

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890064

研究課題名（和文） 新たな創傷感染発症機序の解明に基づくリアルタイムアセスメント指標とケア方法の開発

研究課題名（英文） Development of real-time assessment technology and care methodology based on wound infection pathogenesis

研究代表者

仲上 豪二郎 (NAKAGAMI GOJIRO)

東京大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：70547827

研究成果の概要（和文）：

褥瘡における細菌感染の病態メカニズムは十分明らかになっていない。本研究では、緑膿菌のクオラムセンシングシグナルであるアシル化ホモセリンラクトン（AHL）に着目し、感染における役割を検討した。その結果、AHLにより創部に炎症が誘導されていることが明らかになった。また、ラット線維芽細胞株において AP-1/MAPK シグナリングを介して、Matrix Metalloproteinase (MMP) の発現が制御されている可能性が示された。以上より、AHLによる肉芽組織での炎症誘導に MMP 発現上昇が関与している可能性が新たに示唆され、創傷感染メカニズムの解明の一助となりえた。

研究成果の概要（英文）：

It is still unclear that how bacteria invade the wound and cause wound infection. In the present study, the researcher focused on quorum sensing signal molecule, acylated homoserine lactone (AHL) as a key target for wound infection pathogenesis. By applying the AHL to the granulation tissue of full-thickness wound in rats, marked inflammatory reaction was observed. The specific up-regulation of matrix metalloproteinase (MMP) consisting of AP-1 on their promoter region was observed in AHL treated fibroblastic cell lines. The researcher further revealed that AP-1/MAPK signaling was considered to be involved in AHL induced MMP up-regulation. These results indicated the new insights for understanding the mechanism of wound infection through quorum sensing signaling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：地域・老年看護学

キーワード：クオラムセンシング、褥瘡、感染、遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

急速な高齢化により皮膚創傷を有する高齢者の数が急増している。特に、褥瘡など日常生活に起因する創傷の場合、便・尿汚染な

どにより創傷感染を起こすリスクが高く、生活を支援する看護師がその管理の多くを担う。しかしながら、高齢者は典型的な臨床徴候が出ずに発見が遅れ、適切なケアを早期に

提供出来ないために、創傷治癒遅延や敗血症などの致死性合併症の発生、入院期間の延長など重大な問題を惹き起こしており、これが看護師のジレンマとなってきていた。その原因として、創傷感染のアセスメント方法が臨床経験に基づく主観的なものであり、客観的な指標が不足していることが挙げられる。従来からの創傷細菌感染のアセスメントは宿主の炎症反応の同定ならびに細菌数によって行われ、また、治療は細菌数を減らすことに注力されてきた。しかしながら、これらは、創傷感染は単に細菌の量的優勢に起因しているという発症機序の理解によるものであり、褥瘡のように、常に細菌汚染を受けており細菌数の定量が意義をなさない創傷では有効ではない。つまり、創傷感染においては細菌の量的優劣以外の因子が発症に関連していることが考えられる。したがって、創傷感染の問題を解決するためには、その発症機序を明確にする基礎研究が必須である。

本研究では、病原性細菌が有する遺伝子発現機構であるクオラムセンシングに着目する。クオラムセンシングとは、オートインデューサー(autoinducer, AI)を用いて細菌間で情報伝達を行い、AIが一定の濃度(Quorum: 定足数)に達すると病原性を発揮する細菌の遺伝子発現機構である。既に、創傷感染にクオラムセンシングが重要であることを動物実験によって示してきた。その結果、興味深いことに、単なる細菌間シグナル物質であるはずのAI自体が創傷治癒に影響を与えているという結果が得られたため、創傷感染発症には宿主免疫反応へのAIの直接的影響が関与しているのではないかという仮説に至った。AIは緑膿菌などの病原性細菌の遺伝子発現機構であるクオラムセンシングに必須の細菌間情報伝達物質である(右図)。これまで、細菌病原性因子のみが宿主へ傷害を及ぼすと考えられてきたが、近年、様々な哺乳類細胞に対して影響を与えることが知られており、AI自体が感染現象に重要な役割を持つことが示唆されつつある。特に免疫担当細胞や線維芽細胞、上皮細胞などに作用し、炎症性サイトカイン合成や細胞増殖、細胞間接着など、創傷感染に直接関連する遺伝子発現に影響を与えることが報告されている。つまり、AI自体による宿主の遺伝子発現調節が創傷感染の重要な一部を担っている可能性が強く示唆される。しかしながら、これらの報告は、何れもin vitroにおける限られた状況であり、創傷感染におけるAI独自の影響を解析することは、新たな創傷感染発症機序の解明につながり、ひいてはより効果的な創傷感染同定法およびケア法の確立につながることを期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、クオラムセンシング機構による創傷細菌感染発症メカニズムを明らかにし、客観的アセスメント技術の開発の基礎的知見を得ることを目的とする。

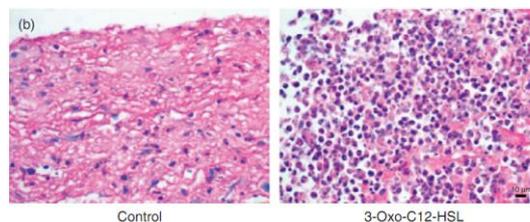
## 3. 研究の方法

緑膿菌の遺伝子発現制御機構であるクオラムセンシングに利用されているシグナル分子であるアシル化ホモセリンラクトン(AHL)に着目し、この物質の創傷治癒過程における生理活性について検討を行った。ラット全層皮膚創傷を作成して、5日間閉鎖状態を保って肉芽を増生させたのち、AHLを創表面へ添加した。その際の創傷治癒への影響を検討した。

また、ラット線維芽細胞株(Rat-1)に対して、緑膿菌AHLを作用させ、蛋白分解酵素である各種MMPの遺伝子発現をreal-time RT-PCRにて経時的に解析した。また、その作用メカニズムを検討するため種々シグナル伝達経路を検討した。

## 4. 研究成果

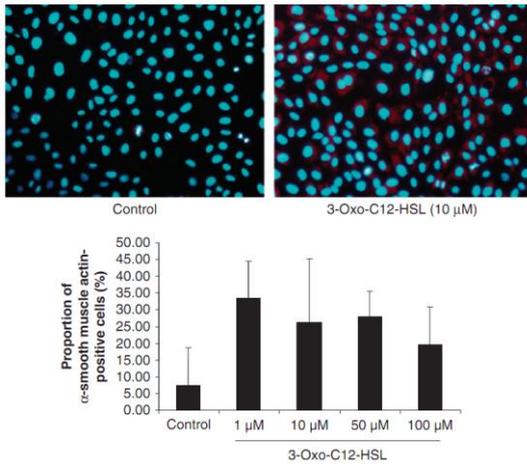
添加後24時間でAHL投与群において線維芽細胞の有意な発現増加を認め、それ以降の創収縮速度が促進した。また、炎症性細胞の浸潤も促進されていた。



図：肉芽へのAHL投与は炎症性細胞浸潤を引き起こす

その現象を詳細に検討するため、ラット皮膚線維芽細胞株(Rat-1)を用いてin vitroで検討したところ、alpha-smooth muscle actin陽性細胞数の上昇を認めた。また、同時に線維芽細胞からのCox-2の発現上昇も認められ、線維芽細胞からの炎症メディエターの産生並びに線維芽細胞への分化が創傷治癒に影響していることが示唆された。これらから、緑膿菌がシグナル分子として使用している物質自身が宿主の創傷治癒に影響を与え、それが感染現象の一側面を構成していることが示唆された。

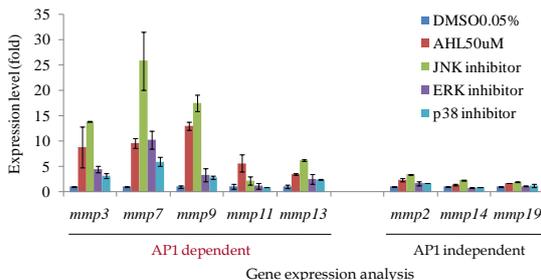
そこで、炎症に重要な役割を果たすMMPに焦点を絞り、さらに解析を進めた。MMP遺伝子発現の解析の結果、MMP3、7、9、11、13において著明に発現が増加していた。また、そ



図：緑膿菌 AHL による線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化誘導（赤色が  $\alpha$ -smooth muscle actin）

これらの発現制御に共通に関わるプロモーターに着目し解析を行ったところ、AP-1 サブユニットである c-fos および c-jun において発現が上昇しており、AHL による MMP 発現上昇作用メカニズムであることが示唆された。さらに、AP-1 の上流である各種 MAPK の関与を検討したところ、ERK および p38MAPK を介して MMP の発現を上昇させている可能性が示された。以上から、AHL による宿主 MMP 発現の上昇が創傷感染の本体の一部を担っている可能性が示され、新たな感染症発症メカニズムの解明につながった。

図：AHL 投与による MMP 発現上昇および各種阻害剤による発現抑制



## 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 3 件）

1. Nakagami G, Minematsu T, Asada M, Nagase T, Akase T, Huang L, Morohoshi T, Ikeda T, Ohta Y, Sanada H. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone can accelerate cutaneous

wound healing through myofibroblast differentiation in rats. FEMS Immunol Med Microbiol. 2011(掲載確定 (印刷中)) 査読有

2. Nakagami G, Morohoshi T, Ikeda T, Ohta Y, Sagara H, Huang L, Nagase T, Sugama J, Sanada H. Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in pressure ulcer infection in rats. Wound Repair Regen. 2011;19(2):214-222. 査読有
3. Ueda K, Akase T, Nakagami G, Nagase T, Minematsu T, Huang L, Sagara H, Ohta Y, Sanada H. A possible animal model for critical colonisation. J Wound Care. 2010;19(7):295-300. 査読有

〔学会発表〕（計 6 件）

1. 仲上豪二郎, 峰松健夫, 浅田真弓, 長瀬敬, 黄麗娟, 赤瀬智子, 真田弘美. 緑膿菌クオラムセンシングシグナルによる MMP 発現制御機構の解明. 第 40 回日本創傷治癒学会 プログラム・抄録集. 2010:64. (第 40 回日本創傷治癒学会学術集会, 東京都市センターホテル (東京都), 2010 年 12 月 2 日)
2. 仲上豪二郎. 看護学研究のイノベーション—新しいトランスレーショナルリサーチの形. 日本看護技術学会第 9 回学術集会講演抄録集. 2010:51. (日本看護技術学会第 9 回学術集会, 愛知県産業労働センター (愛知県), 2010 年 10 月 23 日)
3. 仲上豪二郎. 創感染・クリティカルコロナイゼーションの非侵襲的アセスメント. 日本褥瘡学会誌. 2010;12(3):298. (第 12 回日本褥瘡学会学術集会, 幕張メッセ (千葉県), 2010 年 8 月 20 日)
4. 仲上豪二郎, 浅田真弓, 峰松健夫, 諸星知広, 池田幸, 大田泰徳, 真田弘美. 緑膿菌クオラムセンシングシグナルが皮膚創傷治癒に与える影響. 日本褥瘡学会誌. 2010;12(3):414. (第 12 回日本褥瘡学会学術集会, 幕張メッセ (千葉県), 2010 年 8 月 20 日)
5. 仲上豪二郎, 峰松健夫, 浅田真弓, 黄麗娟, 赤瀬智子, 長瀬敬, 真田弘美. 緑膿菌クオラムセンシングシグナルによる創傷部における炎症の誘導. 第 39 回日本創傷治癒学会 プログラム・抄録集. 2009:67. (第 39 回日本創傷治癒学会学術集会, 東京都市センターホテル (東京都), 2009 年 12 月 8 日)

6. 仲上豪二朗，諸星知広，池田宰，相良洋，大田泰徳，長瀬敬，峰松健夫，黄麗娟，須釜淳子，真田弘美. 褥瘡部における緑膿菌のバイオフィルム形成能と細菌運動性との関連. 日本褥瘡学会誌. 2009;11(3):351. (第11回日本褥瘡学会学術集会, 大阪国際会議場(大阪府), 2009年9月4日)

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: Acylhomoserine lactoneを用いた創傷治癒促進技術

発明者: 真田弘美、仲上豪二朗、峰松健夫

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2010-165523

出願年月日: 2010年7月23日

国内外の別: 国内

[その他]

<http://www.rounenkango.m.u-tokyo.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

仲上 豪二朗 (NAKAGAMI GOJIRO)

東京大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 70547827

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし