

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293295

研究課題名(和文) 光線力学効果に基づく感染制御と創傷治癒促進による新しい褥瘡治療

研究課題名(英文) Infection control based on photodynamic effect and new treatment for pressure ulcer by promoting wound healing

研究代表者

守本 祐司 (Morimoto, Yuji)

防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医学教育部医学科専門課程・准教授)

研究者番号：10449069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：PDTによる感染制御及び創傷治癒促進効果を用いた新しい褥瘡治療の開発研究を行った。

1. 皮下軟部組織の感染症モデルマウスを用いた検討：A) 治療効率の最大化をもたらすPDT条件を見出した。B) PDT後の好中球の動態イメージングに成功した。C) 好中球遊走・集積にかかわるシグナルを同定した。2. 皮膚欠損モデルに対してPDTによる肉芽形成・上皮化促進を引き起こすことに成功し、その効果を決定する条件を明らかにした。3. 免疫抑制剤であるCyclophosphamideを前投与した皮下軟部組織感染症モデルマウスを用いた実験も行い、PDTによって感染抑制する傾向を認めた。

研究成果の概要(英文)：Based on photodynamic therapy (PDT), we studied the Infection control and developed a new treatment for pressure ulcer by promoting wound healing.

1. Study using subcutaneous soft tissue infection model mice: A) PDT conditions inducing maximization of treatment efficiency were found. B) Visualization of neutrophil kinetics after PDT was succeeded. C) Signal transduction related to neutrophil migration / accumulation was clarified. 2. We succeeded in promoting granulation and epithelialization by PDT on the skin defect model mice and clarified the conditions for controlling its effect. 3. Experiments using subcutaneous soft tissue infection model mice pretreated with cyclophosphamide, an immunosuppressive agent, were also conducted, and PDT showed a tendency to suppress the infection.

研究分野：医工学

キーワード：光線力学療法 外科学 感染症 細菌 免疫学

1. 研究開始当初の背景

(1) 褥瘡治療の社会的必要性和申請者らの取り組み

褥瘡は、圧迫等の外力によって微小循環不全となった組織に壊死が起こり、組織欠損・皮膚潰瘍が生じたものであり、高齢化社会の到来に伴い患者数は増大している。国内では寝たきり患者が170万人(2010年推定)に達し、そのうち褥瘡を生じた患者は約30万人、医療費は約500億円に上ると推定されている(大浦武彦、日老医誌2004)。褥瘡では壊死による組織欠損とともに細菌感染が必発する。ゆえに褥瘡治療の基本は創の清浄化(デブリードマン、洗浄および消毒)であるが、治療に要する医療所要は大きい。また、血流の乏しい組織では細菌感染が治癒しにくく、細菌感染は創傷治癒を阻害するため、治療は長期化する傾向にある。特に糖尿病等の合併症保有者は生体防御能が低く、感染は重症化し組織再生能は低下して、治療に対し極めて抵抗性である。加えて近年のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)などに代表される薬剤耐性菌の出現が、褥瘡治療における大きな脅威となっている。

そこで申請者らは、光線力学効果に基づく感染制御効果及び創傷治癒促進効果を用いた新しい褥瘡治療を提案する。光線力学療法(PDT)は、光増感剤に光を照射した際に発生する一重項酸素(1O_2)を主体とする活性酸素を利用して、がんなどの増殖性細胞や病変を消滅・縮小させる治療法であるが、申請者らは最近、PDTが好中球を活性化し、細菌の貪食が促進されることで、深部の感染症治療にも有用であることを世界に先駆けて報告した(Morimoto, PloS ONE 2012)。さらに、PDTは創傷治癒を促進する効果を有することも報告されている(Silva, Lasers Surg Med (2004) 34:451)。

(2) 申請者らのこれまでの研究成果と本研究の着想

PDTの作用として一般的に知られているのは、光化学反応で生じた活性酸素による細胞死誘導であり、PDTによる抗腫瘍効果はこのメカニズムに由来する。細菌感染症に対するPDTも同様に、活性酸素による直接的な殺菌作用が主体であると考えられてきたが、これに対して申請者らは、この定説では説明できない新たなPDT効果を発見した。すなわち、生体における局所細菌感染症に対するPDTでは、直接殺菌作用はほとんど機能しないが、PDTによって好中球の感染局所への遊走・集積が活性化され、その貪食作用により感染が治癒するというメカニズムである(Morimoto, PloS ONE 2012)。その効果は比較的低い光照射強度で発揮されるので、皮膚などの表面のみならず、皮下組織や軟部組織等の生体深部においても治療が可能である。このPDTの感染制御に関する新しい考え方に基づき、申請

者らは褥瘡治療への適用を着想した。

さらにPDTは、細胞死誘導作用、殺菌作用等の定説の効果以外にも、創傷治癒促進(Sahu, Lasers Med Sci 2012)や免疫賦活(Nseyo, Urology 1990)などの効果を有することが報告されている。褥瘡治療においては感染を制御できなければ創傷治癒は見込めないが、PDTは薬剤耐性菌を含む様々な細菌による感染を制御でき、かつ肉芽形成と上皮化を促して、創傷治癒過程を促進できる可能性が高い。

以上のように本研究では、一つの治療モダリティで二つの効果を狙う。いままでに、このような観点からPDTを捉えた研究開発はなく、きわめて独創的である。また、PDTによる感染制御と創傷治癒促進の戦略を明確に設定し、かつ広く臨床応用を可能とすることを目指した本申請課題は、褥瘡治療の新たな道を拓くものであると確信する。

2. 研究の目的

PDTによる感染制御及び創傷治癒促進効果を用いた新しい褥瘡治療を開発する。

3. 研究の方法

褥瘡の治療に結びつく感染制御効果および創傷治癒促進効果につきそれぞれの動物モデルを用いて、治療に最適なPDT条件を探るとともに、PDTによる治療メカニズムを明らかにする。

I. 皮下軟部組織の感染症モデルにおけるPDTの検討

A) 治療効率の最大化

申請者らは先行研究によって、生物学的発光を有するルシフェラーゼ発現メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(以下Lux-MRSA)とマイクロビーズを用いたバイオフィーム形成性の難治性膝関節炎を誘導させたマウスモデルを確立しており、さらに同一個体におけるLux-MRSA数を非侵襲的かつ経時的に追跡できる生体イメージングシステムを構築している(Morimoto, Expert Rev Clin Immunol 2012)。この実験系を基に最近、Lux-MRSAによる皮下軟部組織感染モデルも確立することができた(unpublished)。そこで本研究では、光増感剤の局所投与(局注、塗布)を基本としたPDTによる感染抑制効果を検証する。申請者らの以前の検討(Morimoto, Photochem Photobiol 2012)より、光増感剤としてメチレンブルー(MB)やトルイジンブルー(TBO)が、生体防御能に与える悪影響低減の観点より適していることを明らかにしているため、これらの光増感剤を先行検証して、治療効果を最大化させるための条件(光増感剤の種類、光増感剤濃度、光照射エネルギー、光増感剤投与後照射までの時間、光照射時間など)を見出していく。

B) 好中球遊走・集積にかかわるシグナルの同定・定量

申請者らはこれまでに、細菌感染に対する

PDT によって、いくつかの好中球走化因子 (MIP-2 など) が誘導されることを明らかにしてきた (Morimoto, PLoS ONE 2012, Lasers Surg Med 2011)。本研究では、セルカルチャーインサートを用いてマクロファージと線維芽細胞の共培養を行い、PDT によって誘導されるサイトカインを Real-time PCR、ウェスタンブロット等で同定・定量する。

II . 皮膚欠損モデルにおける PDT の検討

皮膚欠損マウスモデル(Kinoshita, Plast Reconstr Surg 2013)を用いて、PDT による肉芽形成・上皮化促進効果を検証する。申請者らは、光増感剤としてアミノレブリン酸を用いた PDT の予備検討において、皮膚欠損の修復が促進されることを確認している (unpublished)。そこで本研究では、組織修復を促進させるメカニズムを、新生血管増生の観点から経時的に解析する。

III . 均質照射光照射デバイスの開発

平面上に広がりのある褥瘡への PDT で確実な治療効果を得るためには、治療部位への均質な光照射を行う必要がある。申請者らはすでに、10×11cm の面に 156 個の LED を配置させ、一定の照射密度 (単位面積当たりの光強度) で均質な面照射ができる (光強度ムラ ±5%以内) プロトタイプ照射用デバイスを試作した。本開発では、個々の LED の出力を個別制御できるようにして、治療 (褥瘡) 部位の凹凸に起因する光強度ムラを補正できるフィードバックシステムを組み込んだ、次世代型の均質照射システムを確立する。光強度ムラは治療部位の温度変化として検知できるので、赤外線サーモグラフィを用いて温度分布をリアルタイムにフィードバックすることで、このシステムを構築する。

4 . 研究成果

特許申請予定につき後日提出予定

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 12 件)

1. Yamada K, Sato D, Nakamura T, Amano H, Morimoto Y (2017) Unknown biological effects of l-glucose, ALA, and PUFA. The Journal of Physiological Sciences: 1-10
2. Masuda J, Takayama E, Strober W, Satoh A, Morimoto Y, Honjo Y, Ichinohe T, Tokuno S-I, Ishizuka T, Nakata T (2017) Tumor growth limited to subcutaneous site vs tumor growth in pulmonary site exhibit differential effects on systemic immunities. Oncology reports:
3. Nomoto T, Fukushima S, Kumagai M, Miyazaki K, Inoue A, Mi P, Maeda Y, Toh K,

Matsumoto Y, Morimoto Y, Kishimura A, Nishiyama N, Kataoka K (2016) Calcium phosphate-based organic-inorganic hybrid nanocarriers with pH-responsive on/off switch for photodynamic therapy. Biomater Sci 4: 826-838

4. Nakashima H, Nakashima M, Kinoshita M, Ikarashi M, Miyazaki H, Hanaka H, Imaki J, Seki S (2016) Activation and increase of radio-sensitive CD11b+ recruited Kupffer cells/macrophages in diet-induced steatohepatitis in FGF5 deficient mice. Scientific Reports 6:
5. Mi P, Kokuryo D, Cabral H, Wu H, Terada Y, Saga T, Aoki I, Nishiyama N, Kataoka K (2016) A pH-activatable nanoparticle with signal-amplification capabilities for non-invasive imaging of tumour malignancy. Nature nanotechnology:
6. Ono K, Fujimoto N, Akiyama M, Satoh T, Tajima S (2016) Accumulation of C-reactive protein in basal keratinocytes of normal skins. J Dermatol Sci 83: 26-33
7. Zulaziz N, Azhim A, Himeno N, Tanaka M, Satoh Y, Kinoshita M, Miyazaki H, Saitoh D, Shinomiya N, Morimoto Y (2015) Photodynamic therapy mediates innate immune responses via fibroblast-macrophage interactions. Hum Cell 28: 159-166
8. Tsujimoto H, Morimoto Y, Takahata R, Nomura S, Yoshida K, Hiraki S, Horiguchi H, Miyazaki H, Ono S, Saito D, Hara I, Ozeki E, Yamamoto J, Hase K (2015) Theranostic Photosensitive Nanoparticles for Lymph Node Metastasis of Gastric Cancer. Ann Surg Oncol 22 Suppl 3: 923-928
9. 十河基文, 守本祐司 (2015) "光殺菌治療"って何だ?. デンタルダイヤモンド
10. 田中優砂光, 守本祐司, 木下学, Hamblin MR (2015) 光線力学療法 (PDT) による生体防御能の活性化と抗生物質併用の影響～臨床応用に向けて～. 光アライアンス 3月号:
11. 守本祐司, 辻本広紀, 小関英一 (2015) 光を使ったがんの診断・治療. O plus E 37: 360-363
12. Tsujimoto H, Morimoto Y, Takahata R, Nomura S, Yoshida K, Horiguchi H, Hiraki S, Ono S, Miyazaki H, Saito D, Hara I, Ozeki E, Yamamoto J, Hase K (2014) Photodynamic therapy using nanoparticle loaded with indocyanine green for experimental peritoneal dissemination of gastric cancer. Cancer science 105: 1626-1630

[学会発表](計 24 件)

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

守本 祐司 (MORIMOTO, Yuji)
防衛医科大学校・その他の部局等・准教授
研究者番号：10449069

(2)研究分担者

木下 学 (KINOSHITA, Manabu)
防衛医科大学校・その他の部局等・准教授
研究者番号：70531391

(3)研究分担者

佐藤 貴浩 (SATO, Takahiro)
防衛医科大学校・その他の部局等・教授
研究者番号：30235361

(3)研究分担者

青木 伊知男 (AOKI, Ichio)
放射線医学総合研究所・分子イメージング
研究センター・チームリーダー
研究者番号：10319519