

令和 6 年 6 月 12 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：21K10598
研究課題名（和文）慢性創傷に対する「好中球細胞外トラップ」阻害によるユニバーサル創傷ケアの開発

研究課題名（英文）Development of Novel Universal Wound Care by Inhibition of "Neutrophil Extracellular Trap" for Chronic Wounds

研究代表者
丹野 寛大（Tanno, Hiromasa）

東北大学・医学系研究科・講師

研究者番号：10755664
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：慢性創傷は、バイオフィルム形成、血流障害などが複合的に関与し、難治化する。しかし、複数の原因に対し、同時にアプローチできるユニバーサル創傷ケアは存在しない。本研究では、既に突発性難聴や慢性閉塞症などの治療薬として用いられ、血流改善効果や血栓を形成する好中球細胞外トラップ阻害効果が確認されているデフィブラーゼが創傷治癒に与える影響を解明することにより、ユニバーサル創傷ケアの確立を目指した。急性創傷モデルと慢性創傷モデルを用いて、デフィブラーゼが創傷治癒に与える影響について解析し、創閉鎖率、再上皮化率、肉芽面積、血管新生の解析を行い、デフィブラーゼが創傷治癒を促進することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性創傷を有する患者は、本邦だけでなく、世界的に増加の一途をたどっている。特に糖尿病患者は増加しており、糖尿病性潰瘍の患者の増加も予想される。感染や血流障害などのより、慢性創傷のケアは難渋するが、本研究のより複数の難治化要因に同時にアプローチ可能なユニバーサル創傷ケアを開発することができれば、救済できる慢性創傷患者を増やすことが出来ると考える。

研究成果の概要（英文）：Chronic wounds are intractable due to the combined effects of biofilm formation and impaired blood flow. However, there is no universal wound care that can simultaneously approach multiple causes. In this study, we aimed to establish universal wound care by elucidating the effect of defibrase, which has already been shown to inhibit neutrophil extracellular trapping, on wound healing. Using acute and chronic wound models, we analyzed the effects of defibrase on wound healing and found that defibrase promotes wound healing by analyzing wound closure rate, re-epithelialization rate, granulation area, and angiogenesis.

研究分野：基礎看護学

キーワード：創傷治癒 血管新生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた本邦では、褥瘡や糖尿病性下腿潰瘍など慢性創傷を有する患者が急増している。慢性創傷は、細菌バイオフィルム、血流障害などが複合的に関与し、難治化する。近年、細菌バイオフィルム形成や血流障害に、好中球細胞外トラップ (NETs) の関与が報告されている。さらに、糖尿病性潰瘍患者では NETs 形成が増加することや動物モデルを用いた検証により、NETs 自体が創傷治癒を遅延させることも明らかとなってきた。そこで、本研究では NETs を阻害は、細菌バイオフィルム形成、血流障害の問題を同時に解消し、かつ治癒自体も促進する可能性を考えた。しかしながら、複数の原因を同時に解決できるケアは存在しない。難治化の原因によらず、全ての創傷を治す「ユニバーサル創傷ケア」の開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、急性創傷モデルマウスを用い、NETs 阻害薬デフィブラーゼ投与が創傷治癒に与える影響を明らかにすることを目的とし、創閉鎖率、再上皮化率、肉芽形成、血管新生、増殖因子産生に注目して解析を行い、新たな創傷ケア技術の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

実験は7-8週齢のオスのC57BL/6Jマウスを用いて行った。マウスは東北大学医学系研究科付属動物実験施設において、1週間以上SPF環境下で飼育し順化したマウスを使用した。食事や飲水は常時摂取可能とし、12時間ごとに明暗の切り替えを行い飼育した。本研究のすべての実験は、「国立大学法人東北大学動物実験に関する規定」に準じ、東北大学環境安全委員会動物実験専門委員会の承認を得た上で実施した。

(2) デフィブラーゼの調整と投与

デフィブラーゼは30バトロキソピンユニット (BU) /kgとなるように生理食塩水 (生食) で希釈し、マウス1匹当たり200 μ Lを腹腔内に投与した。対照群には生食200 μ Lを腹腔内に投与した。

(3) 創作成と皮膚組織の採取

マウスに麻酔を吸入させながら、以下のような手順で創作成を行った。背側の体毛を除毛し、皮膚を完全に露出させ、70%エタノールで消毒後、皮膚生検用6mmパンチとハサミを用いて、マウス一匹に4つの皮筋に達する全層欠損創を作成した。創作成後、ポリウレタンフィルムと弾性粘着包帯で創部を閉鎖環境においた。ポリウレタンフィルムおよび弾性包帯は、組織摘出時まで交換しなかった。皮膚組織はマウスを犠牲死させた後、創周囲1cm角を採取した。

(4) 病理学的解析

創周囲1cm角を摘出し、頭尾側方向に半切した後、4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋した。半切した面から厚さ3 μ mの切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施した。HE染色をした皮膚切片を用いて再上皮化率、肉芽形成を算出した。また、免疫染色により血管数も算出を行った。

(5) 増殖因子濃度測定

皮膚ホモジネート上清中のサイトカインとして、血管内皮増殖因子 (VEGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF)、表皮増殖因子 (EGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の濃度をELISAキットを用いて測定した。

(6) マウス皮膚内白血球分離

マウス1匹あたり4個の創を作成し、各タイムポイントに1cm角に創を摘出した。摘出した創を細切し、各種の酵素を加えたRPMI1640培養液に入れ、37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベーションした。2時間後、皮膚組織片を70 μ mのナイロンメッシュで濾過した後、遠心し、細胞ペレットを4mLの40% Percoll溶液に懸濁したものを、80% Percoll溶液4mLの上に重層した。遠心後、中間層を回収し、0.1%アジ化ナトリウム、1% FCS 添加 PBS で3回洗浄した。サンプル中の白血球数は血球計算盤にて計測した。

(7) フローサイトメトリー

皮膚から回収した白血球の Fc 受容体 (Fc R) をブロックする目的で、事前に 1%FCS・0.1% アジ化ナトリウム添加 PBS 中の細胞を抗 Fc R・Fc R モノクローナル抗体 (mAb) (clone 2.4G2) と氷上で 15 分間インキュベートした。その後、Pacific Blue 標識抗 CD45 抗体 (clone 30-F11)、APC 標識抗 CD11b 抗体 (clone-M1/70)、APC/Cy7 標識抗 Ly6G 抗体 (clone 1A8)、PE 標識抗 F4/80 抗体 (clone BM8)、FITC 標識抗 CD3 抗体 (clone 145-2C11)、FITC 標識抗 NK1.1 抗体 (clone PK136)、FITC 標識抗 T-cell receptor (TCR) 抗体 (clone GL3)、FITC 標識抗 CD45R/B220 抗体 (clone RA3-6B2)、7-AAD Viability staining Solution で染色した。対象として、アイソタイプを一致させた IgG にて染色した。7-AAD 陰性細胞を生細胞とし、死細胞除去後、CD45+ CD11b+ Ly6G+ 細胞を好中球、CD45+ CD11b+ F4/80+細胞をマクロファージ、CD3 + TCR + NK1.1+ B220+ 細胞をリンパ球として解析を行った。

(8) 創部コラーゲン発現

ISOGEN を用いて、摘出した創部組織から RNA を抽出し、逆転写反応を行い、cDNA を合成した。得られた cDNA をコラーゲン特異的プライマー (型コラーゲン、型コラーゲン) のプライマーと Sybr Green 液を混合し、Real-time PCR 法により解析を行った。

4. 研究成果

(1) NETs 阻害が急性創傷の治癒に与える影響

デフィブラーゼ投与による NETs 阻害が創傷治癒に与える影響を明らかにするため、生食またはデフィブラーゼを創作成日から摘出前日まで腹腔内に投与した。生食投与群と比較し、デフィブラーゼ投与群では創閉鎖率が有意に増加した。また、創閉鎖以外の治癒の指標として、肉芽面積、再上皮化率を解析した。フィブラーゼ投与により、再上皮化率は増加した。一方、肉芽面積に差はみられなかった。

(2) NETs 阻害が急性創傷の血管新生に与える影響

血管新生の指標として血管内皮細胞のマーカーである CD31 の免疫組織染色を施し、CD31 陽性血管をカウントした。CD31 陽性血管数は、生食投与群と比較して、デフィブラーゼ投与群で有意に増加した。

(3) NETs 阻害が急性創傷の増殖因子産生に与える影響

血管新生の促進因子である VEGF、PDGF、表皮細胞の遊走を促進する EGF、コラーゲン産生に関連する bFGF、TGF- β を ELISA 法にて測定した。デフィブラーゼ投与により、VEGF、PDGF、bFGF、EGF 産生が増加した。TGF- β 産生に差は認められなかった。

(4) NETs 阻害が急性創傷の創部白血球集積に与える影響

デフィブラーゼ投与による創部白血球集積への影響を明らかにするため、創作成後 3、5 日目の創部白血球を採取し、その分画を解析した。生食投与とデフィブラーゼ投与では、創作成後 3、5 日目の総白血球数、好中球数、マクロファージ数、リンパ球数に差はみられなかった。

(5) NETs 阻害がコラーゲン産生に与える影響

デフィブラーゼ投与によるコラーゲン産生への影響を明らかにするため、型コラーゲン (COL3A1)、型コラーゲン (COL1A1) mRNA 発現量をリアルタイム PCR にて解析した。創作成後 10 日目においてデフィブラーゼ投与群で COL1A1、COL3A1 mRNA の発現量が有意に増加した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanno Hiromasa, Kanno Emi, Kurosaka Shiho, Oikawa Yukari, Watanabe Takumi, Sato Ko, Kasamatsu Jun, Miyasaka Tomomitsu, Ishi Shinyo, Shoji Miki, Takagi Naoyuki, Imai Yoshimichi, Ishii Keiko, Tachi Masahiro, Kawakami Kazuyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Topical Administration of Heat-Killed Enterococcus faecalis Strain KH2 Promotes Re-Epithelialization and Granulation Tissue Formation during Skin Wound-Healing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 1520 ~ 1520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines9111520	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanno Hiromasa, Kanno Emi, Sato Suzuna, Asao Yu, Shimono Mizuki, Kurosaka Shiho, Oikawa Yukari, Ishi Shinyo, Shoji Miki, Sato Ko, Kasamatsu Jun, Miyasaka Tomomitsu, Yamamoto Hideki, Ishii Keiko, Imai Yoshimichi, Tachi Masahiro, Kawakami Kazuyoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Contribution of Invariant Natural Killer T Cells to the Clearance of Pseudomonas aeruginosa from Skin Wounds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3931 ~ 3931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22083931	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丹野寛大
2. 発表標題 現地特別企画「集まれ Young Researchers！」研究活動の共有・交流をはかろう
3. 学会等名 第42回日本看護科学学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新井山ももこ, 丹野寛大, 伊師森葉, 小番冠奈, 真壁風子, 川上和義, 菅野恵美
2. 発表標題 バトロキソピン投与による皮膚創傷治癒促進機構の解析
3. 学会等名 第52回日本創傷学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 才神利奈, 丹野寛大, 新井山ももこ, 黒坂志歩, 及川ゆかり, 黒澤佑太, 志済真優, 菅野恵美
2. 発表標題 ヘビ毒由来酵素パトロキソピンによる新規創傷ケア技術の検証
3. 学会等名 第41回日本看護科学学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新井山ももこ, 丹野寛大, 黒坂志歩, 及川ゆかり, 川上和義, 菅野恵美
2. 発表標題 Batroxobin投与が皮膚創傷治癒過程に与える影響の解析
3. 学会等名 第51回日本創傷学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 丹野寛大, 菅野 恵美	4. 発行年 2022年
2. 出版社 BIO Clinica	5. 総ページ数 4
3. 書名 創傷治癒への C 型レクチン受容体の関与	

1. 著者名 丹野寛大, 菅野恵美	4. 発行年 2022年
2. 出版社 メヂカルフレンド社	5. 総ページ数 7
3. 書名 Part2 急性期褥瘡の特徴. 松田友美編集, 看護技術 第1特集 急性期褥瘡のアセスメントとケア 慢性化・重症化を防ぐために	

〔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	高木 尚之 (Takagi Naoyuki) (30569471)	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