

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463284

研究課題名(和文) 褥瘡・慢性創傷の炎症遷延に関わるダメージ関連分子の同定と炎症制御ケア技術の確立

研究課題名(英文) Involvement of DAMPs in the inflammatory response at the chronic wound site and the establishment of effective care

研究代表者

菅野 恵美 (Kanno, Emi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：10431595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウス創傷モデルを用いて、治癒過程の炎症へのDAMPsおよびDAMPsを認識するC型レクチン受容体(CLRs)の関与について検討した。はじめにCLRsを介し、NF- κ Bを活性化するCARD9の役割について解析した。次にSAP130(DAMPsの一種)とSAP130を認識するMincleを解析した。WTに比べCARD9KOマウスでは創閉鎖率と白血球集積数、TNF- α 、MIP-1 α 、MIP-1 β のmRNA発現が有意に低下した。免疫染色結果より、創部においてSAP130とMincle陽性細胞を認めた。以上の結果から、Mincleを介したシグナル伝達が創傷治癒に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We addressed the possible involvement of damage-associated molecular patterns (DAMPs) and C-type lectin receptors (CLRs) in the wound site. We analyzed the role of caspase recruitment domain-containing protein 9 (CARD9), which is an essential signaling adaptor molecule in NF- κ B activation upon triggered through CLRs. Next, we analyzed the expression of SAP130 and Mincle in the wound site. Wounds were created on the backs of wild-type and CARD9 gene-disrupted (knockout) mice. We analyzed percent wound closure, accumulation of leukocytes, mRNA expression of cytokines and chemokines by real-time PCR. CARD9 KO mice were exhibited significant attenuation in wound closure compared with WT mice, which was associated with the decreased expression of TNF- α , MIP-1 α and MIP-1 β mRNA. In an immunohistochemical analysis using WT mice, expression of SAP130 and Mincle were detected in the leukocytes. These results suggest that DAMPs may be involved in the inflammatory response.

研究分野：創傷治癒

キーワード：創傷治癒 炎症 DAMPs

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の高齢社会、慢性疾患患者の増加に伴い、褥瘡など慢性創傷を有する患者が急増し、約3割が感染や壊死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) 創部の炎症は、創の清浄化に重要なステップであるが、慢性創傷では、感染や壊死など、異物の存在が炎症反応を持続させ創傷治癒を停滞させる。多くの研究者は炎症を持続させる要因として、感染に注目し、細菌を減少させる「銀イオン入りドレッシング」や「抗菌薬入り軟膏」の開発に取り組んできた。一方、死細胞からなる壊死組織は、物理的障壁、細菌の温床と考えられ、速やかな除去(デブリードマン)が推奨されているが、出血のリスク、敗血症の危険性によりデブリードマンが困難な症例もある。これまでに、デブリードマンが創傷治癒に有利に働くか、また、壊死組織が創傷治癒に与える影響は解明されていない。

壊死組織に注目した理由は、近年明らかになった死細胞から放出される『ダメージ関連分子パターン(Damage-Associated Molecular Patterns; DAMPs)』の存在(図2)である。免疫学分野で解析が進み、DAMPsは細菌感染を伴わない炎症反応の惹起に関与することが明らかになってきた。タンパク質や核酸など様々なDAMPsが発見され、いずれも細胞の損傷により初めて放出される点が共通している。これまでDAMPsが動脈硬化、慢性関節リウマチ、腎炎など局所炎症性疾患の原因となることが報告されている(Krysko DV, et al.:Cell, 32:157-164, 2011)。慢性創傷でも、壊死組織からのDAMPs放出が炎症遷延の原因である可能性が高い。また、慢性創傷では「壊死組織からのDAMPs放出」と同時に「細菌感染」が起こることが懸念され、DAMPsと細菌の関連性も解決すべき問題である。

申請者はこれまで、細菌が導く炎症反応に注目して研究を進め、正常ラットでは、適度な細菌負荷は初期の炎症反応を高め創傷治癒に有効であることを明らかにした。残された課題は、「細菌+」の解析である。すなわち、慢性創傷でみられるような、「細菌+壊死組織」、「細菌+免疫低下状態」における炎症誘導メカニズムの解明と炎症をコントロールできるケア技術の確立が求められている。

(3) 近年、炎症を引き起こすイニシエーター

として、免疫学の分野では、ダメージ関連分子パターン(DAMPs)が注目されている。代表的なDAMPsとして、HMGB1、Heat shock protein、SAP130などがよく知られている。DAMPsは、壊死組織・死細胞から放出される内因性因子であり、心筋梗塞や脳梗塞など感染を伴わない炎症への関与が報告されている。生体内においてDAMPsの認識に関わる受容体としてToll様受容体(TLR)、C型レクチン受容体(CLRs)が挙げられる。創傷治癒との関連においてTLRはよく解析されており、TLR4、TLR9が治癒促進に関与することが報告されている。

2. 研究の目的

皮膚創傷治癒過程において、感染や壊死組織は、炎症遷延や治癒阻害に働く要因と考えられているが、壊死組織に関する解析は遅れており、近年注目されている「壊死組織・死細胞が放出するダメージ関連分子パターン(DAMPs)」が創傷に与える影響は解明されていない。本研究では、動物実験モデルを用い、壊死組織・死細胞が放出するDAMPsが炎症反応や創傷治癒に与える影響を明らかにし、創部の壊死組織(DAMPs)制御に基づく新しい創傷管理法の確立を目指す。

今回は特に、C型レクチン受容体(CLRs)を介したDAMPsの影響に注目した。CLRはマクロファージなどに発現している受容体であり、これまでにDectin-1、Dectin-2、Mincleなどが報告されている。真菌や細菌の菌体成分の認識に関与する他、MincleはDAMPsの一種であるSAP130の認識に関与することが明らかになっている。

3. 研究の方法

本研究では、看護学・創傷治癒学・免疫学を融合し、分野間を超えた連携体制のもと、慢性創傷にみられる壊死組織が創傷に与える影響の解明、壊死に対する新しい管理方法の確立を目指す。

マウス創傷モデルを用い、壊死組織から放出されるダメージ関連分子(DAMPs)が創傷治癒過程に与える影響を解析する。得られた結果を当該分野の国内・国外学会にて発表すると共に、論文として公表し臨床応用を目指す。

マウス創傷モデル：マウスの背側皮膚にバイオプシーパンチで開放創を作成、湿潤環境を保ち、経時的に組織を摘出し、以下の解析に用いる。

<炎症反応の解析>：DAMPs濃度、白血球

集積、炎症性サイトカイン産生の解析 (大学内の共通機器室に設置された細胞解析装置、吸光プレートリーダーにて解析)

皮膚組織を摘出後、ホモジナイズし、比重遠心にて炎症細胞 (好中球、マクロファージ、リンパ球など)と上清を同時に回収し、解析する。上清中の DAMPs、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-13、白血球の遊走) に関与するケモカインである CINC-1 や CINC-3) は ELISA 法で測定し、定量化する。 < 治癒速度の解析 > : 創上皮化率、上皮細胞分化、血管新生、コラーゲン合成量の解析 摘出組織をパラフォルムアルデヒドで固定、パラフィン包埋、各種染色後、上皮化率 (HE 染色)、上皮細胞の分化 (PCNA 免疫染色)、血管新生 (CD31 免疫染色) を組織学的に評価する。以上の解析は大学内の病理プラットフォームの協力を得て実施する。コラーゲン合成量については、摘出組織をホモジネート後、塩酸処理にてコラーゲンを抽出し、定量化する。

4 . 研究成果

創傷治癒過程における炎症反応を解析するにあたり、本研究では C 型レクチン受容体 (CLRs) を介した DAMPs の影響に注目した。CLRs はマクロファージや樹状細胞に発現するパターン認識受容体としてよく知られている。

(1) CLRs を介して NF- κ B を活性化させるためのアダプター分子である Caspase recruitment domain-containing protein 9 (CARD9) 欠損 (KO) マウスを用い、以下の結果を得た。野生型マウスに比べ CARD9KO マウスでは、受傷 5、7、10 日目の創閉鎖率が有意に低下した。それに先立ち 24 時間後の創部に集積した創白血球数及びマクロファージ集積数が有意に少なかった。また、創作成後 12、24 時間の TNF- α およびマクロファージの集積に関与するケモカインである MIP-1 α と MIP-1 β の mRNA 発現が有意に低下した。

(2) さらに、創部における DAMPs の発現について免疫組織化学的に検証した。今回は DAMPs を認識する CLRs である Mincle と Mincle に認識されることが報告されている spliceosome associated protein 130 (SAP130) に注目した。その結果、受傷後早期から創部において Mincle を発現した白血球および SAP130 が観察された。

(1)、(2)の結果より、Mincle を介したシグナル伝達が創傷治癒過程における炎症惹起

に関与している可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

Kanno E, Kawakami K, Miyairi S, Tanno H, Suzuki A, Kamimatsuno R, Takagi N, Miyasaka T, Ishii K, Gotoh N, Maruyama R, Tachi M: Promotion of acute-phase skin wound healing by *Pseudomonas aeruginosa* C4-HSL. Int Wound J, 2016 (in press). 査読有

Kanno E, Tanno H, Suzuki A, Kamimatsuno R, Tachi M: Reconsideration of Iodine in Wound Irrigation: The Effects on *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Formation. Journal of Wound Care, 2016 (in press). 査読有

菅野恵美: 創傷治癒における微生物負荷の意義. 基礎科学をもとにした Co-Medical 研究会雑誌, 3(1): 16-21, 2015. 査読有

菅野恵美: 創傷における細菌コントロールの意義. 東北大学保健学科紀要, 24(1): 15-18, 2015. 査読有

菅野恵美, 館正弘: 皮膚の構造と機能. 理学療法, 30(4): 387-393, 2013. 査読無

菅野恵美, 館正弘: 褥瘡の部位・状態による創傷被覆材の選び方と使い分け. 薬局, 64(12): 106-112, 2013. 査読無

[学会発表] (計 5 件)

上松野りな, 鈴木愛子, 菅野恵美, 丹野寛大, 高木尚之, 石井恵子, 原博満, 丸山良子, 川上和義, 館正弘: マウス創傷治癒過程における CARD9 遺伝子欠損の影響. 第 26 回日本生体防御学会, 台東区生涯学習センター (東京), 2015 年 7 月 10-12 日

SUZUKI Aiko, KANNO Emi, TANNO Hiromasa, KAMIMATSUNO Rina, ISHII Keiko, HARA Hiromitsu, KAWAKAMI Kazuyoshi: Effect of CARD9-deficiency on the wound healing process in skin. 第 43 回日本免疫学会学術集会, 国立京都国際会館 (京都市), 2014 年 12 月 10-12 日

鈴木愛子, 菅野恵美, 川上和義, 丹野寛大, 上松野りな, 高木尚之, 石井恵子, 丸山良子, 館正弘: マウス皮膚創傷治癒過程における CARD9 遺伝子欠損の影響. 第 44 回日本創傷治癒学会, メトロポリタン仙台 (仙台市), 2014 年 12 月 2, 3 日

Aiko Suzuki, Emi Kanno, Kazuyoshi Kawakami, Hiromasa Tanno, Keiko Ishii, Ryoko Maruyama, Masahiro Tachi: CARD9 DOES NOT AFFECT ACUTE WOUND HEALING. The Wound Healing Society's 2014 Annual Meeting/The Symposium of Advanced Wound Care (Orland, USA), April 23-27, 2014.

鈴木愛子, 菅野恵美, 川上和義, 丹野寛大, 上松野りな, 石井恵子, 丸山良子, 館正弘: 皮膚創傷治癒過程における CARD9 遺伝子欠損の影響に関する研究. 第 43 回日本創傷治癒学会, 別府湾ロイヤルホテル (大分市), 2013 年 11 月 14, 15 日

〔図書〕(計 5 件)

菅野恵美, 館正弘: 総論・湿潤環境療法と感染症, クリティカルコロナイゼーションとバイオフィルム. 館正弘 企画編集, WOC Nursing. 医学出版, 3(9): 7-14, 2015.

菅野恵美, 館正弘: 創傷治癒と湿潤環境理論. 貝谷敏子企画編集, WOC Nursing. 医学出版, 3(10): 7-14, 2015.

菅野恵美, 館正弘: 治療薬は外用薬だけではない ドレッシング材の活用, 使い分け. 宮地良樹編集, 間違いだらけの褥瘡・フットケア 変容する創傷管理の常識. 中山書店, 35-45, 2014.

菅野恵美, 館正弘: ドレッシング材の選び方と使い分け. 宮地良樹編集, まるわかり創傷治療のキホン. 南山堂, 151-159, 2014.

菅野恵美, 館正弘: 下肢感染症の評価と栄養管理. 小林修三企画編集, WOC Nursing. 医学出版, 58-65, 2014.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :

種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.snp.med.tohoku.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

菅野恵美 (KANNNO, Emi)
東北大学・医学系研究科・講師
研究者番号 : 10431595

(2) 研究分担者

館正弘 (TACHI, Masahiro)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号 : 50312004

丸山良子 (MARUYAMA, Ryoko)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号 : 10275498

(3) 連携研究者

川上和義 (KAWAKAMI, Kazuyoshi)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号 : 10253973