

令和元年9月23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. 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の構築を目指して、強度ムラ補正のための基盤技術の開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PDTを用いた感染症治療に関しては、これまで皮膚などの外表面における感染対策が中心であったが、本技術開発により皮膚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となる。また、本研究での抗菌効果の実証は、薬剤耐性を示す菌に対するPDTによる感染制御効果の典型的事例を示すことになるだけでなく、PDTの持つ創傷治癒促進効果を利用した治療期間の短縮にもつながる技術となる。これらの技術開発は、褥瘡など難治性の病変に対しても朗報をもたらすことが期待できる。

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. Aiming at the construction of a next-generation homogeneous irradiation system that incorporates a feedback system that can correct light intensity unhomogeneity, we have developed basic technology for intensity unhomogeneity correction.

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(概要)

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) プロトタイプの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

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

①方法

i 発光黄色ブドウ球菌を用いたマウス皮下感染モデルの作製

感染細菌株には発光形質を遺伝子改変により付与された黄色ブドウ球菌株 Xen31 (PerkinElmer) を用いた。PBS に浮遊させた Xen31 (1.0×10⁹/mL) を C57BL/6 マウス (9 週齢、オス) 左踵部に皮下接種 (10uL) した。

ii 光殺菌

Xen31 接種より 1 日後、滅菌水およびジメチルスルホキシド (DMSO) で溶解された染色剤 (メチレンブルー:MB、トルイジンブルー:TB、ローズベンガル:RB、インドシアニングリーン:ICG) を菌接種部位に 20uL 皮下注入し、注入直後に光照射を行った。なお、照射光の波長はそれぞれの染色剤における最大吸収波長とした (MB:660 nm, TB: 630 nm, RB: 550 nm, ICG: 800 nm) (図 1)。対照群には PBS を

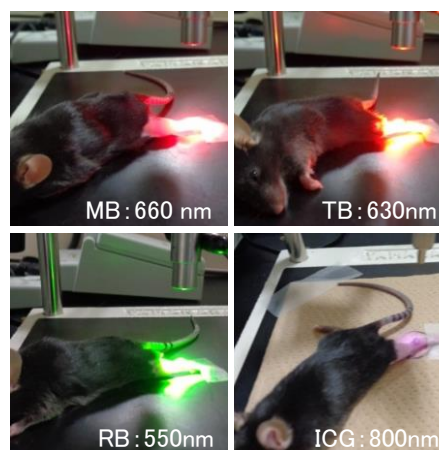


図1. マウス踵皮下Xen31感染モデルへの光殺菌。図中の表示は、染色剤略名と照射光波長



図2. 左: 菌接種直後、右: LASイメージング画像 (青→赤は菌数少→菌数多に対応)

20uL 注射し、光照射は行わなかった。Xen31 接種日 (0 日目) より 1~4、6 日目に生体イメージングシステム (ImageQuant LAS 4000 mini) にて、Xen31 由来の発光シグナルを計測した。

②結果

踵部皮下に Xen31 を接種した直後より Xen31 からの発光が観察できた (図 2)。予備検討によって、この発光と Xen31 菌数は正相関することを確認した。また、無処置コントロール (対照群)、染色剤のみ投与あるいは光照射のみを行ったマウスにおいては、発光シグナルは確認されなかった。

細菌接種して染色剤投与後に光殺菌を行ったマウスでは、細菌接種されたのち無処置のマウス (図 3 の MRSA-PBS) に比して、Xen31 からの発光は低下していた。すなわち、対照群の菌接種後 2 日目の発光強度は約 13 倍に増加していた一方、同時点における光殺菌群では、1.1 - 12 倍の範囲にあった (図 3)。本検討では、光照射条件において光照射強度を 2 通り設定したが、低いほうの光照射強度で光殺菌を行った場合、菌接種後 2 日目 (光殺菌後 1 日目) における発光強度は、MB, TB, RB, ICG のそれぞれで 1.9, 1.9, 1.6, 2.8 倍であり、前 3 者の染色剤において後一者の ICG よりも高い効果が見られた。また、光照射強度の低い場合のほうが高い場合に比して、殺菌効果は高かった (低照射強度: 発光強度 2.2 倍、高照射強度: 発光強度 3.9 倍)。他方、各染色剤で行ったすべての照射条件での発光強度の平均値をみると、MB, TB, RB, ICG のそれぞれで 2.5, 4.3, 1.9, 3.3 倍であり、RB が広い照射条件で安定した殺菌効果を示すことがわかった。

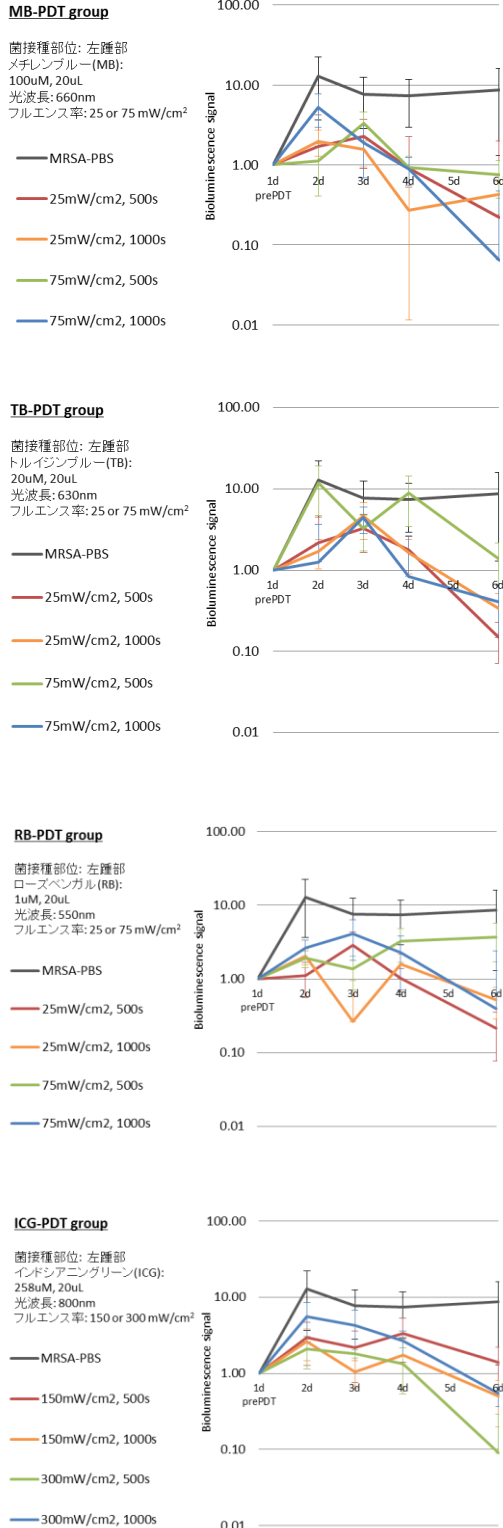


図3. 各染色剤投与後に光殺菌を行った際のXen31由来の発光強度の推移。上から、メチレンブルー、トルイジンプルー、ローズベンガル、インドシアニングリーンを使用した際の光染色の光照射条件(右側)および発光強度変化グラフ(光殺菌直前の発光強度値に対する相対値)(左側)を示す。n=各3、対照群(MRSA-PBS)のみn=6。

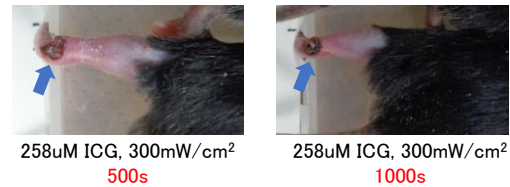


図4. ICGを用いた光殺菌において観察された熱傷様変化(矢印)

しかしながら今回、検討数が少ないため、いずれの群間においても統計学的な有意差は認められなかった。

なおICG群では、細菌増殖抑制効果が確認された一方、光殺菌による熱傷様所見を呈する動物が確認された(図4)。その他の染色剤(MB、TB、RB)では同様の症状は確認されなかった。

B) 好中球遊走・集積にかかわるシグナルの同定・定量

①方法

申請者らは以前、メチシリン耐性ブドウ球菌(MRSA)を膝関節に感染させたマウスモデルに対しPDTを行うことにより、膝関節滑膜への好中球が遊走・集積が促進誘導されるのを確認した。そこでこの免疫反応のカスケードを明らかにする上で、PDTによって滑膜内の線維芽細胞のストレス反応タンパク(HSPなど)が活性化し、そのシグナルがマクロファージに伝播して炎症サイトカインを放出することで、好中球が集積されているのではなかという仮説を立てた。

上記仮説の検証をするため、マウス由来のマクロファージ様細胞であるJ774とマウス線維芽細胞のSCRC-1008をそれぞれ独立に培養させた系、および共培養させた系の計2グループに分けて培養しPDTを行った。その後、それぞれのグループにおけるmRNAと生成されたタンパク質レベルを、リアルタイムPCRおよびELISA法で計測した。

②結果(論文7)

共培養させた細胞群の方が、線維芽細胞のHsp1bの発現レベルが高く、またマクロファージのTlr2, Tlr4が高く発現していた。さらに、転写因子であるNfkb1, Ikbkbの活動性が亢進しており、炎症サイトカインであるTNF- α 、IL-1 β 、IL-6が多く分泌し、MIP2/CKが活性化していることを示す所見が得られた。

このことから、共培養させた細胞群では、PDTにより線維芽細胞のHsp1b発現が促され、マクロファージのTLRを通してNF- κ Bを活性化する。そして、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6などの炎症サイトカインが放出されることによって、MIP2/CK系が活性化されて好中球の遊走・集積が引き起こされるという結論に至った。図5に上記のカスケードを踏まえたモデルを示す。

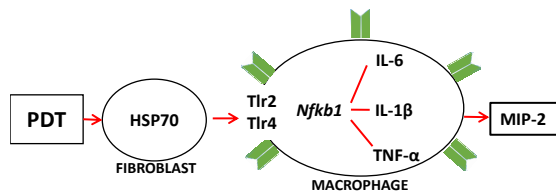


図5. A proposed model of PDT-induced gene & protein expression cascade occurring in fibroblasts and macrophages.(論文7, Fig.7一部改変)

II. 皮膚欠損モデルにおける PDT の検討 (論文 13)

①方法

アミノレブリン酸 (ALA) は、ミトコンドリア内でプロトポルフィリンIX (PPIX) に変化することで光増感作用をもつ。ALA を用いた PDT では、 $5\text{J}/\text{cm}^2$ 程度の低エネルギー量光照射によって、発生する ROS(reactive oxygen species)を低用量にコントロールすると、通常の PDT とは逆にアポトーシスを抑制し、好中球遊走刺激、fibroblast 増殖刺激、ミトコンドリア呼吸鎖の反応速度亢進等の細胞増殖、組織修復促進の方向に働くことが報告されている。一方、ALA を生体に投与することで、ヘム合成代謝経路の代謝速度を上げ、光照射なしでも抗炎症作用や細胞増殖作用、創傷治癒促進作用を発揮する可能性がある。

そこで申請者らは、ALA 局所投与および低エネルギーの近赤外線照射による ALA-PDT、それぞれの創傷治癒促進効果を検証した。

C57BL/6 マウスの背部に皮膚全層を円形 ($\phi 15\text{mm}$) に切除した皮膚欠損モデルを作製し、メチルセルロースを基材とした ALA ゲルを欠損部位に塗布した。

①ALA ゲル局所塗布群では、欠損創の大きさの推移をコントロール群 (ALA 0%) と比較した。②ALA-PDT 群では、ALA ゲルを欠損部位に塗布後、波長 630nm の近赤外線を照射し ($3\text{J}/\text{cm}^2$)、欠損創の大きさの推移を観察した。1,3,5 日目に創の標本を採取し HE 染色及び CD31 (血管内皮を陽性に染める) による免疫組織染色を行った。

②結果

ALA ゲル局所塗布群において皮膚欠損面積は、ALA ゲル塗布後 3~7 日目において ALA 濃度依存的にコントロール群に比べて縮小した。

ALA-PDT 群では、皮膚欠損面積は ALA ゲル局所塗布群に比べて更に縮小した。ALA ゲル局所塗布群、ALA-PDT 群ともに、組織学的には皮膚欠損部皮下組織において CD31 染色部位がコントロール群に比して有意に増加していた。

ALA ゲルの単独局所塗布では、ALA が細胞におけるヘム合成経路の反応速度を上げることで早期の創傷治癒が促進された可能性がある。さらに低エネルギーの光線照射により (ALA-PDT 群)、創傷治癒の促進効果が増強

された。当該機序は不明だが、ヘム合成にかかわる物質と光による相互作用が関係するかもしれない。

III. 均質照射光照射デバイスの開発 (論文 14)

①方法

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の構築を目指して、強度ムラ補正のための基盤技術の開発を行った。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、レーザー出力を制御するシステムとした。開発したシステムは、サーモグラフ、温度センサー回路 (PC およびマイクロコントローラ)、および近赤外線レーザーで構成された。光照射中に 100ms ごとに取得されたレーザー照射領域の最高温度に基づいて、最高温度がプリセット値に維持されるようにレーザー出力が制御されるように設計した。

②結果

マウスの皮膚を用いて、システムの実用性を検証した。その結果、光照射中の温度変動は 0.14°C 程度以内であり、温度センサー回路なしの場合の温度変動 (1.6°C 程度) に比して 1/10 未満に抑えられることが示された。

開発したシステムによって、光照射中の物体温度をプリセット値に安定維持させることができた。したがって、このシステムは、レーザー照射領域の温度を一定に保つためのシステムとして機能することが期待できる。

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 14 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
 13. 桐野泉, 青笹季文, 山本順司, 四ノ宮成祥, 上本伸二, 守本祐司(2018) 5-アミノレブリン酸による創傷治癒促進と光照射によるさらなる増強効果. 日本レーザー医学会誌 38: 451-456
 14. Nomura S, Arake M, Morimoto Y, Tsujimoto H, Miyazaki H, Saitoh D, Shinomiya N, Hase K, Yamamoto J, Ueno H. (2017) Thermal Sensor Circuit Using Thermography for Temperature-Controlled Laser Hyperthermia. J Sensors. doi.org/10.1155/2017/3738046

[学会発表] (計 24 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 光治療システム
 発明者: 内田広夫、守本祐司、辻本広紀、小関英一、檜 顕成、野村信介
 権利者:
 種類:
 番号: PCT/JP2016/079124
 出願年月日: 平成 28 年 9 月 30 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