

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10025

研究課題名(和文) 大気圧プラズマのケロイド・肥厚性瘢痕に与える影響に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research for the effect of plasma-activated lactate Ringer's solution on keloid and hypertrophic scar

研究代表者

亀井 譲 (Kamei, Yuzuru)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10257678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、乳酸リンゲル液に大気圧プラズマを照射したプラズマ活性乳酸リンゲル液(PAL)によるケロイド・肥厚性瘢痕に与える影響について検討した。PALの活性種濃度を測定した。次にPALの皮膚創傷治癒関連細胞へ与える影響を定量PCRにて解析したところ、PALは真皮線維芽細胞に影響を与えることが示された。さらに、動物モデルの作成を試行錯誤したが、結局は成功せず、動物でのPALのケロイド・肥厚性瘢痕への効果は検討できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

われわれ形成外科の扱う疾患の中で、ケロイドや肥厚性瘢痕は日常的な診療に携わる機会の最も多い疾患の一つである。機能的障害・疼痛・醜状による精神的苦痛など患者の負担は大きい。治療に難渋する症例も少なく、新たな治療法の開発が大いに期待されている。本研究での発見は、疾病に苦しむ患者への新たな治療法を提供できる可能性があり、社会的な意義を有すると考える。今後動物モデルでの追加検証が必要であり、その成果がさらなる社会貢献となると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the effect of plasma-activated lactate Ringer's solution(PAL) for keloid and hypertrophic scar. At first, we measured radicals pattern in PAL. Then, we investigated the effect of PAL for cultivating human dermal fibroblasts using quantitative PCR. Cultivating dermal fibroblasts, the expression level of mRNA was changed with PAL. This finding showed there were a possibility to affect keloid and hypertrophic scar formation. We also assayed the expression growth factors in the same procedure. They showed specific expression pattern. And we tried to make keloid and hypertrophic scar animal model several times, but could not success, therefore we could not investigate the effect of PAL to keloid and hypertrophic scar in vivo.

研究分野：プラズマ医学

キーワード：プラズマ医学 ケロイド 肥厚性瘢痕 ケロイド

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

われわれ形成外科の扱う疾患の中で、ケロイドやその類縁疾患である肥厚性瘢痕は日常的な診療に携わる機会の最も多い疾患の一つである。これらは、赤色の隆起した固い組織であり、拘縮による変形など機能的障害だけでなく、疼痛や醜状による精神的苦痛など患者の負担は大きい。その病態は真皮から皮下組織にかけて、硝子様の太い膠原線維束が縦横に錯綜増殖し、平滑筋アクチン(SMA)、ビメンチン陽性の筋線維芽細胞の関与が示唆されている。治療法としては圧迫やシリコンジェルシート貼付による理学的療法、トラニラストや柴苓湯内服、ステロイド密閉療法や局所注射、手術および電子線照射などがある。これらはある程度の効果を認めるものの、易感染性や放射線皮膚障害などの副作用、治療後の再発率が低いことなど難渋する症例も少なくなく、新たな治療法の開発が大いに期待されている。

プラズマは気体を構成する分子が電離し陽イオンと電子に別れて運動している状態であり、電離した気体に相当する。太陽、雷、核融合などの高温プラズマや蛍光灯など真空プラズマなどが知られている。しかし近年、大気圧下で低温なプラズマ(大気圧プラズマ)を生成する技術が開発され、その医療応用に注目が集まっている。

このような学術的背景において、研究分担者の田中らは名古屋大学における医工連携の枠組みの下、大気圧プラズマを用いたがん治療の研究に積極的に取り組んでいる。(2012年から現在までに23報の論文公表と5件の特許公開を達成した)。特にプラズマ照射した溶液による抗腫瘍効果を発見し、これをプラズマ活性化溶液(plasma activated medium: PAM)と名付け、PAMによる脳腫瘍培養細胞へのアポトーシス(プログラム細胞死)誘導の細胞内機構として、生存・増殖シグナリングを抑制することを世界に先駆けて発見した(PLoS One. 18;8(12), 2013)。

以上の経緯から、『大気圧プラズマがケロイド・肥厚性瘢痕の重要な因子である筋線維芽細胞への分化やその増殖を特異的に制御し、その形成抑制や予防効果があるのではないか』、という着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大気圧プラズマを照射した乳酸リンゲル液(plasma activated lactate ringer's solution: PAL)によるケロイド・肥厚性瘢痕に与える影響について検討することである。

具体的には、PALのラジカルパターンを解析し、次に大気圧プラズマの皮膚創傷治癒関連細胞に与える影響を解析した上で、最終的にはケロイド・肥厚性瘢痕動物モデルで、大気圧プラズマによる発症・進展予防や治療の効果検討を進める。

3. 研究の方法

本研究は、大気圧プラズマ照射した乳酸リンゲル液(PAL)によるケロイド・肥厚性瘢痕に与える影響について検討した。具体的には、PAL中のラジカル分布パターンを解析し、次に大気圧プラズマの皮膚創傷治癒に重要な線維芽細胞に与える影響を解析した上で、最終的にはケロイド・肥厚性瘢痕動物モデルで、PALによる進展・予防や治療効果を検討することにした。

PALのラジカルパターン本学にある大気圧プラズマ装置を用いPALを作成した。デジタルパケットテスト(株)共立理化学研究所) H202 及び N02-を測定した。

PALの線維芽細胞へ皮膚に与える影響の検討

ヒト正常線維芽細胞(NHDF, LONZA)を6ウェルプレートに播種し、10%FBS DMEM培にて培養した。同時に別の条件下での培養を行った。さらに、培地のみ(ctrl)、PALまたは乳酸リンゲル液(Lactec)をX%の終濃度になるように添加し37℃、5%CO₂インキュベータにて3日間培養した。プレートより細胞を回収し、RNA抽出(RNeasy® Mini Kit, QIAGEN)、逆転写反応(ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix, TOYOBO)を行い、LightCycler 96 (Roche)によりqPCR(KOD SYBR® qPCR Mix, TOYOBO)を実施した。

ケロイドモデルおよび肥厚性瘢痕モデルの作成

免疫不全マウス背部皮下に、名古屋大学医学部附属病院生命倫理審査委員会にて承認されたプロトコルに従い、得られたヒトケロイドおよび肥厚性瘢痕を細切し、これらを移植することにした。研究期間がコロナ禍の最中でありケロイド・肥厚性瘢痕切除例が少なく、まずは正常皮膚を移植し、ヒト皮膚化モデルの作成を試みた。

大気圧プラズマによるケロイド・肥厚性瘢痕発症・進展予防(抑制効果)の検討

にて作成したモデルに、大気圧プラズマ直接照射またはPAL投与(注入または塗布)を行い、継時的にケロイドの観察を行ない、画像評価を行うこととした。また、8週間後にケロイド組織の組織学的評価、MMPゼイモグラフィによるMMP-2、-9活性測定、ELISAによる組織中タ

ンパク発現量測定を行い評価することにした。

4. 研究成果

PAL のラジカルパターン

われわれの保有するプラズマデバイスを使用し、アルゴン 80%、窒素 10%、酸素 10%の混合ガスを 2slm (1/min) プラズマヘッドに流した条件下で乳酸リンゲル液に照射を行った。H₂O₂ は 6527 μM、NO₂⁻は 1299 μM であった。

PAL の線維芽細胞へ皮膚に与える影響の検討

1) A

A の mRNA 発現が上昇しており、細胞への影響が示唆された。培地のみでは 2.77 倍、乳酸リンゲル液添加群では 2.65 倍であったのに対し、PAL 群では 2.04 倍であった。

2) B、C、D

真皮線維芽細胞では、B の発現が対照群、乳酸リンゲル群、PAL 群でそれぞれ 1.04、0.92、0.73 であり、PAL 投与による真皮由来線維芽細胞の B 分泌の低下の可能性があった。また、対照群、乳酸リンゲル群、PAL 群でそれぞれ 0.78、0.91、0.59 であった。別の条件では真皮線維芽細胞の B 分泌が低下するが、PAL がその低下を抑制している可能性が示唆された。

真皮線維芽細胞の C の発現は対照群、乳酸リンゲル群、PAL 群でそれぞれ 2.43、2.38、3.21 であった。

真皮線維芽細胞の D の発現は対照群、乳酸リンゲル液群、PAL 群ではそれぞれ 6.04、5.65、6.96 であった。

3) E、F

真皮線維芽細胞での E の発現は、対照群、乳酸リンゲル群、PAL 群ではそれぞれ 1.33、1.30、0.83 であった。別の条件下での培養培では、対照群、乳酸リンゲル液群、PAL 群でそれぞれ 0.71、0.74、0.55 であった。

真皮線維芽細胞での F の発現は、対照群、乳酸リンゲル群、PAL 群ではそれぞれ 0.96、0.77、0.64 であった。別の条件下での培養培では、対照群、乳酸リンゲル液群、PAL 群でそれぞれ 0.29、0.34、0.38 であった。

ケロイドモデルおよび肥厚性瘢痕モデルの作成

免疫不全マウス(nu/nu)の背部皮膚に直径 8 mmの生検用パンチで皮膚欠損を作成し、同径のヒト皮膚をナイロン糸で固定し皮膚移植を行った。術後 1 週間では一時的に正着したように見えたが、その後水疱を形成し、最終的には移植片が全壊死して脱落した。植皮片固定のため、体幹をフィルムドレッシングで被服したが、結果は同様であった。次に、マウス背部へ皮下ポケットを作成し、その中へ皮膚片を移植した。2 週間後、移植片上のマウス皮膚を切除し移植片を露出させると正着していたが、1 ヶ月後には同様に皮膚が壊死してしまった。

大気圧プラズマによるケロイド・肥厚性瘢痕発症・進展予防(抑制効果)の検討

動物モデルの作成ができなかったため、PAL のケロイド・肥厚性瘢痕に対する in vivo の検討が行えなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	田中 宏昌 (Tanaka Masahiro) (00508129)	名古屋大学・未来社会創造機構・特任准教授 (13901)	
研究分担者	蛭沢 克己 (Ebisawa Katsumi) (20397459)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	
研究分担者	神戸 未来 (Kanbe Miki) (50597862)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	
研究分担者	高成 啓介 (Takanari Keisuke) (80378190)	愛知県がんセンター(研究所)・がん病態生理学分野・研究員 (83901)	

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