

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22649

研究課題名(和文)皮膚-肝臓間クロストークによる創傷治癒の制御、糖尿病における制御機構の破綻

研究課題名(英文)Contribution of invariant natural killer T cells and IFN-gamma to neutrophilic inflammation in skin wounds

研究代表者

菅野 恵美 (Kanno, Emi)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：10431595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、神経系・液性因子を介した臓器間クロストーク機構が次々と明らかにされている。長年、皮膚の創傷(キズ)は、皮膚に存在する線維芽細胞や受傷後、創部に遊走する免疫細胞が治すと考えられてきたが、申請者は「皮膚-肝臓間クロストークによる創傷治癒の制御」を推測し、皮膚創傷治癒への肝臓の関与について明らかにすることを目的としている。

我々の解析により、肝臓に豊富に存在するiNKT細胞は皮膚創傷では集積した白血球の0.1%未満であるが、iNKT細胞が産生する代表的なサイトカインであるIFN- γ が好中球の過剰な活性化、MMP-2産生を制御し、治癒促進に寄与することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長年、皮膚に生じる創傷(キズ)は皮膚に存在する線維芽細胞や受傷後創部に遊走する免疫細胞が治すと考えられてきたが、肝臓をはじめとする全身の臓器の関与については不明であった。本研究成果により、肝臓の直接的な関与は解明できなかったが、肝臓に豊富に存在するNKT細胞が主に産生するサイトカインであるインターフェロン γ が、創部の好中球性炎症反応、MMP-2産生を制御し、慢性化に関与していることが明らかになった。今後、MMP-2阻害による新規の慢性創傷治療法の開発に向けての基礎的データを得ることができ、社会的意義は非常に高い。

研究成果の概要(英文)：Interferon (IFN)- γ is mainly secreted by CD4+ T helper 1 (Th1), natural killer (NK) and NKT cells after skin injury. Although IFN- γ is well known regarding its inhibitory effects on collagen synthesis by fibroblasts in vitro, information is limited regarding its role in wound healing in vivo. In the present study, we analyzed how the defect of IFN- γ affects wound healing. Full-thickness wounds were created on the backs of wild type (WT) C57BL/6 and IFN- γ -deficient (KO) mice. We analyzed the percent wound closure, accumulation of leukocytes, and matrix metalloproteinases (MMPs). IFN- γ KO mice exhibited significant attenuation in wound closure on Day 10, characteristics that are associated with prolonged neutrophil accumulation. Expression levels of MMP-2 mRNA were significantly greater in IFN- γ KO than in WT. Moreover, under neutropenic conditions created with anti-Gr-1 monoclonal antibodies, wound closure in IFN- γ KO mice was recovered through low MMP-2 expression levels.

研究分野：基礎看護学

キーワード：NKT細胞 創傷治癒 肝臓 IFN-

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、肝臓-脳-膵β細胞間クロストークによる膵β細胞数の制御など、神経系・液性因子を介した臓器間クロストーク機構が次々と明らかにされている。

長年、皮膚の創傷(キズ)は、皮膚に存在する線維芽細胞や受傷後、創部に遊走する免疫細胞が治すと考えられてきたが、申請者は皮膚-肝臓間クロストークの関与を推測している。

(2) 肝臓の関与を推測した理由は2つある。1つ目は、申請者らの解析により、皮膚が損傷すると、6時間後と早期に肝臓の好中球とナチュラルキラーT(NKT)細胞が増加する現象の発見、2つ目は、肝硬変患者の難治性褥瘡(皮膚潰瘍)が肝臓移植直後に劇的に改善したというInuiらの報告(Inui S, et al. *J Dermatol*, 2007)。

肝臓で増加した好中球とNKT細胞は、創傷治癒に深く関与することが知られており、申請者らはすでに緑膿菌感染創では好中球が治癒促進に働くこと(Kanno E, et al. *Wound Repair Regen*, 2011)、NKT細胞欠損マウスでは創傷治癒が遅延すること(Tanno H, Kanno E, et al. *Am J Pathol*, 2015)を明らかにしている。

肝臓と皮膚のクロストークは報告されていないが、インスリンを分泌する膵β細胞数は肝臓-脳-膵臓間クロストークを介して制御されていることが報告されており、皮膚-肝臓間クロストークも夢の話ではないと考える。

2. 研究の目的

(1) 創傷治癒への皮膚-肝臓間クロストークの存在・関与を解明する

申請者らがすでに確立したマウスモデルを用い、創傷治癒への皮膚-肝臓間クロストークの存在・関与を解明する。具体的には、皮膚損傷後、肝臓における炎症性細胞の動態・機能を中心に解明する。

(2) 肝臓に豊富に存在するNKT細胞、NKT細胞が産生するIFN- γ の関与を解明する。

IFN- γ を遺伝子欠損したマウスにおける創傷治癒、収縮に関わる筋線維芽細胞集積、免疫細胞の集積、ケモカインの産生、細胞外マトリクスを分解するMMPの関与について解明する。

3. 研究の方法

(1) 皮膚損傷後、肝臓への炎症波及効果

<実験モデルの作成>

・野生型マウス(C57BL/6)にデルマパンチを用いて全層欠損創を作成し、皮膚における治癒過程と肝臓への炎症波及について比較検証する。

<解析項目>

・全層欠損創作成後、肝臓における炎症性細胞集積: フローサイトメトリーにより定量化

(2) 肝臓に豊富に存在するNKT細胞が産生するIFN- γ の治癒過程への関与

<実験モデル>

IFN- γ 遺伝子欠損マウス、野生型マウス(C57BL/6)に創傷を作成し、その後の治癒過程、収縮に関わる筋線維芽細胞集積、免疫細胞の集積、ケモカインの産生、細胞外マトリクスを分解するMMPの関与、さらに好中球を除去する抗Gr-1抗体投与後の影響について検証する。

<解析項目>

- ・ 創閉鎖率、筋線維芽細胞の集積、コラーゲン合成の解析
- ・ IFN- γ がマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) -2、9 活性に与える影響
- ・ 抗 Gr-1 抗体を投与し、好中球を除去した状況下での IFN- γ の影響

4. 研究成果

(1) 皮膚損傷後、肝臓への炎症波及効果

創傷作成後、肝臓における NKT 細胞の集積

本年度、我々が確立したマウスモデルを用いた解析より、皮膚が損傷すると6時間と早期に肝臓において好中球と Natural Killer T (NKT 細胞) の増加が認められた。特に炎症制御に重要である NKT 細胞に注目し、肝臓において増加した NKT 細胞が皮膚に流入してきているかどうかをフローサイトメトリーを用いて解析を行った。その結果、NKT 細胞は皮膚に集積した白血球中の 0.1%未満の割合であった。

NKT 細胞を特異的に活性化する α -galactocylceramide (α -GalCer) の効果

NKT 細胞は少数だとしても高い免疫活性を有することが知られていることから、次に NKT 細胞を特異的に活性化する α -galactocylceramide (α -GalCer) を創部局所に投与し、その効果を検証した。 α -GalCer を創作成直後から3日目まで連日、マウスの創部に投与し、創作成3、5日目における創閉鎖率を算出した結果、創作成3、5日目ともに、Vehicle 群と比較し α -GalCer 群において、肉眼的に創部の縮小がみられ、創閉鎖率が有意に増加した。さらに、 α -GalCer 群で有意に高い肉芽組織(新生血管と線維芽細胞で構成)の形成を確認した。次に α -GalCer 創部投与による効果についてより詳細に解析するため、創部における mRNA 発現について解析を行った。創作成1、3日目の mRNA 発現を解析した結果、 α -GalCer 創部投与により、NKT 細胞が産生する代表的なサイトカインである IFN- γ 発現が有意に増加していることが明らかになった。

(2) 肝臓に豊富に存在する NKT 細胞が産生する IFN- γ の治癒過程への関与

IFN- γ を遺伝子欠損が創傷治癒過程に与える影響

IFN- γ を遺伝子欠損したマウス (IFN- γ KO) と野生型 WT マウス創傷モデルを用いて比較検証した結果、IFN- γ KO マウスでは、Day10 (増殖期) 以降の治癒が遅延し、創傷の収縮に働く筋線維芽細胞マーカーである α -SMA 陽性細胞の低下を認めた。

また、コラーゲンの mRNA である COL1A1 (I 型コラーゲン)、COL3A1 (III 型コラーゲン) の mRNA は IFN- γ KO マウス有意な減少を認めた。

IFN- γ を遺伝子欠損が好中球集積に与える影響

IFN- γ KO マウスでは、増殖期以降の治癒過程の遅延を認めたことから、増殖期の創傷部位における白血球の集積を病理学的に解析したところ、通常は Day 3 以降に減少するはずの好中球の顕著な集積を認めた。さらに、好中球遊走に働くケモカインである KC、MIP-2 の発現が増殖期においても高かった。

さらに IFN- γ KO マウスでは、細胞外マトリックス (ECM) を分解するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) のうち、MMP-2 と MMP-9 の発現が高く、これら MMP の主たる産生細胞は好中球であることを確認した。

好中球除去が IFN- γ 遺伝子欠損マウスの創傷治癒過程に与える影響

IFN- γ を遺伝子欠損したマウスに好中球を除去する抗 Gr-1 抗体を投与し、創傷治癒を解析したところ、抗 Gr-1 抗体を投与した IFN- γ KO マウスでは、治癒の改善、MMP-2 の発現低下を認めた。抗 Gr-1 抗体を投与した IFN- γ KO マウスでは、創部への好中球集積が著明に減少し、また MMP-2 産生細胞が好中球から線維芽細胞にシフトする傾向がみられた。

以上の結果より、IFN- γ は好中球からの過剰な MMP-2 産生を抑制し、正常な治癒に必須である可能性が導かれた。

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 Kanno E, Tanno H, Masaki A, Sasaki A, Sato N, Goto M, Shisai M, Yamaguchi K, Takagi N, Shoji M, Kitai Y, Sato K, Kasamatsu J, Ishii K, Miyasaka T, Kawakami K, Imai Y, Iwakura Y, Maruyama R, Tachi M, Kawakami K	4. 巻 20(22)
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 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 pii: E5657.
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 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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

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 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
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	館 正弘 (Tachi Masahiro) (50312004)	東北大学・医学系研究科・教授 (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	笠松 純 (Kasamatsu Jun) (60567345)	東北大学・医学系研究科・講師 (11301)	
研究分担者	佐藤 光 (Sato Ko) (20832124)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	
研究分担者	丸山 良子 (Maruyama Ryoko) (10275498)	東北大学・医学系研究科・名誉教授 (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
---------	---------