

令和元年5月23日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11909

研究課題名(和文)慢性創傷バイオフィルム誘導に関わるダメージ関連分子の解明と新規ケア技術の確立

研究課題名(英文) Analysis of DAMPs at the wound sites and development of novel wound care on chronic wounds

研究代表者

菅野 恵美 (Kanno, Emi)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：10431595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：慢性創傷では、治癒の障害に死細胞から放出されるダメージ関連分子パターン(DAMPs)の関与が示唆されているが明らかではない。

本研究ではDAMPsとその受容体発現を解析した。創部から抽出したmRNAを用い、Dectin-2が皮膚損傷後12時間をピークとして発現が高まり、その後低下することを確認した。Dectin-2は主に創部に集積した好中球の約40%、マクロファージの約32%に発現していることをフローサイトメトリー解析で明らかにした。Dectin-2が認識するDAMPsがDectin-2陽性細胞周囲に存在していることを免疫組織化学的に確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、慢性創傷では炎症反応の遷延が問題視されてきたが、その主体は外来性の病原微生物や病原微生物由来のPAMPsであると考えられてきた。

本研究により、宿主由来(内因性)のDAMPsが創部領域において存在することが、さらにDAMPsの認識に働く受容体を持った細胞が多数浸潤しているという結果を得た。これらが創部の炎症反応遷延や治癒遅延に多大なる影響を与えている可能性があり、今後さらなる解析が必要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The role of endogenous damage-related molecular patterns (DAMPs) in skin wound healing remains unclear.

In the present study, to identify the possible contribution of CLRs, such as Dectin-2, the expression of Dectin-2 mRNA was examined. Dectin-2 mRNA expression reached peak levels at 12 hours in WT mice, and expression levels declined thereafter to the basal level. We found that both neutrophils and macrophages expressed Dectin-2, and the proportions of these cells expressing Dectin-2 were 40.1±5.0% and 32.1±2.9%, respectively. In immunohistochemical analysis, DAMPs recognized by Dectin-2 was increased in infiltrating cells at the wound site.

研究分野：基礎看護学

キーワード：創傷治癒 バイオフィルム ダメージ関連分子

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性創傷は、壊死・感染により治癒が停滞

近年の高齢化、慢性疾患患者の増加に伴い、褥瘡や下腿潰瘍など慢性創傷を有する患者が増加し、3割が細菌感染によるバイオフィーム形成を伴う重症例と報告されている。慢性創傷の治療には長期間を要し、莫大な医療費と精神的な忍耐力が必要とされる。順調に治癒する急性創傷に対し、慢性創傷では、壊死や感染により炎症期が遷延し治癒が停滞する。

(2) 壊死組織の除去（デブリードマン）により、細菌感染が制御され、治癒が進行

皮膚に発生した創傷において、壊死組織は細菌の温床、物理的障壁と考えられている。実際に壊死組織を除去（デブリードマン）すると感染が沈静化し、治癒が進行する症例が多い。しかし、壊死組織の詳細な解析は行われておらず、死細胞から放出される『ダメージ関連分子パターン(Damage-Associated Molecular Patterns; DAMPs)』がバイオフィームや治癒過程に与える影響は明らかではない。

(3) DAMPs はバイオフィーム形成の足場となるか？

創傷において、バイオフィームが形成される第1ステップは、創面への有機物の付着である。創傷では、皮膚が損傷し大量のDAMPsの放出が予想される。従ってDAMPsがバイオフィーム形成の足場となっている可能性が非常に高い。近年、免疫学の分野では、炎症誘導のイニシエーターとして、DAMPsが注目されている。これまでに、タンパク質や核酸など様々なDAMPsが発見され、いずれも細胞の損傷により、初めて放出される。申請者も動物実験モデルを用いて、創作成前に検出されなかったDAMPs(SAP130)が、創作成後に初めて検出されることを確認している。

創傷治癒とDAMPsについて、代表的なDAMPsであるHMGB1投与により、糖尿病マウスの治癒促進が報告されている。しかしDAMPsと感染との複合的な関連は解明されておらず、DAMPs制御に有効なケア技術についても解明すべき点である。

創部の局所環境を整えることにより全身への感染拡大を未然に防ぐことができれば、罹病期間の短縮に繋がる。さらに、疾病の早期回復は患者のQOLを確実に向上させる。

慢性創傷では、免疫不全、低栄養、糖尿病などの基礎疾患を有する患者における感染症の蔓延化が問題視されているが、現在でも制御困難な感染症が多数存在する。既存のケアには限界があり、新たな切り口として、DAMPs制御による局所管理方法に注目している。DAMPsをターゲットとした創傷管理方法は世界的にも解明されていない。一部の抗菌薬入り軟膏に、バイオフィーム破壊能があると報告されているが、一過性の作用を示すに留まる。

申請者はDAMPsと創部炎症に注目し、これまでに様々なDAMPsの中でSAP130が創部炎症反応の惹起に関与する可能性を見いだしている。

2. 研究の目的

本研究では以下の点を明らかにすることを当初の目的とした。

(1) 壊死組織中のDAMPsがバイオフィーム産生、治癒に与える影響の解明

- ①治癒過程で産生されるDAMPsの種類、産生量、推移
- ②創部の細菌数、バイオフィームの有無
- ③創傷治癒速度

(2) DAMPs投与もしくはDAMPs阻害がバイオフィーム産生、治癒に与える影響の解明

- ①DAMPs投与の効果
- ②DAMPsに対する抗体投与(DAMPsの阻害)の効果

3. 研究の方法

(1) 創傷におけるDAMPsやDAMPsを介したシグナル伝達が治癒に与える影響の解析

本研究では、PAMPsやDAMPsの認識に関わる受容体として、特に好中球やマクロファージに発現しているDectin-2に注目して解析を行った。

①実験モデルの作成

・全身麻酔下で野生型マウス(C57BL/6)、Dectin-2遺伝子欠損(KO)マウス(入手済・自家繁殖)の背側皮膚に6mmパンチで開放創を作成、閉鎖環境を保持し、野生型マウスとDectin-2KOマウス間で下記解析項目について比較検証する。

②各種解析項目に関する検証

- ・創閉鎖率、再上皮化率、血管新生、コラーゲン合成の解析
- ・フローサイトメトリーによる炎症性細胞浸潤、好中球活性化の評価
- ・創部におけるDectin-2が認識するDAMPs発現の解析

(2) Dectin-2のリガンド投与が創傷治癒に与える影響の解析

①実験モデルの作成

- ・(1)と同様の方法で創傷を作成し、創傷作成後、直ちに α -マンナン(Dectin-2のリガンド)を投与し、閉鎖環境を保持する。

②各種解析項目に関する検証

- ・創閉鎖率、再上皮化率、血管新生、コラーゲン合成の解析
- ・フローサイトメトリーによる炎症性細胞浸潤、好中球活性化の評価
- ・NETs の同定: 好中球マーカー: Ly6G、NETs マーカー: H3Cit、DNA マーカー: Hoechst 33342 にて染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて解析

4. 研究成果

これまで、創傷治癒と各種パターン認識受容体や受容体の下流のアダプター分子 (MyD88 や CARD9) の関与が各種遺伝子欠損マウスを用いて行われてきたが、どの受容体や分子も欠損すると治癒が遅延する、すなわち創傷治癒にプラスの役割を果たしていることが報告されてきた。

今回我々は、慢性創傷で問題となってくる DAMPs の関与を進める中で、好中球やマクロファージに発現している受容体である Dectin-2 を欠損させたマウスでは、創傷治癒が促進し、Dectin-2 のリガンドを投与することによって治癒が遅延することを世界で初めて明らかにした。

(1) DAMPs の認識に関わる Dectin-2 とそのリガンドの発現

創部から抽出した mRNA を用い、Dectin-2 が皮膚損傷後 12 時間をピークとして発現が高まり、その後低下することを確認した。Dectin-2 は主に創部に集積した好中球の約 40%、マクロファージの約 32% に発現していることをフローサイトメトリー解析で明らかにした。

また、Dectin-2 が認識する DAMPs が Dectin-2 陽性細胞周囲に存在していることを免疫組織化学的に確認した (未発表データ)。

(2) Dectin-2 遺伝子欠損が創傷治癒に与える影響

野生型マウスと Dectin-2 遺伝子欠損マウスに創傷を作成し、各種指標にて解析したところ、創傷作成 3 日目、5 日目に Dectin-2 遺伝子マウスで有意に高い創閉鎖率を認めた。さらに、5 日目の再上皮化も有意に高かった。

(3) Dectin-2 遺伝子欠損が創部への白血球集積に与える影響

創部から白血球を分離し、フローサイトメトリーにて定量的に解析したところ、創作成 12 時間、24 時間、3 日目のマクロファージ集積が野生型マウスと比較し Dectin-2 遺伝子欠損マウスで有意に少ない結果を得た。さらに、マクロファージポピュレーションを解析したところ、Dectin-2 遺伝子欠損マウスでは、炎症性マクロファージから抗炎症性マクロファージへのシフトがよりスムーズに行われていた。

(4) Dectin-2 のリガンド投与が創傷治癒に与える影響

野生型マウスと Dectin-2 遺伝子欠損マウスに作成した創部に Dectin-2 のリガンド (PAMPs) である α -マンナンを投与したところ、野生型マウスでは治癒が遅延したが、Dectin-2 遺伝子欠損マウスでは影響を認めなかった。さらに、野生型マウスではコラーゲン特異的なアミノ酸であるヒドロキシプロリンの量が α -マンナン投与によって有意に低かった。さらに、血管内皮細胞のマーカーである CD31、筋線維芽細胞のマーカーである α -SMA の単位面積あたりの量が有意に低かった。

(5) Dectin-2 のリガンド投与が白血球集積に与える影響

創部から白血球を分離し、フローサイトメトリーにて定量的に解析したところ、創作成 3 日目と 5 日目の好中球集積数が α -マンナン投与群において有意に多い結果を得た。さらに、好中球集積に関わる IL-17A と TNF- α 産生量も α -マンナン投与群において有意に高かった。

(6) Dectin-2 のリガンド投与が NETosis に与える影響

α -マンナンを創部に投与することにより、Dectin-2 依存的に好中球が遷延し、創傷治癒が遅延することから、好中球による治癒遷延機構について、好中球特異的な細胞死である NETosis に注目して解析を行った。

その結果、野生型マウスの創部に α -マンナンを投与したところ、

NETosis マーカーである Cit H3 の増強が好中球マーカー (Ly6G) 上に共発現していることを確認した (図 1, 雑誌論文①より引用)。

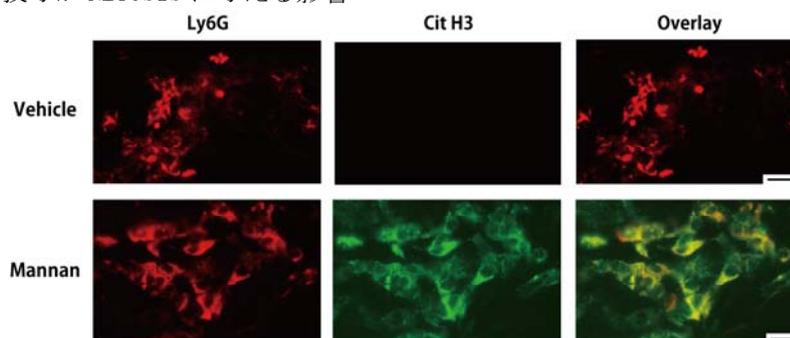


図 1

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- ① Takayuki Miura, Kazuyoshi Kawakami, Emi Kanno, Hiromasa Tanno, Hiroyuki Tada, Noriko Sato, Airi Masaki, Rin Yokoyama, Kotone Kawamura, Yuki Kitai, Naoyuki Takagi, Kenji Yamaguchi, Natsuki Yamaguchi, Yoshika Kyo, Keiko Ishii, Yoshimichi Imai, Shinobu Saijo, Yoichiro Iwakura, Masahiro Tachi: Dectin-2-mediated signaling leads to delayed skin wound healing through enhanced neutrophilic inflammatory response and neutrophil extracellular traps formation. J Invest Dermatol, 139(3): 702-711, 2019. DOI: 10.1016/j.jid.2018.10.015. 査読有
- ② Emi Kanno, Hiromasa Tanno, Kenji Yamaguchi, Ayako Sasaki, Ryoko Maruyama, Masahiro Tachi: Experimental wound ischemia does not promote Pseudomonas aeruginosa biofilm formation. J Dermatol Dermatologic Surg, 22(2): 68-71, 2018. DOI: 10.4103/jdds.jdds_33_18. 査読有
- ③ Emi Kanno, Kazuyoshi Kawakami, Hiromasa Tanno, Aiko Suzuki, Noriko Sato, Airi Masaki, Ayano Imamura, Naoyuki Takagi, Takayuki Miura, Hideki Yamamoto, Keiko Ishii, Hiromitsu Hara, Yoshimichi Imai, Ryoko Maruyama, Masahiro Tachi: Contribution of CARD9-mediated signaling to wound healing in skin. Exp Dermatol, 26(11): 1097-1104, 2017. DOI: 10.1111/exd.13389. 査読有

〔学会発表〕(計7件)

- ① Emi Kanno, Hiromasa Tanno, Ayako Sasaki, Keiko Ishii, Shinobu Saijo, Yoichiro Iwakura, Kazuyoshi Kawakami: Dectin-2-mediated signaling leads to delayed skin wound healing through enhanced neutrophilic inflammatory response and NETosis. 第47回日本免疫学会学術集会 (Workshop-19), 福岡, 2018.
- ② 山口賢次, 川上和義, 菅野恵美, 丹野寛大, 佐々木綾子, 三浦考行, 高木尚之, 館正弘: 皮膚創傷治癒における Dectin-1,2 シグナル活性化の影響の違い. 第48回日本創傷治癒学会, 東京, 2018年.
- ③ 佐々木綾子, 菅野恵美, 丹野寛大, 石井恵子, 丸山良子, 川上和義, 館正弘: Dectin-2 シグナル活性化による創傷治癒遅延への Natural Killer T 細胞の関与. 第48回日本創傷治癒学会, 東京, 2018年.
- ④ MIURA Takayuki, Kanno Emi, Tanno Hiromasa, SATO Noriko, MASAKI Airi, ISHII Keiko, SAIJO Shinobu, IWAKURA Yoichiro, KAWAKAMI Kazuyoshi: Effect of Dectin-2-mediated signaling on skin wound healing and NETosis. 第46回日本免疫学会学術集会, 仙台, 2017年.
- ⑤ 菅野恵美: C タイプレクチン受容体を介した皮膚炎症反応の制御. 第1回東北医真菌研究会, 仙台, 2017.
- ⑥ 菅野恵美, 川上和義, 丹野寛大, 山口賢次, 館正弘: バイオフィームに対する治療・ケア—何をターゲットとするべきか?. 第47回日本創傷治癒学会 シンポジウム4 創傷感染管理の最前線: Biofilm-based wound therapy, 京都, 2017.
- ⑦ 三浦考行, 川上和義, 菅野恵美, 丹野寛大, 多田浩之, 佐藤紀子, 正木愛梨, 高木尚之, 山口賢次, 石井恵子, 館正弘: 皮膚創傷における Dectin-2 を介した治癒過程および NETosis の制御. 第47回日本創傷治癒学会, 京都, 2017.

〔図書〕(計6件)

- ① 丹野寛大, 菅野恵美: 急性創傷と慢性創傷の治癒過程. 菅野恵美 企画編集, WOC Nursing. 医学出版, 6(7): 5-12, 2018.
- ② 菅野恵美: バイオフィーム制御による創傷治癒へのアプローチ. 菅野恵美 企画編集, WOC Nursing. 医学出版, 6(7): 20-25, 2018.
- ③ 菅野恵美: Part3 column 4. 研究者の目から見た皮膚科学の面白さ!—創傷治癒過程の華麗なるバトンパスに魅了されて—. 安部正敏 責任編集, Visual Dermatology. 秀潤社, 17(2):180, 2018.
- ④ 丹野寛大, 菅野恵美: Part1 創傷治癒と細菌感染. 菅野恵美 編集, 看護技術 第1特集 創部感染の予防とケア. メディカルフレンド社, 63(9):4-7, 2017.
- ⑤ 菅野恵美: Part2 創部感染のアセスメントとケア 3) 褥瘡. 菅野恵美 編集, 看護技術 第1特集 創部感染の予防とケア. メディカルフレンド社, 63(9):20-23, 2017.
- ⑥ 菅野恵美, 館正弘: 第7章足のアセスメントと検査. 1. プライマリケアで必要なアセスメント. 潰瘍・感染徴候のアセスメント. 一般社団法人日本フットケア学会編集, フットケアと足病変ガイドブック. 医学書院, 71-76, 2017.

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称：皮膚損傷治癒の促進剤
発明者：菅野恵美、川上和義、館 正弘、丹野寛大
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2018-64275
出願年：2018 年
国内外の別：国内

名称：皮膚塗布用の皮膚創傷治癒促進組成物、その製造方法、及び創傷被覆材
発明者：菅辰彦、渡邊卓巳、菅野恵美、川上和義、館 正弘、丹野寛大
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2018-211868
出願年：2018 年
国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ：<http://www.snp.med.tohoku.ac.jp/>
（東北大学大学院医学系研究科看護アセスメント学分野）

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：館 正弘
ローマ字氏名：(TACHI, masahiro)
所属研究機関名：東北大学
部局名：大学院医学系研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：50312004

研究分担者氏名：川上 和義
ローマ字氏名：(KAWAKAMI, kazuyoshi)
所属研究機関名：東北大学
部局名：大学院医学系研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：10253973

研究分担者氏名：丹野 寛大
ローマ字氏名：(TANNO, hiromasa)
所属研究機関名：東北大学
部局名：大学院医学系研究科
職名：助教
研究者番号（8桁）：10755664

研究分担者氏名：丸山 良子
ローマ字氏名：(MARUYAMA, ryoko)
所属研究機関名：東北大学
部局名：大学院医学系研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：10275498

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。