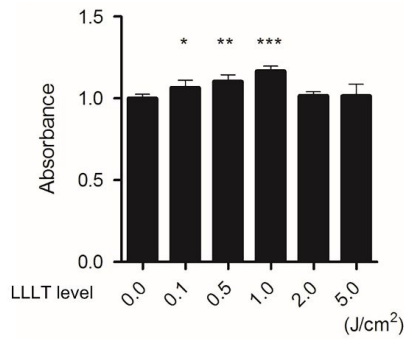
(4) 各種シグナル伝達分子の阻害剤による影響について

Akt、ERK、JNK それぞれの阻害剤 (LY294002, U-0126, SP600125 [10 mM]) を添加した培地で培養した線維芽細胞を使用して実験を行った。線維芽細胞に上記 3 つの実験と同様の条件で LLLT を施行した後、MTS assay、Scratch assay 及び Western blotting 解析を行い、阻害剤を使用しない群と比較した。

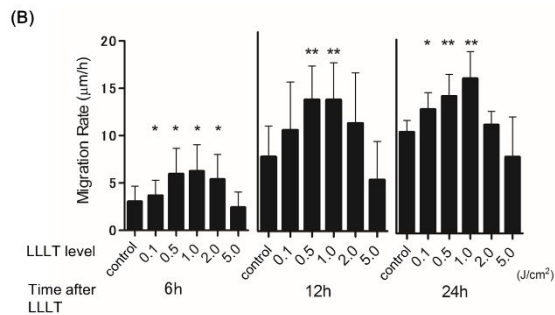
4. 研究成果

(1) MTS assay では 0.1 J/cm²、0.5 J/cm² 及び 1.0 J/cm² という出力条件で照射した細胞で、細胞増殖能が有意に促進された。特に

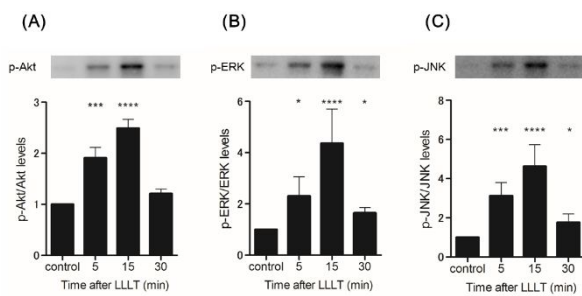
1.0J/cm² で照射した際に細胞増殖能が強く促進された。



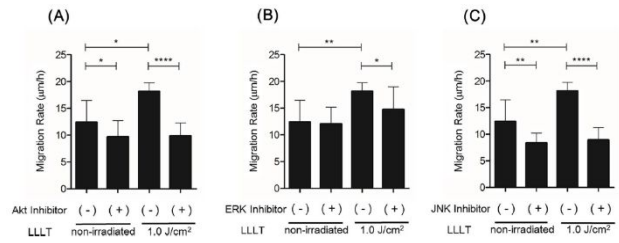
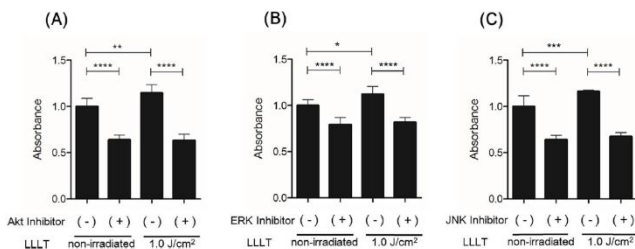
(2) Scratch assay では 0.5J/cm² 及び 1.0J/cm² という出力条件で照射した細胞で、細胞遊走能が有意に促進された。また、細胞増殖能と同様に、特に 1.0J/cm² で照射した際に細胞遊走能が強く促進された。



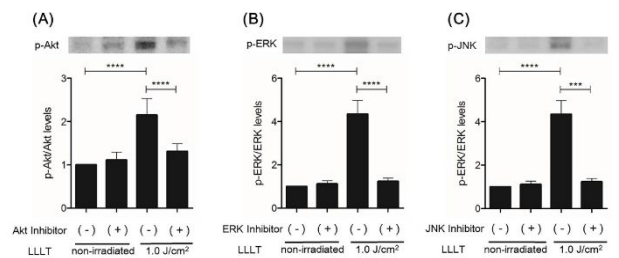
(3) Western Blotting では、1.0J/cm² の条件で照射した 15 分後に回収した線維芽細胞において Akt、ERK、JNK の活性が促進された。



(4) CO₂ レーザーを用いた LLLT 後の線維芽細胞において、Akt、ERK、JNK それぞれのシグナル伝達分子を阻害した群は、阻害剤を使用していない群と比べ、細胞増殖能及び遊走能が抑制された。



また、CO₂ レーザーを用いた LLLT 後の線維芽細胞において、Akt、ERK、JNK それぞれのシグナル伝達分子を阻害した群は、阻害剤を使用していない群と比べ、それぞれのシグ



ナル伝達分子の活性が抑制された。

MTS assay および Scratch assay の結果から、炭酸ガスレーザーを用いた LLLT が皮膚線維芽細胞の増殖能および遊走能を促進し、また 1.0J/cm² という照射条件が特に細胞活性を促進することが分かった。どちらの実験からも同様の結果が得られたことより、この照射条件は細胞の活性促進に重要な意義を持つと考えられる。

また炭酸ガスレーザーを用いた LLLT 後の線維芽細胞において、Akt、ERK、JNK といったシグナル伝達分子の活性が有意に促進したことから、LLLTT による創傷治癒促進過程にこれらの伝達分子を含むシグナル伝達経路の活性化が大きく関与することが示唆された。

さらに、上記のシグナル伝達分子をそれぞれ阻害した状態では、炭酸ガスレーザーを用いた LLLT 後の線維芽細胞において増殖能及び遊走能が抑制された。これにより LLLTT による細胞増殖能及び遊走能促進過程において、これらのシグナル伝達経路の活性化が大きく関与することが示唆された。

これまでに様々なレーザーの LLLTT による創傷治癒促進効果に関する研究結果が報告されているが、炭酸ガスレーザーを用いた LLLTT に関する報告は少なかった。さらに我々の渉猟し得た限り、本研究は、炭酸ガスレーザーを用いた LLLTT が皮膚を構成する細胞のシグナル伝達経路に与える影響に関して言及した初めての研究である。

本研究により、炭酸ガスレーザーを用いた LLLTT の持つ創傷治癒効果の細胞生物学的メカニズム解明の一助となる大きな意義のあ

る結果が得られた。しかし LLLT による細胞への刺激が、どのように各種シグナル伝達経路を活性化するかに関してはまだ解明されていないため、さらなる詳細な研究が必要とされている。

また、本研究の最終目標である臨床応用を目指し、今後はさらにマウス等の実験動物を使用した in vivo での実験等を計画する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Shingyochi Yoshiaki, Kanazawa Shigeyuki, Tajima Satoshi, Tanaka Rica, Mizuno Hiroshi, Tobita Morikuni, A Low-Level Carbon Dioxide Laser Promotes Fibroblast Proliferation and Migration through Activation of Akt, ERK, and JNK, PLOS ONE, 12 巻、2017、e0168937、査読有

[学会発表](計 2 件)

新行内 芳明、低出力炭酸ガスレーザーが線維芽細胞の増殖能、遊走能に与える影響 - 第 2 報 - 細胞内シグナル伝達に関して、第 25 回日本形成外科学会基礎学術集会、2016 年

Yoshiaki Shingyochi, Effect of Low-level carbon dioxide laser therapy on proliferation and migration of cultured fibroblasts, The 46th Annual Meeting of Japanese Society for Wound Healing, 2016 年

6. 研究組織

1) 研究代表者

上森 友樹 (KAMIMORI, Tomoki)

順天堂大学・医学部・助手

研究者番号：70773836