

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06052

研究課題名(和文) バイオフィーム形成慢性創傷に対するリンパ球機能の解明と新規ケア技術への展開

研究課題名(英文) The analysis of lymphocyte function against biofilm formation in chronic wound

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) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：褥瘡や糖尿病性下腿潰瘍など慢性創傷からは緑膿菌がしばしば分離される。緑膿菌感染の制御には白血球が関与するが、白血球の中でもリンパ球の働きには不明な点が多い。本研究では、リンパ球の一種であるNKT細胞が急性創傷における白血球集積に与える影響および創部緑膿菌感染にどのような影響を与えるか解析を行った。NKT細胞欠損マウスでは、創部好中球数が野生型マウスと比べ、有意に増加していた。また、NKT細胞欠損マウスの創部緑膿菌排除が低下した。以上より、NKT細胞が創部好中球集積、および緑膿菌排除に重要な役割を担う可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： *Pseudomonas aeruginosa* is frequently isolated from chronic wounds. NKT cells play an important role in various aspects of the regulation immune responses, including protection against bacterial infections. However, it is not fully understood how this lymphocyte is involved in the host defense against *P. aeruginosa* wound infection. In the present study, we elucidated the role of NKT cells in clearance of *P. aeruginosa* from the wound. NKT cell-deficient mice showed impaired clearance of *P. aeruginosa*. These results indicate that NKT cells may be involved in the clearance of *P. aeruginosa* from wounds.

研究分野：基礎看護学

キーワード：創傷治癒 感染 リンパ球

## 1. 研究開始当初の背景

近年の高齢化、慢性疾患患者の増加に伴い、褥瘡や下腿潰瘍など慢性創傷を有する患者が急増し、3割が細菌感染によるバイオフィルム

産生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。創傷は様々な要因で難治化するが、糖尿病や免疫不全など易感染状態の患者における感染が最大の問題となっている。

創傷において、細菌感染によるバイオフィルム産生は白血球により制御される。白血球は主に好中球、単球・マクロファージ、リンパ球に分類され、好中球やマクロファージの貪食・殺菌能については、動物モデルを用いた詳細な解析がなされている。しかし、慢性創傷の細菌感染に対するリンパ球の機能は、

好中球集積の促進に関する報告の一報に限られ、詳細な解析は行われていない。

リンパ球には、通常のT細胞、B細胞の他にNatural Killer (NK) 細胞、NKT細胞、 $\gamma\delta$ T細胞など自然免疫リンパ球の存在が知られている。本研究では、リンパ球の中でも感染制御に深く関与し、強力な免疫増強作用を有するNKT細胞に注目した。

## 2. 研究の目的

本研究では、非常に強力な免疫増強作用を有し、他の白血球の司令塔として働くリンパ球(NKT細胞)に注目し、慢性創傷の細菌によるバイオフィルム産生に対するNKT細胞の機能を解明する。創傷における細菌感染に対するNKT細胞の役割は明らかにされていない。我々は、慢性創傷モデルマウスを用いて、リンパ球制御に基づく新規ケア技術の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1)情報収集

褥瘡、慢性創傷治療の現状や課題をタイムリーに把握するため、文献検索、資料の収集を実施する。このため、当該分野(創傷、免疫、看護技術)の学会や研究会へ参加した。

### (2)動物実験

皮膚創傷治癒過程におけるNKT細胞活性化の影響

野生型マウス(C57BL/6J)の背部皮膚に全層欠損創を作成し、NKT細胞活性化物質である $\alpha$ -GalCerを創部に摘出日まで連日で塗布し、その治癒過程について解析した。

NKT細胞が創部白血球集積に与える影響

NKT細胞欠損J $\alpha$ 18KOマウスと野生型マウスの背部皮膚に全層欠損創を作成し、白血球集積およびケモカイン産生を解析した。

創部細菌感染に対するNKT細胞の役割  
野生型マウスに全層欠損層を作成後、緑膿菌 PAO1 株を  $1 \times 10^4$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ /CFU/wound で接種し、創部感染モデルの検討を行った。さらに、J $\alpha$ 18KO マウスへも PAO1 株を接種し、緑膿菌感染防御および創傷治癒への影響を解析した。

### (3)

創収縮率：創作成時と摘出時に創部の肉眼所見をデジタルカメラで撮影し、PCソフト Axio Vision を用いて面積を算出し、創収縮率を評価

筋線維芽細胞数：パラフィン切片を用いて、創収縮に関わる筋線維芽細胞のマーカーである抗  $\alpha$ -SMA 抗体により免疫染色し、陽性細胞を同定評価

血管新生：パラフィン切片を用いて、血管内皮細胞のマーカーである抗 CD31 抗体により免疫染色し、陽性細胞を同定評価

コラーゲン量：摘出創部をホモジナイズし、創部のヒドロキシプロリンを定量、評価

### 白血球集積の解析

摘出した創を 10 mM HEPES と 10% FCS、1 mg/ml collagenase と 1 mg/hyaluronidase を加えた RPMI1640 培養液 とともにステンレスメッシュを用いてホモジネートした後、37℃ で 60 分震盪した。ホモジネート中の皮膚組織片を 40  $\mu$ m のナイロンメッシュを通過させて除去した後遠心し、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℃、1600 rpm/分で 20 分遠心した後、中間層を回収し、1% FCS を加えた RPMI1640 で 3 回洗浄した。約  $1 \times 10^5$  個の細胞を Cytofuge-2 を用いてスライドガラス上に塗沫し、Diff-Quick 法を用いて染色した。得られた細胞に含まれる好中球、マクロファージ、リンパ球数は染色した 500 個の細胞の各細胞比率を基に、総白血球数より算出した。

### サイトカイン・ケモカイン産生の解析

摘出皮膚組織より mRNA を抽出、もしくは皮膚ホモジネート上清中の炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17A、IFN- $\gamma$ )白血球遊走に関与するケモカイン(MIP-2、KC、MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 、RANTES)産生を ELISA 法と PCR 法で解析した。

### 好中球アポトーシスの解析

上記の方法で回収した白血球を Fc $\gamma$  受容体 (Fc $\gamma$ 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 $\gamma$ R  $\cdot$  Fc $\gamma$ R モノクローナル抗体と氷上で 15 分間インキュベートした。その後、抗 CD11b 抗体と抗 Gr-1 抗体で白血球を染色し、Gr-1 陽性 CD11b 強陽性細胞を好中球として解析した。アポトーシスの解析には Annexin V Apoptosis

Detection Kit with PI を用い、早期アポトーシス、後期アポトーシスについて、PI 陰性 Annexin V 陽性細胞を早期アポトーシス細胞、PI 陽性 Annexin V 陽性細胞 c を後期アポトーシス細胞とした。

菌液の調整：PAO1 株を羊血液寒天培地上で 37、24 時間静置培養したのち、単一コロニーを採取し brain heart infusion broth (BHI) メディウム内で 37、24 時間静置培養し増菌した。この菌液を生理食塩水で 3 回洗浄した。菌液の濃度を OD600 で吸光度を測定し、任意の濃度の菌液を作製し、以下の実験で使用した。

創部細菌数の解析：摘出組織のホモジネート上清を羊血液寒天培地もしくは緑膿菌選択培地である NAC 寒天培地に接種し、創作成 5、7 日後の細菌数を定量化した。

#### 4. 研究成果

(1) 皮膚創傷治癒過程における NKT 細胞活性化の影響

$\alpha$ -GalCer 創部投与により創閉鎖率、肉芽の厚さおよび血管新生 (CD31) が対照群と比較し、有意に促進した。一方、再上皮化率、筋線維芽細胞数 ( $\alpha$ -SMA) は両群間に差を認めなかった。創部 IFN- $\gamma$  mRNA は創作成 1, 3 日目に  $\alpha$ -GalCer 投与により、有意に増加した。TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MIP-2 mRNA 発現は  $\alpha$ -GalCer 投与により、創作成 1 日目において対照群と比べ有意に低下した。

(2) NKT 細胞が創部白血球集積に与える影響

野生型マウスと比べ、Ja18KO マウスで創部好中球数が創作成 1, 3 日後に有意に増加した。WT マウスと比べ、Ja18KO マウスで創作成 12 時間後の MIP-2 mRNA 発現、創作成 1, 3 日後の KC mRNA 発現、創作成 1 日後の IL-17A 産生および創作成 3 日後の好中球エラスターゼ活性が有意に増加した。一方で、創部マクロファージ、リンパ球数は、Ja18KO マウスで有意に低下した。さらに、マクロファージやリンパ球集積に関与するケモカインである MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 、RANTES について解析したところ、MCP-1、RANTES mRNA 発現が野生型マウスと比較し、有意に低下していた。MIP-1 $\alpha$  には差は認められなかった。好中球早期アポトーシス、後期アポトーシスは両方とも、創作成 1 日後に Ja18KO マウスで有意に低下した。Ja18KO マウスへの抗 Gr-1 抗体、抗 IL-17A 抗体、または好中球エラスターゼ阻害剤投与により、WT マウスと同レベルまで創作成 3 日後の創閉鎖率、コラーゲン合成が回復したが、コントロール群では、そのような効果は認められなかった。

(3) 創部細菌感染に対する NKT 細胞の役割  
野生型マウスへの PAO1 接種濃度について

$1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ /CFU/wound で検討を

行った。PAO1 株の  $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ /CFU/wound 接種群ではマウスの著しい体重減少が認められたため、動物愛護の観点から犠牲死対象とした。そのため、以降の実験では、PAO1 株  $1 \times 10^4$ /CFU/wound を用いることとした。さらに、予備実験として、Ja18KO マウスへも PAO1 株  $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ /CFU/wound 接種したところ、PAO1 接種によって、著明な創収縮率の低下を認めた。

さらに、野生型マウスと Ja18KO マウスに PAO1 株  $1 \times 10^4$ /CFU/wound を創部に接種し、創作成 7 日目の創閉鎖率および、創部緑膿菌数について解析したところ、創収縮率には差は認められなかったが、創部緑膿菌数が、Ja18KO マウスで増加傾向にあった。

#### 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 4 件)

1. Naoyuki Takagi, Kazuyoshi Kawakami, Emi Kanno, Hiromasa Tanno, Atsushi Takeda, Keiko Ishii, Yoshimichi Imai, Yoichiro Iwakura, Masahiro Tachi: IL-17A promotes neutrophilic inflammation and disturbs acute wound healing in skin. *Experimental Dermatology*, 26: 137-144, 2017.  
DOI: 10.1111/exd.13115  
(査読あり)
2. Emi Kanno, Hiromasa Tanno, Aiko Suzuki, Rina Kamimatsuno, Masahiro Tachi: Reconsideration of Iodine in Wound Irrigation: The Effects on *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Formation. *Journal of Wound Care*, 25(6):335-339, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.12968/jowc.2016.25.6.335>  
(査読あり)
3. Emi Kanno, Kazuyoshi Kawakami, Shinichi Miyairi, Hiromasa Tanno, Aiko Suzuki, Rina Kamimatsuno, Naoyuki Takagi, Tomomitsu Miyasaka, Keiko Ishii, Naomasa Gotoh, Ryoko Maruyama, Masahiro Tachi: Promotion of acute-phase skin wound healing by *Pseudomonas aeruginosa* C4-HSL. *International Wound Journal*, 13(6): 1325-1335, 2016.  
DOI: 10.1111/iwj.12523  
(査読あり)
4. Hiromasa Tanno, Kazuyoshi Kawakami,

Masae Ritsu, Emi Kanno, Aiko Suzuki, Rina Kamimatsuno, Naoyuki Takagi, Tomomitsu Miyasaka, Keiko Ishii, Yoshimichi Imai, Ryoko Maruyama, Masahiro Tachi: Contribution of invariant natural killer T cells to skin wound healing. The American Journal of Pathology, 185(12): 3248-3257, 2015.

DOI:https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.08.012

(査読あり)

〔学会発表〕(計8件)

1. Hiromasa Tanno, Kazuyoshi Kawakami, Emi Kanno, Keiko Ishii, Ryoko Maruyama, Masahiro Tachi : Lack of iNKT cells leads to persisted infiltration of neutrophils and delayed wound healing process in skin. 5th Congress of the World Union of Wound Healing Societies (Firenze, Italy), September 25-29, 2016.
2. Hiromasa Tanno, Kazuyoshi Kawakami, Emi Kanno, Naoyuki Takagi, Keiko Ishii, Ryoko Maruyama, Masahiro Tachi : Invariant Natural Killer T cells: Roles in skin wound healing and potential clinical application. The 10th Congress of Chinese Tissue Repair Society (Fuzhou, China) September 10-11, 2016.
3. Hiromasa Tanno, Kazuyoshi Kawakami, Emi Kanno, Naoyuki Takagi, Keiko Ishii, Ryoko Maruyama, Masahiro Tachi : Invariant Natural Killer T cells: Roles in skin wound healing and potential clinical application. The 13th Japan-Korea Congress of Plastic and Reconstructive Surgery, ANA CROWN PLAZA HOTEL KANAZAWA, (Kanazawa, Japan), May 15-17, 2016.
4. 菅野恵美, 川上和義, 丹野寛大, 鈴木愛子, 佐藤紀子, 正木愛梨, 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 を介したシグナル伝達の影響. 第46回日本創傷治癒学会, 東京大学伊藤国際学術研究センター・安田講堂, 東京, 2016年12月9-10日.
5. 丹野寛大, 川上和義, 菅野恵美, 今村彩乃, 佐藤紀子, 正木愛梨, 高木尚之,

石井恵子, 丸山良子, 館正弘: NKT 細胞の活性化が創傷治癒に与える影響— $\alpha$ -Galactosylceramide 創部投与による検証—. 第46回日本創傷治癒学会, 東京大学伊藤国際学術研究センター・安田講堂, 東京, 2016年12月9-10日.

6. 正木愛梨, 菅野恵美, 丹野寛大, 佐藤紀子, 石井恵子, 丸山良子, 川上和義, 館正弘: マウス皮膚創傷治癒過程におけるインターフェロン- $\gamma$ の影響に関する研究. 第46回日本創傷治癒学会, 東京大学伊藤国際学術研究センター・安田講堂, 東京, 2016年12月9-10日.
7. 佐藤紀子, 菅野恵美, 丹野寛大, 正木愛梨, 高木尚之, 石井恵子, 丸山良子, 川上和義, 館正弘: マウス皮膚創傷治癒過程における Mincle 遺伝子欠損の影響. 第46回日本創傷治癒学会, 東京大学伊藤国際学術研究センター・安田講堂, 東京, 2016年12月9-10日.
8. TANNO Hiromasa, KANNO Emi, SATO Noriko, MASAKI Airi, ISHII Keiko, KAWAKAMI Kazuyoshi: Effect of iNKT cell deficiency on neutrophilic response during early phase of skin wound healing. 第45回日本免疫学会学術集会, 沖縄コンベンションセンター、ラクナガーデンホテル, 沖縄, 2016年12月5-7日.

〔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  
丹野 寛大 (TANNO HIROMASA)  
東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10755664

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )