

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792692

研究課題名（和文） 創傷感染メカニズムの解明による新たな看護ケア方法の確立

研究課題名（英文） Development of wound care management of wound infection 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）：

本研究は高齢者で特に問題となる褥瘡の感染を適切に予防・管理する新しい方策を構築することを目的に、褥瘡感染発症メカニズム解明のための基礎的検討を行った。緑膿菌のクオラムセンシングシグナルであるアシルホモセリンラク톤を線維芽細胞に曝露させた際の細胞応答を検証したところ、Matrix metalloproteinase (*Mmp-9*) の遺伝子発現が上昇していることが明らかとなった。特にこれらは AP-1/ERK/p38 シグナリングパスウェイによって制御されていることを直接的に証明した。また、AHL により特異的に上昇する遺伝子群を DNA マイクロアレイ解析にて特定した。本研究により、創傷感染のメカニズムに、AHL による線維芽細胞の *Mmp-9* 発現誘導が関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

This study aimed to establish an appropriate strategy for prevention and control of pressure ulcer infection, an unsolved problem among elderly population. For exploring mechanism responsible for pressure ulcer infection, we targeted *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing system. We demonstrated the increased expression of matrix metalloproteinase (*Mmp-9*) gene, which acts as an inflammatory cytokine and proteinase, in fibroblasts exposed to 3-oxo-dodecanoyl homoserine lactone (AHL). This induction was occurred via AP-1/ERK/p38 signaling pathway. For further exploring mechanism above this pathway, we assessed the gene expression changes by DNA microarray using fibroblast exposed to 10 μ M of AHL, which is determined to be detrimental concentration for fibroblast response to AHL. This study suggested the contribution of AHL on the inflammation and tissue destruction by *P. aeruginosa* during wound healing process through the specific signaling pathway to fibroblast by inducing *Mmp-9* gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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、シグナル伝達、褥瘡、感染

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ため、その予防が最も重要であることは言うまでもない。創傷が発生した場合、特に、褥瘡など日常生活に起

因する創傷では、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ないために適切なアセスメント指標がないのが問題

となっている。さらに、感染制御のための看護技術は、創周囲の洗浄などで一定の成果は上がってきているものの、消毒や抗生剤の使用などは旧来より大きな進歩を見せておらず、結果として、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いる。

これらの問題の原因は、慢性創傷における創傷感染のメカニズムが十分解明されてこなかったことにある。細菌感染は宿主免疫力和細菌病原性のバランスの破綻によって生じている日和見感染であるため、そのバランスの正常化が本来の看護ケアのターゲットであるべきである。しかしながら、現状では壊死組織の除去や洗浄などの基本的な看護ケアに加えて、抗菌剤や消毒剤など、細菌そのものを死滅させる薬剤を用いた侵襲的な管理が主流となっている。しかし、抗菌剤では耐性菌問題が社会問題化しており、また消毒剤では細菌のみならず宿主細胞をも死滅させるという根本的問題があり、本来の目的である、バランスの正常化が達せられていない。そこで本研究では、細菌を死滅させるのではなく、細菌と宿主を一種の共生関係と捉え、細菌病原性のみを特異的に減弱させる手法をとることが感染対策において重要であるとの考えに基づき、以下に説明する現象を明らかにすることで、看護師が非侵襲で、即効性の高い感染管理を確立することを目指した。

褥瘡感染の重要な起炎菌である緑膿菌について、クオラムセンシングという遺伝子発現調節機構が着目されている。クオラムセンシングとは、アシルホモセリンラクトン (AHL) を用いて細菌間で情報伝達を行い、AHL が一定の濃度(Quorum : 定足数)に達するとエラスターゼやバイオフィルムなどの病原性を発揮する細菌の遺伝子発現機構である。我々は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(Nakagami, 2012)。

さらに AHL 自体が褥瘡感染に及ぼす影響を検証したところ、創傷部位への AHL 投与により、炎症性細胞浸潤が明らかに亢進し、組織障害が生じていた。創傷部の宿主遺伝子発現を網羅的に解析したところ炎症に関連するタンパク質の遺伝子発現が上昇していることが明らかになった。特にこの現象が線維芽細胞にて生じていることが明らかになった (Nakagami, 2012)。

さらに線維芽細胞での遺伝子発現の変化を検討した結果、Mmp3、7、9、13 において著明に発現が増加していた。また、それらの発現制御に共通に関わるシグナル伝達経路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いた。これらより、AHL は線維芽細胞

の遺伝子発現を上昇させる際に特定のシグナル伝達経路を介していることが示唆されたがその直接的な証明には至っていない。

そこで本研究は、AHL が創傷治癒において重要な役割を果たす線維芽細胞に与える影響およびそのメカニズムを明らかにすることで、「褥瘡感染には細菌病原性ととともに、AHL による宿主への直接的な影響の両方が関与している」という新たな感染概念を検証し、細菌病原性と AHL の影響を減弱させる、新たな感染管理方法を提案することを目標とする。

2. 研究の目的

本研究の目的は緑膿菌クオラムセンシングシグナルである AHL が皮膚線維芽細胞の遺伝子発現に与える影響およびその作用メカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

ラット線維芽細胞株 (Rat-1) に対して、緑膿菌 AHL (3-oxo-C12, 50 μ M) を作用させ、炎症・組織障害にかかわるタンパク質である各種 MMP の遺伝子発現を real-time RT-PCR にて解析した。また、その作用メカニズムを検討するため、種々のシグナル伝達経路阻害剤で前処理した後、AHL 処理を行い、遺伝子レベル、蛋白質レベルにて検討を行った。また、プロモーター活性の上昇を検討するためにルシフェラーゼアッセイを行った。ラット Mmp9 のプロモーター領域を PCR にてラット線維芽細胞から抽出したゲノミック DNA よりクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子を有するプラスミドに組み込み、線維芽細胞に導入した (Wild type, WT)。また、AP-1 の関与を検討するため、AP-1 結合サイトに変異を加えた変異プロモーターも構築した (AP-1 mutant)。

上記にて同定したシグナル伝達経路のさらに上流を探索するために、より広範に AHL の濃度を変化させ、10 μ M を境に遺伝子発現および細胞形態が Drastic に変化することを見出した。そこで、1 μ M と 10 μ M の濃度の AHL への反応の違いがどのようなもたらされるかを明らかにすることが AHL の作用メカニズムの解明につながると考え、両濃度に曝露させた細胞より RNA を抽出し、DNA マイクロアレイに供した。

4. 研究成果

AHL への曝露により AP-1 依存の MMP の遺伝子発現が上昇していた。また、AP-1 の構成蛋白である c-Fos が活性化し、核内移行が生じており、蛋白レベルでも AP-1 が関与している可能性が示された。そこで各種シグナル伝達経路を検討した結果、ERK、p38 および AP-1 阻害により、Mmp の遺伝子発現およ

び c-Fos の核内移行が抑制された (図 1、矢印が c-Fos の核内移行を示す)。

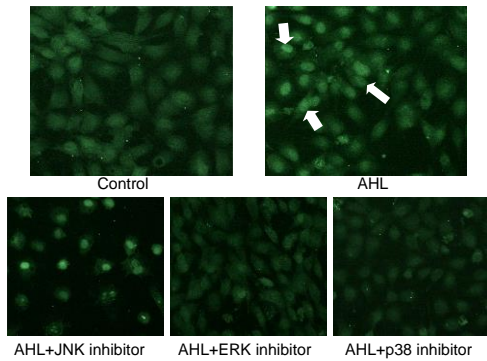


図1: AHLによるc-Fosの活性化

さらに AHL による AP-1 シグナル伝達の利用を直接的に検討するため、プロモーター活性を検討したところ、Wild type では AHL 処理により活性が上昇したが、AP-1 結合サイトを欠損させると活性上昇は抑制された (図 2)。

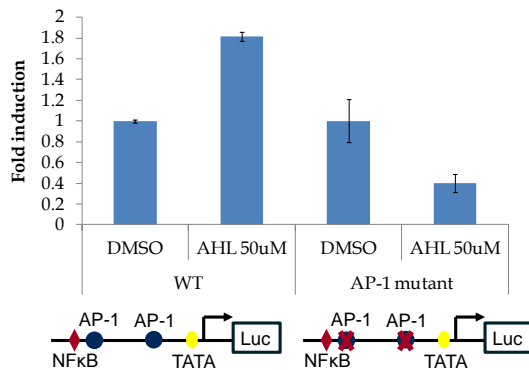


図2: AHLによるMMP9プロモーター活性上昇は AP-1依存である

以上より、AHL はラット線維芽細胞において、AP-1/ERK/p38 を介して Mmp の遺伝子発現を上昇させていることが強く示唆され、AHL による炎症誘導メカニズムの一端が明らかになった (Nakagami, in submission)。さらにより詳細な作用メカニズムを検討するために、濃度を広範囲に変化させた際の細胞応答を Phalloidin を用いたアクチンフィラメントの蛍光染色により確認したところ、10 μ M で細胞形態が急激に変化することが明らかになった (図 3、矢印がアクチンフィラメントの配向の変化を示す)。

そこで 1 μ M、10 μ M の AHL およびネガティブコントロール (DMSO) を曝露させ、DNA マイクロアレイに供し網羅的に遺伝子発現をスクリーニングしたところ、798 遺伝子が 10 μ M 曝露のみで上昇していることが明らかになり、パスウェイ解析を用いていくつかの G タンパク質共役受容体の候補が見いだされた。

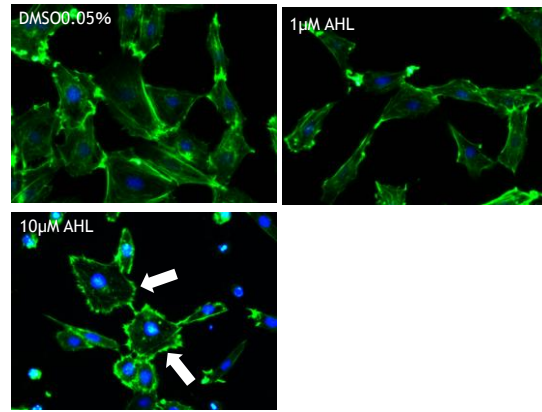


図3: AHL10 μ Mによるアクチンフィラメント配向の変化

今後受容体探索を進め、特異的に AHL により引き起こされる炎症を抑える方策を構築し、新しい概念の感染制御法を提唱することを目指す。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Paes C, Nakagami G, Minematsu T, Nagase T, Huang L, Sari Y, Sanada H. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone enhances keratinocyte migration and induces Mmp13 gene expression in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;427(2):273-9. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. 仲上 豪二郎, 峰松 健夫, 長瀬 敬, 山根 拓実, 金澤 寿樹, 真田 弘美. ラット線維芽細胞における緑膿菌クオラムセンシングシグナルによる遺伝子発現調節に関する検討. 第 42 回日本創傷治癒学会 プログラム・抄録集. 2012::108. (第 42 回日本創傷治癒学会学術集会, 札幌, 12 月)
2. Paes C, Nakagami G, Minematsu T, Nagase T, Huang L, Asada M, Yamamoto Y, Kanazawa T, Kishi C, Sanada H. Investigation of the influence of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone on keratinocyte migration. The 4th Congress of the World Union of Wound Healing Societies. OR103, 2012, Yokohama, Sep
3. 仲上 豪二郎, 峰松 健夫, 黄 麗娟, 浅田 真弓, 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 MMP9 発現制御機構の解明. 第 41 回日本創傷治癒学会 プログラム・抄録集. 2011::64. (第 41 回日本創傷治癒学会学術集会, 名古屋, 12 月)
4. Nakagami G, Minematsu T, Nagase T,

Morohoshi T, Ikeda T, Asada M, Paes C, Sanada H. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal molecule, N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone, induces matrix metalloproteinase expression via MAPK / AP-1 pathway in rat fibroblast. 21st Conference of the European Wound Management Association. 2011, Brussels, Belgium, May

5. Paes C, Nakagami G, Minematsu T, Nagase T, Morohoshi T, Ikeda T, Sanada H. In vitro effect of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal molecule, N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone, on keratinocyte migration. 21st Conference of the European Wound Management Association. 2011, Brussels, Belgium, May

[図書] (計 2 件)

1. 仲上豪二郎. アドバンスド創傷アセスメント 創傷の感染の評価方法 (Part II アドバンスド創傷ケアの実際 - 2. 実際編). ナースのためのアドバンスド創傷ケア. 照林社. 160-164, 2012.
2. 仲上豪二郎. 症例にみる治療とケア① 感染をコントロールする (Part3. 治りにくい褥瘡). 治りにくい創傷の治療とケア. 照林社. 96-100. 2011.

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし