

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791650  
 研究課題名（和文）褥瘡発生機構における基礎的研究  
 －皮膚・筋肉構成細胞の加圧負荷に対する応答－  
 研究課題名（英文）Fundamental study on mechanism of the pressure ulcer developing.  
 －Response to pressure of skin and muscle cells. －  
 研究代表者  
 高田 直子（TAKADA NAOKO）  
 滋賀医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：10432303

研究成果の概要：褥瘡（いわゆる床ずれ）の発生機序を解明する助けとして、皮膚および筋肉を構成する細胞の圧力に対する反応を実験的に検討した。その結果、皮膚および筋肉の構成細胞は、圧力を受けることで特異的な反応を示し、特に皮膚の構成細胞は細胞外マトリックス（細胞と細胞の間を埋める物質）を分解する酵素を作り出すことが明らかになった。また、圧力によってアポトーシス（細胞の自殺）が生じることもわかった。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	330,000	3,230,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：看護学・基礎看護

キーワード：褥瘡、皮膚線維芽細胞、筋管細胞、機械的刺激、アポトーシス、低酸素刺激

## 1. 研究開始当初の背景

現在の医療における重要な関心事のひとつである褥瘡は、従来、持続した局所の圧迫による虚血（循環障害）が組織壊死を引き起こすことにより発生すると考えられてきた。近年、褥瘡が臨床現場で注目されるに従い、その発生や治療過程に関連した研究が多数行われるようになり、様々な可能性が示唆され

ている。褥瘡発生の主たる原因は外部からの圧迫であることは、動かしがたい事実であり、実際に圧迫負荷がない状態では褥瘡は発生しない。しかし体表より体内に向け圧迫をした際、血管以外の皮膚、皮下、筋組織を構成する細胞も圧迫される。にもかかわらず、褥瘡の発生機構に関する研究において、圧迫に対する血流の変化以外の生体反応を考察し

たものは非常に少ない状況であった。

研究者は褥瘡発生機構に関して、従来の血流障害説に加え、皮膚および筋肉の構成細胞が圧迫（＝加圧負荷・加圧刺激）に対し直接応答することで、マトリックスの分解や炎症細胞などの動員を招く等のイベントが起った結果、褥瘡発生に繋がるのではないかと考えていた。そのため、従来の血流に関連した研究もさることながら、皮膚および筋肉の構成細胞の加圧という機械的刺激に対する反応が関与している可能性、さらにはそれらの構成細胞の役割を研究する必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、褥瘡発生プロセスには加圧という機械的刺激への細胞応答に始まる一連の細胞反応が関与するという仮説を、*in vitro*にて検証することである。本研究は、臨床上起こりうる圧力で、かつ褥瘡発生に繋がる負荷量に対する皮膚構成細胞の反応を検討するものであり、褥瘡発生と皮膚および筋肉構成細胞の応答の関連性を検討するまったく新しい研究であると位置付けられる。具体的には以下の2つの項目を目的とし研究を行なった。

(1) 皮膚および筋肉の構成細胞が、加圧刺激に対し特異的な反応を示す可能性を検討する。

(2) 皮膚および筋肉の構成細胞への加圧刺激によって、アポトーシスが誘発される可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

本研究では、皮膚線維芽細胞・筋管細胞のコラーゲングル内3次元培養系を用いて、加圧刺激に対する細胞応答を遺伝子レベルで検討した。

### (1) 細胞培養

正常ヒト皮膚線維芽細胞(HDF)およびマウス由来の筋管細胞(C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>)を使用し、10%ウシ胎児血清、ペニシリン(100U/ml)、ストレプトマイシン(100μg/ml)を加えたダルベッコ変法 MEM 培養液 (DMEM) を用い、培養を行った。

コラーゲングルの作成には、酸性コラーゲン溶液 (0.5%, CELLGEN-AC, KOKEN) を最終濃度約 0.37%とし、0.5ml を 5cm 径のプラスチックディッシュ内に流し込み、37°C 環境にてゲル化させ、ベースレイヤーを作製した。その後、ベースレイヤー上に約  $1.5 \times 10^6/\text{ml}$  の HDF または、 $8 \times 10^5/\text{ml}$  の C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> を分散したコラーゲン溶液を 3ml 加えてゲル化させ、細胞レイヤーを作製した。コラーゲンが凝固した後、DMEM 培養液を 4ml 加え培養を行った。3次元培養および以下のすべての実験は 37°C炭酸ガスインキュベーター内で行った。

### (2) 加圧負荷実験

培養 5~7 日後に加圧負荷実験を行った。テフロン被膜加工したスチールプレートを 3次元培養細胞の上に乗せ、ディッシュ底面に永久磁石を 3点に設置し、プレートが磁石に引き寄せられることによりサンプルに加圧負荷をかけた。ディッシュ磁石間のスペーサー厚による負荷圧変化量を EZ-Graph (島津製作所) を用いて測定した。本研究ではスペーサー厚は 2mm、負荷量は約 100g/cm<sup>2</sup> (約 74mmHg/cm<sup>2</sup>) で 5時間の負荷とした。なお、低酸素刺激実験との比較サンプルでは、2時間の負荷時間とした。

### (3) 低酸素刺激実験

加圧負荷実験では、細胞は低酸素環境にさらされることを考慮し、HDF を低酸素下 (5%酸素、95%窒素) で培養した。低酸素暴露時間は 30分、60分、120分とした。

#### (4) サンプル作成

##### ①RNA・cDNA サンプル

加圧負荷終了後、氷冷 PBS<sup>(-)</sup>にて洗浄を行った後、コラゲナーゼ (約 4,000units) を加えゲルを可溶化した。次いで、TRIZOL 試薬 (Invitrogen, life tech.) を用いて総 RNA 抽出を行った。総 RNA 2.1 $\mu$ g から Oligo(dT)<sub>12-18</sub> をプライマーとし、SuperScript II 逆転写キット (Invitrogen) を使用し、1 本鎖 cDNA を合成した。

##### ②組織サンプル

コントロール群および実験群のサンプルを、実験終了後直ちに 10%ホルマリンにて固定し、脱水・包埋にてパラフィンブロックとした。ブロックから、4 $\mu$ m および 8 $\mu$ m の薄切切片を作成した。また、法医解剖体から摘出した急性期褥瘡のサンプルも同様の方法で薄切切片を作成した。

#### (5) RT-PCR

PCR 反応液は総量 20 $\mu$ l とし、反応液組成は cDNA (50ng 総 RNA 相当量)、10mM Tris-HCl (pH 8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.2mM dNTP mix、0.5 $\mu$ M プライマー、0.5U Ampli Taq Gold DNA ポリメラーゼ (Perkin-Elmer Co.) である。なお、cDNA サンプル間の量的相違を補正するために、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH を用いた。

#### (6) 染色

作成したサンプルに対し、In situ Apoptosis Detection Kit (TaKaRa) を使用し、TUNEL 染色を行った。また、TUNEL 染色での陽性反応がアポトーシスの発現であるか否かを、活性型 caspase3 の抗体 (Anti-human/mouse caspase3 active, R&D) を用いた免疫染色にて再確認した。免疫染色は、LSAB+ Kit/HRP for Mouse/Rabbit/Goat (DAKO) を使用した。なお一次抗体の反応時間は overnight とした。

#### 4. 研究成果

(1) 加圧負荷実験での低酸素状態に対する細胞応答という面を考慮し、低酸素下での皮膚線維芽細胞の細胞応答を確認した。その結果、これまでの加圧負荷実験から得た加圧負荷により発現が有意に増加した多くのサイトカイン類 (TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 など)、シクロオキシゲナーゼ (COX)-2 の遺伝子は低酸素刺激によっても発現が増加するが、MMP-9、-13 および熱ショックタンパク (HSP70) の遺伝子発現は低酸素下においても増加しないという結果を得た。このことは、MMP-9、-13、HSP70 の遺伝子は加圧という機械的刺激に特異的な応答によって発現する可能性が示された。HSP70 は、熱刺激や低酸素刺激により合成が促進されるタンパクのひとつであり、アポトーシスの抑制など生体防御に関与すると言われている。しかし、線維芽細胞では低酸素によっても HSP70 の含有量は増加しないという報告があり、皮膚線維芽細胞では HSP70 は加圧刺激に特異的に反応するという本研究の結果を支持していると考えられる。

これらの結果から、加圧刺激により細胞外マトリックスの分解酵素である MMP が単独に活性化され、細胞外マトリックスの分解を促進し、褥瘡発生に関与する可能性が示唆された。また、HSP70 の発現は、褥瘡発生の抑止力として機能している可能性が考えられる。今後は褥瘡組織における HSP70 の発現について検討し、褥瘡発生の抑制因子となっている可能性について検討することで、新たな見地が得られると考える。

なお、低酸素刺激・加圧刺激両者で発現が増加したサイトカイン類、COX-2 は、生体への加圧負荷による血流障害により、2 次的に褥瘡発生へ関与している可能性も十分考えられる。そのため、これらの遺伝子発現と褥

瘡発生への関連性については、継続して検討することが必要である。

また、筋管細胞に関しては、加圧負荷実験で HDF と同様の結果を得ている。そのため、今後は低酸素刺激による反応を確認する予定である。

(2) HDF サンプルを染色にて検討した結果、TUNEL 染色像では、切片ごとの全細胞における TUNEL 陽性細胞の割合が、コントロール群では平均 1.3%であったのに対し、実験群では平均 3.8%でありコントロール群に比して約 3 倍 ( $p > 0.05$ ) と有意に増加した結果を得た。また、免疫染色にてカスパーゼ-3 の陽性細胞が、コントロール群ではほとんど確認されなかったのに対し、実験群では点在し確認できた加圧刺激によって有意に増加することを明らかにした。また、法医解剖体から摘出した急性期褥瘡の染色も同様に、褥瘡発生部位にカスパーゼ-3 陽性細胞を多く観察した。カスパーゼ-3 は、アポトーシスのシグナル伝達に関連するカスパーゼファミリーのうち、最も下位で作用するエフェクターのひとつである。これらの結果から、褥瘡発生にはアポトーシスが関与していることと、このアポトーシスの発現には、加圧負荷された皮膚線維芽細胞の応答が関与している可能性が示唆された。加圧という機械的刺激がシグナルとなって直接細胞にアポトーシスを引き起こすのか、またはサイトカインの発現等により二次的にアポトーシスが引き起こされるのかは、現時点では判断できない。今後は、この発生機構についてさらに研究を進めていく。

また、筋管細胞においても TUNEL 染色およびカスパーゼ-3 免疫染色で同様の結果を得たが、現在再現性の確認を行っている状況

である。

以上のことから、本研究では褥瘡発生には皮膚および筋肉の構成細胞の圧刺激に対する応答が関与する可能性を示唆できた。この新たな見地からの褥瘡発生機構の検討は、褥瘡発生機構の解明への基礎的研究に貢献でき、さらには新たな褥瘡予防に関する臨床応用への貢献につながると考える。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 高田直子, 佐伯行一: 3 次元培養ヒト皮膚線維芽細胞は加圧刺激によってアポトーシスを誘発する. 日本褥瘡学会誌, 査読有り, 10 (4), 520-524, 2008.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 高田直子, 佐伯行一: 加圧刺激によるアポトーシスの誘発の検討 (第 2 報). 第 10 回日本褥瘡学会学術集会, 平成 20 年 8 月 30 日, 神戸国際展示場.
- ② 高田直子, 佐伯行一: 褥瘡発生機構に関する基礎的研究-加圧刺激に特異的に応答する遺伝子の検討-. 第 9 回日本褥瘡学会学術集会, 平成 19 年 9 月 7 日, 群馬県民会館.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 直子 (TAKADA NAOKO)  
滋賀医科大学医学部・講師  
研究者番号: 10432303