

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10142

研究課題名(和文) 網羅的スキンプロテオミクスによる「褥瘡予測タンパク質」の探索と臨床応用

研究課題名(英文) Exploration of biomarkers for pressure ulcer prediction and its clinical application

研究代表者

大貝 和裕 (Ogai, Kazuhiro)

金沢大学・保健学系・准教授

研究者番号：40706983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、褥瘡(いわゆる床ずれ)が治った後、再びその部位で褥瘡が発生するかどうかを、皮膚のタンパク質を分析することで判断できるかを検討した。タンパク質の分析として、電気泳動によるパターン分析と、サンプル中にあるタンパク質を一斉に解析するプロテオームを実施予定であった。タンパク質を一斉に解析する方法については確立できた。この方法を用いて分析を行う予定であったところ、COVID-19の流行により実験自体が一時停止してしまった。その後、電気泳動によるバンドパターン比較により再発する人としない人のパターン差異を見いだすことには成功したものの、そのタンパク質の詳細については現在も分析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代日本の抱える課題の一つである「高齢化」が進行し、在宅介護等が増えると顕在化する問題の一つに褥瘡(いわゆる床ずれ)がある。褥瘡は痛みを伴う皮膚創傷であり、生活の質を低下させる。さらに感染症を起こしやすくなり、菌血症を起こせば命を脅かすことにもなりかねない。看護・介護をする側にとっても、創部の洗浄、治療、感染予防などに時間と費用が費やされ、労力と介護費は増大する。このため、可能な限り褥瘡を予防することが強く望まれる。本研究では、褥瘡再発を予測しうる皮膚タンパク質を検索して、詳細は現在も検討中であるものの、「褥瘡再発の予測タンパク質」の候補を発見できた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated whether it is possible to predict pressure ulcer (so-called bed sore) recurrence in the area after they have healed by analyzing skin proteins. For the protein analysis, we planned to use pattern analysis by electrophoresis and proteome for all detectable proteins in the sample. The method for comprehensive analysis of proteins has been established. We had planned to conduct the analysis using this method, but the experiment itself was temporarily stopped due to the COVID-19 epidemic. After that, we succeeded in finding the difference in patterns between those who had recurrence and those who did not by comparing band patterns by electrophoresis, but the details of the proteins are still under analysis.

研究分野：皮膚科学

キーワード：褥瘡 再発 スキンプロテオミクス プロテオミクス タンパク質 予防

1. 研究開始当初の背景

現代日本の問題の一つに、急速に進む高齢化がある。2016年の国勢調査によって、4人に1人が65歳以上であることが明らかになった。2025年には団塊の世代が一斉に後期高齢者となる、いわゆる「2025年問題」が喫緊の課題となっている。さらに、高齢者介護・看護を病院中心から地域・在宅中心に振り分ける「地域包括ケアシステム」「地域医療構想」が策定され、高齢者介護の場が病院から地域・在宅へ移る流れとなっている。

高齢化が進行し、在宅介護等が増えると顕在化する問題の一つに褥瘡（いわゆる床ずれ）がある。褥瘡は痛みを伴う皮膚創傷であり、生活の質を低下させる。さらに感染症を起こしやすくなり、菌血症を起こせば命を脅かすことにもなりかねない。看護・介護をする側にとっても、創部の洗浄、治療、感染予防などに時間と費用が費やされ、労力と介護費は増大する。このため、可能な限り褥瘡を予防することが強く望まれる。

そこで申請者らは、申請者らが新規に開発した「網羅的スキンプロットティング法」が応用できないかと考えた。この方法は皮膚内部のタンパク質を複数種同時に解析できる方法である。この方法によって、褥瘡発症と関連して変化のあったタンパク質を見つけ出すことができ、褥瘡の予測→予防が可能になるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は「皮膚内部にあるタンパク質のうち褥瘡発症に関わるものをピックアップし、そのタンパク質の分析によって褥瘡発症を予測する」ことである。その達成のために、

- (i) 褥瘡発症時に皮膚内部で増加または減少しているタンパク質は何か？
- (ii) (i) で発見したタンパク質が、褥瘡発症を予測できるか？

の2項目を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 網羅的スキンプロットティング法の検討

本研究ではまず、研究で用いる網羅的スキンプロットティング法を、より多くの種類のタンパク質を回収できる方法を確認することとした。

タンパク質回収については、大きく分けて2つのステップに分かれる。すなわち、①メンブレンからのタンパク質回収と、②タンパク質の濃縮である。先行研究を元に、以下の図1に示すような方法を検討した。なお、本実験については、金沢大学医学倫理審査委員会の承認を得ている (No. 757)。

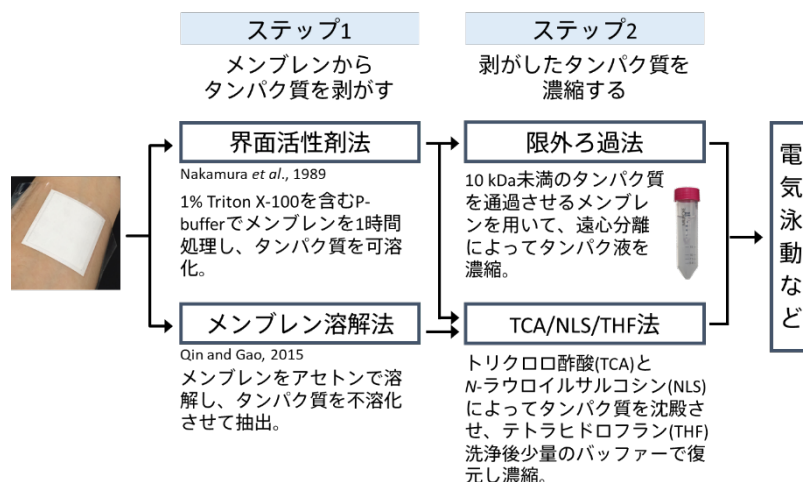


図1 より多くのタンパク質を回収できるタンパク質回収・濃縮方法の検討

(2) 「褥瘡再発タンパク質」の解析

本研究では当初、褥瘡の発症を予測するタンパク質を発見することを目的としていた。しかし、パイロット調査を開始したところ、褥瘡を新たに発症する方の人数が想定を下回った。そのため、既に褥瘡を発症した方で、治癒後、再度褥瘡を発症する「褥瘡の再発」に注目した。この褥瘡の再発を予測するタンパク質を同定することを次の目的とし、次の通り調査を実

施した。

研究デザイン	前向きコホート研究
対象者	長期療養型施設に入居する高齢者
場所	長期療養型施設
包含基準	書面による同意を得られた者 1か月以内に褥瘡が治癒した者
除外基準	調査部位に皮膚疾患（ケロイドや肥厚性瘢痕）を持つ者
調査部位	褥瘡治癒部と対照部（図2）

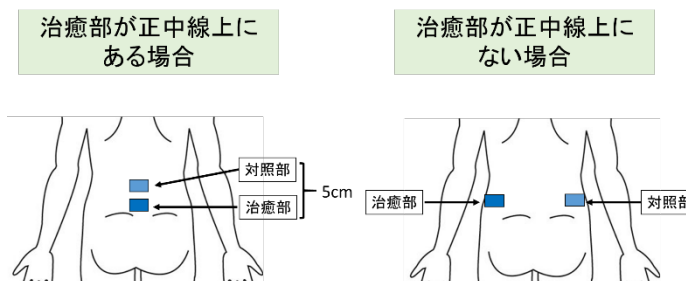


図2 調査対象部位

上記調査によって回収されたタンパク質を、(1)で確立した方法で抽出し、電気泳動によるバンドパターン比較と、サンプルに含まれるタンパク質を網羅的にリストアップするショットガンプロテオミクス（LC-MS/MS）を実施することを計画した。なお、この調査についても、金沢大学医学倫理審査委員会の承認を得ている（No. 44）。

4. 研究成果

(1) 網羅的スキンプロテオミクス法の検討

「3. 方法」で示した回収・濃縮法を検討した結果、メンブレン溶解法はメンブレンの残渣が残り回収ができず（図3）、濃縮法として限外ろ過を用いた場合、界面活性剤も濃縮され、泳動が著しく乱れることが分かった（図4左）。よって、回収法としては高濃度の界面活性剤を用いた剥離法が、濃縮法としてはトリクロロ酢酸を用いた方法がそれぞれ適していることが明らかになった（図4右）。

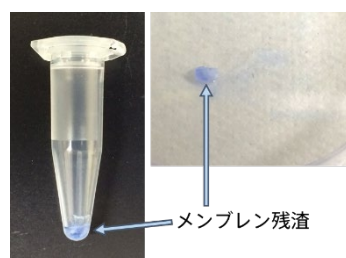


図3 メンブレン溶解法

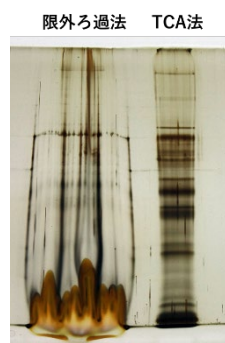


図4 限外濾過法とトリクロロ酢酸（TCA）法の泳動結果の比較

(2) 「褥瘡再発タンパク質」の解析

計29名を調査し、うち7名が6週間以内に褥瘡を再発した。再発群と非再発群の比較は表1の通りであり、性別に有意差が認められた（ $p = 0.049$ ）。

再発群7名のタンパク質と、非再発群の22名のタンパク質をそれぞれプールし、(1)の方法でタンパク質を抽出し、電気泳動に供したところ、不明瞭な部分を除いて、5つのバンドで増減が認められた（図5）。このバンドについてタンパク質の同定を行い、かつ泳動前のタンパク質を網羅的に解析・比較する予定であったところ、COVID-19の影響によって実験自体を停止しなければならない時期があり、サンプルを分析のために送付する手前で一次停止を余儀なくされた。現在、サンプルを分析に供しており、解析結果が得られ次第、あらためて解析を再開させる。

表 1 非再発群と再発群の比較

項目	非再発群 (n = 22)	再発群 (n = 7)	p 値
年齢	86 (67-97)	89.5 (74-95)	0.46 ¹
性別 (女性)	15 (68.2%)	2 (25.0%)	0.049 ²
治癒前褥瘡の深さ			
d2	17 (77.3%)	5 (62.5%)	0.64 ²
D3	5 (22.7%)	3 (37.5%)	
治癒から調査開始までの日数 (日)	7.5 (3-29)	8 (3-30)	0.50 ³
ブレードンスケール	11 (8-22)	11.5 (8-16)	1.00 ³
治癒部の最大体圧値 (mmHg)	28.9 (10.5-84.2)	29.7 (14.6-64.7)	0.73 ³
治癒部の位置			0.15 ²
仙骨	10(45.5)	2(25.0)	
尾骨	4(18.2)	0(0.0)	
大転子	4(18.2)	5(62.5)	
その他	4(18.2)	1(12.5)	

中央値 (min-max) または n (%)

¹Studentのt検定 ²Fisherの正確確率検定, ³Mann-WhitneyのU検定

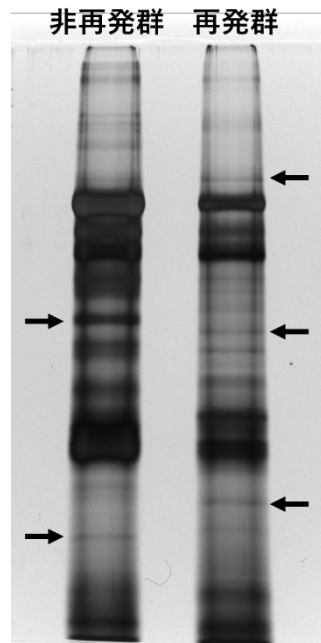


図 5 非再発群と再発群のタンパク質比較

矢印は 2 群でバンドが異なるものを指す

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Arisandi Defa, Ogai Kazuhiro, Urai Tamae, Aoki Miku, Minematsu Takeo, Okamoto Shigefumi, Sanada Hiromi, Nakatani Toshio, Sugama Junko	4. 巻 29
2. 論文標題 Development of recurrent pressure ulcers, risk factors in older patients: a prospective observational study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Wound Care	6. 最初と最後の頁 S14 ~ S24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12968/jowc.2020.29.Sup4.S14	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大貝和裕, 浦井珠恵, 青木未来, 須釜淳子
2. 発表標題 Exploring factors related to recurrence of pressure injuries: skin physiology and skin bacteria
3. 学会等名 第29回日本創傷・オストミー・失禁管理学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大貝和裕
2. 発表標題 スキンプロットティングのさらなる応用 -定量解析・網羅的解析に向けた検討-
3. 学会等名 第50回日本創傷治癒学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ogai K
2. 発表標題 Introduction for Skin blotting
3. 学会等名 International Teleconference of Magister Science Laboratory Clinic/Medic（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔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	須釜 淳子 (Sugama Junko) (00203307)	金沢大学・新学術創成研究機構・教授 (13301)	
研究 分担者	峰松 健夫 (Minematsu Takeo) (00398752)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任准教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------