

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670769

研究課題名(和文) 創部炎症連鎖に対するC型レクチン受容体を介したDAMPsの影響

研究課題名(英文) The effects of DAMPs through C type lectin receptors on the wound healing

研究代表者

薄葉 千絵 (Usuba, Chie)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：80509232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウス創傷モデルを用いて、創傷治癒過程の炎症反応へのダメージ関連分子パターン(DAMPs)とその受容体の一つであるC型レクチン受容体(CLRs)の関与について検討した。皮膚損傷に伴い、MincleやDectin-1、Dectin-2などCLRのmRNAが早期に増加することを確認した。次に、CLRを介してNF- κ Bを活性化するアダプター分子CARD9の役割について解析した。その結果、CARD9を欠損したマウスでは、創閉鎖率、白血球集積数、TNF- α のmRNA発現が有意に低下した。以上の結果より、CLRを介したシグナル伝達が創傷治癒の炎症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 C-type lectin receptors (CLR) in the wound site. The expression of CLR (Mincle, Dectin-1, Dectin-2) mRNA in the wounded skin were increased after wound creation. 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 CLR. The percent wound closure, accumulation of leukocytes, mRNA expression of TNF- α were decreased in CARD9 KO mice. These results suggest that CLR may involved in the inflammatory response at the wound site.

研究分野：形成外科学

キーワード：創傷治癒 炎症 C型レクチン受容体 DAMPs

1. 研究開始当初の背景

皮膚損傷後に起こる炎症反応は、創部の清浄化、感染防御に重要な役割を担う。しかし、何らかの理由で炎症起因为物質が排除されない状況下では、炎症が慢性化し、創傷治癒が遅延する。

褥瘡や糖尿病性下腿潰瘍など難治性皮膚潰瘍では、炎症遷延が問題視され、デブリードマンや抗菌薬の投与など、病原微生物の減少、除去に対する治療法が主となっているが、病原微生物を減少させたとしても、一行に治癒に向かわない皮膚潰瘍が多数存在する。

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。

一方、CLRs と創傷治癒の関連は検証されていないが CLRs の一つである Mincle は死細胞から放出される DAMPs (SAP130) により活性化され、炎症性サイトカインを産生することから、創傷治癒過程においても CLRs を介した内因性 DAMPs が炎症反応の誘導に関与している可能性が高い。

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、この分野における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、マウス動物実験モデルを用い、壊死組織・死細胞が放出する DAMPs が創部の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。CLRs 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 やコレステロール結晶の認識に関与することが明らかになっている。今回は、CLRs のシグナルを伝えるアダプター分子である CARD9 遺伝子欠損マウスを用いて、実際の創傷治癒過程に CLRs や DAMPs が関与するか否かを明らかにする。

これまで慢性創傷における炎症連鎖の主たる原因は病原微生物による感染と考えられてきた。本研究は慢性創傷の不必要な炎症遷延機構に対する CLRs を介した DAMPs の影響に注目し、学術的に解明する初めての試みであり、独創性がある。これが明らかになれば、CLRs 阻害による炎症制御等、創傷の新たな治療法の確立に繋がる。

これは、他の炎症性疾患にも応用可能であり、研究の意義は非常に大きい。

3. 研究の方法

本研究では、創傷治癒過程の炎症反応に対し、C 型レクチンレセプター (CLRs) を介したダメージ関連分子パターン (DAMPs) の複合的な影響について、マウス動物実験モデルを用いて検証し明らかにする。

(1) CLRs の推移：創傷 (皮膚損傷) によって CLRs の発現が変化するか否かについて、野生型マウスの背側皮膚に創傷を作成し、経時的に摘出したのち、創部を含む皮膚組織より RNA を抽出し、real time PCR によって解析する。

(2) CARD9 遺伝子欠損の影響：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) マウスを用いて、治癒過程 (創閉鎖率)、創部への白血球集積、炎症性サイトカイン産生について解析する。

得られた結果は当該分野の国内・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。

4. 研究成果

創傷治癒過程における炎症連鎖における C 型レクチン受容体 (CLRs) を介した DAMPs の影響について、CARD9KO マウスを用いて検証した。

(1) 野生型マウスに作成した創傷を経時的に摘出し、RNA を抽出し、real time PCR で解析した結果、皮膚損傷に伴い、Mincle や Dectin-1、Dectin-2 など CLR の mRNA が早期に増加することを確認した。最も発現量の増加が顕著であったのは Mincle であり、12 時間後、7 日後に発現の増加を認めた。次に Dectin-2 が 12 時間、3 日後に発現の増加を認めた。Dectin-1 は Mincle や Dectin-2 と比較すると軽微な増加を示した。

この結果は、皮膚損傷後の炎症反応に CLR が関与している可能性を強く示唆する結果といえる。

(2) CLR 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 、IL-1 β の mRNA 発現が有意に低下した。その他、Th1 サイトカイン、Th17 サイトカインについては有意な差を認めなかった。また、ケモカインについては、マクロファージの遊走に関する macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α and MIP-1 β が CARD9KO マウスで有意に低下していた。

この結果は創部に集積したマクロファージによる炎症性サイトカイン産生が皮膚損傷後の炎症反応に関与している可能性を示唆する。

(1)、(2)の結果より、CLR を介し、マクロファージ、TNF- α 、IL-1 β による反応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。

今後は、具体的にどの CLR が炎症反応に関与しているのか、その CLR のリガンドは何か、また病原微生物との関連性などについて詳細な解析が必要であると考えられる。

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*, 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*, in press. 査読有

Tanno H, Kawakami K, Ritsu M, Kanno E, Suzuki A, Kamimatsuno R, Takagi N, Miyasaka T, Ishii K, Imai Y, Maruyama R, Tachi M: Contribution of invariant natural killer T cells to skin wound healing. *Am J Pathol*, 185(12): 3248-3257, 2015. doi: 10.1016/j.ajpath. 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.

http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=dv0tohih/2015/002401/003&name=0015-0018j&UserID=130.34.173.69&base=jamas_pdf

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

後藤孝浩, 館正弘: 褥瘡の褥瘡の保存的治療と外科的治療. *PEPARS*, 88: 78-87, 2014.

<http://www.zenniti.com/f/b/show/b01/618/zc01/5.html> 査読無

澁谷暢人, 館正弘: 新しい創傷管理: 陰圧閉鎖療法. *感染症*, 44(4): 8-11, 2014. <http://ci.nii.ac.jp/naid/40020379665> 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: 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.

http://www.igaku.co.jp/pdf/1510_wocnursing-01.pdf

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.

http://www.igaku.co.jp/pdf/1509_wocnursing-01.pdf

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, 2(11): 58-65, 2014.

http://www.igaku.co.jp/pdf/1411_wocnursing-01.pdf

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.

<http://www.nanzando.com/books/34051.php>

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.

<http://rr2.nakayamashoten.co.jp/products/978-4-521-73972-4>

〔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.prs.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

薄葉千絵 (USUBA, Chie)
東北大学・医学系研究科・非常勤講師
研究者番号: 80509232

(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

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

(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