

論文の内容の要旨

論文題目

Development of biomarkers for delayed wound healing caused by pressure

(圧力起因性創傷治癒遅延バイオマーカーの開発)

氏名 金澤 寿樹

背景

褥瘡は治癒期間の長い慢性創傷である。治癒が進まない理由は体表面にかかる圧力や失禁による創感染、低栄養や原疾患などによる全身状態が挙げられる。治癒期間の短縮には、治癒を阻害する要因を特定し、適切なケアを実施する必要がある。創感染や低栄養状態の診断や評価方法は多くの先行研究があるが、圧力による治癒遅延を同定する試みはなされていない。圧力は褥瘡の発生原因であると同時に、創部への負荷は治癒の進行を阻害する。特に寝たきり高齢者等では、自力での体位変換が困難なことに加えて拘縮や病的骨突出などにより圧力の除去は難しくなる。褥瘡予防では除圧ケアの目標値として体圧測定が広く用いられているが、圧力負荷が治癒過程に及ぼす影響を検証した研究はなく、創部の除圧ケアのための基準値は存在しない。更に、全身や局所の状態によって組織耐久性は異なるため、体圧計測による一律な評価は十分とは言えない。そこで筆者は、圧力による治癒遅延を同定するバイオマーカーとして、圧刺激への細胞応答として分泌される因子に着目した。分泌物質は、創の滲出液成分での同定・計測が可能であるため、非侵襲的な評価手法として利用出来ると考えられる。

修士課程では、このストラテジーにおけるマーカー候補を探索する目的で、コラーゲンスポンジに皮膚線維芽細胞を3次元培養した肉芽モデルに圧荷重を与える *in vitro* 実験を実施した。圧力負荷に応じてアポトーシスの増加に伴う細胞数減少、*Cyclooxygenase (Cox) 2*、*Hyaluronan synthase (Has) 2*、*Heat shock protein (Hsp) 90aa1* の遺伝子発現上昇に伴う PGE₂ (COX2 の作用によって産生)、ヒアルロン酸 (HAS1/2 の作用によって産生)、HSP90α の分泌の増加が観察された。これらの3因子は、血管内皮細胞や歯根膜細胞でも同様に圧縮荷重や剪断力負荷によって増加することが報告されていることから、圧力起因性創傷治癒遅延を同定するマーカー候補であると考えられる。

しかし、圧力起因性創傷治癒遅延の同定にこれらマーカー候補を臨床応用するには、まだ二つの課題が残っている。これら3因子の動態はラット線維芽細胞単一の *in vitro* 実験で見出された

ものであり、様々な細胞が関与する生体の創傷治癒過程で同様にマーカーになり得ることを示さなければならない。もう一つは動物種の壁である。ラットなどのげっ歯類とヒトとでは皮膚の構造や創傷治癒過程に相違が存在するため、これまで同定されたマーカー候補の妥当性を臨床の褥瘡の滲出液で検証しなければならない。

本研究では圧力起因性治癒遅延マーカーを確立するために、1) 圧力起因性創傷治癒遅延モデル動物におけるマーカー候補因子の妥当性の証明、2) 実際の褥瘡における臨床研究による臨床応用可能なバイオマーカーとしての妥当性の証明を試みる。最後に、臨床の治癒遅延褥瘡における圧力負荷の関与の検討に、確立したバイオマーカーの応用を試みた。

第1章：圧力起因性創傷治癒遅延モデル動物におけるバイオマーカーの確立

背景

創傷治癒は線維芽細胞、表皮角化細胞、炎症性細胞、血管内皮細胞、神経細胞などが複雑に関与する現象である。この様な状況下で、線維芽細胞が培養系と同様に挙動し、滲出液中 PGE2、HA、HSP90 α が圧力起因性創傷治癒遅延マーカーとして妥当であることを証明するために、圧力起因性創傷治癒遅延モデル動物における分子生物学的・生化学的な検証が必要である。

そこで本章では、①圧力起因性創傷治癒遅延動物モデルの確立、②同モデルにおけるバイオマーカーの発現/合成および分泌の動態解析を目的とした。発現/合成解析には創部組織を用い、分泌解析として滲出液の生化学的解析を行った。

方法

圧力起因性創傷治癒遅延動物モデルは、褥瘡モデルラット作製法を応用し、Wistar ラット（オス、6ヶ月齢）の側腹部に作製した全層欠損創に、創作成後7日後、1、5、および10 kg/3 cm²の圧荷重を2時間負荷した（1 kg, 5 kg, 10 kg 荷重群）。対象群として圧荷重以外の操作を行った動物を用いた(各群、n=5)。モデル動物の妥当性を証明するために、治癒過程の肉眼的所見、治癒期間、創面積の推移を定量的に解析した。また、肉芽組織における mRNA の発現解析、ELISA および免疫組織化学にて、バイオマーカー候補因子の動態を解析した。さらに、滲出液は創面ブロッティング法で定量的に解析した。

結果

全ての圧荷重群では処理翌日の創面積が拡大、治癒期間の荷重量依存的延長を示し、モデル動物の妥当性が示された。*Cox2*、*Has1*、*has2*、*HSp90aa1* の mRNA 発現は、実験期間を通してあるいは一過性に荷重群で上昇しており、PGE2、ヒアルロン酸、HSP90 α も同様に挙動した。創面ブロッティング法による滲出液解析では HSP90 α のみが荷重群における検出量の上昇を認めた。

考察

本章の結果は、PGE₂、ヒアルロン酸、HSP90α の 3 因子が生体における圧力起因性創傷治癒遅延のバイオマーカーとして妥当であることを示している。創面ブロッティング法による滲出液解析では HSP90α は有意な結果を示したことから、この手法による HSP90α の評価は圧力起因性創傷治癒遅延を同定する創傷アセスメント技術として期待される。PGE₂ とヒアルロン酸に関しては創面ブロッティング法に変わる滲出液解析法を今後検討していく必要がある。

第 2 章：臨床褥瘡におけるバイオマーカーの妥当性の検証

背景

第 1 章では、生体における圧力起因性創傷治癒遅延マーカーとして PGE₂、ヒアルロン酸、HSP90α を同定したが、動物種および創傷の種類の違いなどにより、その臨床応用可能性は不明である。そこで本章では、3 つのマーカー候補の臨床褥瘡における妥当性を示すため、以下の 2 つの臨床調査を行った。

- 1) 明らかに圧力により治癒遅延を起こしている褥瘡のデブリードマン組織における 3 つのマーカー候補の妥当性の検証（症例研究 1）
- 2) 圧力負荷や除去が明らかな褥瘡における創面ブロッティング法による HSP90α 評価の妥当性の検証（症例研究 2）

さらに、臨床褥瘡の治癒遅延に対する圧力負荷の関与を検討するため、横断研究において創面ブロッティング法による HSP90α の評価を応用した。

方法

症例研究 1：3 つのマーカー候補の妥当性の検証

片麻痺をもつ 60 歳の入院患者（女性）の仙骨部褥瘡を対象とした。停滞する治癒の促進を目的とした外科的デブリードマンにより切除された創と周辺部位の組織を HE 染色および COX2、HAS2、HSP90α の免疫組織化学に供した。

症例研究 2：創面ブロッティングによる HSP90α 解析の妥当性検証

2014 年 7 月から 2015 年 8 月に都内の大学病院においてカテゴリー II 以上の褥瘡を有し 2 週間以上連続で褥瘡回診を受けた患者を対象とした。褥瘡に明らかな感染兆候を示す患者、局所陰圧閉鎖療法を施行された褥瘡は除外した。前週から創面積が 10%以上の減少が認められなかった褥瘡を治癒遅延創と定義した。創面ブロッティングは創洗浄後、水分を拭き取って実施し、HSP90α の免疫染色に供した。診療録等により創部への圧力の負荷あるいはその改善が明らかな褥瘡について、HSP90α の検出との関連を検討した。

横断研究：治癒遅延に対する圧力負荷の関与

研究参加者、包含・除外基準および治癒遅延の定義は症例研究 2 に準じ、創面ブロッティングによる HSP90α の評価も同様である。HSP90α の検出の有無のほか、基本属性、栄養や疾患など

の全身状態に関連する項目などについて治癒遅延との関連を解析した。

結果

症例研究 1：HE 染色において、第 1 章のモデル動物の組織と同様の所見が認められ、COX2、HAS2、HSP90 α いずれも肉芽組織の線維芽細胞に陽性反応が多く認められた。

症例研究 2：創部にかかる圧力に関する情報が確かな患者 3 名について、治癒経過と HSP90 α の検出を記述的に解析したところ、一週間前に創部が圧力を受けた経緯がある場合 HSP90 α が陽性であり、また ADL 改善により治癒が進行した際に HSP90 α が陰性に転じた。

横断研究：治癒遅延の有無と HSP90 α の検出の有無を調べたところ HSP90 α は治癒遅延の説明変数になることが有意に示された。反復測定データ 47 件中 18 件が治癒遅延しており HSP90 α 陽性はその中で 16 件であった。

考察

症例研究 1 より、PGE₂、ヒアルロン酸および HSP90 α が褥瘡における圧力起因性創傷治癒遅延マーカーとして妥当であることが示めされた。今後、これらを組み合わせた更に精度および感度の高い滲出液評価技術の開発が期待される。

症例研究 2 では、創面ブロッティング法による HSP90 α の評価だけでも圧力起因性創傷治癒遅延の同定法として妥当であることが示された。また横断研究では、圧力が臨床における褥瘡の治癒遅延の大きな原因であることが示唆された。したがって、滲出液が HSP90 α 陽性であった場合には、創部の除圧ケアを見直すことで治癒期間の短縮、褥瘡有病率の低下に繋がると期待される。今後、これらマーカーおよび評価技術の更なる妥当性証明のため前向きコホート研究が求められる。

結論

本研究の結果から PGE₂、ヒアルロン酸、HSP90 α は圧力起因性創傷治癒遅延を示すバイオマーカーとなる可能性がある。また HSP90 α は創面ブロッティング法に適応があり、圧力による褥瘡治癒遅延を判断するための評価手法として利用出来る可能性を示した。