

機関番号：32643

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792175

研究課題名 (和文) 褥瘡発生に関わる基礎的研究－皮膚・筋肉の構成細胞の加圧刺激に対する応答－

研究課題名 (英文) Fundamental study on mechanism of pressure ulcer developing. -Response to pressure of skin and muscle cells. -

研究代表者

高田 直子 (TAKADA NAOKO)

帝京大学・医療技術学部・講師

研究者番号：10432303

研究成果の概要 (和文)：褥瘡 (いわゆる床ずれ) の発生メカニズムを解明する助けとして、皮膚および筋肉を構成する細胞の圧力に対する反応を実験的に検討した。その結果、皮膚の構成細胞は圧力を受けることでこれまで褥瘡に関与するとは考えられていなかった遺伝子を発現することが明らかとなった。さらにこれまで圧力によって発現した遺伝子は、タンパク質のレベルでも発現することもわかった。加えて、より生体に近い実験モデルを作成した。

研究成果の概要 (英文)：The purpose of this study was reveal mechanism of pressure ulcer developing by using the cell that composed the skin and the muscle. As a result, the application of external pressure induced the expression of gene not thought to be related to the generation of the pressure ulcer before. And, the gene that increases by a current research was confirmed by the immunostaining. In addition, I made three-dimensionnal culture model that similar living body.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：看護学・基礎看護

キーワード：褥瘡、皮膚線維芽細胞、筋管細胞、機械的刺激、アポトーシス、低酸素刺激

1. 研究開始当初の背景

現在わが国をはじめとする先進諸国においては、加速する高齢化、医療の高度化などにより褥瘡発生のリスクは高まっている。褥瘡は寝たきり老人や重症患者に発生する皮膚の傷害であり、慢性化しやすく、その発生や保有により医療費の増大や療養日数の増加などを引き起こす為、現在の医療における重要な関心事のひとつとなっている。褥瘡は、

従来、持続した局所の圧迫による虚血(循環障害)が組織壊死を引き起こすことにより発生すると考えられてきた。近年、褥瘡が臨床現場で注目されるに従い、その発生や治癒過程に関連した研究が多数行われるようになり、様々な可能性が示唆されている。褥瘡発生の主たる原因は外部からの圧迫であることは、動かしがたい事実である。実際に圧迫負荷がない状態では褥瘡は発生しない。しかし体表

より体内に向け加圧をした際、血管以外の皮膚、皮下、筋組織を構成する細胞にも圧負荷がかかる。にもかかわらず、褥瘡の発生機構に関する研究において、圧迫に対する血流の変化以外の生体反応を考察したものは非常に少ない状況であった。研究者は、褥瘡発生機構に関して従来の血流障害説に加え、皮膚および筋肉の構成細胞が加圧に対し直接応答することで、マトリックスの分解や炎症細胞などの動員を招く等のイベントが起った結果、褥瘡発生に繋がるのではないかと考えていた。そのため、従来の血流に関連した研究もさることながら、皮膚および筋肉を構成する細胞の加圧という機械的刺激に対する反応が関与している可能性、さらにはそれらの構成細胞の役割を検討する必要があると考え、これまで研究を実施してきた。

これまでの研究結果を基に、さらなる検証を行い、新たな見地を確立することが必要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、褥瘡発生プロセスには圧という機械的刺激への細胞応答に始まる一連の細胞反応が関与するという仮説を検証することである。

皮膚および筋肉の構成細胞の応答を褥瘡発生の一要因として検討することは、これまで十分になされていない領域であり、本研究は褥瘡の予防と治療に新たな視点を提言することを目指している。

3. 研究の方法

本研究では、ヒト皮膚線維芽細胞のコラーゲンゲル内三次元培養系を用いて、加圧刺激に対する細胞応答を遺伝子レベルで検討した。また、これまで加圧負荷により発現量が増加した遺伝子を対象に、他研究者との共同

研究において、実際の褥瘡組織を用いてタンパク質レベルでの発現の確認を、免疫染色法を用いて行った。

また、より生体に近い（弾力性のある）モデルの作成を目指し、ヒト皮膚線維芽細胞をカイコフィブロインスポンジ内で培養する方法を検討した。

(1) 細胞培養

ヒト正常皮膚線維芽細胞 (HDF) を、10% ウシ胎児血清、ペニシリン、ストレプトマイシンを加えたダルベッコ変法 MEM 培養液 (DMEM) を用い、培養を行った。

コラーゲンゲルの作成には、0.5%酸性コラーゲン溶液を用いて、最終濃度 0.37% のコラーゲンゲル溶液を作成した。そのうち、0.5ml をベースレイヤーとして、5cm のプラスチックディッシュ内に流し込み、37°C 環境にてゲル化させた。その後、ベースレイヤー上に約 $1.5 \times 10^6/\text{ml}$ の HDF を分散したコラーゲンゲル溶液を加えてゲル化させ、細胞レイヤーを作成した。細胞レイヤーが凝固した後、DMEM を加えて培養を行った。すべての培養および実験は、37°C 炭酸ガスインキュベーター内で行った。

(2) 加圧負荷実験

3 次元培養 5~7 日で加圧負荷実験を行った。加圧にはテフロン皮膜加工のスチールプレートで 3 次元培養細胞上に乗せ、ディッシュ底面に磁石を設置し、プレートが磁石に引き寄せられる力を利用した。負荷量は、スペーサーを用いてディッシュと磁石間の距離で調整し、スペーサー厚による圧負荷変化量の測定には、EX - Graph (島津製作所) を用いた。本研究では、スペーサー厚約 2mm、負荷量約 $100\text{g}/\text{cm}^2$ (約 $74\text{mmHg}/\text{cm}^2$) で、負荷時間は 5 時間とした。

(3) 遺伝子発現

加圧負荷実験後、TRIzol を用いて総 RNA

を抽出後、cDNA 合成を行った。cDNA サンプルを RT-PCR 法を用いて、複数の遺伝子の発現を検討した。

(4) 褥瘡組織の免疫染色

共同研究者の取り扱った法医学解剖遺体から採取した初期褥瘡 (stage I) の組織に対し、RT-PCR で変動を確認したタンパクに対する抗体を用いて ABC 法にて免疫染色を行った。対象となるタンパク質は、これまでの研究によって発現増加を確認した、熱ショックタンパク質 (heat-shock protein : HSP) 70、血管拡張因子であるシクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase : COX) -2、NO 合成酵素類 (nitric oxide synthase : NOS) のうちの eNOS、および 3 次元培養 HDF を用いた実験で新たに発現増加が確認できた遺伝子とした。

(5) 新たな 3 次元培養方法の検討

単層培養したヒト皮膚線維芽細胞を、カイクロフィブロインスポンジ内で複数の方法にて培養した。培養方法には、コラーゲンの使用の有無と、スポンジへの細胞播種方法 (注入・攪拌・何もせず播種) を組み合わせて検討した。また、市販されている培養スポンジを用いた培養と、カイクロフィブロインスポンジでの培養を線維芽細胞の増殖程度で比較検討した。

4. 研究成果

(1) 加圧負荷による遺伝子発現

3 次元培養 HDF を用いた実験では、皮膚線維芽細胞は加圧負荷によって、骨形成因子 (bone morphogenetic protein : BMP) ファミリーである BMP-6 の発現を増強させることを明らかにした。BMP-6 これは、これまで褥瘡に関与する可能性が述べられていない遺伝子 (タンパク質) であり、重要な発見であると言える。BMP ファミリーは様々

な細胞に発現し、多くの機能を有していることがこれまでの研究で明らかにされている。そのため、今後褥瘡の発生プロセスのほかに治癒経過との関連性を経時的に追っていくことも、重要な意味を持つと考える。

(2) 初期褥瘡の組織での検討

ストレスタンパクであるヒートショックプロテイン (HSP) 70 は、皮膚線維芽細胞への加圧刺激によってその遺伝子発現が増加することは 3 次元培養による実験ですでに証明していたが、今回、免疫染色によって初期褥瘡 (stage I) の真皮層に発現していることが、明らかにできた。このことは、stage I の褥瘡は、圧という機械的刺激や低酸素状態など何らかの刺激によって、真皮層の細胞が傷害されることにより引き起こされる可能性を示している。

Stage I 褥瘡では、血管拡張は認めるが血管拡張因子であるシクロオキシゲナーゼ (COX) -2 の免疫染色陽性細胞は非褥瘡組織のほうが多く確認できた。また、他の血管拡張因子となる NO 合成酵素である eNOS においては、Stage I の褥瘡組織で陽性細胞を多く認めた。特に、真皮層の血管周辺では、陽性反応が強かった。このことは、初期の褥瘡には血管拡張が関与し、その血管拡張には eNOS が関与している可能性が見えてきた。

褥瘡の治癒過程において、血管の拡張は非常に重要な要素となる。しかし、褥瘡の発生および発生直後の急性期では、局所の血管拡張に関する見解は少ない。そのため、褥瘡の予防及び急性期褥瘡の治癒促進について検討する視点として重要な意味をなすと考え、急性期褥瘡を対象とした更なる検討が必要である。

BMP-6 は、褥瘡組織の真皮に特異的に陽性反応を示し、褥瘡の発生および経過に何らかの関連性を持つ可能性を示唆した。また、

圧負荷による遺伝子発現の増加に加え、急性期褥瘡組織での発現の確認により、褥瘡の発生および進行に対する関与の可能性がより強固に示されたと考える。

(3) 新たな3次元培養方法

細胞浮遊液には従来の3次元培養の際に用いていたコラーゲンを含有しない培養液のみを用いて、培養は攪拌させながら行う方法が最も細胞増殖効率が高いことを明らかにできた。また、カイコフィブロインスポンジが他の市販されている培養スポンジよりも培養効率は高いことも明らかにした。

弾力性が高く、より生体に近いモデルはカイコフィブロインスポンジを使用した3次元培養であることは明らかとなったが、実用に向けてスポンジからの細胞の抽出方法、弾力性の調整方法などを検討する必要がある。このモデルの実用化によって、より生体の線維芽細胞の圧負荷への応答に近い結果を得られるのでは以下と考える。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計1件)

①高田直子, 佐伯行一: ヒト皮膚線維芽細胞の3次元培養方法の検討—弾力のある実験モデル作成の試み. 日本褥瘡学会学術集会, 平成22年8月20日, 幕張メッセ

6. 研究組織

(1)研究代表者

高田 直子 (TAKADA NAOKO)

帝京大学・医療技術学部・講師

研究者番号: 10432303