

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K12725

研究課題名（和文）局所陰圧閉鎖療法の科学的根拠に基づいた適正治療指針の策定と適応拡大

研究課題名（英文）Adaption expansion of evidence based negative pressure wound therapy

研究代表者

東 隆一（Azuma, Ryuichi）

防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・病院 形成外科・教授

研究者番号：00531112

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）：局所陰圧閉鎖療法（Negative-pressure wound therapy: NPWT）の治療メカニズムについては基礎研究による十分な裏付けに乏しく、臨床での使用には一定の制限が設けられている。そこで本研究では、NPWTの使用法の最適化と、さらなる技術革新、治療応用につなげるために、治療メカニズム解明のための研究を行った。培養細胞と実験動物を用いた研究結果から、NPWTはTHBS1を介したTGF- β 1制御によって上皮細胞の運動性に影響を与える可能性が示唆された。NPWTにおいてTHBS1がメカニカル応答のメディエーター物質の一つであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果より、局所陰圧閉鎖療法（Negative-pressure wound therapy: NPWT）においてTHBS1がメカニカル応答のメディエーター物質の一つであることが示唆された。NPWTの治療メカニズムについては基礎研究による十分な裏付けに乏しいため、臨床での使用には一定の制限が設けられているが、本研究結果により、THBS1が関連する治癒過程を経る創傷・手術創や組織移植の際にNPWTを適切に使用できることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The therapeutic mechanism of Negative-pressure wound therapy (NPWT) lacks sufficient support from basic research, and certain limitations have been placed on its clinical use. Therefore, this study was conducted to optimize the use of NPWT and to elucidate the therapeutic mechanism in order to lead to further technological innovation and therapeutic application. The results of our studies using cultured cells and experimental animals suggest that NPWT affects epithelial motility through THBS1-mediated TGF- β 1 regulation, suggesting that THBS1 is one of the mediator substances of mechanical responses in NPWT.

研究分野：創傷治癒

キーワード：創傷治癒 局所陰圧閉鎖療法

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

局所陰圧閉鎖療法 (Negative-pressure wound therapy、以下 NPWT) は、創にポリウレタンフォームなどを充填してフィルムで密閉し、内部を吸引して創面に陰圧を付加することで創傷治癒を促進する治療法である。陰圧による創縁の引き寄せ、肉芽形成の促進や浮腫軽減などの効果により創傷治癒が促進するといわれている。最初の使用報告から 25 年、本邦での保険収載から 10 年がたち、その有効性から現在では多くの外科系診療科で日常的に使われている。この間、治療機器の発達とともに臨床での適応疾患も拡大してきた。具体的には洗浄機能を付加した NPWTi-d、ドレッシング材のフォームを使用する単回使用式 NPWT、陰圧の強さを変化させる周期的・間欠的 NPWT、一次閉鎖不能な開腹手術創に対して行われる NPWT などが登場し、その優れた創傷治癒促進効果が認められている。さらに近年では縫合創に対して術直後からドレッシングの代わりに単回使用式 NPWT を行う incisional NPWT (以下 iNPWT) が登場し、その高い手術部位感染 (Surgical site infection、以下 SSI) 予防効果から注目を集めている。

2. 研究の目的

NPWT は商業ベースかつ臨床先行で発展してきた治療法であるため、その治療メカニズムについては基礎研究による十分な裏付けに乏しく、臨床での使用には一定の制限が設けられている。そこで本研究では、NPWT の使用方法の最適化と、さらなる技術革新、治療応用につなげるために、治療メカニズム解明のための研究を行った。

NPWT は従来開放創に対して行われてきたため、基礎研究の対象は肉芽組織を構成する線維芽細胞や内皮細胞が中心であり、NPWT が皮膚ケラチノサイトに与える影響についてはほとんど知見がない。Nuutila らはヒト採皮部の遺伝子プロファイリング研究で、NPWT が短期的には上皮化を促進するものの、長期的にはむしろ上皮障害をきたす可能性を指摘した (Nuutila K, *et al.* Burns. 2013)。我々はこの事象を、「皮膚ケラチノサイトの遊走能の促進と、それに伴う皮膚バリア機能障害」として説明できると考え、細胞外マトリックス糖蛋白質である thrombospondin 1 (THBS1) に注目した。THBS1 は創傷治癒に重要な役割を担い、NPWT で上昇することが知られている transforming growth factor-beta 1 (TGF-β1) の主要な生理的活性化因子の一つであり、近年皮膚ケラチノサイトの遊走 (Siriwach R, *et al.* iScience. 2022) に加え、動脈瘤形成 (Yamashiro Y, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 2020) や骨新生 (Deng R, *et al.* Adv Sci (Weinh). 2022) におけるメカノトランスダクションに重要な役割を担っていることがわかってきている。そこで我々は、まず実験動物を用いた NPWT の治療メカニズムの検証を行い、さらに、陰圧環境下における培養皮膚ケラチノサイトの遊走能に関して、THBS1 の発現に着目して研究を行った。

3. 研究の方法

糖尿病マウスを用いた NPWT モデルの作製

すべての動物実験は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認後に実施した。動物実験には 9 週齢、雌の糖尿病モデルマウスを使用した。除毛したマウスの背部両側に 2 × 3cm の区域を設定し、左側を介入側、右側を非介入側とした。18 匹のマウスを 6 匹ずつ、介入側に何もしないコントロール群、ポリウレタンフォームを当てるだけの AP 群、ポリウレタンフォームを当てて 120 mmHg の連続陰圧を与える NP 群に割り付けた。3 種混合麻酔下で一日あたり 3 時間の治療を計 4 日間行った。コントロール群でも麻酔の投与は同様に行った。4 日目の治療終了後、マウス背部両側の区域中央から組織サンプルを回収した。個体差の調整のため、以下の実験では個体ごとに介入側と非介入側の差を算出して比較した (図 1)。

病理組織学的検討

回収した組織サンプルから病理組織標本を作製した。HE 染色によって表皮および真皮の厚さ

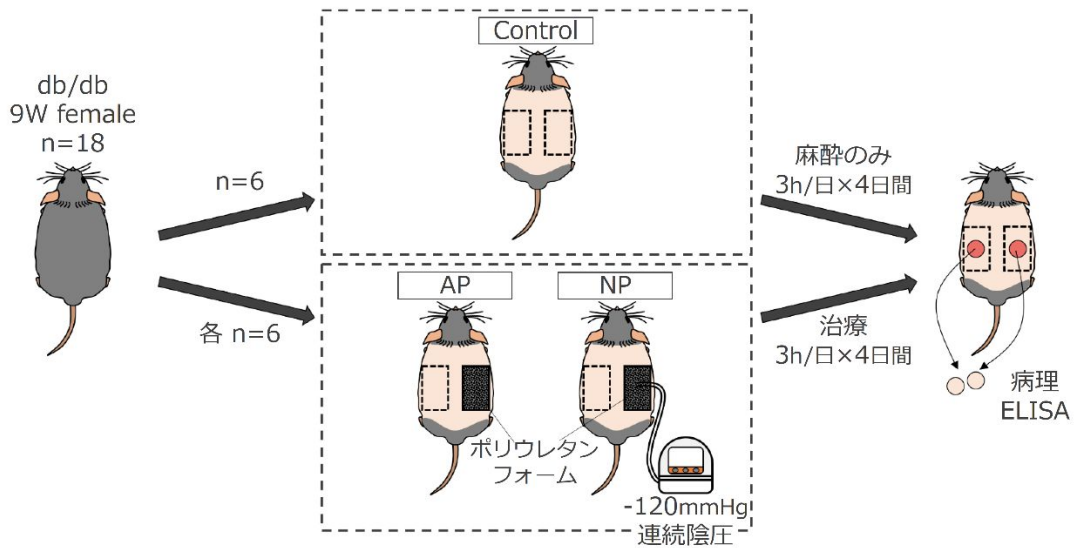


図 1. NPWT を用いた動物実験プロトコール

を比較した。また抗 THBS1 モノクローナル抗体 (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いた免疫組織化学染色を行い、表皮における THBS1 陽性率を Image J で計測し比較した。

マウス皮膚組織における TGF- β 1、THBS1 発現量の評価

回収した組織サンプルをホモジナイズして組織ライゼートを作製し、ELISA キットを用いて TGF- β 1 (Thermo Fisher Scientific, USA)、THBS1 (Aviva Systems, USA) の発現量を評価した。

4. 研究成果

病理組織学的検討

HE 染色の結果、NP 群では他の 2 群に比べて表皮、真皮の厚さが有意に厚かった (図 2)。THBS1 の免疫組織化学染色の結果、NP 群では他の 2 群に比べて表皮における THBS1 陽性率が有意に高かった (図 3)。

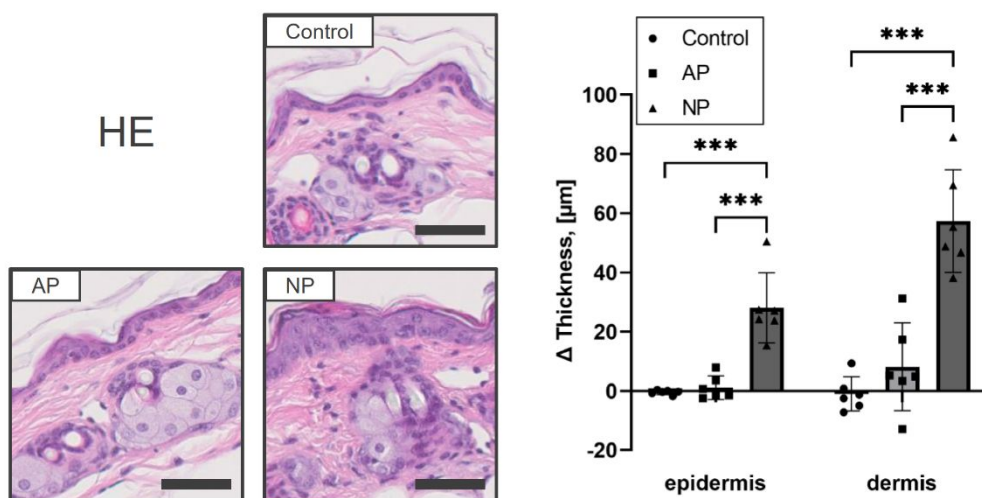


図 2. マウス皮膚の厚さの評価

(左) マウス皮膚組織の HE 染色像。Bar: 50 μm

(右) マウス皮膚の表皮、真皮の厚さの比較。NP 群では他の 2 群に比べて表皮、真皮の厚さが有意に厚かった。(n = 6. Tukey's HSD test, ***p < 0.001.)

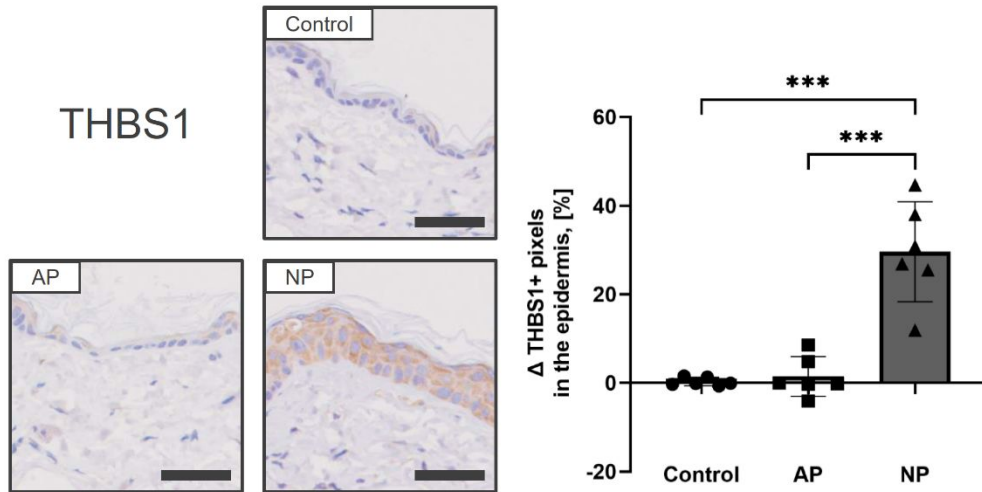


図3. マウス表皮における THBS1 発現の評価

(左) マウス皮膚組織の THBS1 免疫組織化学染色像。Bar: 50 μ m

(右) マウス表皮における THBS1 陽性ピクセルの割合。NP 群では他の 2 群に比べて有意に THBS1 陽性率が高かった。(n = 6. Tukey's HSD test, ***p < 0.001.)

マウス皮膚組織における TGF- β 1、THBS1 発現量の評価

NP 群で Control 群、AP 群に比べて有意に TGF- β 1 及び THBS1 の発現量が増加した(図4)。

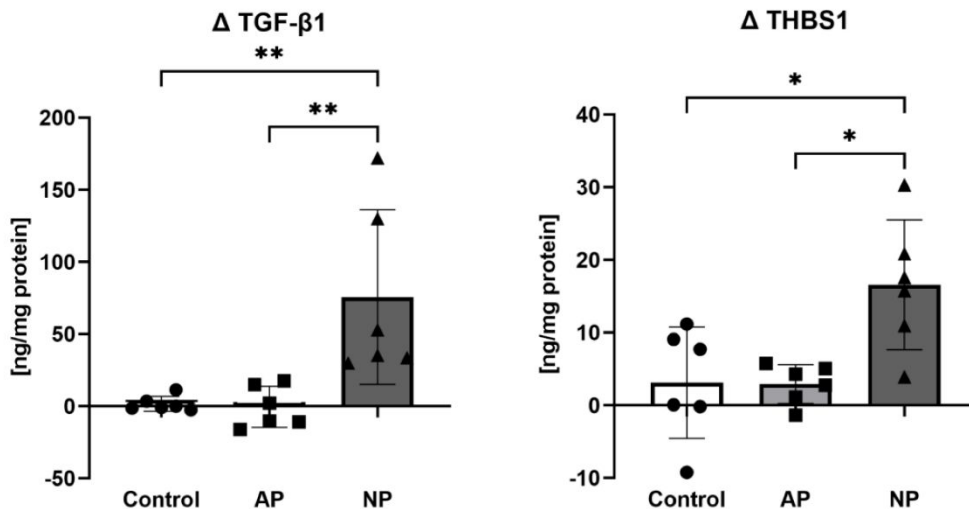


図4. マウス皮膚組織における TGF- β 1 および THBS1 の ELISA 結果

ELISA 法によってマウス皮膚組織中の TGF- β 1 及び THBS1 を測定し、介入側と非介入側の差を TGF- β 1 及び THBS1 として算出した。NP 群で Control 群、AP 群に比べて有意に TGF- β 1 及び THBS1 が高発現していた。(n = 6. Tukey's HSD test, *p < 0.05, **p < 0.01.)

これらの研究の結果、NPWT を施したマウス正常皮膚において TGF- β 1 及び THBS1 の発現量が増加した。THBS1 は表皮ケラチノサイトの移動性サブpopulationで高発現するとされており (Siriwach R, et al. iScience. 2022) NWPT は表皮で THBS1 発現を介してケラチノサイトの移動性を亢進させると考えられた。そこで次に、陰圧環境下での皮膚ケラチノサイトを用いた研究を行った。本研究では、リアルタイム観察を可能とする陰圧下細胞培養装置の開発から実施した (Yamashiro T, et al. Skin Res Technol, 29(1), e13262, 2023.)。この陰圧下細胞培養装置を用いてヒトケラチノサイトの細胞遊走能評価および培養上清中における TGF- β 1、THBS1 の発現量の評価を行ったところ、マウスを用いた研究結果と同様に TGF- β 1 及び THBS1 の発現量が増加し (図5) 陰圧下培養ヒトケラチノサイトの遊走能が促進された。

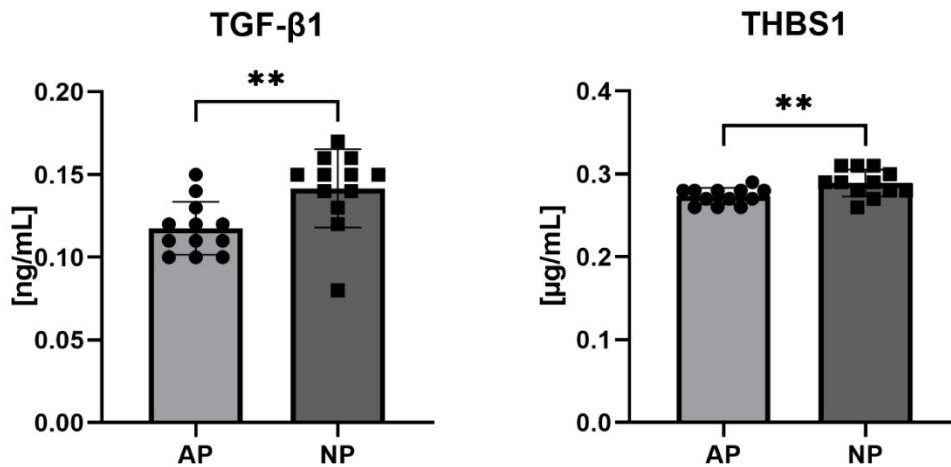


図5. 細胞上清における TGF-β1 および THBS1 の ELISA 結果
 NP 群で AP 群に比べて有意に TGF-β1 及び THBS1 が高発現していた。(n = 12. Student's t-test, **p < 0.01.)

これらの研究結果から、NPWT は THBS1 を介した TGF-β1 制御によって上皮の運動性に影響を与える可能性が示唆された。今回の結果から、THBS1 発現増加による皮膚ケラチノサイトの移動性亢進の結果として上皮化が促進するが、治療が長期にわたり効果が過剰になると皮膚のバリア機能の破綻により上皮障害をきたすものと考えられた。

今回、実験動物と培養細胞を用いた研究で同様の結果が得られた。これらの研究結果から、NPWT において THBS1 がメカニカル応答のメディエーター物質の一つであることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Yamashiro Toshifumi, Kushibiki Toshihiro, Mayumi Yoshine, Tsuchiya Masato, Ishihara Miya, Azuma Ryuichi	4. 巻 20
2. 論文標題 Negative-Pressure Wound Therapy: What We Know and What We Need to Know	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Biology and Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 131 ~ 152
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/5584_2023_773	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 -

1. 著者名 Yamashiro Toshifumi, Kushibiki Toshihiro, Mayumi Yoshine, Tsuchiya Masato, Ishihara Miya, Azuma Ryuichi	4. 巻 29
2. 論文標題 Novel cell culture system for monitoring cells during continuous and variable negative pressure wound therapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Skin Research and Technology	6. 最初と最後の頁 e13262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/srt.13262	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山城利文, 櫛引俊宏, 真弓芳稲, 土屋壮登, 石原美弥, 東隆一
2. 発表標題 局所陰圧閉鎖療法はthrombospondin-1制御により皮膚ケラチノサイトの移動性を向上させる
3. 学会等名 第32回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山城利文, 櫛引俊宏, 真弓芳稲, 土屋壮登, 東隆一, 石原美弥, 清澤智晴
2. 発表標題 局所陰圧閉鎖療法の創傷治癒機序解明にむけた陰圧下培養細胞のリアルタイム観察
3. 学会等名 第31回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東 隆一
2. 発表標題 下腿骨・踵骨骨折術後プレート露出創は陰圧閉鎖療法のみで治癒するか?
3. 学会等名 第63回日本形成外科学会 シンポジウム
4. 発表年 2020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	榑引 俊宏 (Kushibiki Toshihiro) (30403158)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・医用工学・准教授 (82406)	
研究分担者	堀口 明男 (Horiguchi Akio) (20286553)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・病院泌尿器科・准教授 (82406)	

	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
研究協力者	中山 瑛子 (Nakayama Eiko)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・病院形成外科 (82406)	
研究協力者	山城 利文 (Yamashiro Toshifumi)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・病院形成外科 (82406)	

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
---------	---------