

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26671004

研究課題名(和文) 超高齢者の治癒力を最大限に引き出す創傷看護技術の開発 AHLに着目して

研究課題名(英文) Development of effective wound care management methods for promoting wounds among older people focusing on acylated homoserine lactone.

研究代表者

仲上 豪二郎(Nakagami, Gojiro)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：70547827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：創傷の治癒力が低下している高齢者において難治性創傷が問題となっている。そこでクオラムセンシングシグナル(AHL)による創傷治癒促進技術開発を行った。糖尿病ラットに全層欠損創を作成し、AHLを投与すると炎症性細胞の集積の抑制、繊維芽細胞の増殖、酸化ストレスの低減が確認された。また、異なるアシル鎖長のAHLを用いた結果、C10は炎症を惹起することなく血管新生を促進し、創傷治癒を促進させる可能性があることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Elderly people are suffering from intractable wounds due to the lack of proper wound healing. We aimed to develop a novel therapeutic method using quorum sensing signal (AHL). AHL topical application to the full-thickness wounds in diabetic rats showed inhibited inflammatory cell infiltration, enhanced proliferation of fibroblasts, and reduced oxidative stress. Furthermore, experiments using different length of acyl-acid of AHL revealed the C10-AHL promoted wound healing via neovascularization without inducing inflammation.

研究分野：創傷看護学

キーワード：クオラムセンシング 創傷治癒 高齢者 糖尿病 緑膿菌 感染 褥瘡 動物実験

1. 研究開始当初の背景

我が国で今なお進行している急速な高齢化がもたらす様々な問題の中でも、本研究が課題として挑戦する難治性創傷は、高齢者自身のウェルビーイングを直接的に脅かす最も深刻な医療問題の一つである。難治性創傷は強い疼痛や炎症状態の遷延、感染のリスクにさらすだけでなく、既存の治療・ケアにほとんど反応しないために年単位の管理が必要となることから、日々のケアにあたる看護師の心理的負担は極めて高く (Searle, 2008)、早急な対策が求められている。特に認知機能が低下している場合はその苦痛を訴えることが困難であり、創傷保有高齢者の生きる尊厳を護るためにも、難治性創傷の治癒促進技術の開発はまさに必要とされる研究課題である。特に超高齢者においては、質の確保された予防ケアを提供したとしても防ぎきれずに創傷が発生している現状があり、治癒促進技術の開発は予防技術の開発とともに重要な看護学の課題である。

難治性創傷の発症機序は、出血凝固期→炎症期→肉芽形成期→成熟期の4段階の創傷治癒過程のうち、炎症の遷延、肉芽の形成不全、表皮化の遅延といった各過程での遅滞が考えられている。その原因は様々であるが、高齢者においては細胞の老化や循環不全など、加齢に伴う退行性変化がその根本にある。既存の創傷ケア技術は生体が本来もつ治癒力を正常な状態に戻すことを目的としているが、高齢者においては治癒力そのものが低下しているため、保存的療法が奏功せず、結果として難治性創傷が発生しているのが現状である。本応募課題ではこの問題に挑戦する。

これまで、特に創傷を持つ高齢者において重要な創傷の日見感染症の制御方法を提案するために分子生物学、細菌学的手法を看護学に導入してきた。中でも、耐性菌の原因である「細菌の死滅による感染制御方法」に限界を感じ、細菌の病原性のみを減弱させることができれば、効果的に感染制御できるのではないかと着想し、クオラムセンシングシステムに着目して研究を続けている。細菌を排除するのではなく共生し、本来あるべき姿を取り戻す援助をすることで日見感染をなくすという、いわば看護学的視点に立った基礎研究である。本応募課題で提案する AHL による創傷治癒促進技術はこのような看護学的視点から基礎研究を行うことによって見いだされたユニークな発想といえる。

従来の創傷治癒促進方法は生体の治癒力を正常レベルに戻すことを想定しており、いわば不足分を補う消極的なケア方法であった。しかし加齢現象によりその治癒力自体が低下している高齢者においてはその手法は奏功せず、結果として難治性創傷が発生している。そこで本研究では外部からの刺激により積極的に治癒力を高め、創傷治癒を促進する技術の開発を行う。その刺激の方法に、アシル化ホモセリンラクトン (以下 AHL とす

る) の創部への付与、を取り入れる。

AHL とは、創傷部位に生息する常在菌である緑膿菌の遺伝子発現システム「クオラムセンシング」の中核をなす化学物質である。すなわち、緑膿菌が病原性を発揮する際に、AHL を合成し、緑膿菌周囲の AHL 濃度が一定レベル (クオラム: 定足数) を超えると、一斉に病原因子を発現するシステムである。このシステムにより緑膿菌は効率的に病原性を発揮し、宿主免疫力を凌駕することでその生存を確保する。

当初創傷感染発症メカニズムを解明することを目的に (図の左側)、合成された AHL を用いて、緑膿菌のいないラットの創傷に投与する実験を行った。その結果予想とは全く反し、創傷治癒が著しく促進されることが明らかとなり、世界で初めての報告となった (Nakagami, 2011)。さらに、上皮化を担うケラチノサイトを培養し AHL を添加したところ、ケラチノサイトの遊走が促進されることも報告した (Paes, 2012)。その後、同様の結果が他の研究グループからも相次いで報告され (Jacobsen, 2012; Kanno, 2013)、その再現性は高く、また注目されている現象である。我々は基本的な特許を抑えており (特開番号: 特開 2012-025692 号 創傷治療のための医薬)、緑膿菌が合成し、自身の遺伝子発現の制御に利用している AHL を創傷治癒促進に適応するという極めて斬新なアイデアを実社会に役立たせるための優先権を保有している。

このように高い効果を有する一方で、1. AHL は炎症を誘導することもまた報告しており (Nakagami, 2015)、創傷治癒過程によっては逆に創傷治癒を阻害してしまうのではないかと、2. 緑膿菌が常在することが想定される創傷に AHL を投与することで細菌の病原性が発現してしまうのではないかと (Nakagami, 2011)、という大きな課題が残っている。

2. 研究の目的

本応募課題は AHL による創傷治癒促進メカニズムを動物実験によって解明し臨床応用へつなげるための前臨床研究である。AHL はその化学的特性 (低分子化合物) から、スプレーや創傷ドレッシング材への含有など様々な利用形態が可能のため、メカニズムが明らかになれば、安全かつ有効な難治性創傷ケア材料となりうる。

3. 研究の方法

本研究では、緑膿菌クオラムセンシングシグナルであるアシルホモセリンラクトン (N-3-oxo-dodecanoyl homoserine lactone : 3-oxo-C12-HSL) を応用した創傷治癒促進技術の確立に向けて、動物実験により効果検証を行うことを目的としている。

3-1: 創傷治癒遅延モデルとして STZ 誘発糖尿病ラットを用いて実験を行った。麻酔下に

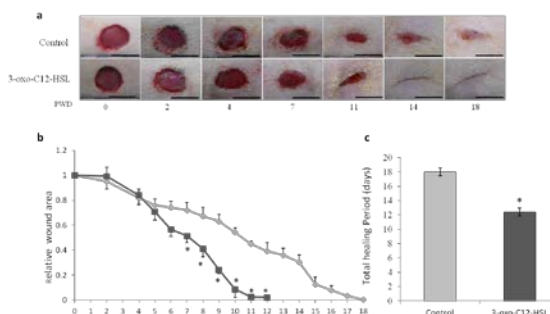
Wistar ラットの両側腹部に全層欠損層を作成し、創作成 4 日目に 3-oxo-C12-HSL を投与しその後の治癒経過を観察するとともに、作用機序を明らかにするために組織学的解析並びに遺伝子発現の解析を行った。

3-2 : 3-oxo-C12-HSL はワイルドタイプラットの創部で炎症を惹起することが分かっており、慢性的な炎症状態にある糖尿病ではネガティブな作用として働いてしまう可能性がある。そこで、アシル鎖長の異なる他の AHL の創傷治癒に与える影響を確認するため、C12 にアシル鎖の長さが近い C8、C10、C14 について検討した。

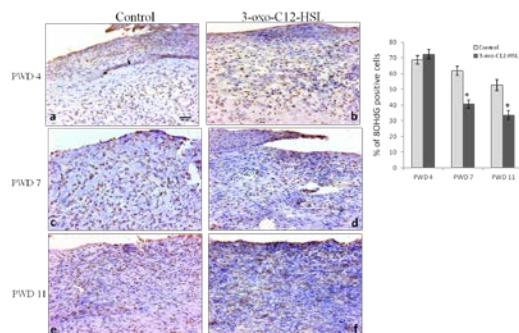
創傷治癒遅延モデルとして STZ 誘発糖尿病ラットを用いて実験を行った。創作製後 4 日目で 10 μ M の各 AHL をランダムに選択した何れかの創に 24 時間塗布致した。もう片方の創をコントロールとした。創作製後 7 日目に創周囲を含めてサンプリングし、HE 染色に供した。

4. 研究成果

4-1 : 3-oxo-C12-HSL は糖尿病ラットにおいて全層欠損層の創傷治癒を有意に促進することが明らかになった。



また、炎症生細胞の集積が抑制され、線維芽細胞の増殖が確認された。それに伴い肉芽組織でのコラーゲン沈着や新生血管が促進され、表皮形成も促進された。特に酸化ストレスの著明な低減が 8OHdG 染色で確認された。



さらに、作用機序を明らかにするため、C8、C10、C12、C14 の異なる長さのアシル鎖を有するホモセリンラクトンを用いて検討した。その結果、C12 が最も創傷治癒を促進する能力が高いことが明らかになったものの、異なるアシル鎖のホモセリンラクトンにお

いても創傷治癒がコントロールよりも促進しており、炎症期、肉芽形成期、上皮形成期で異なる作用を示す可能性が明らかとなった。

これらの結果はホモセリンラクトンが特定の受容体を介して特異的なメカニズムで創傷治癒を促進している可能性を示唆しており、そのメカニズム解明を行うことは創傷治療におけるホモセリンラクトンの利用可能性を高めるといえる。

4-2 : 創縁部では C10 で比較的炎症性細胞の浸潤が弱いことが明らかとなった。創中央部では C12 や C14 で炎症性細胞の浸潤が強く、また線維芽細胞が多数観察された。さらに、C8 と C10 においては血管新生様所見が観察された。遺伝子発現解析により、C10 投与群で炎症マーカーである Ptgs2 の発現が抑制される傾向にあった。血管新生のマーカーとして Hif1a では C10 および C14 で発現が抑制されていた。

C12 は糖尿病モデルラットにおいても炎症性細胞の浸潤が強いことが確認できたが、一方で 3-oxo-C10-HSL は不要な炎症を抑えながら創傷治癒を促進させる可能性が示され、Ptgs2 の発現の結果と一致している。C10 は炎症を惹起することなく血管新生を促進することで創傷治癒を促進させる可能性を見出した。今後、C10 に着目し、創傷治癒促進の更なるメカニズム解明を行う必要がある。

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)

[学会発表] (計 3 件)

- Goto T, Nakagami G, Rajendran NK, Minematsu T, Sanada H. Different effects of various N-acyl-homoserine lactones on healing process of full-thickness wounds in diabetic rats. 2015 Global Prospect and New Innovations for Best Wound Care and Scar Management. 2015 年 6 月 27 日「高雄市 (台湾)」
- 後藤大地, 仲上豪二郎, 金澤寿樹, 峰松健夫, 真田弘美. 糖尿病モデルラット皮膚全層欠損創に対してアシル鎖長の異なるアシルホモセリンラクトンが及ぼす影響. 第 45 回日本創傷治癒学会 2015 年 11 月 30 日「JP タワーホール&カンファレンス (東京都・千代田区)」
- Rajendran NK, Minematsu T, Nishijima Y, Nakagami G, Sanada H. N-(3-oxododecanoil)-1-homoserine lactone promotes wound healing through the up regulation of HOMX1 and inhibits oxidative stress in diabetic rats. 第 23 回日本創傷・オストミー・失禁管理学会学術集会. 2014 年 5 月 16 日「大宮ソニックシティ (埼玉県・

大宮市)」

〔その他〕

ホームページ等

東京大学大学院医学系研究科健康科学・看護
学専攻老年看護学／創傷看護学分野

<http://www.rounenkango.m.u-tokyo.ac.jp/>

仲上 豪二郎 (Nakagami, Gojiro)

東京大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：70547827

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲上 豪二郎 (Nakagami, Gojiro)

東京大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：70547827

(2) 研究分担者

真田 弘美 (Sanada, Hiromi)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50143920

(3) 連携研究者

峰松 健夫 (Minematsu, Takeo)

東京大学・大学院医学系研究科・特任講師

研究者番号：00398752