

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09759

研究課題名（和文）糖尿病性足壊疽に対する切り札-プロタミン含有創傷被覆材の開発-

研究課題名（英文）Development of protamine-containing wound dressing for diabetic foot gangrene

研究代表者

梅山 広勝（Umeyama, Hirokatsu）

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：40770334

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：サケ白子由来物質であるプロタミンの創傷治癒促進効果について検証した。培養細胞におけるプロタミン投与によるサイトカイン放出や細胞数の変化などについて詳細に検討した。マウスマクロファージのみならず、樹状細胞刺激においてもサイトカイン誘導への関与が示唆されたが、使用したプロタミン製剤内のリポポリサッカライドが関与している可能性があり、ポリミキシンB併用によるエンドトキシン不活化実験にてその効果を検討した。その結果、プロタミン単独での炎症誘導は認められず、含有物質による治癒促進である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サケの白子は廃棄資源であり、臨床的にはヘパリンの拮抗薬として静脈内注射用製剤としてすでに応用されている。しかし、創傷治癒分野における応用は未だなく、新規治療薬としての応用が期待されていた。本研究結果により、プロタミン単独での炎症誘導は認められず、含有物質による治癒促進である可能性が示唆された。プロタミンは医薬品の他、食品保存料としてすでに実用化されており、安全性は高いものである。創部への抗菌作用も期待されるが、治癒の促進に関しては単独の効果は得られなかったため、治癒促進物質としての有効性は低いと判断した。今後、抗菌性に着目した新たな製剤の開発の糸口を見つけたいと考えている。

研究成果の概要（英文）：The wound healing promoting effect of protamine, a substance derived from salmon milt, was examined. The cytokine release and changes in cell number induced by protamine administration in cultured cells were examined in detail. The involvement of cytokine induction not only in mouse macrophages but also in dendritic cell stimulation was suggested, and the lipopolysaccharide in the protamine formulation used may be involved, and the effect was examined in an endotoxin inactivation experiment using polymyxin B. As a result, no induction of inflammation was observed with protamine alone, suggesting the possibility that the substances contained in the product promote healing.

研究分野：創傷治癒

キーワード：プロタミン 創傷治癒 糖尿病性足潰瘍 難治性潰瘍

1. 研究開始当初の背景

サケ白子由来物質であるプロタミンの創傷治癒促進効果について検証した。プロタミンは医薬品の他、抗菌性作用による食品保存料としてすでに実用化されており、安全性は高いものである。さらに、サケの白子は廃棄資源であり、臨床的にはヘパリンの拮抗薬として静脈内注射用製剤としてすでに応用されている。しかし、創傷治癒分野における応用は未だなく、新規治療薬としての応用が期待されていた。

2. 研究の目的

本研究では、in vitro 予備実験でのプロタミンにおけるマウスマクロファージ刺激実験でプロタミンがサイトカインなどの放出を誘導する可能性が示唆され、創傷治癒と炎症に着目して創傷治癒を促進するかどうかについて検討してきた。

3. 研究の方法

マウスから抽出した骨髄由来樹状細胞を培養し、プロタミンで刺激する実験を行った。また、マウスへのプロタミン投与実験を行った。非固着性ガーゼに塩酸プロタミンを浸漬させ乾燥させた疑似的な創傷被覆材を作成し、マウス背部に 3mm パンチで作成した全層皮膚欠損に貼付、連日交換のうえ Day3 で創閉鎖率を解析した。さらに、マウスマクロファージである Raw264.7 を用いた刺激試験を行った。さらに、C3H / HeN および C3H / HeJ マウスから採取した骨髄由来樹状細胞の刺激試験を行った。加えて、エンドスパーシーキットでエンドトキシンの定量を行なった。培養細胞におけるプロタミン投与によるサイトカイン放出や細胞数の変化などについて詳細に検討した。また、ポリミキシン B 併用によるエンドトキシン不活化実験にてその効果を検討した。

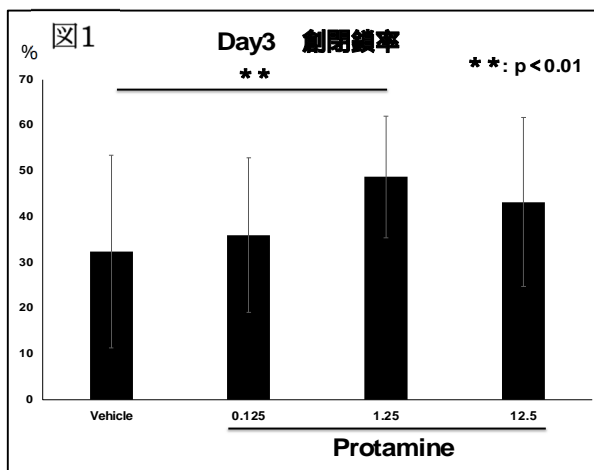
4. 研究成果

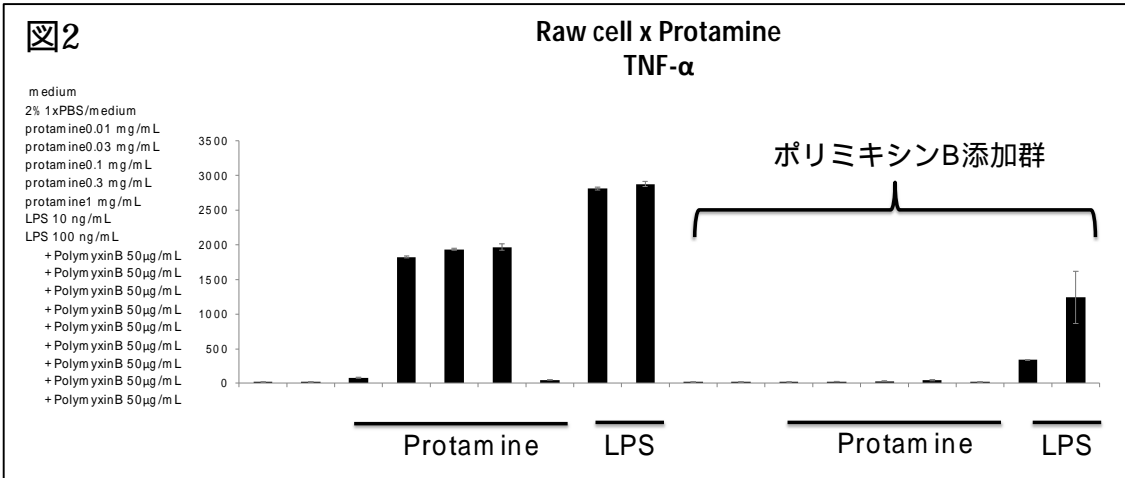
骨髄由来樹状細胞でのプロタミン刺激実験では、IL-6 や TNF- α 、IL-12p40 などの炎症性サイトカインの上昇を認めた。創傷治癒において早期の炎症性サイトカインの上昇は白血球の遊走を促進し、創の清浄化を早め治癒を促進すると言われている。

マウスへのプロタミン投与実験では、1.25mg / ml の溶液で作成した疑似的被覆材において投与後 3 日目の創閉鎖率の改善を認めた (図 1)。

マウスマクロファージである Raw264.7 を用いた刺激試験では、炎症性サイトカインの産生を認めたが、プロタミン高濃度での細胞毒性による細胞死が確認された。これは、プロタミンが陽電荷であることによる細胞の吸着が進むことによる生菌作用が細胞にも影響したためと考えられた。このため、特に至適濃度での濃度での投与が重要と考えられた。

さらに、C3H / HeN および C3H / HeJ マウスから採取した骨髄由来樹状細胞の刺激試験により、HeJ マウスのサイトカイン産生がキャンセルされた。これは、TLR4 を介した反応によるサイトカイン産生である可能性があり、プロタミン製剤のエンドトキシン含有の可能性が示唆された。そのため、エンドスパーシーキットでエンドトキシンの定量を行なったところ、エンドトキシン含有が判明した (図 2)。





培養細胞におけるプロタミンとポリミキシン B 併用によるエンドトキシン不活化実験にて、プロタミン単独での炎症誘導は認められず、含有物質による治癒促進である可能性が示唆された。サケの白子は廃棄資源であり、臨床的にはヘパリンの拮抗薬として静脈内注射用製剤としてすでに応用されている。しかし、創傷治癒分野における応用は未だなく、新規治療薬としての応用が期待されていた。本研究結果により、プロタミン単独での炎症誘導は認められず、含有物質による治癒促進である可能性が示唆された。プロタミンは医薬品その他、食品保存料としてすでに実用化されており、安全性は高いものである。創部への抗菌作用も期待されるが、治癒の促進に関しては単独の効果は得られなかったため、治癒促進物質としての有効性は低いと判断した。今後、抗菌性に着目した新たな製剤の開発の糸口を見つきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	菅野 恵美 (Kanno Emi) (10431595)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	
研究分担者	丹野 寛大 (Tanno Hiromasa) (10755664)	東北大学・医学系研究科・講師 (11301)	
研究分担者	高木 尚之 (Takagi Naoyuki) (30569471)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師 (11301)	
研究分担者	山口 賢次 (Yamaguchi Kenji) (70897892)	東北大学・医学系研究科・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