

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09806

研究課題名(和文)慢性創傷とNETs発現の関連の解明とNETsをターゲットにした新規治療の開発

研究課題名(英文)Relationship between chronic wounds and NETs expression for novel therapeutic development targeting NETs

研究代表者

今川 孝太郎 (Imagawa, Kotaro)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：50366001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：慢性創傷においてNeutrophil extracellular traps (NETs)が発現していることを確認した。NETsの発現は微小血管障害、創傷治癒遅延に関与している可能性があり、バトロキソピン投与がNETs発現を抑制するかをラットの皮弁虚血再灌流障害モデルを用いて検証した。バトロキソピン投与により皮弁組織の生存範囲が改善することを確認した。組織学的検討でNETsの発現がコントロール群に比較してバトロキソピン投与群で少ないこと、皮下の血管数がバトロキソピン投与群で多く認められた。バトロキソピンはNETs発現を抑制することによる微小血管保護作用を有す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

慢性皮膚創傷において局所の強い炎症後に皮膚壊死が生じる原因としてNETsの発現が関与していることが示唆された。このNETsによる微小循環障害をバトロキソピンを投与することにより抑制することができることを確認した。バトロキソピンが炎症時の微小循環障害に起因する皮膚組織障害に対し、新たな機序としての治療薬として効果が期待できることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：In chronic wounds, the expression of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) has been confirmed. The expression of NETs may be involved in microvascular damage and delayed wound healing. To investigate whether Batroxobin administration suppresses NETs expression, we utilized a rat skin flap ischemia-reperfusion injury model. We confirmed that Batroxobin administration improves the survival area of the skin flap tissue. Histological examination revealed that the expression of NETs was lower in the Batroxobin-administered group compared to the control group, and a higher number of vessels were observed in the subcutaneous tissue of the Batroxobin-administered group. Batroxobin may possess a microvascular protective effect by suppressing NETs expression.

研究分野：形成外科学

キーワード：NETs バトロキソピン 慢性創傷 再灌流障害 微小循環障害

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性創傷における Neutrophil extracellular traps (NETs) の発現

NETs とは好中球自身が DNA や、好中球顆粒内に存在する好中球エラスターゼなどの抗菌蛋白を細胞外に放出し、ネット状の構造を形成することで異物を補縛し、効率的に殺菌する免疫機構である¹⁾。また、血管内皮細胞に作用し微小血栓を形成し感染の拡大を防ぐ作用も有する。しかし、過剰な NETs 発現が動脈硬化の促進、DIC における血栓形成の要因、潰瘍性大腸炎や慢性関節リウマチといった慢性炎症の要因になっていることが明らかになり、NETs の抑制が治療につながる可能性が示唆されている²⁾。糖尿病性潰瘍や褥瘡などの難治性皮膚潰瘍では炎症期が停滞し炎症細胞浸潤による微小血管閉塞や過度な蛋白分解酵素による正常肉芽コラーゲンの破壊が起こり、組織壊死、治癒が遅延すると考えられている。慢性皮膚潰瘍における炎症期の遷延の原因として、局所の過剰な NETs 形成が関与している可能性が十分に考えられるが、その発現を詳細に検討した報告は見当たらない。

(2) バトロキシピンの NETs 抑制をターゲットにした創傷治療への応用

研究分担者の増田らはマウス下肢虚血モデルに対しバトロキシピンを腹腔内投与したところ、血栓形成抑制による血管保護作用、筋肉壊死の拡大抑制を認めたと報告した³⁾。バトロキシピンは作用機序としてフィブリンノーゲン活性を抑制することで抗凝固作用を有することが知られているが、別な作用として NETs 形成を抑制することを確認し報告した。この NETs 発現抑制作用によりバトロキシピンが創傷治療の新しい機序の薬剤となるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

(1) 慢性皮膚潰瘍において NETs 発現を観察し、NETs の発現があるのか検討すること

(2) 皮膚創傷において NETs の過剰発現が微小血管閉塞、創傷治癒遅延に関与しているならばバトロキシピンが効果を発揮する可能性がある。そこで、今回我々は炎症細胞浸潤が組織損傷の中心的役割と考えられる皮弁虚血再灌流障害ラットモデルを用いて、バトロキシピンが壊死範囲の抑制に寄与するか検証した。

3. 研究の方法

(1) 慢性皮膚潰瘍（糖尿病性潰瘍、虚血性潰瘍、褥瘡）の治療では、壊死組織や不活化組織を外科的に切除して創傷を清浄化（メンテナンスデブリードマン）するが、その際に得られた組織中の NETs 発現を検討した。NETs の発現はカルプロテクチン（S100A8）染色⁴⁾で観察した。

(2) ラット皮弁虚血再灌流障害モデルによるバトロキシピンの検討

ラットの左腹部に 4.5x3cm の浅腹壁動静脈を茎とする皮弁を挙上し、血管茎を 6 時間クランプした後に解除し虚血再灌流モデルとした。血管クランプ解除時にバトロキシピン 10BU/kg を腹腔内投与（1 回のみ）する群と、コントロール群として生理食塩水を腹腔内投与する群で検討した。皮弁血流の灌流範囲をレーザードプラーで確認、組織染色としてカルプロテクチン染色（NETs の発現）、CD31 染色（新生血管の確認）を観察した。

4. 研究成果

(1) 虚血性潰瘍、褥瘡の7部位について壊死部と健常部の境界から組織を採取し、カルプロテクチン(S100A8)染色を施行したところ、NETsの発現が認められた。特に肉眼的に発赤の強い部位にNETsが強く発現しており、METs発現が、その後の微小循環障害、壊死へ伸展する要因としての可能性が示唆された(図1)。

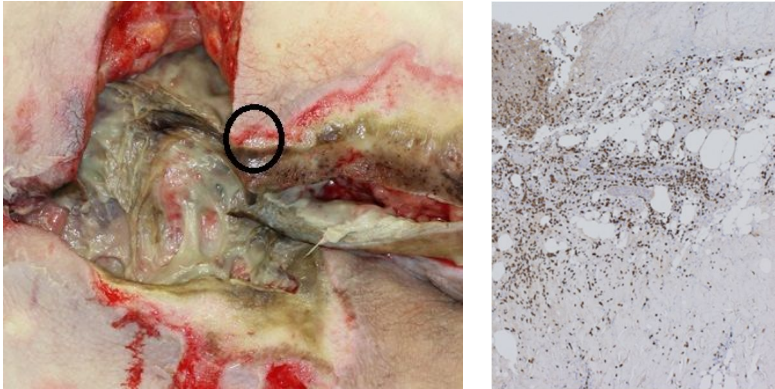


図1 左：仙骨部褥瘡 右：カルプロテクチン染色(×4) 壊死と健常部の境界発赤部にはNETsが強く発現

(2) ラット皮弁虚血再灌流障害モデルを用い、コントロール群(生食投与) バトロキシピン投与群を48時間と7日目で皮弁の血液灌流範囲をレーザードプラー血流イメージで確認した(図2 コントロール群、図3 バトロキシピン投与群)。皮弁内血液灌流領域の平均は48時間でコントロール群(n=10):31.2%、バトロキシピン投与群(n=10):59.0%、7日目でコントロール群(n=5):45.2%、バトロキシピン投与群(n=5):76.3%で48時間、7日目ともにコントロール群とバトロキシピン投与群で有意差(P<0.05)を認めた(図4)。

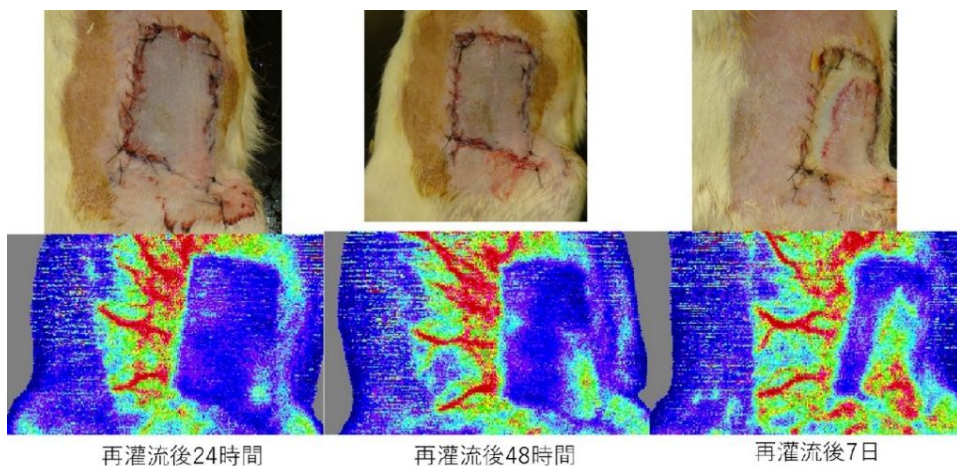


図2 コントロール群 上段：皮弁外観 下段：レーザードプラー血流イメージ
24時間では皮弁血流は認められない。48時間で血管茎部位の血流が一部再開、7日目では皮弁の1/2程度の血流が再開している。

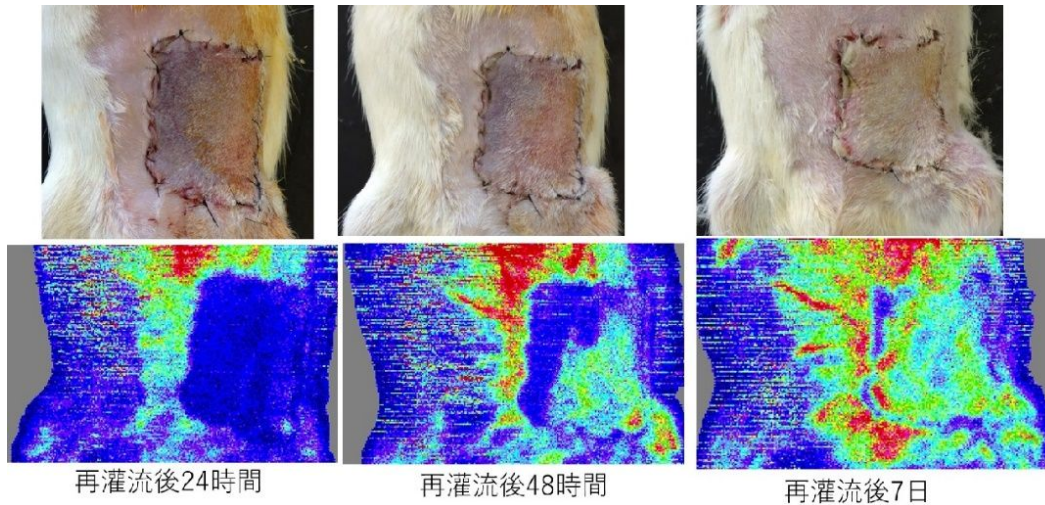


図3 バトロキソピン投与群 上段：皮弁外観 下段：レーザードプラー血流イメージ
24 時間では皮弁血流は認められない。48 時間で皮弁の 1 / 2 程度に血流が再開し、7 日目では皮弁の大部分の血流が再開している。

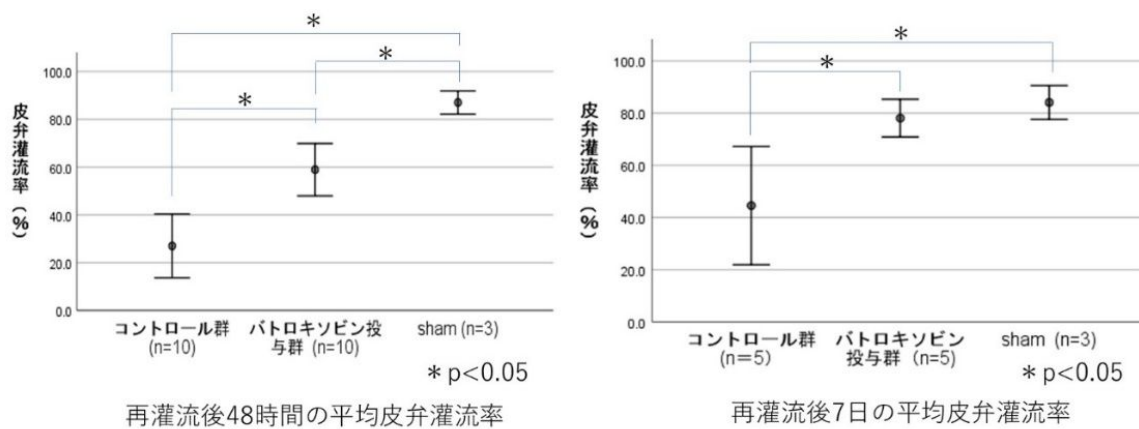


図4 皮弁内血液灌流量の平均値

48 時間でコントロール群、バトロキソピン投与群、sham 群で平均値に有意差を認める。
7 日目でコントロール群とバトロキソピン投与群、コントロール群と sham 群で有意差を認めるが、バトロキソピン投与群と sham 群で有意差を認めない。

再灌流後 48 時間で採取した組織中のカルプロテクチン染色において、バトロキソピン投与群ではコントロール群に比較して皮下のカルプロテクチン陽性細胞は少なく、NETs の発現が少ないことが認められた (図 5)。また、7 日目の組織では皮下の新生血管がバトロキソピンで明らかに多く認められる結果であった。

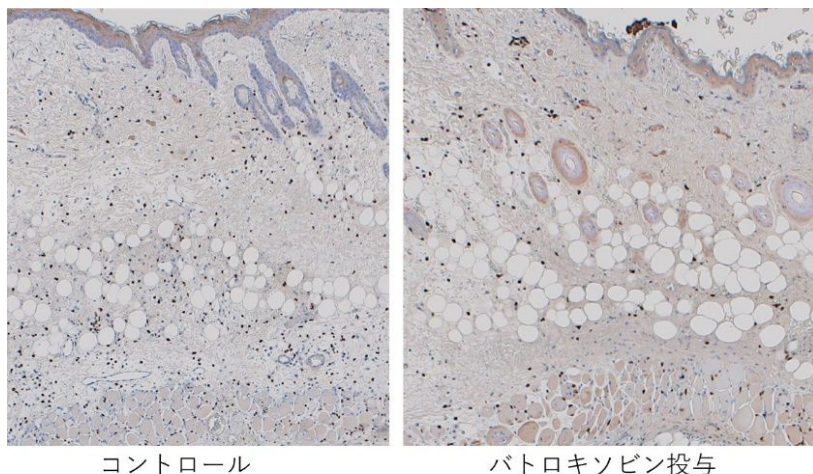


図5 再灌流後48時間のプロカルテクチン染色

コントロール群の皮下にカルプロテクチン染色陽性細胞が多く、皮下のNETs発現が強いことが確認できる

レーザードプラー血流イメージと組織学的検討から、バトロキシピンは虚血再灌流障害モデルにおいて皮弁血流保護作用があることが認められた。その機序として従来からのフィブリノーゲン活性抑制作用に加えて、NETs過剰発現を抑制することが確認された。

我々の検討において慢性皮膚潰瘍においてもNETsが過剰発現し微小血管閉塞が皮膚壊死、創傷治癒遅延に参与していることが示唆された。また虚血再灌流障害モデルにおいてバトロキシピンが血流保護作用を有することが確認された。

以上からバトロキシピンはNETsの過剰発現が組織損傷を引き起こす病態における新しい視点からの創傷の治療薬となる可能性が示唆された。

<引用文献>

- (1) Brinkmann V. et al, Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303, 2004
- (2) Warnatsch A. et al, Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science*, 349, 2015
- (3) Masuda H. et al, Batroxobin accelerated tissue repair via neutrophil extracellular trap regulation and defibrinogenation in a murine ischemic hindlimb model. *PLoS ONE*, 14(8), 2019
- (4) Evelien G.G. Spenkeler, et al, S100A8/A9 is a marker for the release of neutrophil extracellular traps and induces neutrophil activation. *Cells*, 236(11), 2022

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	増田 治史 (Masuda Haruchika) (50278496)	医療法人徳洲会湘南鎌倉総合病院(臨床研究センター)・湘南先端医学研究所 再生医療開発研究部・主席研究員 (92720)	

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