

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 7日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390476

研究課題名（和文） バイオフィルム制御による新しい創傷管理法の開発

研究課題名（英文） New wound management strategy by distraction of wound biofilm

研究代表者

館 正弘（TACHI MASAHIRO）

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50312004

研究成果の概要（和文）：バイオフィルム形成を制御するクオラムセンシング因子のホモセリンラクトンは創部の再上皮化，白血球集積，TNF- α 産生に促進的に関与していた。

バイオフィルム制御に低侵襲性体外衝撃波治療法を取り上げ、マウスの創傷治癒促進メカニズムを検討した。創傷血管密度は増加したが、eNOS-KO型の照射群では確認できなかった。遺伝子解析からeNOS経路を介した血管新生を通じた作用機序が予想された。

研究成果の概要（英文）：Quorum-sensing (QS) systems regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*, which produces autoinducers. Accelerations of wound healing were not observed when inoculated with $\Delta lasI$ or $\Delta rhII$ in place of PAO1 and cancelled when co-treated with these anti HSL antisera, respectively, but not with control rabbit serum. By contrast, administration of HSL significantly accelerated the re-epithelialization. These results suggest that HSL may be deeply involved in the skin wound healing during *P. aeruginosa* infection.

Low-energy extracorporeal shockwave treatment (LE-ESWT) has been demonstrated to accelerate wound repair. E-NOS is induced at the wound tissues by LE-ESWT and plays a critical role in the therapeutic effects of this treatment accelerating the wound healing through promoting VEGF expression and neo-vascularization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

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：(1) バイオフィルム (2) 創傷治癒 (3) 慢性創傷

(4) 糖尿病性足潰瘍

1. 研究開始当初の背景
慢性皮膚潰瘍の有病率は2～7%であり、

患者の苦痛に加え、医療費の増大の大きな
要因となっている。皮膚潰瘍が治癒せず難

治化する原因の1つが、潰瘍表面の細菌が形成するバイオフィームであると考えられている。バイオフィームは多糖体であり、これが細菌を包み込むように存在するために、抗生物質が効きにくく、かつバイオフィームの中で細菌が互いに情報を伝達し、薬剤耐性を獲得するとも言われている。皮膚潰瘍において、バイオフィームそのものが創傷治癒阻害因子になるという直接的証拠はまだ少ないが、2008年のJamesらの報告では、臨床的慢性皮膚潰瘍の60%にバイオフィームが観察され、急性損傷の6%と比して有意に高い割合であった。また、ヒトにおける感染症の80%はバイオフィームが基になっているという研究がNIHから出ていることから、高い確率でバイオフィームが創傷治癒を阻害していることが疑われる。現在のところはバイオフィームそのものが創傷治癒を阻害するのか、バイオフィームを形成する環境に問題があるのかが不明である。

2. 研究の目的

1) クオラムセンシング機構と創傷治癒の関係

バイオフィーム形成をコントロールする機構のひとつに、菌体が有するクオラムセンシング (QS; Quorum Sensing) 機構が挙げられる。緑膿菌のQS機構として、las系とrhI系が特に広く解析されており、それぞれの系に属するlasI, rhII遺伝子がホモセリンラクトン (HSL) の合成に関与している。緑膿菌 PA01 株接種創 (PA01 群) と、QS機構に関与するlasI, rhII遺伝子を欠損した緑膿菌 Δ PA01 株接種創 (Δ PA01 群) の創傷治癒過程を比較し、バイオフィーム形成と治癒速度、および創部の炎症反応を解析した。さらに、創部に3O-C₁₂-HSLを接種し、3O-C₁₂-HSLが単独で治癒過程に与える影響についても検証を行うことを目的とした。

2) 低侵襲性体外衝撃波照射による創傷治癒促進効果ならびにバイオフィーム抑制の検討

低侵襲性体外衝撃波照射によって創傷治癒が促進されることが文献的に知られている。マウスモデルを用いて衝撃波照射を開始し毛細血管新生、バイオフィーム抑制効果の有無を検討した。eNOS-ノックアウト

(eNOS-KO) マウスを用いることにより、創傷治癒促進のメカニズムを検討し、実際の臨床使用の前段階試験とする。

3. 研究の方法

ラット背部に開放創を作成し、緑膿菌としてPA01株とQS機構内のHSL合成に関わる遺伝子lasI, rhIIの欠損株 (Δ PA01株 (KG7004)) を播種した。GFP導入緑膿菌を創に接種したマウスより創部皮膚組織を摘

出し、Cryostatにて5mmの切片を作製 rhodamine-conjugated ConA (50mg/ml) にて染色後、Olympus IX70 倒立型顕微鏡とIX-FLA 倒立型落射蛍光観察装置のセットにより、FITCは450-490nmの励起波長、rhodamineは520-550nmの励起波長を用いて観察した。摘出組織からmRNAを抽出し、各種サイトカイン濃度を測定した。さらに、HSLの添加による創傷治癒促進効果について検討した。

平行して低侵襲衝撃波照射の効果も検討する。eNOSKOマウスと糖尿病マウスにおいて衝撃波照射し、創傷治癒効果と採取した組織のmRNAからVEGFの産生を調べることとした。さらに上記二種類を組み合わせることで、理想的なバイオフィーム治療戦略を立て、臨床応用へ結びつける。

4. 研究成果

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PA01株の創傷接種によりTNF- α 依存性に皮膚創傷治癒が促進された。緑膿菌のクオラムセンシング機構を調節する3-oxo-C₁₂-HSLに着目し、3-oxo-C₁₂-HSL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3-oxo-C₁₂-HSLを産生できない変異株による治癒促進抑制は、添加した3-oxo-C₁₂-HSLによってPA01と同様な効果が見られた。

抗バイオフィームの方法として、低侵襲性体外衝撃波治療法を活用することを柱とし東北大学医学部循環器内科と共同で、マウスモデルを用いて衝撃波照射を開始し毛細血管新生、バイオフィーム抑制効果の有無を検討した。低侵襲性体外衝撃波照射によって、マウス創傷治癒が促進されることが確認され、mRNRレベルではbFGFとeNOSが衝撃波によって増加していることが明らかになった。バイオフィームの直接的な抑制作用と、血管新生を通じて間接的に生体の作用による制御の2つの作用機序が予想された。

ホモセリンラクトンの投与、およびブロックの実験の成果は以下のものである。1、クオラムセンシング調節遺伝子のうち、lasI遺伝子発現は創部の再上皮化、白血球集積、TNF- α 産生に促進的に関与していた。3-oxo-C₁₂-HSLは急性創傷において再上皮化、白血球集積の促進に関与した。3、3-oxo-C₁₂-HSLはRAW264.7, J774-1, MH-S, マウス腹腔マクロファージからのTNF- α ,

IL-12産生を誘導しなかった。4. マクロファージ細胞は3-oxo-C12-HSLで刺激することにより、アポトーシスが誘導された。またC4-HSLの投与実験では以下のことが明らかになった。1. rhI遺伝子欠損によりPA01株の治癒促進、白血球集積促進効果が低下した。2. C4-HSLは再上皮化を促進する効果を有するが、濃度により作用が異なる可能性がある。3. 高濃度のC4-HSLはLPSによる活性を阻害する可能性がある。

抗バイオフィームの方法として、低侵襲性体外衝撃波治療法を活用することを柱とし東北大学医学部循環器内科と共同で、マウスモデルを用いて衝撃波照射を開始し毛細血管新生、バイオフィーム抑制効果の有無を検討した。マウスはeNOS-ノックアウト(eNOS-KO)マウスを用いると照射による差はなかった。次に、VEGFおよびeNOSのmRNAレベルでの発現を調べたところ、野生型の照射群では確認できたが、eNOS-KO型の照射群では確認できなかった。またCD31の免疫染色で血管密度(MVD)を計測したところ、野生型では対照群よりも照射群が有意に増加したが、eNOS-KO型では両群の間に有意差はなかった。バイオフィームの直接的な抑制作用と、eNOS経路を介した血管新生を通じて間接的に生体の作用による制御の2つの作用機序が予想された。

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8件)

1. Matsui, Yuko, M Tachi, Development of the DESIGN-R with an observational study: an absolute evaluation tool for monitoring pressure ulcer wound healing. Wound Repair Regen. 19: 309-315, 2011 査読有

2. Iizaka S, M Tachi Serum albumin level is a limited nutritional marker for predicting wound healing in patients with pressure ulcer: Two multicenter prospective cohort studies. Clin Nutr 30: 738-745, 2011 査読有

3. T Ohura, M Tachi, Clinical efficacy of basic fibroblast growth factor on pressure ulcers: Case-control pairing study using a new evaluation method. Wound Repair Regen. 19: 542-551, 2011 査読有

4. Sanada H, M Tachi, Clinical wound assessment using DESIGN-R total score can predict pressure ulcer healing: Pooled analysis from two multicenter cohort studies. Wound Repair Regen. 19: 559-567, 2011 査読有

5. Kanno Emi, M Tachi, Wound healing in skin promoted by inoculation with *Pseudomonas aeruginosa* PA01: The critical role of tumor necrosis factor-alpha secreted from infiltrating neutrophils. Wound Repair Regen. 19:608-621, 2011 査読有

6. Kanno E, M Tachi, Biofilm formation on rat skin wounds by *Pseudomonas aeruginosa* carrying the green fluorescent protein gene. Exp Dermatol. 19: 154-156, 2010 査読有

7. 館 正弘、古和田雪. 創傷治療に対する物理療法の効果. 理学療法学. 37: 618-621, 2010 査読無し

8. 館 正弘、林 殿聡 フットセンター開設までの道のり. 創傷. 2: 40-42, 2010 査読無し

[学会発表] (計7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
ルネサンスホテル岐阜

2. 丹野寛大, 川上和義, 立 雅恵, 菅野恵美, 石井恵子, 林 殿聡, 丸山良子, 館正弘. マウス皮膚創傷治癒過程におけるNatural Killer T細胞とIFN- γ の役割. 第22回日本生体防御学会学術集会, 那覇, 2011年6月30日

3. 菅野恵美, 川上和義, 乙丸礼乃, 石井恵子, 丹野寛大, 林殿聡, 丸山良子, 館正弘: 緑膿菌クオラムセンシング分子N-3-Oxododecanoyl-homoserine lactoneが創傷治癒過程と創部炎症反応に与える影響. 第22回日本生体防御学会学術集会, 那覇, 2011年6月30日

4. 菅野恵美, 川上和義, 乙丸礼乃, 石井恵子, 丹野寛大, 林殿聡, 丸山良子, 館正弘: 緑膿菌クオラムセンシング機構が創傷

治癒過程と創部炎症反応に与える影響. 第13回日本褥瘡学会学術集会, 福岡, 2011年8月27日

5. 丹野寛大, 川上和義, 立 雅恵, 菅野恵美, 石井恵子, 林 殿聡, 丸山良子, 館正弘. マウス皮膚創傷治癒過程におけるNatural Killer T細胞の役割. 第13回日本褥瘡学会学術集会, 福岡, 2011年8月27日

6. 丹野寛大, 川上和義, 立 雅恵, 菅野恵美, 石井恵子, 林 殿聡, 丸山良子, 館正弘. マウス皮膚創傷治癒過程におけるNatural Killer T細胞の役割. 第41回日本創傷治癒学会, 名古屋, 2011年12月6日

7. 菅野恵美, 館正弘. 緑膿菌クオラムセンシング分子による創傷治癒の促進と創部炎症反応の誘導. 第41回日本創傷治癒学会 2011年12月6日 名古屋

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://prs.main.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

館 正弘 (TACHI MASAHIRO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50312004

(2) 研究分担者

川上 和義 (KAWAKAMI KAZUYOSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10253973

菅野 恵美 (KANNO EMI)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10431595

(3) 連携研究者

()

研究者番号：