

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791142

研究課題名(和文) 皮膚虚血再灌流傷害マウスモデルを用いた臨床的褥瘡予防療法の検討・開発

研究課題名(英文) Anti-IL-6 antibody attenuates TNF-alpha and cutaneous ischemia-reperfusion injury in a mouse model of pressure ulcer

研究代表者

齋藤 佑希 (Saito, Yuki)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：90547168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：虚血再灌流傷害において、IL-6はTNF- α の上流に位置し、抗IL-6抗体を投与することによりTNF- α 産生が抑制され、TNF- α 自体による皮膚傷害を軽減し、またTNF- α 産生に引き続いて生じるiNOSからのNO産生を抑制することにより皮膚障害を軽減する。従って、抗IL-6抗体は抗TNF- α 抗体よりも虚血再灌流傷害をより軽減できることが示唆された。またその投与方法としては、皮内注射が安全に投与できることが示唆されたが、理想的な投与方法である貼付ないし塗布は本モデルでは評価困難であり、虚血再灌流モデルの改良が必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In a mouse model of cutaneous ischemia-reperfusion injury, local administration of anti-IL-6 antibody inhibited expression of TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase, and reduced cytotoxicity of them. And we checked the safeness about intradermal injection with anti-IL-6 antibody. From that reason, I suggest that anti-IL-6 antibody treatment might prevent the pressure ulcers.

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：虚血再灌流傷害 褥瘡 TNF- α IL-6

1. 研究開始当初の背景

医療や生活水準の向上により寿命は延び、健康な高齢者も増えた反面、新たな問題も浮上してきており、その中で褥瘡は大きな問題の一つと言える。褥瘡が病院や介護施設などで生じた場合、その処置や管理にマンパワーが裂かれ、入院は長期化し医療費の増加は免れない。自宅に於いても、処置や管理が不十分とあれば創部からの細菌感染により重症・重体化となるケースは稀ではなく、介護者の精神的・身体的負担は計り知れない。また、高齢化が加速的に進む日本においては、今後も褥瘡リスクが高い患者の増加が予想され、褥瘡の克服は喫緊の課題である。そして褥瘡を克服し得る褥瘡予防療法の開発は、褥瘡のみならず、介護および医療費問題の解決策の一つに成り得ると考える。

褥瘡は寝たきり高齢者だけに生じるわけではない。術中・術後の長時間臥床や、装具等の装着面にも容易に発生し得る。褥瘡は、局所の阻血や剪断力などの直接的因子と、患者の栄養状態や組織環境、皮膚の温度などの間接的因子から成る多因子疾患であり、最近では虚血再灌流傷害も褥瘡の形成に関与していると考えられてきている (*Wound Repair Regen.* 8: 68-76, 2000)

虚血再灌流傷害とは、虚血状態に陥った組織に血液が再灌流すると、細胞傷害因子であるフリーラジカルなどが発生し、病変が増悪するという概念である。Nitric oxide (NO) はフリーラジカル一つであり、nitric oxide synthase (NOS) によって産生される。NOS はいくつか存在するが、中でも inducible NOS (iNOS) は tumor necrosis factor (TNF)- α によってマクロファージから大量に誘導され、また iNOS は他の NOS より多量の NO を産生する (*Cell.* 78: 915-918, 1994) 脳梗塞や心筋の虚血後の再灌流、腎移植時の血流開始などでは虚血再灌流傷害に NO が関与しているとされているが (*J Am Soc Nephrol.* 14:

2503-2515, 2003) (*Circ J.* 70: 342-351, 2006) 皮膚病変では虚血再灌流傷害の確立されたモデルがほとんどなかったため、皮膚における虚血再灌流傷害についてはあまり検討されていなかった。そこで我々は、Stadler ら (*J Invest Surg.* 17: 221-227, 2004) を参考に、非侵襲的な方法で虚血再灌流傷害マウスモデルを作成し、皮膚の虚血再灌流傷害におけるマクロファージなどの炎症細胞の遊走・浸潤や、炎症性サイトカインや iNOS の関与、および虚血再灌流が皮膚傷害を起こす機序について検討した (*J Invest Dermatol.* 128:1838-5, 2008)

その結果、皮膚においても虚血再灌流傷害が確認され、褥瘡の増悪因子となり得ることが示された。その機序として、monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 によって誘導されたマクロファージとそれに伴って産生された TNF- α を主体とした炎症性サイトカインによって、マクロファージからの iNOS の発現が亢進し、NO が多量に産生されて、皮膚の虚血再灌流傷害が生じることが考えられた。従って、マクロファージの浸潤や TNF- α 、iNOS の産生を抑制することで、褥瘡などの虚血再灌流傷害が関与する皮膚傷害を軽減できることが示唆された。

以上を踏まえ、本研究では、(1)マクロファージ等の炎症細胞の浸潤、(2)iNOS 発現のトリガーである TNF- α 、(3)虚血再灌流傷害の主な細胞傷害因子である NO を産生する iNOS、の3点に着目し、皮膚虚血再灌流傷害の機序を更に詳細に解明し、効果的な褥瘡予防療法の開発を目指す。

2. 研究の目的

(1)マクロファージ等の炎症細胞の浸潤、(2)iNOS 発現のトリガーである TNF- α 、(3)虚血再灌流傷害の主な細胞傷害因子である NO を産生する iNOS、の3点に着目し、皮膚虚血再灌流傷害の機序を更に詳細に解明し、注射や塗布などの局所投与方法を検討し、最

終的には、効果的な褥瘡予防療法の開発・臨床応用について検討し、褥瘡の克服を目指す。

3. 研究の方法

皮膚虚血再灌流傷害マウスモデル (*J Invest Dermatol.* 128:1838-5, 2008) をもとに、野生型マウスとノックアウトマウスを用いる。損傷皮膚の程度を肉眼的および組織学的に経時的に観察し検討する。損傷皮膚に発現するサイトカイン、ケモカイン、iNOS などの虚血再灌流傷害に関与する物質については、real-time PCR や enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて経時的に測定・解析する。続いて、モデルマウスに抗 TNF- α 抗体や 1400W を全身投与し同様の検討を行い、虚血再灌流傷害の程度とその機序について比較検討する。さらに、抗 TNF- α 抗体や 1400W を局所投与し、傷害抑制効果と安全性について同様に検討を行う。局所投与については、モデルマウスの傷害皮膚に局所注射および外用を行い、効果および安全性の検討を行うほか、簡便で非侵襲的な投与方法 (貼付剤や外用剤など) についても検討する。

4. 研究成果

マクロファージの血管内から組織へ浸潤する過程には、多数の接着分子の発現が必要であるが、主なものは ICAM-1、L-selectin、E-selectin、P-selectin であり、まず野生型の皮膚虚血再灌流傷害マウスモデルにおいて、これらの接着分子がどの程度発現しているか検討した。その結果、野生型マウスにおいて4種の接着分子はいずれも傷害時に発現がみられ、特に ICAM-1 と P-selectin が上昇していた。発現量は ICAM-1 と L-selectin は day1 から day3 まで漸増しており、P-selectin と E-selectin は day1 に高発現していた。しかし、接着分子ノックアウトマウス (ICAM-1^{-/-}、L-selectin^{-/-}、E-selectin^{-/-}、P-selectin^{-/-}) では、いずれのマウスでも治癒までの時間は

野生型と同程度であり、傷害の程度は軽減されなかった。ICAM-1 および L-selectin をノックアウトしたマウス (L1^{-/-}) を作成して同様に検討したが、治癒までの期間の有意な短縮はなかった。以上の結果から、炎症細胞浸潤は複数の接着分子が段階的に作用するのではなく、その作用を補完しながら細胞を浸潤させているため、効果を高めるためには複数の接着分子を同時に抑制する必要があるが、その場合細胞浸潤が強く抑制され、むしろ治癒が遅延するため、臨床応用は困難と考えられた。

次に中和抗体について検討した。既に抗 TNF- α 抗体が大きな虚血再灌流傷害軽減効果を持つことはわかっており、今回は TNF- α の更に上流もしくは同程度の直接的な組織傷害性および iNOS 誘導効果を有する可能性のあるサイトカインとして IL-6 に着目した。IL-6 は炎症の急性期に発現するサイトカインであるが、野生型マウスにおいては、day1 に高発現し、day3 にかけて徐々に低下しており、皮膚虚血再灌流傷害においても組織傷害に大きく関与していることが期待された。さらに IL-6 の中和抗体を投与したマウスは、組織傷害が軽減され、それは抗 TNF- α 抗体を投与したマウスと同程度であった。また抗 IL-6 抗体投与マウスの傷害皮膚においては、野生型マウスと比較し iNOS と TNF- α の発現が有意に低下していた。これらのことから、IL-6 が TNF- α の上流にあり、IL-6 を阻害することで抗 TNF- α 抗体よりも効果的に虚血再灌流傷害を軽減できることが示唆された。なお、抗 TNF- α 抗体と抗 IL-6 抗体の治癒までの期間が同程度であったことは、このモデルにおいては虚血による傷害も起こっており、再灌流傷害のみを観察することはできないため有意差が得られず、今以上に再灌流傷害を詳細に検討できるようにマウスモデルが改良されれば、有意差が明らか

になると考えられた。

また、抗 IL-6 抗体と抗 TNF- 抗体、および抗 IL-6 抗体と iNOS の阻害剤である 1400W を組み合わせ、同時に投与してみたが、抗 IL-6 抗体投与時とほぼ同程度の傷害であり、有意差は得られなかった。このことは、前述した抗 TNF 抗体と抗 IL-6 抗体の間に有意差がなかったことと同じであり、虚血再灌流傷害モデルの改良が必要である。

次に投与経路について検討した。これまでに使用した抗 IL-6 抗体、抗 TNF- 抗体、1400W のいずれにおいても、正常皮膚への皮下注射および皮内注射で特に異常は認められず、安全性の高いものであると考えられた。しかし、臨床において褥瘡好発部位であっても、正常皮膚に皮内注射および皮下注射を行うことは憚られるため、塗布ないし貼付での投与が求められる。今回使用した薬剤で最も分子量が小さいのは 1400W (液体) であり、まず 1400W で投与実験を試みた。小さいスポンジを 1400W に浸したものを再灌流時に傷害部位に貼付し、治癒までの時間が短縮するかどうか観察することとした。ところが、マウスの体毛および運動・搔破行為により、ほぼ全てのスポンジが脱落してしまった。以前の予備実験で、マウスの運動を 12 時間程度抑制すると、衰弱して皮膚障害が大きくなってしまふことがわかっており、スポンジが脱落しないようマウスの運動を制限することは正確な評価ができないと判断した。従って、今回は投与経路としては、皮膚への皮下注射・皮内注射の安全性が高いことは示唆されたが、理想的な塗布および貼付での投与は評価できなかった。

以上の結果から、虚血再灌流傷害において、IL-6 は TNF- の上流に位置し、抗 IL-6 抗体を投与することにより TNF- 産生が抑制され、TNF 自体による皮膚傷害を軽減し、また TNF- 産生に引き続いて生じる iNOS からの NO 産生を抑制することにより皮膚障害を

軽減する。従って、抗 IL-6 抗体は抗 TNF- 抗体よりも虚血再灌流傷害をより軽減できることが示唆された。

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)

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 佑希 (Saito, Yuki)
金沢大学・大学病院・助教
研究者番号：90547168