

令和 2 年 4 月 8 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11548

研究課題名（和文）創傷治癒過程における免疫系細胞の役割についての包括的研究：「創傷免疫学」の確立

研究課題名（英文）The roles of immune cells in the process of wound healing

研究代表者

菅 浩隆 (Suga, Hirotaka)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：60633972

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：創傷治癒過程においては様々な免疫系細胞が関与しているが、その役割については不明な点も多い。我々の研究により、マクロファージという免疫系細胞が、インターロイキン6というサイトカインの分泌を介して線維芽細胞に働きかけ、線維芽細胞による線維化を抑制していることが明らかとなった。この結果は、創傷治癒過程における線維化制御のメカニズム解明の一助になり、ケロイドや肥厚性瘢痕の新たな治療に結びつく可能性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

創傷治癒の機序についてはまだ不明な点も多く、ケロイドや肥厚性瘢痕など創傷治癒に関連した疾患に苦しむ患者さんも多い。我々の研究により、マクロファージという免疫系細胞がインターロイキン6というサイトカインの分泌を介して創傷治癒過程の線維化を抑制していることが明らかになった。この結果はケロイドや肥厚性瘢痕の予防や治療につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Various kinds of immune cells are involved in the process of wound healing. However, roles of these immune cells have been unclear. Our in vitro study revealed that CD206+ macrophages have antifibrotic effects on fibroblasts via a paracrine mechanism involving IL-6. An increased understanding of these effects, especially in vivo, will help elucidate the mechanism of scar control in wound healing and contribute to the development of new therapies for scars.

研究分野：創傷治癒

キーワード：創傷治癒 マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

創傷治癒過程には様々な免疫系細胞が関与していることが知られているが、それらの役割については不明な点も多い。形成外科領域においては、創傷治癒に関連した疾患としてケロイドや肥厚性瘢痕などの線維性疾患があり、これらの疾患は整容的にも機能的にも患者に大きな障害をもたらす。創傷治癒過程における線維化制御のメカニズムを解明することができれば、ケロイドや肥厚性瘢痕の予防や治療につながると考えられる。

2. 研究の目的

近年、創傷治癒過程においてマクロファージ (特に M2 タイプと呼ばれる CD206 陽性マクロファージ) が重要な役割を果たしているとの報告がなされているが、その詳細については不明な点も多い。本研究は CD206 陽性マクロファージが線維化の主体である線維芽細胞に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

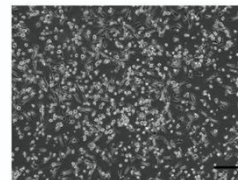
3. 研究の方法

先行研究に基づき、ヒト末梢血から分離した単核球を温度応答性デッシュで継代培養することにより、CD206 陽性マクロファージを得た。続いて、CD206 陽性マクロファージと線維芽細胞を共通の培地で培養する共培養システムを確立させた。72 時間の共培養後に線維芽細胞から RNA を抽出し、線維化関連遺伝子の解析を行った。さらに、培養上清に含まれるサイトカインの解析を行うことにより、両細胞の相互作用に与える因子の解明を試みた。

4. 研究成果

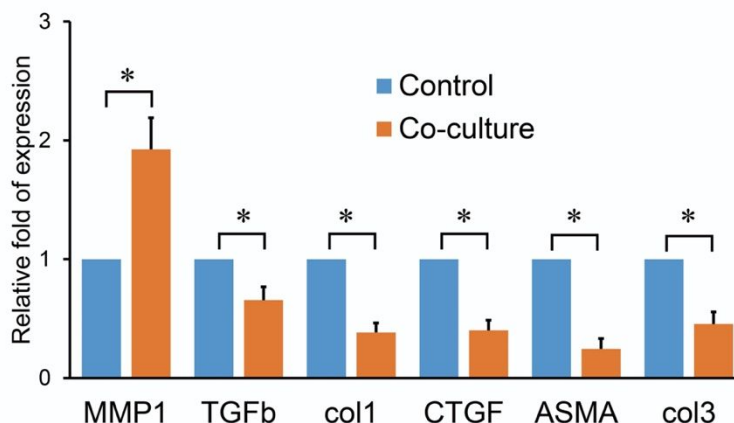
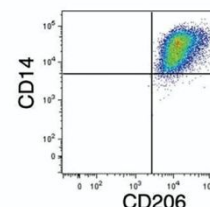
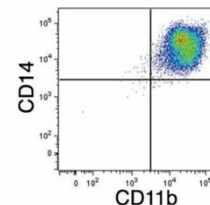
1. フローサイトメトリー解析

培養したマクロファージは紡錘形の接着細胞であった。フローサイトメトリー解析ではマクロファージのマーカである CD11b と CD14 の 2 つが発現していた。また、M2 マクロファージの特異的表面マーカーとして知られている CD206 が陽性であることも確認した (右図)。



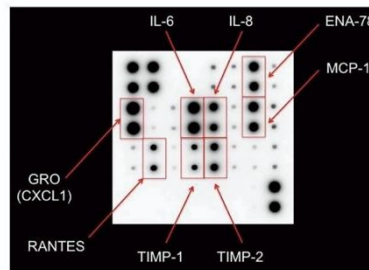
2. CD206 陽性マクロファージとの共培養下における線維芽細胞の遺伝子発現

real-time RT-PCR の結果から、共培養を行った線維芽細胞では単独培養と比較して MMP-1 の発現が上昇していた (fold change 1.92 ± 0.27 , $P = 0.011$)。一方で col 1 (fold change 0.38 ± 0.08 , $P < 0.01$) col 3 (fold change 0.45 ± 0.20 , $P < 0.01$) SMA (fold change 0.24 ± 0.09 , $P < 0.01$) CTGF (fold change 0.40 ± 0.09 , $P < 0.01$) TGF- (fold change 0.66 ± 0.11 , $P = 0.020$) の発現は低下していた (下図)。



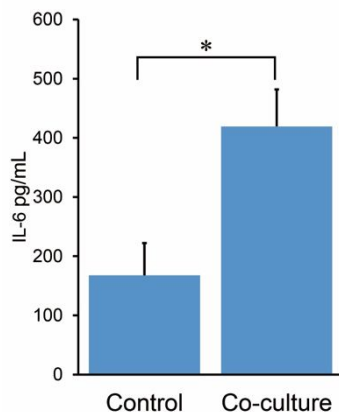
3. サイトカインアレイによる評価

サイトカインアレイの結果、マクロファージは IL-6、IL-8、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)、TIMP-1、TIMP-2、GRO (CXCL1)、RANTES、ENA-78 など様々なサイトカインを分泌していることが判明した (右図)。



4. ELISA による評価

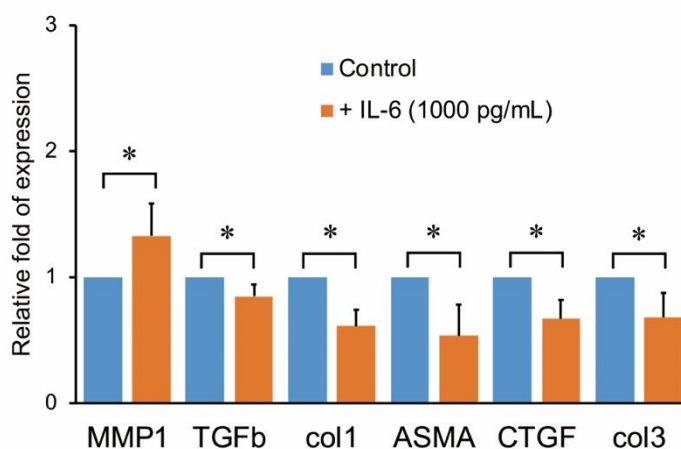
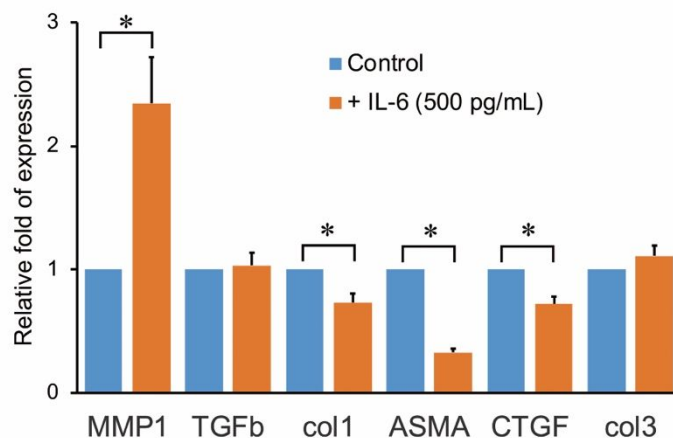
ELISA による解析では、共培養群の IL-6 濃度 (419 ± 88 pg/mL) は対照群 (単独培養) (167 ± 77 pg/mL) と比較して有意に高かった (下図)。



Positive	Positive	Negative	Negative	Angiogenin	EGF	ENA-78	bFGF
Positive	Positive	Negative	Negative	Angiogenin	EGF	ENA-78	bFGF
GRO	INF- γ	IGF-1	IL-6	IL-8	LEPTIN	MCP-1	PDGF-BB
GRO	INF- γ	IGF-1	IL-6	IL-8	LEPTIN	MCP-1	PDGF-BB
PIGF	RANTES	TGF- β 1	TIMP-1	TIMP-2	Thrombo	VEGF-D	VEGF-D
PIGF	RANTES	TGF- β 1	TIMP-1	TIMP-2	Thrombo	VEGF	VEGF-D
BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	Negative	Positive
BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	Negative	Positive

5. IL-6 による抗線維化作用

線維芽細胞に IL-6 を投与した群において MMP-1 の発現は上昇し、col 1、col 3、SMA、CTGF、TGF- β の発現は減少しており、共培養を行ったときの変化とほぼ同様の結果となった (下図)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅浩隆
2. 発表標題 フローサイトメトリーを用いた肉芽組織内の免疫系細胞の解析
3. 学会等名 第28回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅浩隆
2. 発表標題 創傷治癒過程におけるマクロファージの役割
3. 学会等名 第49回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 倉地功
2. 発表標題 単球・マクロファージ系細胞が分泌するIL-6は線維化を抑制する
3. 学会等名 第27回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菅浩隆
2. 発表標題 創傷治癒過程における単球・マクロファージ系細胞による線維化制御
3. 学会等名 第26回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----