

令和 5 年 5 月 4 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19156

研究課題名（和文）創傷治癒能力とミトコンドリア機能に着目した新規創傷治療法の開発

研究課題名（英文）Development of Novel Wound Therapies Focusing on Wound Healing Ability and Mitochondrial Function

研究代表者

齊藤 泉（Saito, Izumi）

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10836456

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒト口腔粘膜由来線維芽細胞、ヒト皮膚由来線維芽細胞をそれぞれ培養し、ミトコンドリア機能制御に関わる因子（PGC-1 $\beta$ 、TFAM、NRF-1/2）を検討した。また、ラット皮膚欠損モデルを作成し、炭酸ガスペースト塗布による創傷治癒促進効果を確認した。IL-1 $\beta$ 、IL-6等の炎症性マーカーは炭酸ペースト群で減少した。また炭酸ペースト群において、HIF-1 $\alpha$ の減少を認め、低酸素環境が改善されていることが示唆された。VEGF、TGF- $\beta$ 等の創傷治癒マーカーは炭酸ペースト群で増加した。これら創傷治癒マーカーは、免疫染色においても同様の結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、創傷治癒促進のための様々な創傷被覆材や治療法が開発されているが、さまざまな問題が残されている。本研究では、局所的炭酸ガスによる効率的で、新たな創傷治癒促進法の確立を目指すもので学術的意義が示された。また、低酸素環境を改善することにより、創傷治癒促進効果が確認できた。今後、臨床応用として、局所的炭酸ガス投与による効率的で、低リスク・低コストな新規創傷治療法が提供できる可能性があり、社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we cultured human oral mucosa-derived fibroblasts and human skin-derived fibroblasts and investigated the factors related to the regulation of mitochondrial function (PGC-1 $\beta$ , TFAM, NRF-1/2). The effect of CO<sub>2</sub> paste on wound healing was examined in a rat skin defect model. The rates of wound healing were significantly higher in the CO<sub>2</sub> paste group than those in the control group. Inflammatory markers such as IL-1 $\beta$  and IL-6 were decreased in the CO<sub>2</sub> paste group. Wound healing markers such as VEGF and TGF- $\beta$  increased in the CO<sub>2</sub> paste group. The results of the wound healing markers were similar in the immunostaining.

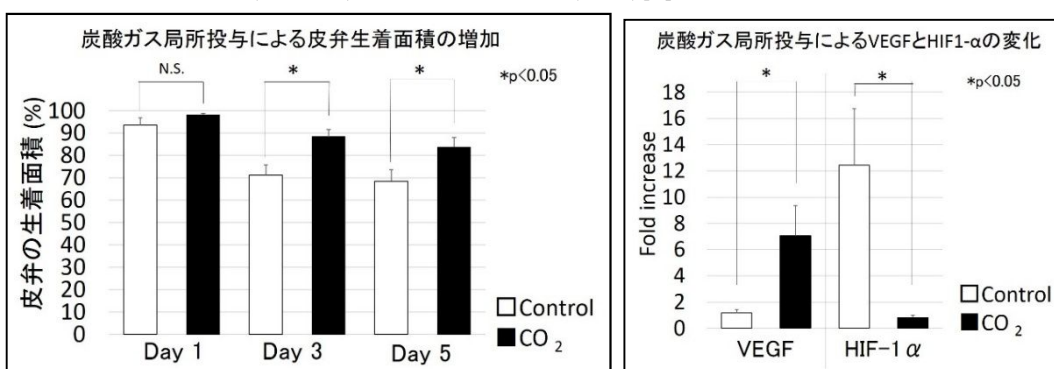
研究分野：創傷治癒

キーワード：炭酸ガス ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

創傷治療は、外科処置後の創部・高齢者に多い褥瘡や糖尿病性潰瘍・若年者の熱傷に至るまで幅広く行われている。現在、日本では1日当たり100万人以上の患者が創傷治療を受けており、そのニーズは増加している。近年では、QOL向上や治療期間短縮を目指して、創傷治癒促進のための様々な創傷被覆材や治療法が開発されているが、被覆材の交換などの医療者への負担や治療に関わる高額な費用など、さまざまな問題が残されている。

さて、炭酸ガス療法は古くから知られており、血流や微小循環の改善に用いられてきた。過去には炭酸泉の創傷治療への応用なども試みられてきたが、水中への浸漬が必要であり、炭酸ガスの吸収率は高くない。したがって、皮膚から効率よく炭酸ガスを吸収する材料の開発が望まれていた。過去にわれわれは、炭酸泉への浸漬における体内への炭酸ガス吸収率と比較し、約50倍の吸収率をしめす経皮的炭酸ガス吸収ゲルを使用した局所的炭酸ガス投与方法を用いて、血管拡張作用とBohr効果により、局所の酸素供給を増やすことと、筋肉細胞内のミトコンドリア量が増加し、その機能が促進することを証明した[1]。また、この投与方法を外科処置後の局所皮弁に応用したところ、皮弁の生着面積が増加し、血管新生・血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の増加と低酸素誘導因子(HIF1- $\alpha$ )の低下を確認した(下図)[2]。



一方、創傷治癒とミトコンドリアは密接な関係があることが、近年報告されているが、皮膚上皮と比較し、口腔粘膜上皮はエネルギー代謝が活発であり、創傷治癒能力が高い理由のひとつとされているが、エネルギー産生の主な担い手であるミトコンドリアの機能が関わっているかは不明である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、異なった細胞間の治癒能力の違いとミトコンドリア機能との関連性を調査し、局所的炭酸ガス投与によって、創傷治癒を促進する新しい治療法の開発を目指すことである。

## 3. 研究の方法

### 細胞の準備

ヒト口腔粘膜由来細胞(線維芽細胞)、ヒト皮膚由来細胞(線維芽細胞)を用いる。インキュベーター内で37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で培養し、サブコンフルエントまで細胞を増やした。

### 各細胞のミトコンドリア量とその機能の解析

培養後、day 2, 4, 7, 14に、RNAを回収し、Real-time PCR法で測定し、蛋白については、免疫染色で評価した。各細胞の通常培養状態でのミトコンドリア量(mtDNA/nDNA)、ミトコンドリア機能制御に関わる因子(PGC-1, TFAM, NRF-1/2)を検討した。

### ラット創傷治癒モデルの作成

皮膚欠損モデルとして、8週齢のSDラット背部皮膚に直径8mmの円形の全層皮膚欠損創を作成した。

### 炭酸ペースト塗布

材料内に炭酸ガスを保持し、外部からの炭酸ガス供給を必要とせず、局所的に炭酸ガス投与ができる局所塗布剤(炭酸ペースト)を使用し、投与時間10分間、週5回、同ペーストの塗布を行った。

#### 各群における創傷治癒関連因子の解析

コントロール群、炭酸ペースト群において、7、14、21日目の創部の写真撮影を行い、創傷治癒の観察および Image J を用いた面積の測定を行った。またそれぞれの time point で組織を採取し、RNA を回収し、Real-time PCR 法で、創傷治癒関連因子 (VEGF, TGF- $\beta$ )、低酸素誘導因子 (HIF-1 $\alpha$ )、炎症性マーカー (IL-6, IL-1 $\beta$ ) の計測を行った。また、蛋白レベルでは、同様に免疫染色を行った。

#### 4. 研究成果

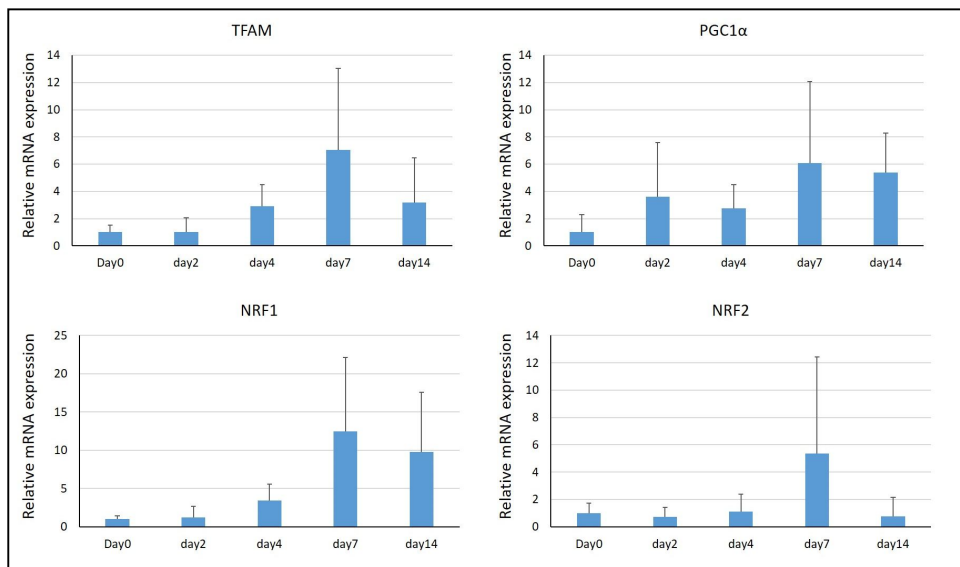
##### 培養細胞における細胞数変化

通常培養状態において、ヒト口腔粘膜由来細胞 (線維芽細胞)、ヒト皮膚由来細胞 (線維芽細胞) とともに、day 2, 4, 7 と経時的に細胞数が増加した。

##### 培養細胞におけるトコンドリア機能制御に関わる因子 (PGC-1 $\alpha$ , TFAM, NRF-1/2) の変化

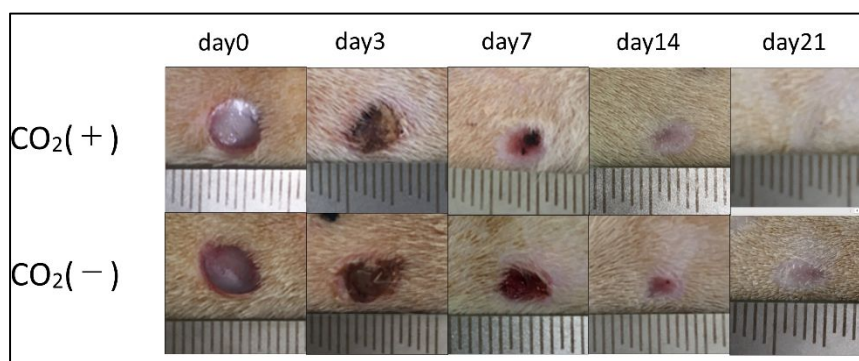
Real-time PCR において、ヒト皮膚由来細胞 (線維芽細胞) とともに、培養後 7 日目において、PGC-1 $\alpha$ , TFAM, NRF-1/2 がピークをむかえた。一方、ヒト口腔粘膜由来細胞 (線維芽細胞) では、ピークがより早い傾向があった。また、免疫染色でも同様の結果を示したが、各 well ごとの差が大きく、バラツキのある結果となったため、有意ではなかった。

図 1: ヒト皮膚由来細胞 (線維芽細胞) における PGC-1 $\alpha$ , TFAM, NRF-1/2 の経時変化



##### ラット創傷治癒モデルにおける炭酸ガスペーストの効果

7 日目以降コントロール群と比べて炭酸ガスペースト群での創の縮小が肉眼的に観察された。21 日目では炭酸ガスペースト群ではほぼ損傷部位はわからなかった。(下図 2)



##### 創傷治癒面積の測定

創傷治癒面積を Image J (ImageJ (a public domain software available at <https://imagej.nih.gov/ij/>)) を用いて計測し、半定量化した。術後 3 日目では両群では 30% 程度の治癒が進行したが、有意差はなかった。7 日目以降では炭酸ガスペースト群において有意に創傷治癒の促進がみられ、21 日目では炭酸ガスペースト群ではほぼ治癒していた (下図 3)。

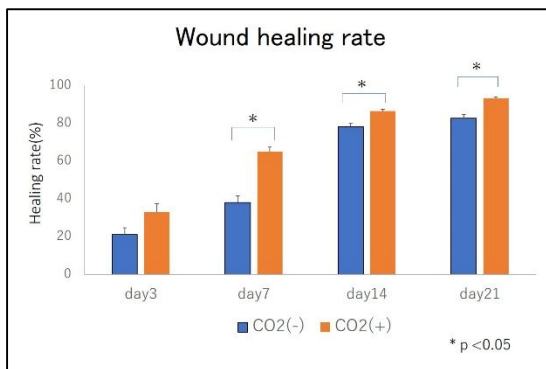
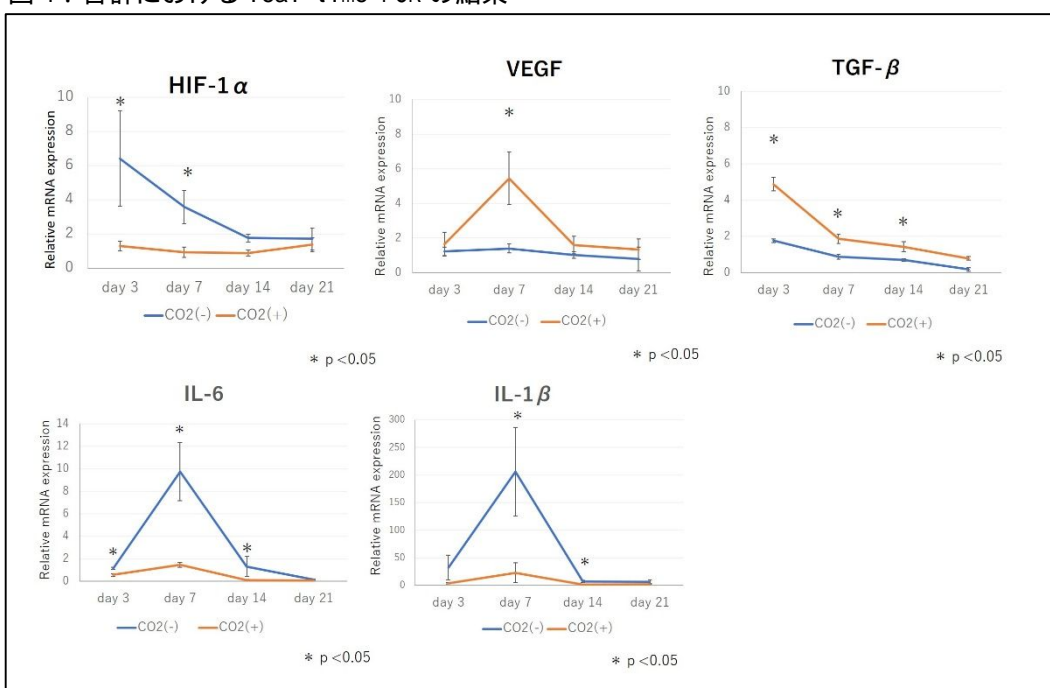


図 3 : 創傷治癒面積

各群の創傷治癒過程における創傷治癒関連因子の変化(real time PCR)

IL-1 , IL-6 等の炎症性マーカーは炭酸ペースト群で減少した。また炭酸ペースト群において、HIF-1 の減少を認め、低酸素環境が改善されていることが示唆された。VEGF, TGF- 等の創傷治癒マーカーは炭酸ペースト群で増加した。

図 4 : 各群における real time PCR の結果



各群の創傷治癒過程において、創傷治癒関連因子の変化(組織学的変化および免疫染色)

HE 染色において、3 日目では、両グループで炎症細胞がみられ、7 日目では線維芽細胞の増殖が確認された。7 日目の炭酸ガスペースト群ではコントロール群よりも線維芽細胞が密に配列している。14 日目には炭酸ガスペースト群で癒痕の明らかな縮小が観察された。さらに、21 日目にはコントロール群では癒痕が残存しているのに対し、炭酸ガスペースト群ではほぼ治癒していた。(図 5)

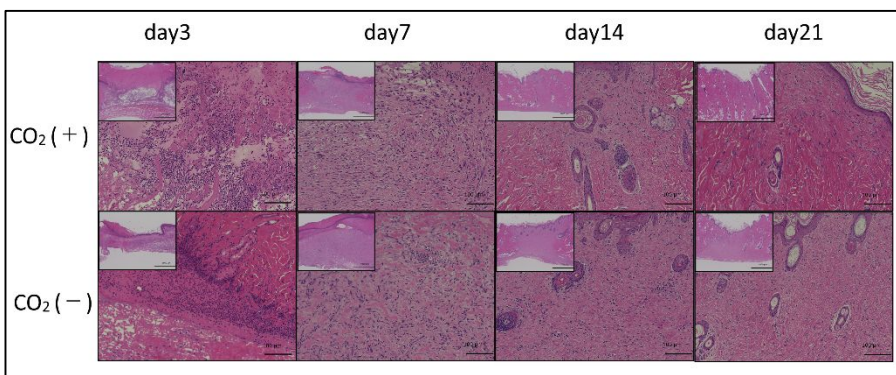
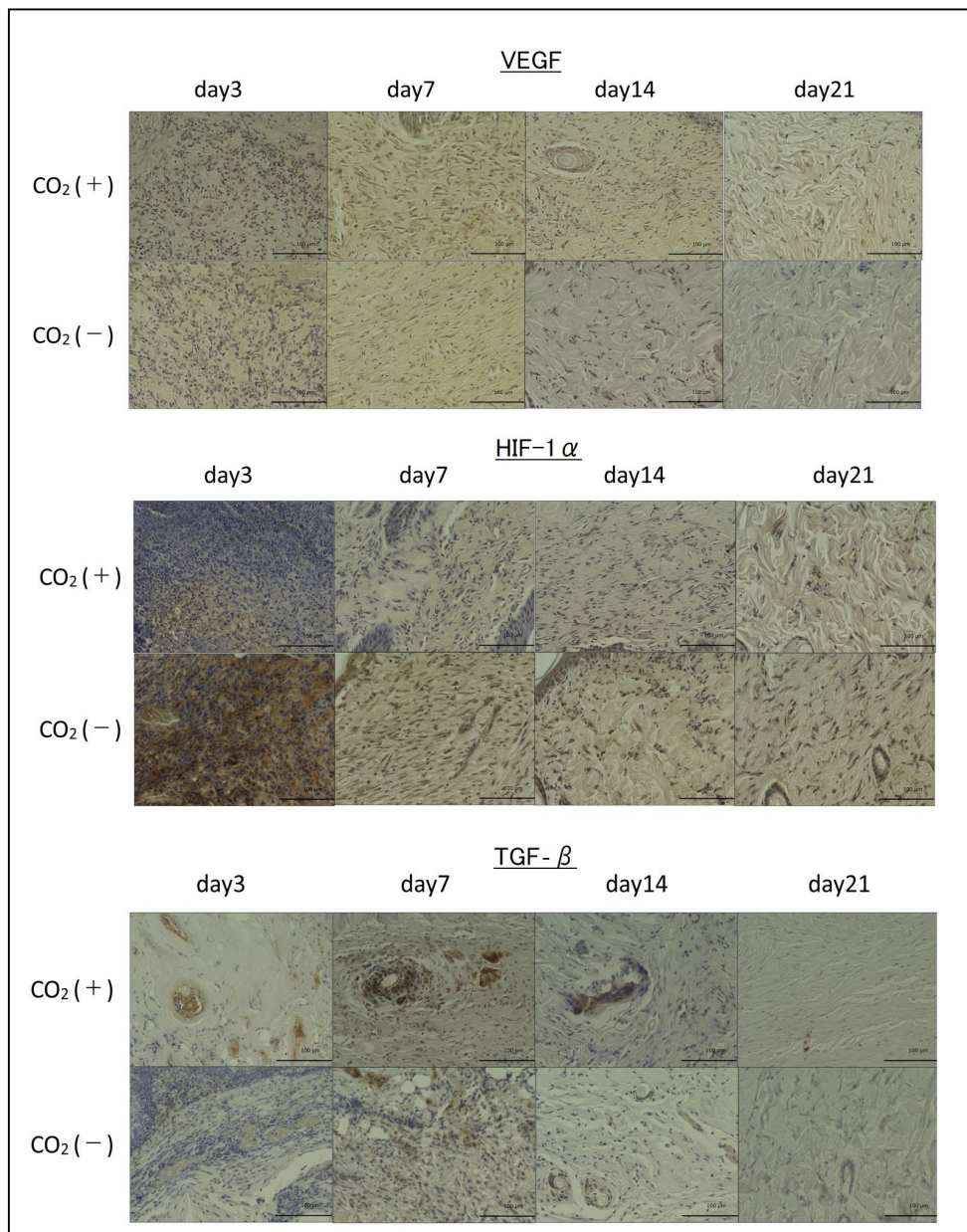


図 5 : HE 染色

免疫染色において、先の結果と同様、炭酸ペースト群において、HIF-1 の減少を認め、低酸素環境が改善されていることが示唆された。VEGF, TGF- 等の創傷治癒マーカーは炭酸ペースト群で増加した。(図 6)

図 6 : 免疫染色



< 引用文献 >

1. Oe K, Ueha T, Sakai Y, Niihara T, Lee SY, Koh A, Hasegawa T, Tanaka M, Miwa M, Kurosaka M. The effect of transcutaneous application of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) on skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Apr 1;407(1):148-52.
2. Saito I, Hasegawa T, Ueha T, Takeda D, Iwata E, Arimoto S, Sakakibara A, Akashi M, Sakakibara S, Sakai Y, Terashi H, Komori T. Effect of local application of transcutaneous carbon dioxide on survival of random-pattern skin flaps. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2018 Nov;71(11):1644-1651.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

|  |                      |
|--|----------------------|
| 1. 著者名<br>Amano-Rika, Hasegawa Takumi, Takeda Daisuke, Murakami Aki, Yatagai Nanae, Saito Izumi, Arimoto Satomi, Kakei Yasumasa, Sakakibara Akiko, Akashi Masaya | 4. 巻<br>13           |
| 2. 論文標題<br>Local Application of Transcutaneous Carbon Dioxide Paste Decreases Inflammation and Accelerates Wound Healing   | 5. 発行年<br>2021年      |
| 3. 雑誌名<br>Cureus   | 6. 最初と最後の頁<br>e19518 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.7759/cureus.19518  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-            |

|  |                   |
|--|-------------------|
| 1. 著者名<br>Yatagai Nanae, Hasegawa Takumi, Amano Rika, Saito Izumi, Arimoto Satomi, Takeda Daisuke, Kakei Yasumasa, Akashi Masaya | 4. 巻<br>2021      |
| 2. 論文標題<br>Transcutaneous Carbon Dioxide Decreases Immunosuppressive Factors in Squamous Cell Carcinoma In Vivo                  | 5. 発行年<br>2021年   |
| 3. 雑誌名<br>BioMed Research International  | 6. 最初と最後の頁<br>1～9 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1155/2021/5568428  | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>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<br>-         |

|  |                             |
|--|-----------------------------|
| 1. 著者名<br>Yatagai Nanae, Hasegawa Takumi, Kyotani Katsusuke, Noda Tomohiro, Amano Rika, Saito Izumi, Arimoto Satomi, Takeda Daisuke, Kakei Yasumasa, Akashi Masaya | 4. 巻<br>101                 |
| 2. 論文標題<br>Exploratory clinical trial to evaluate the efficacy and safety of carbon dioxide paste in healthy people  | 5. 発行年<br>2022年             |
| 3. 雑誌名<br>Medicine   | 6. 最初と最後の頁<br>e29511～e29511 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1097/MD.00000000000029511  | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>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<br>-                   |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>天野利香、長谷川巧実、齊藤泉、武田大介、明石昌也        |
| 2. 発表標題<br>炭酸ガスペーストによるラット癒痕モデルでの癒痕治療効果について |
| 3. 学会等名<br>第64回公益社団法人 日本口腔外科学会総会・学術大会      |
| 4. 発表年<br>2019年                            |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|