

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09473

研究課題名(和文) 糖尿病性足壊疽における好中球NETsへのC型レクチン受容体の関与・治療への応用

研究課題名(英文) Contribution of C-type lectin receptor-mediated signaling to neutrophil extracellular traps in skin ulcers

研究代表者

矢野 亜希子 (Akiko, Yano)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：70612224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性足壊疽など慢性創傷の病態増悪に好中球機能不、ネトースシスの関与が指摘されている。今回我々は、好中球など免疫細胞に発現するC型レクチン受容体(CLRs)であるDectin-1とDectin-2に注目し、これらのCLRとネトースシスの関連について解析を行った。本研究により、Dectin-2のリガンドである α -mannan投与により、皮膚損傷晩期のネトースシスが高まり、この現象はDectin2K0マウスでは消失したことから、Dectin-2依存的な現象であることが明らかになった。また、Dectin-1リガンド投与、Dectin-1K0マウスではこの現象はみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性足壊疽など慢性創傷は、血流不全(血栓)、感染症に加え、好中球の機能異常が関与する複合的な病態であり、糖尿病患者の25%が生涯に足壊疽を形成することが報告されている。これまで、血流不全、感染症に対する治療法は様々検討されているが、好中球の機能異常に関する研究、治療法は発展途上であった。

本研究成果により、難治性皮膚潰瘍の治癒遅延に好中球のネトースシスが関与し、さらにその現象にC型レクチン受容体であるDectin-2の関与が明らかになったことから、今後、Dectin-2阻害によるネトースシス制御、皮膚潰瘍治療法への応用が視野に入り、社会的意義は非常に高い。

研究成果の概要(英文)：C-type lectin receptors recognize microbial polysaccharides. The C-type lectin receptors such as dendritic cell-associated C-type lectin (Dectin)-1 and Dectin-2, which are triggered by α -glucan and α -mannan, respectively, contribute to upregulation of the inflammatory response. This study was conducted to determine the roles of Dectin-1 and Dectin-2 in skin wound healing, with a particular focus on the kinetics of neutrophilic inflammatory response. Full-thickness wounds were created on the backs of C57BL/6 mice, and the effects of Dectin-1 or Dectin-2 deficiency and those of α -glucan or α -mannan administration were examined. We also analyzed wound closure, histological findings, and neutrophilic inflammatory response, including neutrophil extracellular trap formation. We found that Dectin-2 was involved in prolonged neutrophilic responses and neutrophil extracellular trap formation, leading to delayed wound healing.

研究分野：形成外科学

キーワード：慢性創傷 好中球 ネトースシス C型レクチン受容体 Dectin(デクチン)-2

1. 研究開始当初の背景

(1) 創傷治癒において、好中球は最も早く創部に集積し、初期の感染防御、炎症反応の誘導に重要な役割を担う。

しかし、炎症が過剰な糖尿病性足壊疽では、遷延した好中球がネトーシス(NETosis)に陥り、治癒阻害に働くことが指摘されている。

NETosis は活性化好中球にみられる特殊な細胞死であり、NETosis により、好中球は細胞外トラップ・ネット (NETs: neutrophil extracellular trap)を放出する。

NETs は急性感染では細菌を捉え、防御的に働くが、過剰になると過度の炎症と組織修復の遅延を引き起こすことが予想される。

(2) DM 足壊疽は、末梢神経障害、血流不全(血栓)、感染症に加え、好中球の機能異常が関与する複合的な病態である。米国では糖尿病患者の 25% が生涯に足壊疽を形成することが報告されている。

しかしながら、何が好中球機能不全の引き金を引くのか、その制御機構は依然として不明である。

申請者は、炎症性細胞に発現し、糖鎖認識に関わる Dectin-2 に注目している。合わせて、治癒促進に対して対照的な役割が報告されている Dectin-1 についても解析を行う。

2. 研究の目的

(1) 創傷治癒過程における好中球 NETs への Dectin-1、Dectin-2 の関与

申請者がすでに確立した「慢性創傷マウスモデル」を用い、治癒速度と NETs 形成への Dectin-1、Dectin-2 を介した影響を明らかにする。

(2) Dectin-2 阻害による慢性創傷の新規治療法の開発

慢性創傷マウスモデルに Dectin-2 のシグナルを阻害する antagonist を投与し、治癒過程の阻害がキャンセルされるか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 慢性創傷における Dectin-2 を介した NETs の影響

<実験モデルの作成>

・野生型マウス(C57BL/6)、Dectin-2KO マウス (入手済・自家繁殖) に対し、創傷作成直後に マンナンを投与し、慢性創傷モデルを作成する。

・全身麻酔下、マウス背側皮膚に 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 マウス間で比較する。

<解析項目>

・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

(2) Dectin-2 阻害による創傷の新規治療法の開発

<実験モデル> 野生型マウス(C57BL/6)に創傷を作成し、Dectin-2 阻害群 (antagonist 投与)と Dectin-2 非阻害群 (コントロール溶媒投与) 間で比較する。Dectin-2 antagonist は Invivo Gen より購入して使用する。

<解析項目> Dectin-2 阻害剤の効果について、以下の項目を解析する。

・創閉鎖率、再上皮化率、血管新生、コラーゲン合成の解析

4. 研究成果

(1) Dectin-1、Dectin-2 欠損が皮膚創傷治癒過程に与える影響の違い

Dectin-1KO マウスと Dectin-2KO マウスを用いて、創傷治癒過程の各ステップを検証し、以下の結果を得た。

創閉鎖率への影響

WT マウス、Dectin-1KO マウス、Dectin-2KO マウスにそれぞれ創を作成し、創作成後 5 日目における創閉鎖率を算出した。創閉鎖は時間とともに進行し、Dectin-1KO 群の創閉鎖は WT 群と比較して有意に遅延したが、Dectin-2KO 群では促進した。

再上皮化への影響

創閉鎖に大きく影響する再上皮化率を、創作成後 5 日目の HE 染色像を基に算出した。Dectin-1KO 群の再上皮化率は WT 群に比べて低く、Dectin-2KO 群では高かった。

血管新生、筋線維芽細胞、上皮細胞への影響

Dectin-1 あるいは Dectin-2 欠損の皮膚創傷治癒の代替組織形成への影響について調べる目的で、新生表皮における上皮細胞の増殖マーカーとして PCNA 陽性細胞数；血管新生を示す血管内皮細胞のマーカーとして CD31 陽性血管内皮細胞数；創収縮に関わる筋線維芽細胞のマーカーとして α SMA 陽性細胞数について、免疫染色像を基に次の項目を解析した。創作成後 5 日目の PCNA 陽性細胞数は Dectin-1KO 群で WT 群より低かった。CD31 陽性細胞数は Dectin-1KO 群では WT 群より低く、Dectin-2KO 群では高かった。 α -SMA 陽性細胞数は Dectin-2KO 群では WT 群より高かった。以上の結果から、Dectin-1KO マウスでは、上皮細胞の増殖や血管新生などが弱いため、上皮化が進まず、創閉鎖が遅れる一方、Dectin-2KO マウスでは、組織形成が亢進し、創閉鎖が促進されることが示唆された。

好中球集積

好中球は創傷治癒過程早期の炎症反応において重要な役割を果たすことが示されている。そこで、Dectin-1 および Dectin-2 の欠損が好中球の創傷組織への集積に及ぼす影響について、創作成後 6 時間および 5 日目で検証した。Dectin-1KO 群の好中球数は 6 時間で WT 群の半分程度であり、5 日目では WT 群と有意な差がなかった。一方、Dectin-2KO 群の好中球数は 6 時間で WT 群の 2 倍となり、5 日目では逆に WT 群の 1/4 程度に低下した。これらの結果から、創傷治癒の促進には好中球を早期に創部に集積させ、その後は速やかに消退させることが重要であり、Dectin-1 はこの過程に必要な因子で、Dectin-2 は逆に阻害する因子である可能性が示唆された。

(2) 皮膚創傷治癒における Dectin-1、Dectin-2 シグナル活性化の影響の違い

創閉鎖率への影響

遺伝子欠損マウスを用いた実験から、創傷治癒過程における Dectin-1 および Dectin-2 の相反する役割が示唆された。そこで、Dectin-1 および Dectin-2 を既知の外因性リガンドで刺激することで、それぞれの受容体からの強いシグナルが創傷治癒過程に及ぼす影響を調べた。Dectin-1 リガンドとして dZymosan を投与した群、Dectin-2 リガンドとして Mannan を投与した群、および Vehicle として PBS を投与した群について、創作成後 3、5、7 日目における創閉鎖率を算出した。その結果、dZymosan 群の創閉鎖は 3 日目、5 日目、7 日目で Vehicle 群よりも促進していた。一方、Mannan 群の創閉鎖は 5 日目と 7 日目において Vehicle 群よりも遅延した。

(3) dZymosan、 α -mannan 局所投与が好中球集積に与える影響

Dectin-1KO および Dectin-2KO マウスの解析から、創形成後に組織形成に至るまでの過程に好中球性炎症が大きく影響している可能性が示唆された。そこで、Dectin-1 および Dectin-2 に対するそれぞれのリガンドによる刺激が好中球の集積へ与える影響をフローサ

イトメトリーで評価した。解析により創部の好中球数の継時変化を評価したところ、好中球は dZymosan 投与により早期の 6、12 時間において Vehicle 投与より多く、24 時間以降は Vehicle 投与と同レベルで低下していった。一方、Mannan 投与は早期では Vehicle 投与と同等だったが、後期は 5 日をピークに増加し、遷延した。Dectin-1 および Dectin-2 それぞれのリガンドの投与により、創部への好中球集積のタイミングが明確に違うことが示された。

(4) dZymosan、 α -mannan 局所投与による NETosis への影響

好中球が創傷治癒に悪影響を及ぼす機序として、細胞毒性が強い NETs の放出が考えられる。そこで、dZymosan および Mannan 投与による創部 NETosis と NETosis のトリガーとなるヒストンのシトルリン化を蛍光免疫染色とウェスタンブロッティングで解析した。5 日目における創の好中球 (Ly6G; 赤色) とシトルリン化ヒストン (CitH3; 緑色) の蛍光二重染色では、Mannan 投与において、好中球とシトルリン化ヒストンの共局在が認められた。ヒストンのシトルリン化を定量するため、創中のシトルリン化ヒストン (CitH3) とヒストン (H3) をウェスタンブロッティングで検出し、ウェスタンブロッティングのバンドの濃さを ImageJ にて数値化し、CitH3/H3 比を算出した。Mannan 投与群において創作成後 5 日目にシトルリン化の上昇を認めた。創作成後 6 時間では Mannan 投与だけでなく dZymosan 投与においても上昇は認めなかった。この結果より、Dectin-1 ではなく Dectin-2 が NETosis 誘導に関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miura T, Kawakami K, Kanno E, Tanno H, Tada H, Sato N, Masaki A, Yokoyama R, Kawamura K, Kitai Y, Takagi N, Yamaguchi K, Yamaguchi N, Kyo Y, Ishii K, Imai Y, Saijo S, Iwakura Y, Tachi M.	4. 巻 139(3)
2. 論文標題 Dectin-2-Mediated Signaling Leads to Delayed Skin Wound Healing through Enhanced Neutrophilic Inflammatory Response and Neutrophil Extracellular Trap Formation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol	6. 最初と最後の頁 702-711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2018.10.015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi K, Kanno E, Tanno H, Sasaki A, Kitai Y, Miura T, Takagi N, Shoji M, Kasamatsu J, Sato K, Sato Y, Niiyama M, Goto Y, Ishii K, Imai Y, Saijo S, Iwakura Y, Tachi M, Kawakami K	4. 巻 141(1)
2. 論文標題 Distinct roles for Dectin-1 and Dectin-2 in skin wound healing and neutrophilic inflammatory responses.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol	6. 最初と最後の頁 164-176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2020.04.030.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 及川ゆかり, 菅野恵美, 山口賢次, 丹野寛大, 後藤友華, 黒坂志歩, 川上和義, 館正弘
2. 発表標題 創傷治癒におけるDectin-1, 2発現細胞と創部上清中リガンドの検証
3. 学会等名 第50回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅野恵美, 山口賢次, 丹野寛大, 佐々木綾子, 石井恵子, 館正弘, 川上和義
2. 発表標題 皮膚創傷治癒におけるDectin-1, 2の役割の相違 - NETosisへの影響に注目して -
3. 学会等名 第3回東北医真菌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口賢次, 川上和義, 菅野恵美, 佐々木綾子, 庄司未樹, 三浦孝行, 丹野寛大, 高木尚之, 今井啓道, 館正弘
2. 発表標題 皮膚創傷治癒におけるDectin-1, 2の役割とNETs形成との関連
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 Emi KANNO, Hiromasa TANNO, Ayako SASAKI, Keiko Ishii, Shinobu SAIJO, Yoichiro IWAKURA, Kazuyoshi KAWAKAMI
2. 発表標題 Dectin-2-mediated signaling leads to delayed skin wound healing through enhanced neutrophilic inflammatory response and NETosis.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口賢次, 川上和義, 菅野恵美, 丹野寛大, 佐々木綾子, 三浦孝行, 高木尚之, 館正弘
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第48回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2018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
研究 分担 者	菅野 恵美	東北大学・医学系研究科・准教授	
	(Kanno Emi)		
	(10431595)	(11301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	丹野 寛大 (Tanno Hiromasa) (10755664)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	
研究分担者	高木 尚之 (Takagi Naoyuki) (30569471)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	
研究分担者	館 正弘 (Tachi Masahiro) (50312004)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関