

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791062

研究課題名（和文） 皮膚虚血再灌流傷害マウスモデルを用いた褥瘡予防療法の検討

研究課題名（英文） Anti-TNF- α antibody attenuates cutaneous ischemia-reperfusion injury in a mouse model of pressure ulcer

研究代表者

齋藤 佑希 (SAITO YUKI)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：90547168

研究成果の概要（和文）：皮膚虚血再灌流傷害の軽減には、炎症細胞浸潤に重要な接着分子の抑制より、抗 TNF- α 抗体によってマクロファージの iNOS 発現を抑制し、且つ TNF- α 自体による細胞傷害を抑制する方が効果的であった。そしてその投与方法は局所投与が効率的であり、また iNOS を阻害する 1400W と組み合わせることで傷害軽減効果を増強させることができた。従って、抗 TNF- α 抗体および 1400W によって褥瘡が予防できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In a mouse model of cutaneous ischemia-reperfusion injury, local administration of anti-TNF- α antibody and 1400W inhibited expression of inducible nitric oxide synthase and cytotoxicity of TNF- α . From that reason, I suggest that anti-TNF- α antibody treatment might prevent the pressure ulcers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：虚血再灌流、褥瘡、TNF- α 、iNOS、接着分子

1. 研究開始当初の背景

医療や生活水準の向上により寿命は延び、健康な高齢者も増えた反面、新たな問題も浮上してきており、その中で褥瘡は大きな問題の一つと言える。褥瘡が病院や介護施設などで生じた場合、その処置や管理にマンパワー

が裂かれ、入院は長期化し医療費の増加は免れない。自宅に於いても、処置や管理が不十分とあれば創部からの細菌感染により重症・重体化となるケースは稀ではなく、介護者の精神的・身体的負担は計り知れない。また、高齢化が加速度的に進む日本においては、

今後も褥瘡リスクが高い患者の増加が予想され、褥瘡の克服は喫緊の課題である。そして褥瘡を克服し得る褥瘡予防療法の開発は、褥瘡のみならず、介護および医療費問題の解決策の一つに成り得ると考える。

褥瘡は寝たきり高齢者だけに生じるわけではない。術中・術後の長時間臥床や、装具等の装着面にも容易に発生し得る。褥瘡は、局所の阻血や剪断力などの直接的因子と、患者の栄養状態や組織環境、皮膚の温度などの間接的因子から成る多因子疾患であり、最近では虚血再灌流傷害も褥瘡の形成に関与していると考えられてきている (*Wound Repair Regen.* 8: 68-76, 2000)。

虚血再灌流傷害とは、虚血状態に陥った組織に血液が再灌流すると、細胞傷害因子であるフリーラジカルなどが発生し、病変が増悪するという概念である。Nitric oxide (NO) はフリーラジカル一つであり、nitric oxide synthase (NOS)によって産生される。NOSはいくつか存在するが、中でも inducible NOS (iNOS)は tumor necrosis factor(TNF)- α によってマクロファージから大量に誘導され、また iNOSは他のNOSより多量のNOを産生する (*Cell.* 78: 915-918, 1994)。脳梗塞や心筋の虚血後の再灌流、腎移植時の血流開始などでは虚血再灌流傷害にNOが関与しているとされているが (*J Am Soc Nephrol.* 14: 2503-2515, 2003) (*Circ J.* 70: 342-351, 2006)、皮膚病変では虚血再灌流傷害の確立されたモデルがほとんどなかったため、皮膚における虚血再灌流傷害についてはあまり検討されていなかった。そこで我々は、Stadlerら (*J Invest Surg.* 17: 221-227, 2004)を参考に、非侵襲的な方法で虚血再灌流傷害マウスモデルを作成し、皮膚の虚血再灌流傷害におけるマクロファージなどの炎症細胞の遊走・浸潤や、炎症性サイトカイン

や iNOS の関与、および虚血再灌流が皮膚傷害を起こす機序について検討した (※: *J Invest Dermatol.* 128:1838-5, 2008)。その結果、皮膚においても虚血再灌流傷害が確認され、褥瘡の増悪因子となり得ることが示された。その機序として、monocyte chemoattractant protein (MCP)-1によって誘導されたマクロファージとそれに伴って産生された TNF- α を主体とした炎症性サイトカインによって、マクロファージからの iNOS の発現が亢進し、NOが多量に産生されて、皮膚の虚血再灌流傷害が生じることが考えられた。従って、マクロファージの浸潤や TNF- α 、iNOS の産生を抑制することで、褥瘡などの虚血再灌流傷害が関与する皮膚傷害を軽減できることが示唆された。

この結果は極めて重要である。MCP-1 欠損マウスに外科的に潰瘍を形成すると治癒が遷延することが知られている (*Am J Pathol.* 159: 457-463, 2001) にもかかわらず、虚血再灌流の場合においては MCP-1 の存在が組織傷害に働くからである。つまり、完全な潰瘍を形成した状態ではなく、潰瘍が形成される前の褥瘡発症初期段階、すなわち皮膚虚血再灌流傷害においては、炎症細胞浸潤→TNF- α →iNOS→NO の過程を何らかの形で阻害することにより、その後の褥瘡の進展を抑制できる可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、(1)マクロファージ等の炎症細胞の浸潤、(2) iNOS 発現のトリガーである TNF- α 、(3)虚血再灌流傷害の主な細胞傷害因子である NO を産生する iNOS、の3点に着目し、皮膚虚血再灌流傷害の機序を更に詳細に解明する。更に、注射や塗布などの局所投与方法を検討し、最終的には、効果的な褥瘡予防療法の開発・臨床応用について検討し、褥瘡の克服を目指す。

3. 研究の方法

皮膚虚血再灌流傷害マウスモデル (※) をもとに、野生型マウスと接着分子欠損マウスを用いて比較検討する。皮膚損傷の程度を肉眼的および組織学的に経時的に観察し、傷害皮膚に発現するサイトカイン、ケモカイン、iNOS などの虚血再灌流傷害に関与する物質については、real-time PCR や enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて経時的に測定・解析する。続いて、遺伝子欠損マウスの結果から主要と考えられる接着分子に対する中和抗体を全身投与して、その効果を検討する。また、モデルマウスに抗 TNF- α 抗体や 1400W を全身投与して同様の検討を行い、虚血再灌流傷害の程度とその機序について検討する。さらに、これらの治療を局所投与でも検討し、その効果と安全性について同様に検討を行う。

4. 研究成果

接着分子ノックアウトマウス (ICAM-1^{-/-}、L-selectin^{-/-}、E-selectin^{-/-}、P-selectin^{-/-}) を用いた皮膚虚血再灌流傷害マウスモデルを作成し、その傷害の程度について検討した。またその前段階として、野生型マウスの虚血再灌流傷害における接着分子の発現について検討した。その結果、野生型マウスにおいて4種の接着分子はいずれも傷害時に発現がみられ、特に ICAM-1 と P-selectin が上昇していた。発現量は ICAM-1 と L-selectin は day1 から day3 まで漸増しており、P-selectin と E-selectin は day1 に高発現していた。接着分子ノックアウトマウスでは、治癒までの時間は野生型と同程度であり、傷害の程度は軽減されなかった。組織学的には、野生型と比べ day1 での浸潤細胞数は好中球、マクロファージ共に減少していたが、その後漸増し、day3 には野生型と同程度まで増加していた。

さらに、TNF- α と iNOS の発現量も day1 は少ないものの、day3 には同程度まで上昇していた。以上から、いずれの接着分子も皮膚虚血再灌流傷害の細胞浸潤において関与しているものの、1種のみ阻害では十分な治癒軽減効果はなく、複数の接着分子を阻害する必要があることが示唆された。そこで、ICAM-1 および L-selectin をノックアウトしたマウス (L/I^{-/-}) を用い、皮膚虚血再灌流傷害を検討した。その結果、L/I^{-/-} では皮膚傷害の軽減が期待されたが、野生型マウスよりわずかに軽減した程度であり有意なものではなかった。従って、皮膚虚血再灌流傷害における炎症細胞浸潤は、複数の接着分子が段階的に作用するのではなく、その作用を補完しながら細胞を浸潤させている。効果を高めるためには複数の接着分子を同時に抑制する必要があり、その場合細胞浸潤が強く抑制され、むしろ治癒が遷延するため、臨床応用は困難と考えられた。

続いて、抗 TNF- α 抗体および 1400W を用いて同様の検討を行った。抗 TNF- α 抗体および 1400W は全身投与において野生型マウスと比較し有意にその傷害を軽減させた。その軽減量は抗 TNF- α 抗体が大きく、傷害部位に局所投与した場合はより軽減効果が高かった。抗 TNF- α 抗体を投与されたマウスの傷害皮膚を検討したところ、炎症細胞浸潤は野生型マウスと同程度であったが、発現した炎症性ケモカインや iNOS は有意に低下していた。特に iNOS は day3 においては感度以下となり、ほぼ完全に抑制されていた。更に抗 TNF- α 抗体および 1400W の同時投与では、1400W 単独投与に比べ、形成された潰瘍面積は小さく、治癒までの期間は短縮されており、より有意な傷害軽減効果が確認された。従って、抗 TNF- α 抗体の投与により、マクロファージからの iNOS 産生が抑制されただけでなく、TNF-

α 自体にも細胞傷害活性があり、TNF- α 自体による細胞傷害をも抑制し得たと考えられた。また局所投与は皮内注射により行ったが、皮膚障害や全身症状は認められず、安全性も高いことが示唆された。

以上の結果から、抗 TNF- α 抗体が効果的に皮膚虚血再灌流傷害を軽減でき、その投与方法は局所投与が効率的であり、また 1400W と組み合わせることで傷害軽減効果を増強することが可能であるとわかった。この成果は今後の褥瘡予防療法の確率に意義のあるものであり、抗 TNF- α 抗体および 1400W によって褥瘡が予防できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 佑希 (SAITO YUKI)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：90547168

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし