

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860892

研究課題名(和文)皮膚の創傷治癒におけるIL-33/ST2シグナルの解析

研究課題名(英文) Nuclear IL-33/ST2 is positively involved in wound healing in mice

研究代表者

大塩 智之 (OSHIO, Tomoyuki)

自治医科大学・医学部・ポストドクター

研究者番号：70572585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はマウス皮膚創傷部周辺のケラチノサイトが核内でIL-33を高発現することを見出した。IL33ノックアウト(KO)マウスの創傷治癒に有意な遅延と炎症の悪化が認められた。IL33KOマウスの創傷部ではIL-1、IL-6、CXCL1のRNA発現が有意に亢進していた。IL33KOマウスにSN50(NF- $\kappa$ B阻害薬)を腹腔内投与することで、創傷治癒遅延が解消された。このことから、核内IL-33がNF- $\kappa$ Bを抑制し、炎症性サイトカインによる過剰な炎症を抑え創傷治癒を促進していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Our study with mouse model revealed high nuclear expression of IL-33 in keratinocytes around the wound site. The skin wound healing of IL-33 knockout (KO) mice was delayed compared to wild type (WT) mice. The mRNA expression of IL-1, IL-6, and CXCL1 were markedly enhanced in IL33KO compared to WT. The delayed wound healing and over expression of IL-6 in IL33KO was improved by intraperitoneal administration of NF- $\kappa$ B inhibitor (SN50). We speculate that the nuclear IL-33 is positively involved in wound healing, probably by suppressing excessive inflammation through inhibition of NF- $\kappa$ B.

研究分野：皮膚科学、免疫学

キーワード：創傷治癒 IL-33 ケラチノサイト

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚創傷の治癒には止血・炎症・肉芽形成・再上皮化・再構成の5段階から構成され、中でも正常な炎症状態が治癒に重要であり、過剰な炎症は創傷の慢性化や癌化のリスクとなり得る。しかし、創傷治癒のプロセスは様々な要因が複雑に関連し、炎症から組織の再構築へ至る過程の詳細な分子メカニズムは明らかとなっていない。

ケラチノサイトは表皮の大部分を構成する細胞であり、その遊走と増殖は創傷治癒における再上皮化に重要であるだけでなく、炎症性サイトカインを産生し、炎症症状の形成にも関わっている。

Balb/c マウスの背部皮膚に創傷をつくり、治癒過程を詳細に検討したところ、創傷部辺縁のケラチノサイトが IL-33 を高発現することを見出した。

IL-33 は IL-1 ファミリーに属し、IL-1 レセプターファミリーメンバー ST2 (IL1R-like1) のリガンドとして同定された。IL-33 は組織傷害の早期にバリアー組織(皮膚、肺など)の上皮系細胞より産生されることが報告され、Th2 リンパ球・肥満細胞・好酸球に作用し Th2 サイトカイン産生を誘導する。炎症性皮膚疾患において、IL-33 はアトピー性皮膚炎や乾癬の皮膚で発現が亢進することが知られている。IL-33 は、サイトカインとして細胞外から働く場合と、核内で転写を制御する働きとがあり、それぞれ異なった作用が報告されている。

## 2. 研究の目的

IL-33 は乾癬などの炎症性皮膚疾患においてケラチノサイトが発現する重要なサイトカインとして報告されているが、その詳細な役割は明らかとなっていない。そこでこの研究では、皮膚の創傷治癒における IL-33 シグナルの役割を明らかとし、創傷治癒のメカニズムを解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス創傷治癒モデル

野生型(WT)及び soluble ST2 トランスジェニック(sST2 Tg)マウスまたは IL-33 ノックアウト(IL33KO)マウスの背部の除毛を行い、皮膚に 4mm パンチを行った。Day1, 2, 4, 7, 10 における傷の面積を算出し創傷治癒の比較を行った。

### (2) 創傷部でのサイトカイン発現の比較

6mm のパンチを用いて、創傷部を周囲の皮膚ごと採取し、total RNA の抽出を行う。逆転写反応後、リアルタイム PCR によるサイトカイン発現の解析を行った。

### (3) 創傷部の組織学的観察と免疫染色

創傷部皮膚を採取後、10%中性緩衝ホルマリンにより固定し、パラフィン切片を作製した。H&E 染色による創傷部の組織学的観察と、免疫染色による IL-33 発現の比較を行った。また、炎症性浸潤細胞について、トルイジン

ブルー染色によりマストセルを、F4/80、Ly6G の免疫染色によりマクロファージと好中球の浸潤数の算定を行った。

### (4) スクラッチアッセイ

WT 及び IL33KO の生後 3 日のマウス皮膚を採取し、ディスペラーゼ処理により表皮を分離し、そこからケラチノサイトを採取した。このプライマリーケラチノサイトを型コーゲンコート 24well プレートに播種し、コンフルエントになるまで培養した。Well の中心をチップでスクラッチを行い、スクラッチ部へのケラチノサイト浸潤を WT と IL33KO で比較。

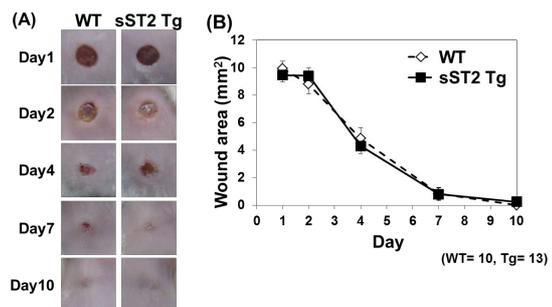
## 4. 研究成果

### (1) WT マウスの皮膚創傷部で IL-33 が誘導される

WT 及び sST2 Tg、IL33KO マウスそれぞれの背部皮膚を除毛し、4mm パンチを用いて創傷を作成した。パンチ後、1・4・7・10 日後に創傷部の皮膚を採取し、パラフィン切片を作成、IL-33 の免疫染色を行った。WT と sST2 Tg マウスのパンチ 1 日と 4 日後では、創傷部周辺と再生上皮のケラチノサイト核内に IL-33 の発現が認められるが、7・10 日後の創傷部では IL-33 の発現は見られなかった。また、いずれのマウスも正常皮膚では IL-33 の発現は見られず、IL33KO マウスは創傷部でも発現は検出されなかった。

### (2) sST2 過剰発現は創傷治癒に影響しない

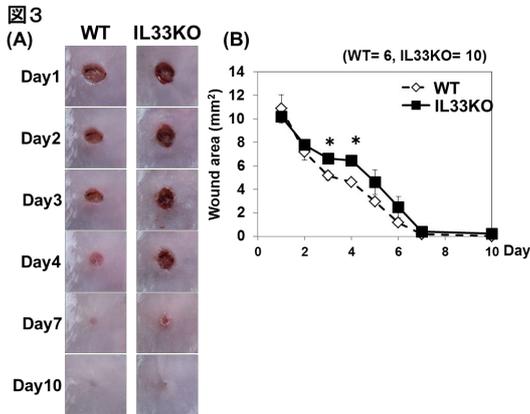
図 1



sST2L は IL-33 の膜結合型受容体である。soluble ST2 は ST2L の細胞外ドメインのみをもつ ST2L スプライスパリアントである。sST2 は IL-33 の受容体結合と競合し、そのシグナルを阻害すると考えられている。我々は IL-33 シグナルが創傷治癒に影響するかどうか検討するため、sST2 Tg マウスの創傷治癒と WT マウスを比較した。

WT 及び sST2 マウスにおいて、4mm パンチ後の創傷部面積を継続的に写真に撮り(図 1A)測定(図 1B)し、比較を行った。WT と sST2 マウスの創傷治癒速度に違いは認められなかった。sST2 マウスでは IL-33 のサイトカインとしての細胞外からの受容体を介したシグナルは阻害されていると考えられるので、創傷治癒において IL-33 のサイトカインとしてのシグナルは関与していないことが示唆される。

### (3) WT マウスと比較して IL33KO マウスの創傷治癒は遅延する



次にサイトカイン及び核内因子としての IL-33 の影響を検討するため IL33KO マウスを用いて実験を行った。WT マウスと IL33KO マウスの創傷治癒を比較すると、パンチ後 3 日、4 日で IL33KO マウスの創傷治癒に有意な遅れが認められた(図 3A, B)。しかし、7 日後では WT と IL33KO マウスは同様に治癒していた。

創傷治癒の過程は、創傷部皮膚の H&E 染色を用いて組織学的に評価をおこなった。顕微鏡下で再生上皮の長さを測定し、WT と IL33KO マウスを比較すると、創傷面積と同様にパンチ後 4 日で、IL33KO の再生上皮の長さが有意に短かった。これらの結果は IL-33 の核内発現が創傷治癒に重要であることを示唆する。

### (4) IL33KO マウスの創傷治癒後期において、好中球浸潤が亢進する

組織学的に創傷部への浸潤細胞の評価を行った。トルイジンブルー染色を用いてマストセルの染色を行い、創傷部中心と辺縁への浸潤数を検討した。WT と IL33KO マウスを比較したが、創傷部中心及び辺縁への浸潤マストセル数に有意な差はなかった。

マクロファージは抗 F4/80 抗体を用いて免疫染色を行い評価した。創傷中心部では WT と IL33KO マウスでマクロファージの浸潤数に差は見られなかったが、創傷辺縁部ではわずかに IL33KO での浸潤数に増加がみられた。

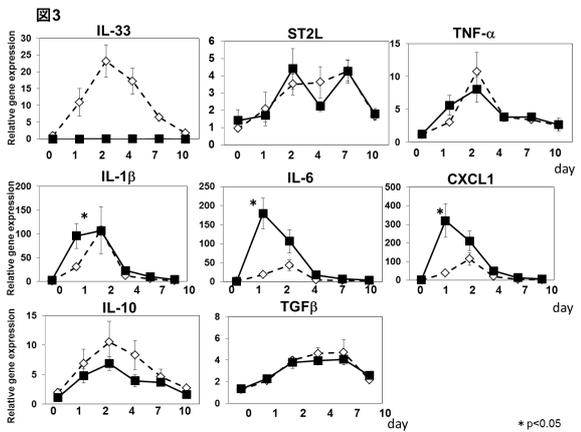
抗 Ly6G 抗体を用いた免疫染色により好中球の浸潤数を評価した。創傷部辺縁において、創傷治癒の後期(パンチ後 6 日~10 日)で好中球の浸潤数が IL33KO マウスで若干の増加が認められたが、有意な差はなかった。

### (5) IL33KO マウスの創傷部において炎症性サイトカインの発現が促進される

IL33KO マウスにおける創傷治癒遅延のメカニズムを明らかとするために、創傷部の皮膚サンプルから total RNA を抽出し、リアルタイム PCR を行った。

WT と IL33KO マウスを比較すると、パンチ後 1 日の創傷部において、IL-1、IL-6、CXCL1 の mRNA 発現が IL33KO において有意に増加していた(図 3 : WT、 : IL33KO)。しかし、

sST2 Tg マウスにおいてこれらサイトカインの発現に違いは見られなかった。



### (6) IL-33 の腹腔内投与により創傷治癒は悪化する

IL33KO マウスに IL-33 を投与することで創傷治癒の遅延が改善するかどうか検討した。WT と IL33KO マウスに、パンチの前日から 1 日おきにリコンビナント IL-33 を 1µg ずつ腹腔内投与し、創傷治癒の比較をおこなった。WT と IL33KO マウスともに、IL-33 を投与しない場合と比較して、創傷治癒が遅延し、創傷が悪化する結果となった。このときの創傷部皮膚のサイトカイン発現を検討したところ、IL-33 投与により Th2 サイトカインが強く誘導されていた。

### (7) IL33KO マウスの創傷治癒遅延は NF B 阻害薬の腹腔内投与により改善する

我々のこれまでの結果と他のグループの検討から、核内の IL-33 は NF B の活性化を阻害することで、サイトカイン産生を抑制することが知られている。核内の IL-33 発現が創傷治癒の促進に寄与していると仮定し、検討を行った。

WT と IL33KO マウスに、パンチの前日から 1 日おきに NF B 阻害薬 SN50 を 1µg ずつ腹腔内投与し、創傷治癒の比較をおこなった。IL33KO におけるパンチ後 2、4 日の創傷治癒の遅延は SN50 の腹腔内投与により正常化した。

この SN50 の腹腔内投与は WT マウスの創傷部のサイトカイン発現には影響を与えなかったが、IL33KO マウスにおける IL-6 の過剰発現を抑制した。

### (8) in vitro スクラッチアッセイでの比較

WT または IL33KO マウス由来プライマリーケラチノサイトを培養し、スクラッチアッセイをおこなった。このアッセイでは、WT 由来ケラチノサイトと比較して、IL33KO 由来ケラチノサイトはスクラッチ後 24、48 時間でのスクラッチ部への細胞浸潤が有意に遅れていた。このことは表皮ケラチノサイトの IL-33 欠損により創傷部の閉塞に遅延が起こり、炎症性細胞の浸潤との関与は低いことを

示唆する。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

Tomoyuki Oshio, Hidetoshi Tsuda, Mayumi Komine, Shin-ichi Tominaga, Hirohisa Saito, Shinichi Aizawa, Susumu Nakae, Mamitaro Ohtsuki.

「Nuclear IL-33/ST2 is positively involved in wound healing in mice」44th Annual European Society for Dermatological Research(ESDR) Meeting (第44回欧州研究皮膚科学会議) 2014.9.10 (コペンハーゲン)

大塩智之, 小宮根真弓, 津田英利, 富永眞一, 斎藤博久, 中江進, 大槻マミ太郎  
「創傷治癒における IL-33/ST2 シグナルの解析」第2回東京皮膚カンファランス 2015.3.14(東京)

大塩智之, 小宮根真弓, 津田英利, 富永眞一, 斎藤博久, 中江進, 大槻マミ太郎  
「皮膚の創傷治癒における IL-33/ST2 シグナルの解析」第22回分子皮膚科学フォーラム 2015.4.17 (高知)

Tomoyuki Oshio, Hidetoshi Tsuda, Mayumi Komine, Shin-ichi Tominaga, Hirohisa Saito, Shinichi Aizawa, Susumu Nakae, Mamitaro Ohtsuki.

「Nuclear expression of IL-33 in skin is positively involved in wound healing in mice」45th Annual European Society for Dermatological Research (ESDR) Meeting (第45回欧州研究皮膚科学会議) 2015.9.9 (ロッテルダム)

〔図書〕(計 0 件)

〔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 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

6. 研究組織

(1)研究代表者

大塩 智之 (OSHIO, Tomoyuki)

自治医科大学・皮膚科学講座・ポस्टドクター

研究者番号: 70572585

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: