

令和元年5月28日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19710

研究課題名(和文) 糖尿病性足壊疽の感染増悪過程における好中球NETsの関与と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Involvement of NETosis on the diabetic ulcers and development of novel wound care

研究代表者

館 正弘(Tachi, Masahiro)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50312004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性足壊疽の易感染性はよく知られており、好中球の機能異常が要因の一つとされるが詳細な機序は不明であり、好中球に対する治療法もみられない。

本研究では、慢性創傷の好中球遷延について、特殊な細胞死であるNETosisとNETosis形成に関わるエラスターゼ阻害効果を検証した。好中球遷延モデルとして、創部にβ-マンナン投与創を用いた。β-マンナン投与により、治癒が遅延し、通常は受傷24時間以降には徐々に減少する好中球が3、5日目でも高い値を示した。これらの好中球は、特殊な細胞死NETosisに陥っていた。創部のエラスターゼ産生量も高く、エラスターゼ阻害剤投与により遅延した治癒が回復した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、慢性創傷における炎症遷延に対する治療法としては、抗菌薬などを用いた病原微生物に対する治療法が主流となっており、好中球など宿主因子に対する治療法は存在しない。

本研究により、宿主内の好中球がNETosis形成やエラスターゼが創傷治癒阻害要因としてクローズアップされ、今後、新規の治療ターゲットになる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：It is well known about immunocompromised state and neutrophil dysfunction in diabetic foot ulcers. But the detailed mechanism of neutrophil dysfunction remains unclear.

In the current study, to identify the possible contribution of NETosis the co-localization between Ly6G (marker of neutrophils) and citrullinated histone (an indicator of NETosis) and elastase activity after β-mannan administration were examined. We discovered that the expression of citrullinated histone was accelerated at the wound sites. In addition, elastase activity level was significantly higher in β-mannan-administrated mice than in vehicle-administered mice. We next investigated the effect of sivelestat sodium, a neutrophil elastase inhibitor, on wound closure in WT mice administered β-mannan, and the administration of sivelestat sodium was found to significantly improve the delayed wound closure caused by β-mannan.

研究分野：形成外科学

キーワード：創傷治癒 好中球 NETosis(ネトーシス) 好中球エラスターゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病患者の易感染性

長年、糖尿病患者の易感染性が問題となっている。

糖尿病性(diabetes mellitus; DM)足壊疽では、軽微な外傷から感染により蜂窩織炎や壊死性筋膜炎を発症し、広範囲の足壊疽から時には大切断に至る。DM足壊疽における易感染性はよく知られており好中球の機能異常がその要因の一つとされているが、詳細なメカニズムは不明であり、好中球に対する治療方法もみられない。

(2) 好中球にみられる特殊な細胞死・NETosisの働きと影響

好中球は感染部位に遊走・集積し活性化される。

近年、活性化した好中球にみられる特殊な細胞死、ネトーシス(NETosis)の概念が提唱された。NETosisにより、活性化好中球は細胞外トラップ・ネッツ(NETs: neutrophil extracellular trap)を放出し、細菌を捉え感染防御に貢献する。さらにNETsは、血栓形成、癌転移、自己免疫疾患等、多くの疾患への関与が明らかになっている。申請者は、軟部組織感染症であるDM足壊疽が容易に重篤な感染症に至り、かつ感染後の創部に血流不全が生じる背景にNETsの関与を疑っている。

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) 糖尿病性(DM)足壊疽の治癒遅延への好中球NETsの関与

申請者がすでに確立した「DM・感染マウスモデル」を用い、NETs形成と感染、血栓形成の推移を解析し、NETsの関与を明らかにする。

さらに、臨床検体を用いてヒトDM足壊疽におけるNETs形成についても明らかにする。

(2) NETs形成に関わる好中球エラスターゼ阻害による新規治療法の開発

NETs形成に関わる好中球エラスターゼの阻害がDM足壊疽の治癒過程に与える影響について明らかにする。好中球エラスターゼ阻害剤(シベレスタットナトリウム)は、すでに全身性炎症反応症候群(SIRS)に伴う急性肺障害の治療で用いられ、確かな効果をあげている。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病性(DM)足壊疽の治癒遅延への好中球NETsの関与

本研究では解析を進める中で、創部における好中球遷延やNETosis誘導に関わる受容体として、好中球やマクロファージ等の細胞表面に発現しているDectin-2の関与を発見し、今回は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、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
- ・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
- ・好中球エラスターゼ活性

(2) 好中球エラスターゼ阻害剤による新規治療法の検証

① 実験モデルの作成

野生型マウス(C57BL/6)、Dectin-2遺伝子欠損(KO)マウスの腹腔に創傷作成前日に好中球エラスターゼ阻害剤(シベレスタットナトリウム)を投与する。翌日、創傷を作成し、直後に 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

経日的に創部を摘出し、以下の解析を行う。

- ・創部炎症反応
- ・NETs形成
- ・創傷治癒速度

4. 研究成果

これまで、創傷治癒の遅延要因として、病原微生物由来の PAMPs の影響が広く注目され、PAMPs による感染や炎症期遷延が問題視されてきた。その一方、免疫学の分野では炎症期を遷延させるイニシエーターとして DAMPs への注目が高まっている。

今回我々は、DM 足壊疽の病態としてしばしば見受けられる好中球遷延に注目した。好中球にフォーカスした解析を進める中、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 のリガンドを投与したモデルマウスでは、好中球が創部に長く留まり、治癒が遅延する減少を認めた。これは世界で初めての発見であった。

(1) Dectin-2 のリガンド投与による創傷治癒遅延

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。

以上の結果より、Dectin-2 のリガンドである α -マンナンは Dectin-2 を介して創傷治癒遅延を誘導する可能性が示された。

(2) Dectin-2 のリガンド投与が白血球集積に与える影響

創傷作成後、経日的に摘出した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 (図 1)。

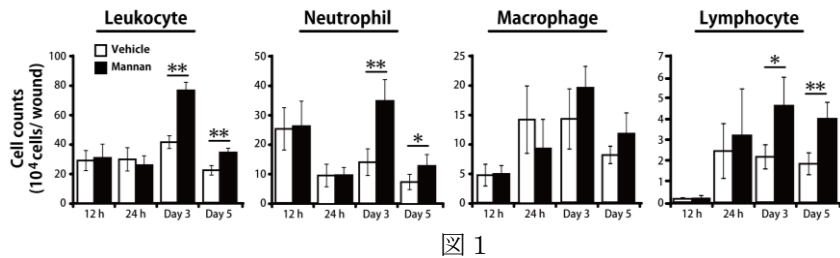


図 1

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創作成 3 日目と 5 日目において有意に高かった (図 2)。

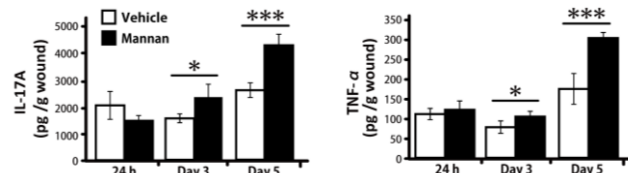


図 2

(3) 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、好中球による治癒遅延機構について、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、正常皮膚 (Normal skin)、Vehicle 投与群の創部と比較して、ウェスタンブロット解析により NETosis マーカーである Cit H3 の増強を確認した (図 3)。ハウスキーピング遺伝子である GAPDH は 3 群間で同程度の発現であり、ヒストン H3 は Vehicle 群とマンナン群で同程度を示した。

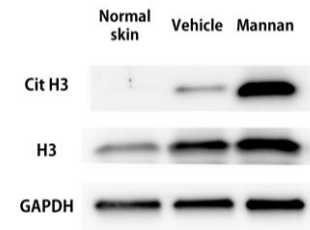


図 3

さらに、 α -マンナン投与創では、Vehicle 投与創と比較して、創部におけるエラスターゼ活性が高い結果を示した。そこで、エラスターゼ阻害剤であるシベレスタットナトリウム投与の影響を解析したところ、シベレスタットナトリウム投与により遅延した治癒の回復を認めた (図 4)。

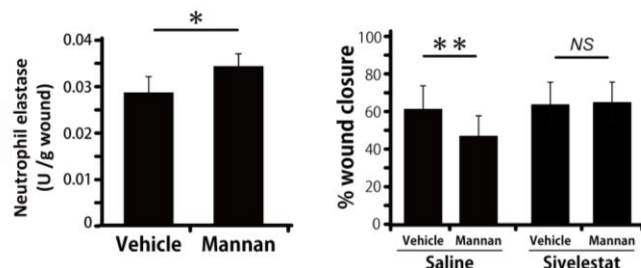


図 4

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年12月11日.
- 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11月29-30日.
- 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11月29-30日.
- 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12月12-14日.
- 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年12月8日.
- 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・ケア一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年11月27-28日.
- 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年11月27-28日.

〔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 菅野恵美, 館正弘: 第7章足のアセスメントと検査. 1. プライマリケアに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.
- 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 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.

〔産業財産権〕

○出願状況（計1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

○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.prs.med.tohoku.ac.jp/>
（東北大学大学院医学系研究科形成外科学分野）

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：菅野 恵美
ローマ字氏名：(KANNO, emi)
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：准教授
研究者番号（8桁）：10431595

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：高木 尚之
ローマ字氏名：(TAKAGI, naoyuki)
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）：30569471

(2) 連携研究者

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

(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。