

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19494

研究課題名（和文）感染創に対する新規ケア技術の確立～宿主免疫を高めるリンパ球機能に注目して～

研究課題名（英文）Development of a novel approach for infected wounds focusing on 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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：褥瘡や糖尿病性下腿潰瘍のような慢性創傷の90%以上から細菌が検出され、中でも緑膿菌はしばしば検出される細菌である。本研究では、リンパ球の一種であるNKT細胞活性化が創部緑膿菌感染排除に与える影響について解析を行った。

-GalCerによるNKT細胞活性化により、創部緑膿菌数は、緑膿菌接種後5、7日目で有意に低下し、3日目の好中球数が有意に増加した。緑膿菌接種後5日目にIFN- γ 、IL-22、IL-23、IL-12p70、S100A9産生量が有意に増加した。NKT細胞活性化は、炎症性サイトカイン、抗菌ペプチド産生、好中球集積の誘導により、創部緑膿菌排除を促進する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、細菌感染・バイオフィルム形成が疑われる慢性創傷のケアとして、洗浄、銀イオン含有ドレッシング材などが選択され、これらは創部の細菌数を減らすことに主眼を置いている。本研究は、宿主免疫を標的とした新しい創傷ケア技術の確立を目指すものである。本研究により、宿主免疫活性化が創部細菌数を減らすことが明らかとなり、新しい創傷ケア技術となる可能性を示した。この宿主免疫を標的としたケア技術は、救済できる慢性創傷を増やす可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Bacteria are detected in more than 90% of chronic wounds such as pressure ulcers and diabetic leg ulcers, and *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most frequently detected bacteria. In this study, we analyzed the effect of NKT cell activation on the elimination of *P. aeruginosa* in wounds.

Administration of -GalCer, a specific activator of NKT cells, resulted in significantly decreased the number of live colonies in the wounded tissues on days 5 and 7 after *P. aeruginosa* inoculation, and significantly increased the number of neutrophils on day 3. IFN- γ , IL-22, IL-23, IL-12p70, and S100A9 production were significantly higher in -GalCer-treated group than in vehicle-treated group. These results suggest that iNKT cells promote *P. aeruginosa* clearance during skin wound healing.

研究分野：基礎看護学

キーワード：創傷治癒 感染 NKT細胞 -GalCer リンパ球

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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(バイオフィーム形成)の問題

褥瘡や糖尿病性下腿潰瘍など慢性創傷のほぼ 100% に細菌感染(バイオフィーム)が観察される (急性創傷: 6%)。近年の高齢化に伴い、感染を有する慢性創傷患者が急増し、3 割が全身感染を伴う重症例に移行する。そのような感染を有する創傷に対する慢性創傷のケアとして、洗浄、デブリードマン、創傷ドレッシング材などが選択されている。しかし、24 時間以内に細菌が増殖し、バイオフィームが再形成されるため、既存の創傷ケアだけでは、感染の再発防止は難しい。この感染の問題を解決するには、創傷ケアに + α が必要であると考へ、我々は + α としてリンパ球に注目した。

細菌感染 (バイオフィーム) は、宿主免疫を担う白血球によって制御される。白血球は主に好中球、単球のような貪食細胞とリンパ球に分類される。貪食細胞は、細菌を貪食し、殺菌する。リンパ球は貪食細胞を感染部位に集積させるのみならず、自身も強力な殺菌作用を有し、さらに好中球、単球の司令塔として働き、細菌を排除する点である。リンパ球には T 細胞、B 細胞、Natural Killer (NK) 細胞、NKT 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、自然免疫リンパ球などの存在が知られている。我々はその中でも、リンパ球の一種である NKT 細胞を欠損したマウスでは皮膚創傷治癒が遅延するのみならず、細菌排除も停滞することを明らかにしてきた。この NKT 細胞は海綿由来の糖脂質 α -galactosylceramide (α -GalCer) により活性化を誘導することが可能である。そのため、創傷ケアと同時に、宿主免疫を高める NKT 細胞を活性化することにより、感染の再発が予防でき、効率的に治癒に向かう可能性が高いと考へた。

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、 α -GalCer 投与による NKT 細胞活性化が、緑膿菌接種創に与える影響を明らかにすることを目的とし、創部緑膿菌排除、再上皮化率、サイトカイン産生、抗菌ペプチド産生に注目して解析を行い、新たな創傷ケア技術の確立を目指す。この創傷ケアが確立すれば、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い。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

実験には、C57BL/6 マウスを 7~8 週齢で使用し、SPF 環境下で飼育されたマウスを使用した。実験期間中はマウスの鎮静を図るため、飲用水に 0.4 mg/マウス/日となるようにアセトアミドフェノールを加えた。すべての実験は、「国立大学法人東北大学動物実験に関する規定」に準じ、東北大学環境安全委員会動物実験専門委員会の承認を得た上で実施した。

(2) 使用菌株

緑膿菌として PAO1 株を用いた。マイクロバンクピースから得た羊血液寒天培地上のコロニーを Brain Heart Infusion (BHI) 培地に接種し、37 °C で 24 時間静置培養した。この菌液を生理食塩水で 3 回洗浄した後、生理食塩水に混濁したものを接種菌液とした。

(3) 創作成と皮膚組織の採取

マウスに麻酔を吸入させながら、以下のような手順で創作成を行った。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、皮膚生検用 6 mm パンチとハサミを用いて、マウス一匹につき 2 つの皮筋に達する全層欠損創を作成した。創作成後、緑膿菌を 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。ポリウレタンフィルムおよび弾性包帯は、組織摘出時まで交換しなかった。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。

(4) 試薬の投与

α -GalCer は、DMSO (dimethyl sulfoxide : ジメチルスルホキシド) に溶解して 5 mg/mL とし、マウス投与時には 0.2% DMSO in PBS となるように PBS で希釈して使用した。創作成 1 日前に、創作成 5 日目に観察する場合には創作成 3 日目にもマウスに腹腔内投与した (2 μ g/マウス)。対照群には溶媒の 0.2% DMSO \cdot PBS を腹腔内投与した。

(5) 創部緑膿菌数の測定

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、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。

(6) 病理学的解析

創周囲 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。

(7) マウス皮膚内白血球分離

マウス 1 匹あたり 2 個の創を作成し、各タイムポイントに 8 mm の皮膚生検用のパンチで摘出した創 2 個中の白血球を分離した。摘出した創を細切し、10% FCS (fetal calf serum) と 10 mM HEPES、0.25 mg/mL Liberase TL、2.5 mg/mL collagenase D、0.1 mg/mL DNase、2.0 mg/mL Dispase を加えた RPMI1640 培養液に入れ、37°C で 2 時間インキュベーションした。2 時間後、皮膚組織片を 70 μm のナイロンメッシュで濾過した後、遠心し、細胞ペレットを 4 mL の 40% Percoll 溶液に懸濁したものを、80% Percoll 溶液 4 mL の上に重層した。20°C、1800 rpm/分で 20 分遠心した後、中間層を回収し、0.1% アジ化ナトリウム、1% FCS 添加 PBS で 3 回洗浄した。サンプル中の白血球数は血球計算盤にて計測した。

(8) フローサイトメトリー

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 \cdot 0.1% アジ化ナトリウム添加 PBS 中の細胞を抗 Fc γ RII \cdot 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)、FITC 標識抗 F4/80 抗体 (clone BM8) で染色した。対象として、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 Cantro II (BD Bioscience) 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とした。

(9) サイトカイン、ケモカイン、抗菌ペプチド濃度測定

皮膚ホモジネート上清中のサイトカインとして、IFN- γ 、IL-17A、IL-22、IL-23、IL-1 β 、IL-12p70、IL-6、ケモカインとして KC、MIP-2、抗菌ペプチドとして S100A8、S100A9 のそれぞれの濃度を ELISA キットを用いて測定した。

4. 研究成果

(1) α -GalCer による NKT 細胞活性化が創部緑膿菌接種創の閉鎖に与える影響

創部緑膿菌数への影響

創作成・緑膿菌接種後 1、3、5、7 日目に創部緑膿菌 CFU の算出を行った。創作成・緑膿菌接種後 5、7 日目における創部緑膿菌数が α -GalCer 投与群で DMSO 投与群と比較して有意に減少した。1、3 日目について同様の解析を行ったが、緑膿菌は検出されなかった。

再上皮化への影響

創作成・緑膿菌接種後 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を測定した。各タイムポイントにおいて、両群間に差はみられなかった。

(2) α -GalCer による NKT 細胞活性化が緑膿菌接種創の好中球、マクロファージ集積に与える影響

創作成・緑膿菌接種後 3、5 日目の創部を含む皮膚を摘出し、フローサイトメトリーで解析を行った。好中球数は、DMSO 投与群と比較して α -GalCer 投与群で創作成・緑膿菌接種後 3 日目に有意に増加したが、5 日目では差はなかった。マクロファージ数にはいずれのタイムポイントにおいても差は認められなかった。

(3) α -GalCer による NKT 細胞活性化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・緑膿菌接種後 1、3、5、7 日目の創部ホモジネート上清を回収し、各種サイトカイン、抗菌ペプチド産生量を ELISA にて解析を行った。

IFN- γ 産生量は、各タイムポイントで有意差はみられなかった。IL-17A 産生量は、緑膿菌接種後 1 日目に DMSO 投与群と比較して α -GalCer 投与群で有意に低下した。IL-12p70、IL-22、IL-23 産生量は、創作成・緑膿菌接種後 5 日目で DMSO 投与群と比較して α -GalCer 投与群で有意に増加した。また、1 日目で IL-23、IL-1 β 産生量は α -GalCer 投与群で有意に低下した。KC、MIP-2 産生は、両群間に有意差はみられなかった。抗菌ペプチド S100A8、S100A9 について解析したところ、S100A8 は各タイムポイントで有意差はみられなかった。S100A9 については、緑膿菌接種後 5 日目に α -GalCer 投与群で有意に増加した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kanno Emi, Tanno Hiromasa, Masaki Airi, Sasaki Ayako, Sato Noriko, Goto Maiko, Shisai Mayu, Yamaguchi Kenji, Takagi Naoyuki, Shoji Miki, Kitai Yuki, Sato Ko, Kasamatsu Jun, Ishii Keiko, Miyasaka Tomomitsu, Kawakami Kaori, Imai Yoshimichi, Iwakura Yoichiro, Maruyama Ryoko, Tachi Masahiro, Kawakami Kazuyoshi	4. 巻 20
2. 論文標題 Defect of Interferon Leads to Impaired Wound Healing through Prolonged Neutrophilic Inflammatory Response and Enhanced MMP-2 Activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5657 ~ 5657
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20225657	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 Miura Takayuki, Kawakami Kazuyoshi, Kanno Emi, Tanno Hiromasa, Tada Hiroyuki, Sato Noriko, Masaki Airi, Yokoyama Rin, Kawamura Kotone, Kitai Yuki, Takagi Naoyuki, Yamaguchi Kenji, Yamaguchi Natsuki, Kyo Yoshika, Ishii Keiko, Imai Yoshimichi, Saijo Shinobu, Iwakura Yoichiro, Tachi Masahiro	4. 巻 139
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 Journal of Investigative Dermatology	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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi Kenji, Kanno Emi, Tanno Hiromasa, Sasaki Ayako, Kitai Yuki, Miura Takayuki, Takagi Naoyuki, Shoji Miki, Kasamatsu Jun, Sato Ko, Sato Yuka, Niiyama Momoko, Goto Yuka, Ishii Keiko, Imai Yoshimichi, Saijo Shinobu, Iwakura Yoichiro, Tachi Masahiro, Kawakami Kazuyoshi	4. 巻 141
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 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 164 ~ 176.e8
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanno Hiromasa, Kanno Emi, Sato Suzuna, Asao Yu, Shimono Mizuki, Kurosaka Shiho, Oikawa Yukari, Ishi Shinyo, Shoji Miki, Sato Ko, Kasamatsu Jun, Miyasaka Tomomitsu, Yamamoto Hideki, Ishii Keiko, Imai Yoshimichi, Tachi Masahiro, Kawakami Kazuyoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Contribution of Invariant Natural Killer T Cells to the Clearance of Pseudomonas aeruginosa from Skin Wounds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3931 ~ 3931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22083931	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 菅野恵美, 川上和義, 丹野寛大, 山口賢次, 館正弘
2. 発表標題 バイオフィルムに対する治療・ケア - 新規ターゲットの可能性
3. 学会等名 第28回日本形成外科学会基礎学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丹野寛大
2. 発表標題 創傷治癒機構に対する宿主免疫に注目して ~ 看護学、形成外科学、免疫学の融合 ~
3. 学会等名 第49回日本創傷治癒学会 (招待講演)
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Dect in-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 Ayako Sasaki, Hiromasa Tanno, Emi Kanno, Keiko Ishii, Kazuyoshi Kawakami
2. 発表標題 Effect of iNKT cell deficiency on Dectin-2-mediated delay in skin wound healing
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019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 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 黒坂志歩, 丹野寛大, 菅野恵美, 及川ゆかり, 石井恵子, 川上和義, 館正弘
2. 発表標題 乳酸菌Enterococcus faecalis KH2株が皮膚創傷治癒に与える影響
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 丹野寛大, 菅野恵美, 佐々木綾子, 黒坂志歩, 及川ゆかり, 石井恵子, 川上和義, 館正弘
2. 発表標題 Dectin-2シグナルを介した皮膚創傷治癒へのNatural Killer T細胞欠損の影響
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 丹野寛大, 菅野恵美, 佐々木綾子, 佐藤光, 笠松純, 石井恵子, 館正弘, 川上和義
2. 発表標題 Dectin-2シグナルを介した皮膚創傷治癒遅延へのNatural Killer T細胞欠損の影響
3. 学会等名 第4回東北医真菌研究会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------