

令和 元年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17393

研究課題名(和文) バイオフィーム形成慢性創傷の治癒促進へ向けたリンパ球制御ケア技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of new wound care for chronic wound with infection by analysing lymphocyte function

研究代表者

丹野 寛大 (Tanno, Hiromasa)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10755664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：褥瘡や糖尿病性解体潰瘍のような慢性創傷の約90%に細菌感染が関与しているとされており、中でも緑膿菌は慢性創傷からよく分離され、慢性創傷における治癒遅延の原因と考えられている。本研究では、創傷治癒や緑膿菌排除に重要な役割をもつ自然免疫リンパ球の一つ、NKT細胞に注目し、解析を行った。本研究において、NKT細胞は再上皮化率、緑膿菌排除を促進することが明らかとなった。その機序にはIL-17A産生の増加による好中球集積や抗菌ペプチドの産生増加が関わっている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、リンパ球が創傷治癒促進に関わることは報告されているが、感染および貪食細胞に対する機能は評価されていない。また、感染によるバイオフィーム産生に対する研究は抗菌薬による細菌数減少に主眼が置かれ、リンパ球機能など宿主側の要因については殆ど明らかになっていない。

本研究により、リンパ球の一種NKT細胞が緑膿菌接種創の創傷治癒と菌排除を促進することが明らかとなり、リンパ球機能に着目した新しいケア技術の確立につながる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Chronic wound infections are considered one of the most severe wound problem. Indeed, some studies reported bacteria are present over 90% of chronic wounds. *Pseudomonas aeruginosa* is frequently isolated from chronic wounds and thought to be a cause of delayed wound healing. Previously, we showed that iNKT cell deficiency resulted in a delayed wound healing process. Other group showed that NKT cells enhanced pulmonary clearance of this bacteria. However, the role of NKT cells in the host defense to *P. aeruginosa* infection at the wound sites remains to be elucidated. In this study, we conducted to elucidate the role of NKT cells in the host defense to *P. aeruginosa* infection at the wound site. NKT cells promote re-epithelialization and *P. aeruginosa* clearance during wound healing. This mechanism may be associated with increased levels of IL-17A and α -defensin1.

研究分野：基礎看護学

キーワード：創傷治癒 感染 NKT細胞 リンパ球

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性創傷における細菌感染によるバイオフィーム産生の問題

創傷の難治化の要因は、全身的な要因として糖尿病、免疫不全、栄養不良、加齢、局所要因として感染、血流障害などが知られている。その中でも糖尿病や免疫不全など易感染状態の患者における感染が最大の問題となっている。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急増し、3割が細菌感染によるバイオフィーム産生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。

(2) バイオフィーム形成には白血球が関与する

白血球は主に好中球、マクロファージのような貪食細胞とリンパ球に分類される。白血球は細菌感染による創部のバイオフィーム形成を制御する。しかし、易感染状態下では、本来、細菌を排除するために集積した貪食細胞の死骸がバイオフィーム形成の温床となることが報告されている。

(3) リンパ球は感染制御・貪食細胞機能に関わるか？

創部細菌感染への好中球、マクロファージの貪食・殺菌能については、動物モデルを用いた詳細な解析がなされている。しかし、リンパ球が慢性創傷のバイオフィーム形成や貪食細胞機能に与える影響は明らかでない。リンパ球には、通常のT細胞、B細胞の他にNatural Killer (NK)細胞、NKT細胞、 $\gamma\delta$ T細胞などの存在が知られている。リンパ球は非常に強力な免疫増強効果を有し、さらに、貪食細胞の司令塔として働くことが報告されている。我々は、「慢性創傷では、リンパ球が正常に機能せず、貪食細胞が創部に停滞し、バイオフィーム形成が増強されるため治癒が遅延する」という仮説を立てた。我々がリンパ球 (NKT細胞) 欠損マウスを用いて検証を試みた結果、リンパ球 (NKT細胞) 欠損マウスでは、バイオフィーム形成の温床となる好中球が創部に停滞し、治癒が遅延した。これは、我々の仮説を裏付けるものである。これまでに、慢性創傷で問題となる緑膿菌による肺炎では、リンパ球が感染制御に中心的に関与することが明らかにされている。慢性創傷でも同様にリンパ球が中心的役割を担う可能性が大きい、その詳細な機能は解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、緑膿菌感染モデルマウスを用い、以下の点を明らかにすることを目的とした。

・慢性創傷におけるバイオフィーム産生、貪食細胞機能に対するリンパ球の影響

- (1) バイオフィームを形成した創傷におけるリンパ球数の推移、種類、機能
- (2) 創部の細菌数、バイオフィーム破壊の有無
- (3) 貪食細胞数、機能 (貪食・殺菌能)

本研究において、感染によるバイオフィーム産生制御やリンパ球活性化に有効な創傷ケアが明らかになれば、リンパ球コントロールによる新たな創傷管理法の確立に繋がる。すなわち、創傷感染において重要なリンパ球機能が分かれば、「リンパ球活性化成分を含んだドレッシング材の開発」、「リンパ球を適切に活性化させる創傷ケア」により、これまで救済できなかった症例を救える可能性が非常に高く、研究の意義は大きい。

3. 研究の方法

NKT細胞欠損が緑膿菌接種創に与える影響

(1) 実験モデルの作製

野生型マウス (C57BL/6) と NKT細胞欠損マウス (Ja18KO マウス) を 7~8 週齢で使用し、背側の体毛を除毛し、皮膚を完全に露出させ、70%エタノールで消毒後、麻酔薬を吸入させながら、皮膚生検用 6 mmパンチとハサミを用いて、マウス 1 匹につき 2 つの皮筋に達する全層欠損創を作成した。創作後、緑膿菌接種群には 1×10^4 CFU/創となるように接種した。その後、ポリウレタンフィルムと弾性粘着包帯で創部を閉鎖環境においた。皮膚組織はマウスを犠牲死させた後、創周囲 1 cm 角を採取した。

(2) 菌液の調整

緑膿菌 PAO1 株を羊血液寒天培地上で 37 °C、24 時間培養した後、単一コロニーを Brain Heart Infusion (BHI) メディウム内で、37 °C で 24 時間静置培養し増菌した。この菌液を生理食塩水で 3 回洗浄した。菌液の濃度を OD600 で吸光度を測定し、 1×10^6 CFU/mL の濃度の菌液を作製し、創部に 10 μ L 接種した。

(3) 治癒速度と創部緑膿菌数に関する解析項目

創閉鎖率

創作成直後及び各タイムポイントで撮影した画像を画像解析ソフト Axio vision Release 4. 6 を使用し、創の辺縁をトレースすることによって創面積を測定し、創閉鎖率を計算した。創閉鎖率は以下の式で算出した。創閉鎖率 = $(1 - \text{各タイムポイントの創面積} / \text{創作成時の創面積}) \times 100 (\%)$

再上皮化率

創周辺 1 cm 角を摘出し、頭尾側方向に半切した後、4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋した。半切した面から厚さ 3 μm の切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施した。HE 染色をした皮膚切片を用いて再上皮化率を算出した。再上皮化率は以下の式で算出した。再上皮化率 = $(\text{創幅} - \text{上皮間隙} / \text{創幅}) \times 100 (\%)$

創部緑膿菌数の解析

採取した皮膚組織をホモジネートし、ホモジネート液を希釈した後、羊血液寒天培地と緑膿菌選択培地である NAC 寒天培地にのせ、コンラージ棒で均等に塗抹した。塗抹後 37 °C で 24 時間静置培養した。培養後、コロニーをカウントし、創 1 つ当たりの菌数を算出した。

白血球集積および白血球分画の解析

各タイムポイントで摘出した創 2 個中の白血球を分離した。摘出した創を 10mM HEPES と 10% FCS、1 mg/mL collagenase および 1 mg/mL hyaluronidase を加えた RPMI1640 培養液とともにステンレスメッシュを用いてホモジネートした後、37°C で 2 時間振盪した。ホモジネート中の皮膚組織片を 70 μm のナイロンメッシュを通過させることにより除いた後、遠心し、細胞ペレットを 4 mL の 40% Percoll 溶液に懸濁し、80% Percoll 溶液層の上に重層した。20 °C、1800 回転で 20 分間遠心した後、中間層を回収し、1%FCS・0.1%アジ化ナトリウム添加 PBS にて 3 回洗浄した。皮膚から回収した白血球の Fc γ 受容体 (Fc γ R) をブロックする目的で、事前に 1% FCS・0.1%アジ化ナトリウム添加 PBS 中の細胞を抗 Fc γ RII・Fc γ RIII モノクローナル抗体 (mAb) (clone 2.4G2) と氷上で 15 分間インキュベートした。その後、Pacific Blue 標識抗 CD45 抗体 (clone 30-F11)、APC 標識抗 CD11b 抗体 (clone-M1/70)、APC/Cy7 標識抗 Ly6G 抗体 (clone 1A8)、Alexa Fluor 488 標識抗 F4/80 抗体 (clone BM8)、PE 標識抗 CD3 ϵ 抗体 (clone 145-2C11)、PE 標識抗 NK1.1 抗体 (clone PK136)、PE 標識抗 TCR $\gamma\delta$ 抗体 (clone UC7-13D5)、PE 標識抗 CD45R/B220 抗体 (clone RA3-6B2) で染色した。対照として、アイソタイプを一致させた IgG にて染色した。染色された細胞は、FACS Canto II にて解析を行い、CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺細胞を好中球、CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺細胞をマクロファージ、CD45⁺細胞中の CD3 ϵ ⁺、TCR $\gamma\delta$ ⁺、NK1.1⁺、B220⁺のいずれかを発現する細胞をリンパ球とした。

サイトカイン・ケモカイン、抗菌ペプチド産生の解析

摘出皮膚組織より mRNA を ISOGEN を用いて抽出し、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17、IL-22、IFN- γ)、好中球遊走に関与するケモカイン (MIP-2、KC) 産生、抗菌ペプチド (β -defensin 1、 β -defensin 3、S100A8、S100A9) 発現量を real-time PCR 法で解析した。

4 . 研究成果

(1) NKT 細胞が緑膿菌接種創の治癒速度に与える影響

創閉鎖への影響

創作成及び緑膿菌接種後 3、5、7、14 日目に創閉鎖率の算出を行った。3、5、7 日目において、野生型マウスと J α 18KO マウス間で有意な差はみられなかった。14 日目については、創部境界不明瞭であったため、測定から除外した。

再上皮化への影響

創作成および緑膿菌接種後 3、5、7 日目に創部を含む皮膚組織を摘出し、HE 染色を施し再上皮化率の観察を行った。創作成後 7 日目における J α 18KO マウスで再上皮化が有意に低下したが、他のタイムポイントでは両群間に差は認められなかった。

(2) NKT 細胞が創部緑膿菌排除に与える影響

創作成及び緑膿菌接種後 5、7、14 日目に創部緑膿菌 CFU の算出を行った。7 日目では、血液寒天培地、NAC 寒天培地共に、創部細菌数が J α 18KO マウスで野生型マウスよりも有意に増加していた。14 日目では、血液寒天培地において緑膿菌 CFU 数が J α 18KO マウスで有意に増加し、NAC 寒天培地では 5、14 日目では、J α 18KO マウスで緑膿菌 CFU 数が野生型マウスと比べ増加傾向であった。

(3) NKT 細胞が緑膿菌接種創の白血球集積に与える影響

緑膿菌接種創への白血球集積と分画に NKT 細胞が与える影響を検討するため、創作成及び緑膿菌接種後 3、5、7 日目の皮膚組織から白血球を採取し、フローサイトメトリーを行い、好中球、マクロファージ、リンパ球数について解析を行った。緑膿菌接種後 3 日目では、野生型マウスと比較し、 $J\alpha 18KO$ マウスで好中球が有意に増加したが、7 日目では有意に低下した。創部マクロファージ数は両群間に差はなかった。リンパ球数は、5 日目において $J\alpha 18KO$ マウスで野生型マウスと比べ、有意に低下した。また、創作成及び緑膿菌接種 7 日目の創部を含む摘出皮膚組織を HE 染色し、創部への白血球集積を観察した。野生型マウスと比較し $J\alpha 18KO$ マウスにおいて集積した白血球が少ない傾向がみられた。集積した白血球の多くは分葉核を示しており、好中球であると考えられる。

(4) NKT 細胞が緑膿菌接種創のサイトカイン・ケモカイン、抗菌ペプチド産生に与える影響

創作成及び緑膿菌接種後 1、3、5 日目の摘出皮膚組織を用いてリアルタイム PCR 法で各種サイトカイン、抗菌ペプチド mRNA 発現について解析を行った。

好中球の分化、遊走及び抗菌ペプチド産生を促進するサイトカイン IL-17A 発現は、緑膿菌接種後 1 日目に野生型マウスと比べ、 $J\alpha 18KO$ マウスで有意に増加したが、5 日目では、有意に低下した。好中球を遊走させるケモカイン、KC、MIP-2 についてはいずれのタイムポイントにおいても両群間に差はみられなかった。緑膿菌を殺菌する抗菌ペプチド β -defensin 1、 β -defensin 3 について解析したところ、 β -defensin 1 は緑膿菌接種後 5 日目に有意に $J\alpha 18KO$ マウスで低下し、他のタイムポイントでは $J\alpha 18KO$ マウスで低下傾向を示した。 β -defensin 3 については、緑膿菌接種後 5 日目に $J\alpha 18KO$ マウスで低下傾向を示した。S100A8/9 については両群間に差はなかった。抗菌ペプチド産生を促進する IL-22 発現は緑膿菌接種後 5 日目に $J\alpha 18KO$ マウスで野生型マウスと比べ、低下傾向を示した。TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 発現はいずれのタイムポイントにおいても両群間に差はなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

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, Tachi M: Dectin-2-Mediated Signaling Leads to Delayed Skin Wound Healing through Enhanced Neutrophilic Inflammatory Response and Neutrophil Extracellular Trap Formation. *J Invest Dermatol*, 139(3):702-711, 2018. DOI: 10.1016/j.jid.2018.10.015. 査読有り

Hiromasa Tanno, Kazuyoshi Kawakami, Emi Kanno, Aiko Suzuki, Naoyuki Takagi, Hideki Yamamoto, Keiko Ishii, Yoshimichi Imai, Ryoko Maruyama, Masahiro Tachi: Invariant NKT cells promote skin wound healing by preventing a prolonged neutrophilic inflammatory response. *Wound Repair and Regeneration*, 25(5): 805-815, 2017. DOI: 10.1111/wrr.12588. 査読有り

〔学会発表〕(計 9 件)

Hiromasa Tanno, Emi Kanno, Ayako Sasaki, Keiko Ishii, Kazuyoshi Kawakami: Contribution of iNKT cells to the clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from skin wounds. 第47回日本免疫学会学術集会, 福岡, 2018年12月10-12日.

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, 福岡, 2018年12月10-12日.

Ayako Sasaki, Emi Kanno, Hiromasa Tanno, Keiko Ishii, Yoichiro Iwakura, Kazuyoshi Kawakami: Effect of interferon- γ deficiency on skin wound healing processes. 第47回日本免疫学会学術集会, 福岡, 2018年12月10-12日.

丹野寛大, 菅野恵美, 佐藤すずな, 霜野瑞葵, 佐々木綾子, 山口賢次, 石井恵子, 丸山良子, 川上和義, 館正弘: 緑膿菌接種創の治癒過程における Natural Killer T 細胞の役割. 第48回日本創傷治癒学会, 東京, 2018年11月29-30日.

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 11 月 29-30 日.

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 11 月 29-30 日.

丹野寛大, 菅野恵美, 佐藤すずな, 山口賢次, 石井恵子, 丸山良子, 川上和義, 館正弘: 緑膿菌接種創の治癒過程と菌排除における NKT 細胞欠損の影響. 第 20 回日本褥瘡学会学術集会, 横浜, 2018 年 9 月 28-29 日.

丹野寛大, 菅野恵美, 佐藤紀子, 正木愛梨, 三浦考行, 山口賢次, 石井恵子, 丸山良子, 川上和義, 館正弘: 皮膚創傷治癒過程における NKT 細胞の役割 - 好中球性炎症に注目して -. 第 47 回日本創傷治癒学会, 京都, 2017 年 11 月 27-28 日.

丹野寛大, 菅野恵美, 三浦考行, 石井恵子, 中山俊憲, 谷口克, 丸山良子, 館正弘, 川上和義: NKT 細胞は好中球性炎症を制御し皮膚創傷治癒を促進する. 第 28 回日本生体防御学会学術総会, 相模原, 2017 年 6 月 29 日-7 月 1 日.

〔図書〕(計 2 件)

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.

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. メヂカルフレンド社, 63(9):4-7, 2017.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

○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〕

ホームページ等

<http://www.snp.med.tohoku.ac.jp/?FrontPage>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名：
研究者番号（8桁）：

(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。