

平成 23 年 4 月 20 日現在

機関番号：11301
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2008～2010
課題番号：20592096
研究課題名(和文) 組織血流とバイオフィルム形成の創傷治癒における研究
研究課題名(英文) The effects of tissue perfusion for wound biofilm

研究代表者

武田 睦 (Atsushi Takeda)
東北大学・病院・助教
研究者番号：30333800

研究成果の概要(和文)：緑膿菌のクオラムセンシング機構を調節するホモセリンラクトンに着目し、ホモセリンラクトンを産生できない変異株を播種するとPA01株に比してTNF- α 産生と治癒促進効果が低下した。またホモセリンラクトンを産生できない変異株による治癒促進抑制は、添加したホモセリンラクトンによってPA01と同様な効果が見られた。

研究成果の概要(英文)：

Inoculation with *Pseudomonas aeruginosa* had accelerated re-epithelialization in rats wounds. Flow cytometry detected higher levels of TNF- α in the infiltrating neutrophils. Quorum sensing mutant induced delayed wound healing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：創傷治癒、感染、バイオフィルム、TNF- α

1. 研究開始当初の背景

実験動物に創を作成し、創面に細菌を播種すると創傷治癒(表皮化)が促進されることが1980年代に報告されている。われわれもラットに開放創を作成し、緑膿菌を播種すると細菌播種したとこ

ろ、好中球浸潤に伴って著明な表皮化の促進が観察された。細菌のcolonizationにより通常の創傷治癒と異なる創傷治癒機構が働くことが推定され、その際に生体側の要因として表皮細胞と白血球の作用があると推定できる。白血球は細

菌と接触すると多核白血球に活性化されるが、細菌 colonization がある状況下の表皮細胞の遊走・進展に関しては殆ど研究されていない。

生体内で、同様な細菌 colonization と組織再生が問題となっている分野が肺胞上皮である。肺嚢胞症において慢性的な細菌感染状態と肺胞上皮の再生が問題となっており、細菌が形成するバイオフィームと多核白血球の働きが研究されている。この表皮細胞由来の増殖因子が多核白血球のアポトーシスを抑制することによって慢性炎症状態が継続される。この表皮細胞由来の多核白血球の活性化とは別の経路で、バイオフィームのクオラムセンシング機構を調整している物質のホモセリンラクトンによっても白血球が活性化される経路も発見されている。肺胞と同じようなメカニズムが慢性皮膚潰瘍創でも起こっていることが予想され、遊走表皮のサイトカイン分析や NF κ B の発現、白血球の膜構造の変化を解明することにより、慢性皮膚潰瘍創の理解・治療に新しい道筋を作ることが可能となる。

2. 研究の目的

(1)動物モデルでの検討

ラット背部に単茎皮弁を作成し、組織血流量を変化させ得る創傷環境を作成する。皮弁上に開放創を作成し、ワイルド株の緑膿菌と遺伝子 rasI と rhII を欠損する緑膿菌を播種させ、経時的に白血球を回収し、白血球の活性化の変化を FACS で検討する。組織の血流量の変化、遺伝子欠損による autoinducer の白血球への影響を検討する。白血球の膜構造の変化、受容体の変化を染色および電顕像において検討する。表皮細胞に対する影響は免疫組織化学的に検討する。

(2)細胞培養における遺伝子解析

表皮細胞シートにワイルド株の緑膿菌と遺伝子 rasI と rhII を欠損する緑膿菌を接触させ、G-CSF, GM-CSF の発現を RT-PCR で解析する。

(3)動物モデルを用いた autoinducer 投与実験

動物モデルに実際の緑膿菌ではなく、autoinducer のみを投与し、表皮化の程度、表皮細胞の G-CSF, GM-CSF の発現を免疫組織化学的に検討する。

(4)嫌気性菌感染合併による影響の検討

実際の慢性皮膚潰瘍では、多菌種ことに嫌気性菌による感染が多いとされる。動物モデルを用いて、緑膿菌と *Bacteroides fragilis* を混合感染させ、その創傷治癒に与える影響を検討する。

(5)バイオフィーム抑制剤の動物モデルでの投与

肺感染症では初期の抗生物質の吸入が有効であるとされている。またバイオフィームのなかのクオラムセンシング機構の中心である autoinducer 阻害剤も自然植物中に認められ、合成されている。Furanone C30 が慢性呼吸器感染症において有効であることが知られている。動物モデルを用いてこれらの autoinducer 阻害剤が使用可能かを検討する。

3. 研究の方法

(1)動物モデルでの白血球活性化の検討

ラット背部に右図のような単茎皮弁を作成する。皮弁基部から作成する創の距離を変えることによって、組織血流量を変化させ得る創傷環境を作成する。皮弁上に 6 mm 直径の開放創を作成し、ワイルド株の緑膿菌と遺伝子 rasI と rhII を欠損する緑膿菌を播種する。①白血球の膜抗原の変化を FACS で検討する。創部へ緑膿菌を播種した後、およそ 5 時間で白血球の創部への遊走が起こることが予備実験で確認した。そこで細菌播種後 5 時間、10 時間、24 時間後に創面をヘパリン含有生理食塩水で洗浄し、表面の白血球を回収する。回収した白血球は FITC でラベルした CD66

b、PE でラベルした CD14, CD16, CD18, CD19, CD34, CD62L, CD64 で二重染色を行い、FACS で分析する。得られた染色パターンにより、創表面に遊走する白血球の中の多核白血球、T・B リンパ球、単球、幹細胞の割合を測定し、経時的变化を緑膿菌ワイルド株、遺伝子欠損株について検討する。さらに細菌バイオフィルムの糖脂質に反応して増加することが予想される CD14、 β 2 インテグリン CD18 の発現パターンを解析する。

②透過電顕像における白血球の膜構造の変化

緑膿菌ワイルド株、遺伝子欠損株を播種し、5 時間、10 時間、24 時間後に組織を摘出、グルタルアルデヒド固定する。4 酸化オスミウム染色後超薄切片を作成し白血球の核と表面膜構造の変化を観察する。

(2)創表面のバイオフィルムの観察

新鮮組織から凍結切片を作成し、GFP 発現タンパクを組みこんである細菌とローダミン Concanavalin A (FITC-ConA) の二重染色によりバイオフィルムを 3 次元的に観察する。グルタルアルデヒドの固定を行った後、温度を段階的に落としながら脱水を行う方法 (progressive lowering of temperature technique) を用い、走査電顕像を観察することにより、バイオフィルムの形成と白血球の関係を経時的に観察する。

(3)表皮細胞に対する影響

①サイトカイン定量

細菌播種後 5 時間、10 時間、24 時間後の組織を表面の細菌を洗浄で除去した後に、パンチバイオプシーで切除する。ポリトロンでホモジェナイズ後遠心し、上清を得る。表皮細胞に含まれるサイトカインを Bio-Plex cytokine analysis kit を用いて測定する。

②免疫組織化学的検討

一部の組織はパラホルムアルデヒド固定後、polyclonal anti-G-CSF を用いて免疫染色し、表皮細胞内の G-CSF の発現を観察する。

(4)細胞培養における遺伝子解析

表皮細胞シートにワイルド株の緑膿菌と遺伝子 rasI と rhII を欠損する緑膿菌を接触させ、G-CSF, GM-CSF の発現を RT-PCR で解析する。10 cm dish に表皮細胞の単層培養シートを作成する。緑膿菌を 60 分間接触させ、洗浄後 RLT buffer で表皮細胞を回収し、total RNA を得る。RT-PCR のプライマーはヒト G-CSF、ヒト GM-CSF、 β -actin を用いる。

(5)動物モデルを用いたクオラムセンシング調節物質投与実験

動物モデルに実際の緑膿菌ではなく、

autoinducer (ホモセリンラクトン) のみを投与し、表皮化の程度、表皮細胞の G-CSF, GM-CSF の発現を前述の方法で免疫組織化学的に検討する。なおホモセリンラクトンはすでに精製済みである。

(6)嫌気性菌感染合併による影響の検討

実際の慢性皮膚潰瘍では、多菌種ことに嫌気性菌による感染が多いとされる。動物モデルを用いて、緑膿菌と *Bacteroides fragilis* を混合感染させ、その創傷治癒に与える影響を検討する。*Bacteroides fragilis* は ATCC 株を入手済みであり、嫌気性培養方法も習得済みである。虚血皮弁と対照の正常血流の皮膚に全層欠損創を作成し、緑膿菌と *Bacteroides fragilis* の濃度を変えて播種し、創傷治癒に与える影響、バイオフィルム形成速度、表皮細胞のサイトカイン発現を前述の方法で計測する。

(7)感染合併による影響の検討

前年度の実験に加えて、緑膿菌と *Bacteroides fragilis*、黄色ブドウ球菌を混合感染させ、より臨床に近いモデルを作成し、その創傷治癒に与える影響を検討する。

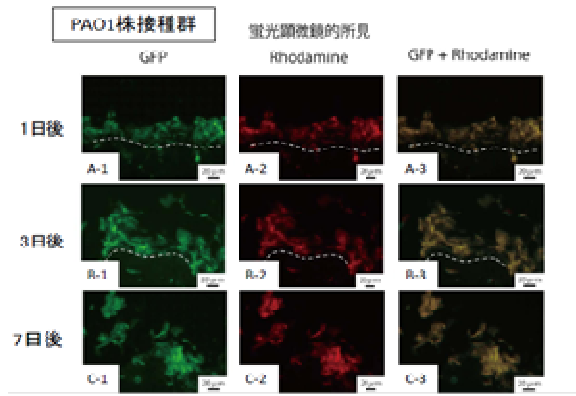
(8)バイオフィルム抑制剤の動物モデルでの投与

肺感染症では初期の抗生物質の吸入が有効であるとされている。またバイオフィルムのなかのクオラムセンシング機構の中心である autoinducer 阻害剤も自然植物中に認められ、合成されている。Furanone C30 が慢性呼吸器感染症において有効であることが知られている。動物モデルを用いてこれらの autoinducer 阻害剤が使用可能かを検討する。

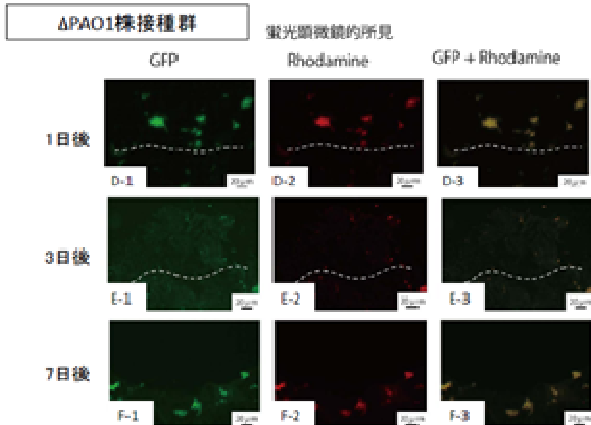
4. 研究成果

(1)動物実験モデルの確立

マウス背側皮膚に 6mm パンチで真皮最下層を残す全層創を作製後、細菌 (GFP 発現プラスミドを導入した緑膿菌 PA01 株) を接種し、経時的に観察を行った。緑膿菌非接種群と比較し、緑膿菌 PA01 を接種した群では、3 日目に好中球の集積と上皮化の促進を認め、創部への白血球数の顕著な増加がみられた。



(2) 播種する細菌に関する知見
 緑膿菌のクオラムセンシング機構を調節するホモセリンラクトンに着目し、ホモセリンラクトンを産生できない変異株を播種すると PAO1 株に比して TNF- α 産生と治癒促進効果が低下した。

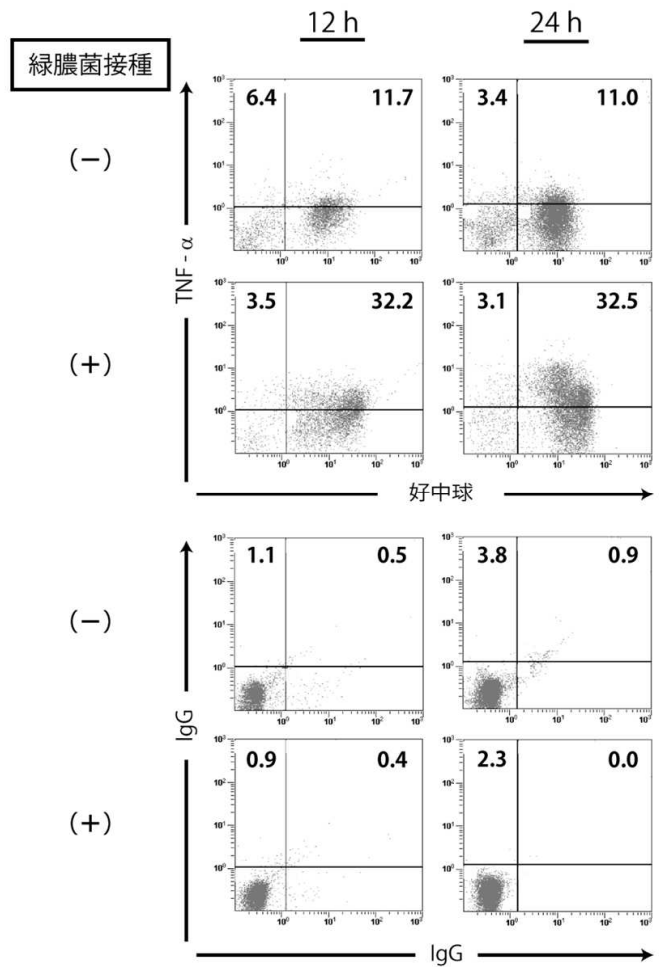


(3) 細菌播種による mRNA の変化
 12 時間目の抽出組織において、TNF- α が mRNA レベルおよび蛋白レベルにおいて誘導されていることを確認した。



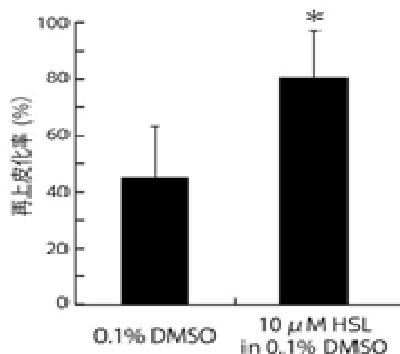
(4) 創部に集積する白血球の解析

フローサイトメトリーにて集積した白血球を解析した結果、細胞内 TNF- α を発現している好中球の割合が高いことを認めた。創面への緑膿菌接種に伴い創部に集



積する好中球が TNF- α を産生し、創傷治癒過程に積極的に関与する可能性が示唆された。

(5) クオラムセンシング機構に関する研究知見
 ホモセリンラクトンを産生できない変異株による治癒促進抑制は、添加したホモセリンラクトン 3O-C₁₂-HSL によって PAO1 と同様な効果が見られた。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Emi Kannol, Kazuyoshi Kawakami, Masae Ritsu, Keiko Ishii, Hiromasa Tanno, Sohachi Toriyabe, Yoshimichi Imai, Ryoko Maruyama, Masahiro Tachi: Wound healing in skin promoted by inoculation with *Pseudomonas aeruginosa* PA01: the critical role of TNF- α secreted from infiltrating neutrophils. *Wound Repair and Regeneration* 2011 in press. 査読有

2. Kanno E, Toriyabe S, Zhang L, Imai Y, Tachi M. Biofilm formation on rat skin wounds by *Pseudomonas aeruginosa* carrying the green fluorescent protein gene. *Exp Dermatol*. 2010 Feb;19(2):154-6 査読有

3. 館 正弘. 創傷治癒に関する基礎研究とその臨床応用. *日本創傷・オストミー・失禁管理学会誌* 13 (2) 2-7, 2009. 査読無

[学会発表] (計 15 件)

1. 館 正弘. 創傷治癒に対する物理療法の効果. 第 45 回理学療法学会、2010 年 5 月 27 日 岐阜市

2. 館 正弘. 創傷治癒に関する基礎研究とその臨床応用. 第 18 回日本創傷・オストミー・失禁ケア研究会、2009 年 5 月 9 日、仙台市

[その他]

ホームページ等

<http://www.prs.med.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 睦 (Atsushi Takeda)

東北大学・病院・助教

研究者番号 : 30333800

(2) 研究分担者

館 正弘 (Masahiro Tachi)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 50312004

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :