

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：34431

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K19398

研究課題名（和文）皮膚の構成細胞を活性化させ褥瘡治癒を促進させる電気刺激療法の確立

研究課題名（英文）Electrical stimulation therapy to promote pressure injury healing by activation of skin cells

研究代表者

植村 弥希子（Uemura, Mikiko）

関西福祉科学大学・保健医療学部・講師

研究者番号：10786601

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：微弱電気刺激（200 μ A、2Hz、250msc）を骨髄由来マクロファージに実施し、その後、リポポリサッカライド（LPS）にて炎症刺激を惹起した。LPS刺激により炎症性サイトカインおよびROS産生は顕著に増加したが、電気刺激群では産生量が有意に抑制されていた。この機序として細胞内代謝に着目したところ、電気刺激によりペントースリン酸経路が賦活され、抗酸化物質であるNADPH産生が著明に増加していたことが明らかになった。以上のことから、電気刺激はマクロファージの細胞内代謝を変化させ、ペントースリン酸経路へ移行させることで抗炎症、抗酸化作用を発揮することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床で使用されている電気刺激機器は小型化、軽量化されている。さらに本研究で使用した刺激条件は皮膚の感覚閾値未満であるため、非侵襲的かつ不快感の少ない治療手段となる。本研究において微弱電気刺激がマクロファージに対し抗炎症作用をもたらすことを明らかにした。マクロファージの過剰な炎症反応を抑制させることが治療目的の一つであるような、慢性炎症を背景とした慢性潰瘍や関節炎などの疾患において、電気刺激療法が治療の一助となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Low intensity electrical stimulation (200 μ A, 2 Hz, 250 msc) was applied to bone marrow-derived macrophages, followed by inflammatory stimulation with lipopolysaccharide (LPS). LPS stimulation markedly increased the production of inflammatory cytokines and ROS, but significantly suppressed their production in the electrical stimulation group. The intracellular metabolism was focused on as the mechanism for this, and it was found that electrical stimulation stimulated the pentose phosphate pathway and markedly increased the production of NADPH, an antioxidant. These results indicate that electrical stimulation alters the intracellular metabolism of macrophages and induces a shift to the pentose phosphate pathway, thereby exerting anti-inflammatory and antioxidant effects.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：電気刺激 物理療法 慢性炎症 マクロファージ 解糖系代謝 NADPH

1. 研究開始当初の背景

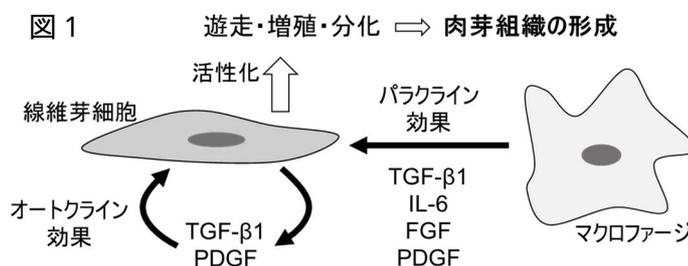
創傷の自然治癒過程では、好中球やマクロファージによる細菌・壊死組織の貪食が生じる炎症期の後に、線維芽細胞が活性化することで肉芽組織が増殖する増殖期を経て治癒に至るが、線維芽細胞の活性化はマクロファージが産生するサイトカインにより惹起される。褥瘡に対する電気刺激療法は国内外の臨床研究において、その治療効果が報告されてきており、申請者はこれまで線維芽細胞の増殖、遊走、分化を促進させる電気刺激条件について明らかにしてきた (Uemura M et al. *ePlasty*. 2016, Yoshikawa Y et al. *Progress in Rehabilitation Medicine*. 2016, Uemura M et al. *Phys Ther Res*. 2021)。当初の研究計画では、電気刺激がマクロファージのサイトカイン産生に与える影響を確認し、電気刺激により放出されたサイトカインが線維芽細胞の遊走、増殖、分化に与える影響について検討する予定であった。本研究により線維芽細胞を活性化させるサイトカイン産生量を増加させる刺激条件が明らかになれば、褥瘡の早期治癒をもたらす電気刺激療法の確立へと展開できる可能性があると考え、本研究の着想にいたった。

2. 研究の目的

電気刺激療法は褥瘡の治癒を促進させることはすでに検証されているが (Khoury C et al. *Wound Rep Reg*. 2017) 創の加速的治癒をもたらす最適条件や治癒メカニズムについては十分に解明されていなかった。

創傷の治癒過程では免疫細胞がはたらく炎症期の後に、線維芽細胞を基盤とした肉芽組織を形成する増殖期へ移行するが、慢性潰瘍である褥瘡ではマクロファージの炎症反応が継続し、増殖期への移行が妨げられている。そのため、慢性潰瘍の治療において炎症期から増殖期へ速やかに移行させることが重要となる。

マクロファージに対する電気刺激の抗炎症作用について既報は散見される程度であり、電気刺激後のマクロファージの線維芽細胞への影響については不明点が多いため、本研究ではマクロファージ電気刺激を行い、産生されるサイトカインならびに線維芽細胞へのパラクライン効果について明らかにすることを目的とした (図1)



3. 研究の方法

マウスの骨髄からマクロファージを抽出、培養した後に電気刺激を実施する。刺激条件は線維芽細胞を活性化させる強度 200 μ A とし、刺激時間は 2, 4, 6 時間とし、細胞生存率を検討したところ、6 時間の刺激で細胞生存率が低下したため、本実験では 4 時間の刺激時間を採用した。

実験

マクロファージに対し電気刺激を 4 時間行った後、リポポリサッカライド (LPS) (100 ng/mL) を添加した。LPS 添加 1.5 時間後に炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-6, IL-1 β) 発現をリアルタイム PCR 法にて、ROS 産生を蛍光染色法にて確認した。さらに、電気刺激による細胞内代謝の変化を確認するため、LS/MS 法にて電気刺激後のマクロファージの細胞内代謝産物を測定した。本実験により電気刺激の抗炎症作用が顕著であったため、その機序および炎症刺激に対する作用の解明を先行させた。

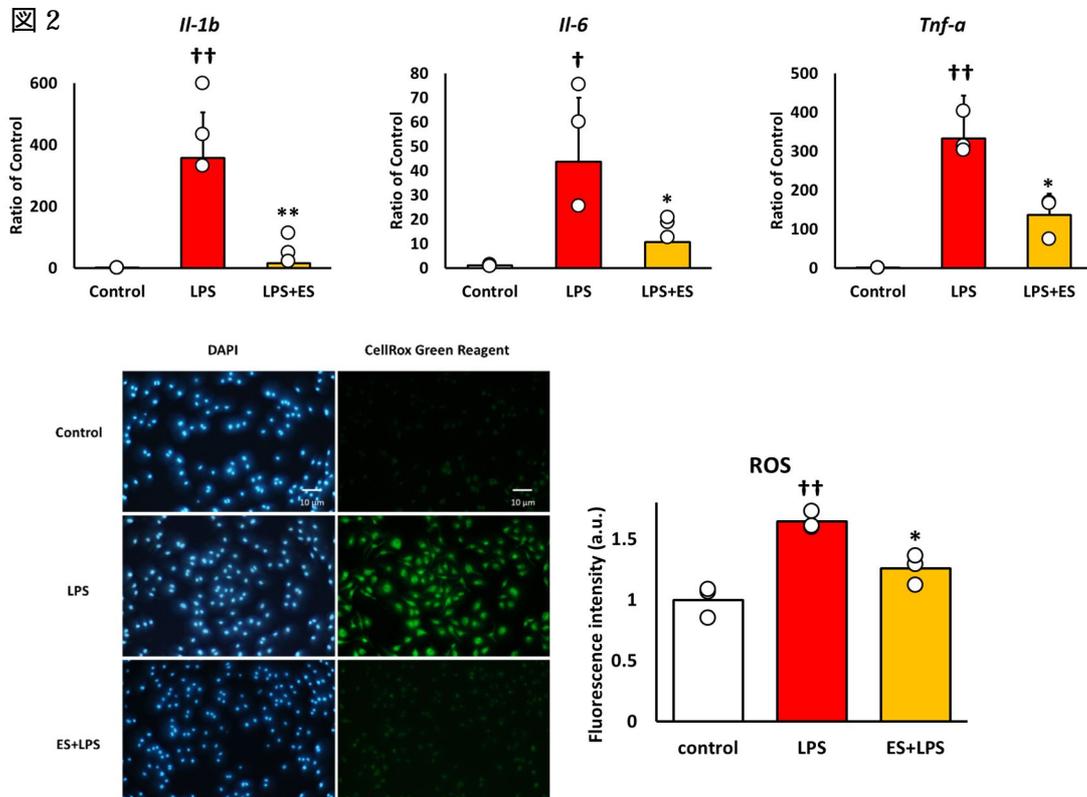
実験

実験 で電気刺激により炎症性サイトカイン発現ならびに ROS 産生が抑制されたため、炎症を惹起したマクロファージに対する電気刺激の効果を検証した。LPS (100 ng/mL) の添加 1 時間後に実験 と同条件の電気刺激を実施した。炎症性サイトカイン発現、ROS 産生ならびに細胞内代謝について実験 と同様に実施した。

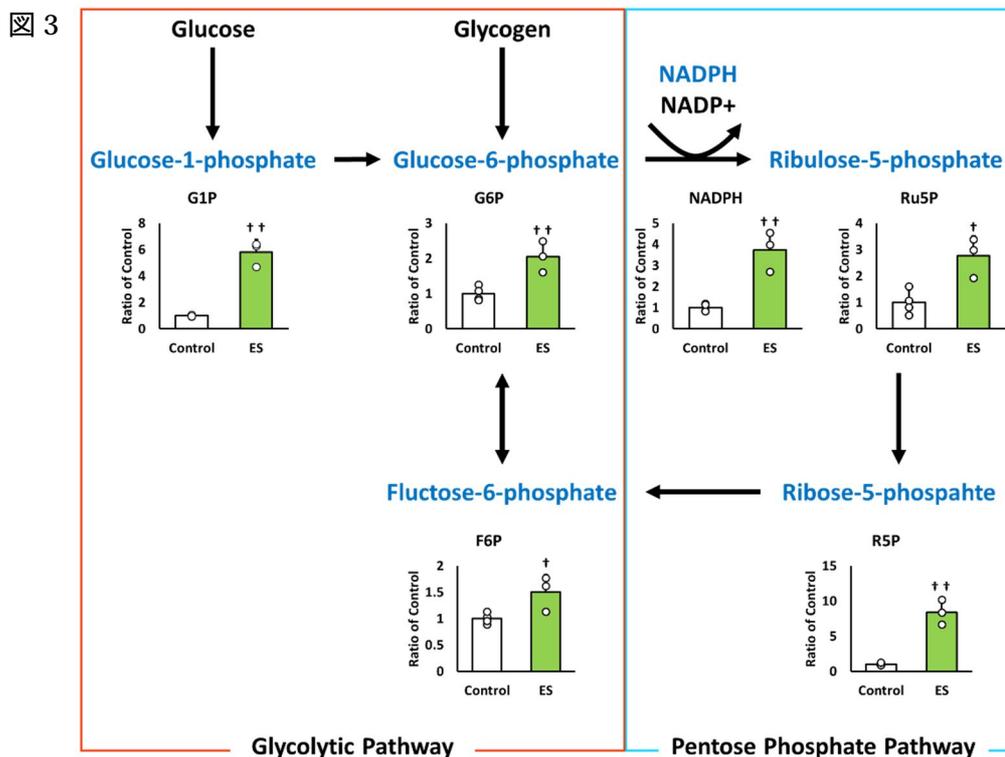
4. 研究成果

実験 (Uemura M et al. *Sci Rep*. 2023)

LPS により炎症性サイトカイン発現並びに ROS 産生は著明に増加したが、電気刺激により有意に抑制された (図2)。

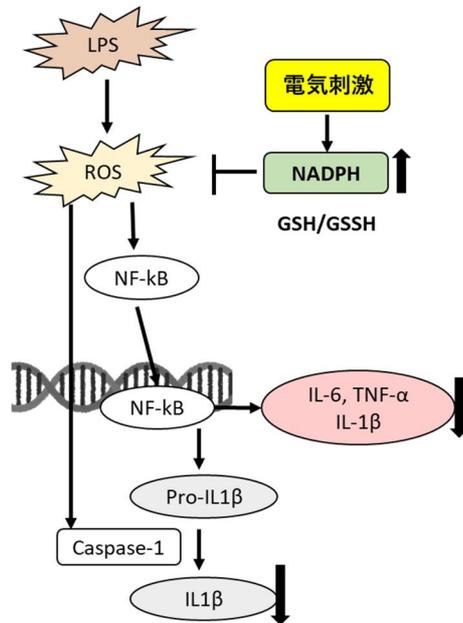


その作用機序として細胞内代謝産物を測定したところ、電気刺激により解糖系代謝が亢進、ペントースリン酸経路へ移行し、抗酸化作用を有する NADPH 産生が有意に増加していた (図 3)。



解糖系代謝の後はフルクトース 6 リン酸からピルビン酸に変換され、その後アセチル CoA から TCA 回路へと進んでいくが、シスアコニット酸から代謝される抗炎症作用を有するイタコン酸は電気刺激で増加しなかった。電気刺激により解糖系代謝は亢進したが、抗炎症作用を有する ケトグルタル酸は蓄積したものの、炎症促進の作用を有するコハク酸の産生量は増加しなかった

図 4



ことから、電気刺激による解糖系代謝の亢進は炎症刺激による亢進とは異なるといえる。以上より、電気刺激によるマクロファージに対する抗炎症、抗酸化作用は細胞内代謝をペントースリン酸経路へと移行させ、NADPH 産生の増加によることが示唆された (図 4)。

実験 (Uemura M et al. EPUAP2023. Leeds, UK, 2023)

実験と同様に、LPS にて炎症を惹起したマクロファージに対しても電気刺激を行うことで IL-6, IL-1 発現量は有意に減少した。また、ROS 産生についても LPS 刺激群と比べ有意に産生量は減少した。

細胞内代謝に関して、電気刺激によりペントースリン酸経路の非酸化的段階で代謝されるセドヘプツロース 7 リン酸が増加、NADPH 産生も増加した。また、実験と同様、コハク酸の蓄積も減少し、炎症を促進させる Hif-1 産生についても電気刺激で抑制されたことから、炎症を惹起したマクロファージに対しても電気刺激は抗炎症、抗酸化作用を発揮させることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 UEMURA Mikiko, SUGIMOTO Masaharu, YOSHIKAWA Yoshiyuki, HIRAMATSU Terutaka, INOUE Taketo	4. 巻 24
2. 論文標題 Monophasic Pulsed Current Stimulation of Duty Cycle 10% Promotes Differentiation of Human Dermal Fibroblasts into Myofibroblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physical Therapy Research	6. 最初と最後の頁 145 ~ 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1298/ptr.E10064	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 -
1. 著者名 Mikiko Uemura, Masaharu Sugimoto, Yoshiyuki Yoshikawa, Rieko Inoue	4. 巻 22
2. 論文標題 Electrical Shunting Prevents the Decline of Galvanotaxis After Monophasic Pulsed Microcurrent Stimulation in Human Dermal Fibroblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Eplasty	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -
1. 著者名 Uemura Mikiko, Maeshige Noriaki, Yamaguchi Atomu, Ma Xiaoyi, Matsuda Mami, Nishimura Yuya, Hasunuma Tomohisa, Inoue Taketo, Yan Jiawei, Wang Ji, Kondo Hiroyo, Fujino Hidemi	4. 巻 13
2. 論文標題 Electrical stimulation facilitates NADPH production in pentose phosphate pathway and exerts an anti-inflammatory effect in macrophages	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-44886-x	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 該当する
1. 著者名 植村 弥希子, 杉元 雅晴, 前重 伯壮, 吉川 義之	4. 巻 29
2. 論文標題 物理療法, 活かしていますか?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 物理療法科学	6. 最初と最後の頁 39 ~ 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.57337/jjeapt.21-7	査読の有無 無
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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 植村弥希子、前重伯壮、山口亜斗夢、Ma Xiaoqi、井上岳人、寺師浩人、近藤浩代、藤野英己
2. 発表標題 直流微弱電流はマクロファージ内のペントースリン酸経路の賦活を介して抗酸化・抗炎症作用を発揮する
3. 学会等名 第52回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 植村弥希子、前重伯壮、山口亜斗夢、Ma Xiaoqi、井上岳人、近藤浩代、藤野英己
2. 発表標題 電気刺激はマクロファージのHIF-1 を抑制し細胞内代謝を変化させることで抗炎症・抗酸化作用を発揮する
3. 学会等名 日本物理療法合同学術大会2023
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 植村弥希子、前重伯壮、山口亜斗夢、Xiaoqi Ma、野口ひかり、寺師浩人、近藤浩代、藤野英己
2. 発表標題 200 μ Aの単相性パルス電流刺激はマクロファージのM1極性変化を抑制する
3. 学会等名 第51回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中翔大、秋山純、植村弥希子、桑水流健二、山浦生也、前重伯壮、寺師浩人
2. 発表標題 直流微弱電流刺激療法により創治癒率が向上した踵部褥瘡症例
3. 学会等名 第19回日本褥瘡学会近畿地方会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 植村弥希子、前重伯壮、山口亜斗夢、Ma Xiaoqi、井上岳人、寺師浩人、近藤浩代、藤野英己
2. 発表標題 直流微弱電流はマクロファージ内のペントースリン酸経路の賦活を介して抗酸化・抗炎症作用を発揮する
3. 学会等名 第52回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 植村弥希子、前重伯壮、山口亜斗夢、Ma Xiaoqi、井上岳人、近藤浩代、藤野英己
2. 発表標題 電気刺激はマクロファージのHIF-1 を抑制し細胞内代謝を変化させることで抗炎症・抗酸化作用を発揮する
3. 学会等名 日本物理療法合同学術大会2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Uemura M., Maeshige N., Yamaguchi A., Ma X., Fujino H.
2. 発表標題 Microcurrent stimulation shows anti-inflammatory and antioxidant effects with alteration of intracellular metabolism in macrophages
3. 学会等名 EPUAP 2023 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023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
研究協力者	藤野 英己 (Fujino Hidemi) (20278998)		

6. 研究組織（つづき）

	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	前重 伯壮 (Maeshige Noriaki) (90617838)		

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		
中国	ShanghaiTech University	Capital Medical University	