

第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

Noncontact Phased-Array Ultrasound Facilitates Acute Wound Healing in Mice

急性創傷マウスモデルにおける非接触集束超音波の治癒促進効果

日本医科大学大学院医学研究科 形成再建再生医学分野

大学院生 前田（若林）奈緒

Plastic and Reconstructive Surgery（2019年）掲載予定

DOI:10.1097

創傷治療において、局所陰圧閉鎖療法 (NPWT) や体外衝撃波治療 (ESWT) などの機械的刺激を応用した治療法が広まりつつあり、近年では高密度収束超音波 (HIFU) や非接触低周波超音波 (NLFU) による創傷治療や組織再生の報告も散見される。一方で、熱などによる疼痛や組織侵襲、感染リスクなどが臨床的にしばしば問題となっている。今回われわれは、これら組織障害を最小限にし、効果・再現性の高い創傷治療機器の開発を目的として、phased array 型の非接触超音波発生デバイスを医療向けに応用開発した。また、本デバイスで急性創傷にどのような効果が得られるか組織学的に評価し、さらに mRNA の測定から機械刺激負荷後の創傷治癒に重要な血管新生のメカニズムの一端を考察した。

マウス (C57BL/6J) の背部正中対称に2か所創傷を作成し、右側の創部のみ創作成直後から3日間、非接触低周波超音波で1時間継続刺激圧 (40 kHz, 10 Hzバースト周期, 90.6 Pa) を与え、創を時系列 (0, 2, 5, 7, 9, 14日目) で上皮化まで評価した。左側の創はデバイスの設置のみとし、それぞれ創傷治癒評価に上皮化、コラーゲン産生量、新生血管量を評価・定量した。上皮化は創部を高解像度カメラで撮影し、上皮化部分を ImageJ で算出し上皮化面積率 (%) として算出した。コラーゲン染色にはマッソントリクロム染色を行い、血管新生は CD31 抗体に対する免疫蛍光染色で評価した。各計測ポイント創の中心部を含め画像処理ソフトで創 (肉芽) 全体に対する、染色領域をそれぞれ % で算出した。

創作成直後の非接触低周波超音波刺激によって、5日目まで有意に上皮化の促進がみられた (治療側: $62 \pm 27\%$, コントロール側: $30 \pm 26\%$, $p < 0.05$)。コラーゲン量は5日目以降の創部でデバイス負荷側の産生量が有意に多くなるという結果となった (治療側: $44 \pm 14\%$, コントロール側: $28 \pm 13\%$, $p < 0.05$)。また新生血管量に関しては2日目の創傷早期にデバイス負荷側で有意に上昇することを確認した (治療側: $4.6 \pm 1.7\%$, コントロール側: $2.2 \pm 1.0\%$, $p < 0.05$)。創傷早期 (2日目) からの新生血管量が治療側で有意に上昇したことに着目し、われわれは当デバイスが創傷治癒における重要なファクターである可能性を考え、新鮮凍結した肉芽組織から RNA を抽出し、血管新生に重要とされる Notch シグナル伝達系関連遺伝子

群（以下Notch関連遺伝子群）と転写因子を測定した。Notch関連遺伝子群は創傷期の血管新生に非常に重要であり、血管新生前駆物質の活性化を介した表皮や真皮の修復にも関わる。また、既存の報告ではNotch遺伝子が欠損していると、異常な癒痕化から創傷治癒遅延を起こすことも知られており、創傷治癒のプロセスに非常に重要な因子であることが言える。実際にRT-PCRの結果は、2日目治療側でNotch 結合因子D111 ($P < 0.05$)、5日目治療側でNotch1 ($P < 0.05$)の順に一過性の遺伝子増加を示した。この結果は組織染色で2日目から、新生血管量が増加したことも一致した。

本研究では、独自に開発した非接触超音波デバイスが創傷治癒過程の早期でNotch関連遺伝子を活性化したこと、創部内での新生血管量を増やしたことから、周期的圧刺激が血管新生を加速する可能性を示した。また、先行した血管新生に遅れて継時的にコラーゲン量の増加や上皮化の促進に貢献することが認められ、従来に例のない周期的圧刺激という機械的刺激を応用した創傷治療法の可能性を見出した。今後の展望として、本デバイスが血管障害を基礎とした糖尿病性潰瘍や動脈閉塞性潰瘍などの慢性潰瘍モデルにおいても奏功する可能性があり、現在実験を継続している。今後さらに、Notch関連遺伝子のノックアウトマウスなどを用いて、デバイスによって加速される血管新生に関わる詳細なメカニズムに焦点を当てて研究する予定である。

二次審査においては、結果が明瞭で、臨床的発展性のある研究であることが確認された。Notchのリガンドや受容体の発現が上昇している細胞は特定されているのかという質問に対し、今回は組織レベルで検討しているが、血管新生が早期からおこっていること、また培養血管内皮細胞の超音波照射実験においてNotch関連遺伝子の発現上昇が認められていることから、血管内皮細胞が主要な細胞である可能性を考えていると回答された。

今後、臨床応用する場合の課題は何かという質問に対しては、ヒトの創傷における出力や周波数などの最適化が必要であるが、マウスの実験で血管新生が早期からおこっていることを考え、出力をあまり上げず効果を出す可能性を検討していると回答された。さらに、疾患マウスモデルで研究されているかという質問に対しては、糖尿病マウスモデルを使っているが、個体のばらつきが多く結果が一定でないため、今後継続して検討していくことが報告された。

よって本研究は創傷治癒の機序解明に留まらず臨床的にも発展性のある重要な研究であることが確認された。以上より、本論文は学位論文として価値あるものと認定した。