

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)（特設分野研究）

研究期間：2017～2019

課題番号：17KT0046

研究課題名（和文）褥瘡・皮膚潰瘍の個別化を目的とした遺伝子プロファイルの検討

研究課題名（英文）Gene profiling for pressure ulcer

研究代表者

西原 広史（NISHIHARA, Hiroshi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授

研究者番号：50322805

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目標は、「複雑系疾病である褥瘡・皮膚潰瘍の個別化を通じて、治療の最適化および新規治療法の開発をおこなうこと」である。臨床病理学的解析は十分に実施することができ、世界で初めて、褥瘡発症過程をメカニズムに応じて分類することに成功した。また、その因子としてPDGFRの関与を示唆することができた。しかし、生体医工学によるアプローチとしてEx vivoによる褥瘡モデル開発に取り組んだが、実験に最適な細胞シートの完成が間に合わず、圧負荷による細胞変化を捉えるには至らなかった。研究目標の達成率は、40%。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究成果により、褥瘡の臨床病理学的分類が明確となり、最適な治療法を選択することが可能となる。また、今後の研究の発展により、より詳細な発症に寄与する因子が同定されれば、新たな治療薬、治療法の開発も期待できる。

研究成果の概要（英文）：Our research aim was to clarify the mechanism of pressure ulcer and try to establish the personalized treatment for the patients with pressure ulcer. Through this research, we have performed clinico-pathological evaluation for up to 200 cases. In results, we could divided pressure ulcer into two types depending on the mechanism. In addition, we explore the involvement of PDGFRb as a responsible factor for pressure ulcer. We also performed biotechnological approach to establish the Ex vivo model for pressure ulcer, but we could not make cell sheet with strength enough for experimental pressure test. Achievement rate of our original research aim would be evaluated as 40%.

研究分野：臨床病理学

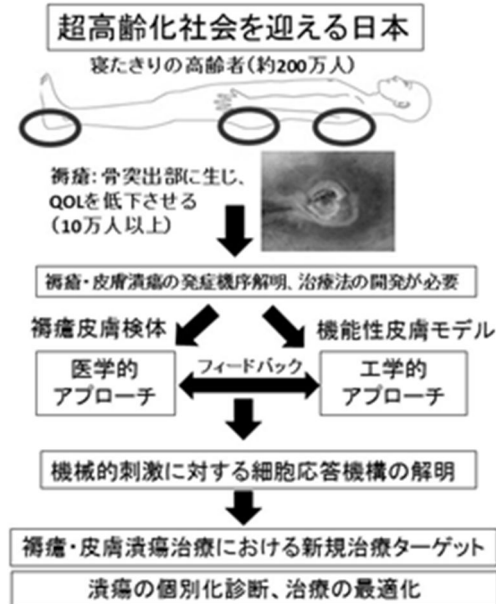
キーワード：褥瘡 病理 臨床 生体医工学 細胞シート 圧負荷

1. 研究開始当初の背景

背景: 日本は急速な高齢化社会を迎えており、高齢者に発生する疾病・障害に対する対策は重要である。褥瘡では、高齢者が長期にわたって同じ姿勢で寝たままとなった場合に、ベッドと体の接触部位で外力が接触部位に作用し、皮膚障害が生じる。褥瘡をはじめとする難治性皮膚潰瘍は生活の質の低下をもたらすだけでなく、潰瘍部からの細菌感染などの致死的な合併症を伴うこともあり、皮膚潰瘍の個別化診断に基づく治療の最適化および有効な治療法の開発が必要である。

これまで褥瘡・皮膚潰瘍の発生機序と創傷治癒過程について、詳しい分子生物学的な解明はされておらず、現状では直接的に生体にかかる力(細胞では垂直応力)による血流障害が考えられている。臨床的に、2時間の阻血によって皮膚組織の壊死が始まることから、「除圧を目的とした2時間ごとの体位交換」が実施されている。また、患者の個人差については全く検討がなされていない。一方、我々の研究グループでは、切断応力(ずり応力)の影響によって真皮から皮下脂肪組織における創傷治癒が遅延してしまうことを報告しており(Wounds 2006) 阻血以外の複合的な要因が示唆されている。さらに最近、研究代表者の西原らは創傷治癒における間質組織の重要性を報告した(Nishihara H. Adv Drug Deliv Rev 2014)。以上の点から褥瘡・皮膚潰瘍は複雑系疾病ととらえ、個別化診断・治療を目指す必要があると考えられる。

褥瘡の病態を検討するために、既に褥瘡を再現する動物実験モデルが開発されているが、この方法では遺伝子の発現調節などの介入が難しいという難点がある。また、細胞もしくは皮膚組織に対する機械的ストレスによる影響(細胞の応答)を見ることが困難である。したがって、培養細胞を用いた2次元および3次元の皮膚モデルを樹立し、その皮膚モデルに対して機械的ストレスを与える研究が必要と考えられる。



2. 研究の目的

本研究の目標は、「複雑系疾病である褥瘡・皮膚潰瘍の個別化を通じて、治療の最適化および新規治療法の開発をおこなうこと」である。この目標を達成するために、1)臨床皮膚検体を用いた分子生物学的的手法による褥瘡の発生・創傷治癒遅延メカニズムの解析、2) Ex vivo 機能性皮膚モデルの樹立と褥瘡発症機構の解明、3) 機能性皮膚モデルおよび臨床検体を用いた機械的治療法による創傷治癒メカニズム(特に陰圧閉鎖療法)の解明、4) メカノセンサー候補分子の制御による皮膚潰瘍の新規治療法探索をおこなう。

3. 研究の方法

研究計画:

1) 臨床皮膚検体を用いた褥瘡の病態解析

褥瘡皮膚潰瘍部 200 検体(すでに一部は採取済)について、臨床 病理学的検討を実施する。併せて、分子・遺伝子レベルでの個人差の解析を実施する。良好な肉芽増殖と不良な肉芽についての、線維芽細胞の増殖(Ki-67、p21、p27 染色)および分化(筋線維芽細胞:SMA 陽性など)について検討を行う。臨床・病理所見の背景となる「個人差」を明らかにするため、オミクス技術を用いた解析を行う。レーザーマイクロダイセクション法などの方法で、褥瘡部の皮膚線維芽細胞を採取し、DNA, RNA, Protein レベルでのシグナル伝達経路をトランスオミクスの手法で解析する。

2) 機能性皮膚モデルの樹立と褥瘡発症機構の解明

細胞積層法・細胞集積法・細胞プリント法を用いた3次元皮膚モデルの作成を行う。細胞および組織に対する「垂直応力」および「ずり応力」を負荷する装置を開発し、細胞応答を解析する。

3) 機能性皮膚モデルおよび臨床検体を用いた陰圧閉鎖療法による創傷治癒メカニズムの解明

陰圧閉鎖療法前後における臨床・病理学的所見の比較、および分子生物学的検討を行う。2次元・3次元培養線維芽細胞に対する陰圧負荷モデルを作成し、陰圧負荷時の細胞応答について解析する。

4) メカノセンサー分子の同定と治療法探索

線維芽細胞における機械的ストレスセンサー(メカノセンサー)候補分子の同定のため、候補分子を導入した(もしくは発現をノックダウンした)皮膚線維芽細胞を樹立する。真のメ

カノセンサー分子を絞り込むため、遺伝子導入細胞を用いた皮膚培養モデルでの機械的ストレスに対する細胞応答を解析する。候補分子について、免疫沈降法などの分子生物学的手法にて結合分子を同定する。同定された機械的刺激に対する受容機構について、阻害剤・促進剤の候補を推定し、これらの化合物を培養細胞に添加した際の細胞応答を観察する。臨床検体におけるメカノセンサー分子の発現を解析し、発現パターンによる個別化診断・個別化治療を探索する。

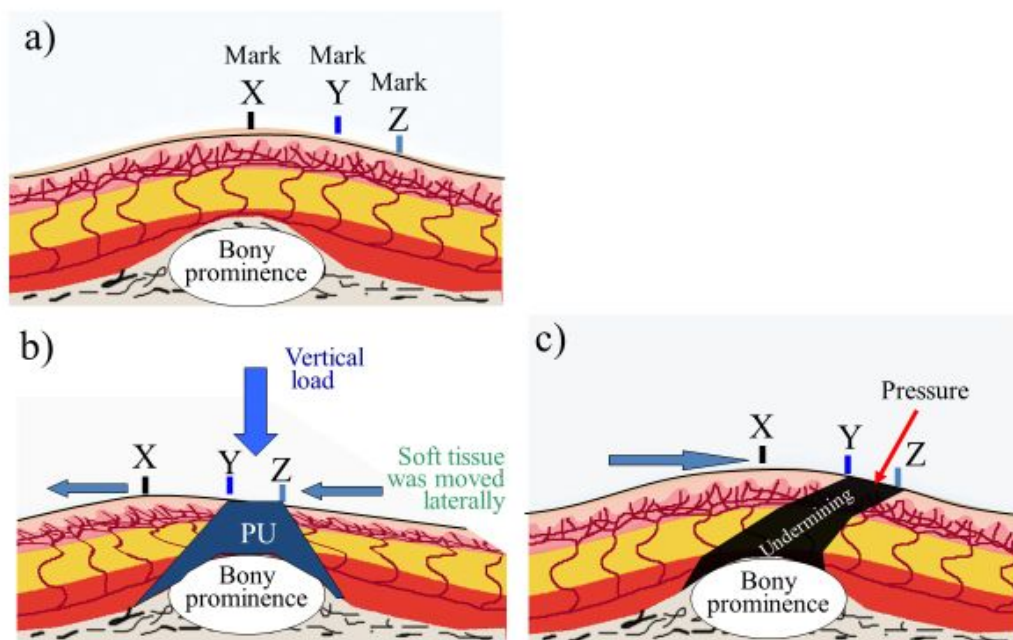
4. 研究成果

1) 臨床皮膚検体を用いた褥瘡の病態解析

200 症例に及ぶ病理解析と臨床情報解析の結果、我々は褥瘡の病態を以下の2つのパターンに分類することができた。これらの結果は、臨床病理論文として、現在投稿中である。

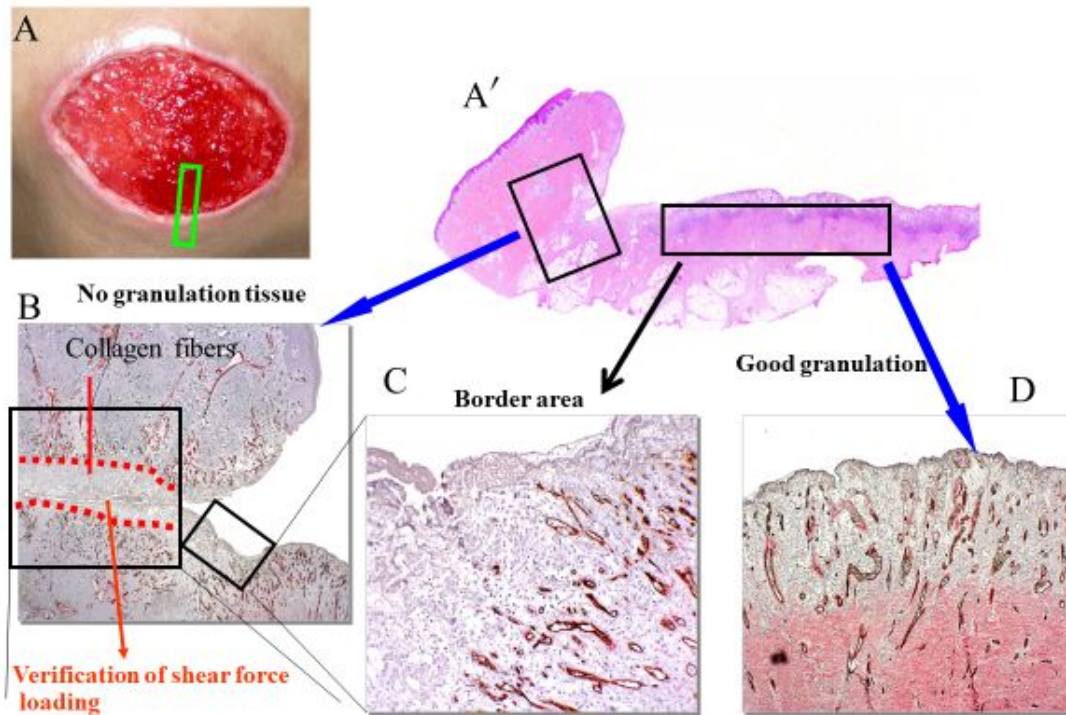
	Time course	Etiology Growing Process	Morphology of wound			Prevention	
			Direction of undermining	Wound bed	Necrosis		Wound edge
PDNT-Uh	Initial phase (Early)	After discharge of liquefied necrosis Hourglass-shaped necrosis occurs	Most ulcers extend as concentric circles	Necrosis and granulation tissue are mixed in this wound undermining	Hourglass-shaped necrosis Some necrotic tissue adhered in the cavity resulting in a risk of predisposed infection	Almost entire circumference of wound margin is freed from wound bed.	Not preventable
EF-Uh	Middle or Late phase	Compression strain generates a large pressure in the soft tissue at the bony prominence, then necrosis and a cavity is formed	Direction of Undermining extends toward the bony prominence	1) Uneven wound, depression, ditches 2) Fibrous membrane 3) Collagen layer is exposed to the air	Fibrous tissue is exposed by an abraded granulation, in stead of necrosis	Most of the wound margin adheres to the wound bed and an epidermis growth is recognized	Preventable Eliminate external force by nursing care

またその発症メカニズムは、以下のような圧負荷によると考えられた。



Outbreak Mechanism of the External force type of Undermining





EF-Un and Histological Findings

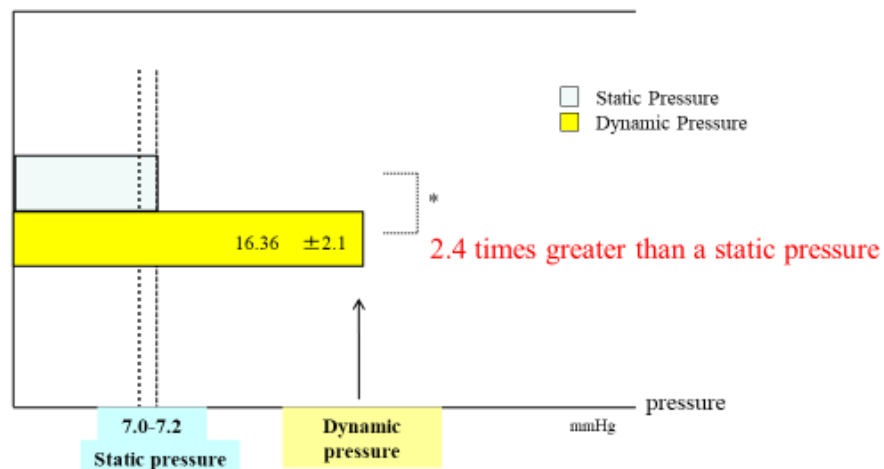
2) 機能性皮膚モデルの樹立と褥瘡発症機構の解明

細胞積層法・細胞集積法・細胞プリント法を用いた3次元皮膚モデルの作成を行った。毛細血管・リンパ管網を作製するために、真皮層の線維芽細胞で臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) や正常ヒト皮膚リンパ管微小内皮細胞 (NHDLMEC) のサンドイッチ培養を実施。細胞シートの作成に成功した。シートの強度の問題から、実験系での検証には至らなかった。今後は、病理標本作製が可能な生体材料に近い基盤を用いて細胞シートの作製を行うことが必要と考えられた

3) 機能性皮膚モデルおよび臨床検体を用いた陰圧閉鎖療法による創傷治癒メカニズムの解明

臨床検体及び動物組織により陰圧閉鎖による皮膚モデルの作製には成功したが、これらを用いた創傷治癒メカニズム解明研究には、時間的に間に合わなかった。今後の検討課題としたい。

Hourglass necrosis causative factors (Occurrence of the large compression near bony prominence)



Experiment Condition were as Follows:

10cm/60sec moving, 1Kg weight
0.5cm bony prominence Raw porcine skin

4) メカノセンサー分子の同定と治療法探索

2) のモデルでの検討が時間的に間に合わず、候補分子を導入した(もしくは発現をノックダウンした)皮膚線維芽細胞の樹立を予定していたが、実施できなかった。

【研究結果のまとめ】

臨床病理学的解析は十分に実施することができ、世界で初めて、褥瘡発症過程をメカニズムに応じて分類することに成功した。

また、その因子として PDGFR の関与を示唆することができた。

しかし、生体医工学によるアプローチとして Ex vivo による褥瘡モデル開発に取り組んだが、実験に最適な細胞シートの完成が間に合わず、圧負荷による細胞変化を捉えるには至らなかった。

研究目標の達成率は、40%。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishikawa Marin, Hayashi Hideyuki, Sakamoto Naoya, Tanaka Shinya, Nishihara Hiroshi	4. 巻 37
2. 論文標題 Cancer gene profiling explores the possible precision medicine for diffuse-type gastric adenocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12032-019-1327-4	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Kohei, Aimon Eriko, Tanishima Shigeki, Imai Mitsuho, Nagatsuma Akiko Kawano, Hayashi Hideyuki, Yoshimura Yuki, Nakayama Kentaro, Kyo Satoru, Nishihara Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Intratumoral Genomic Heterogeneity May Hinder Precision Medicine Strategies in Patients with Serous Ovarian Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 200 ~ 200
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics10040200	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松崎 典弥 (MATSUSAKI Michiya) (00419467)	大阪大学・工学研究科・教授 (14401)	
研究分担者	角五 彰 (KAKUGO Akira) (10374224)	北海道大学・理学研究院・准教授 (10101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	柳 輝希 (YANAGI Teruki) (50755973)	北海道大学・大学病院・助教 (10101)	
研究 分 担 者	繁富 香織 (SHIGETOMI Kaori) (90431816)	北海道大学・高等教育推進機構・特任准教授 (10101)	