

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592705

研究課題名(和文)慢性創傷におけるNKT細胞機能の解明とその制御による新たな治療法の確立

研究課題名(英文)Explication of NKT cellular function in a chronic hurt and establishment of a new remedy by the control

研究代表者

古和田 雪(Kowata, Yuki)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：90623190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：NKT細胞はT細胞とNK細胞の特性を併せ持つユニークな細胞であり、様々な疾患の制御に深く関わっている。本研究ではマウス創傷治癒モデルを用いて創傷治癒過程におけるNKT細胞の役割に注目し解析を行った。NKT細胞を欠損したJ 18KOマウスでは、WTマウスと比べ創傷治癒が遅延した。この遅延は、WTマウス由来のNKT細胞を20～30%程度含む肝臓単核球集団(LMNC)を移植されたJ 18KOマウスで回復した。また、WTマウスにNKT細胞を活性化させる α -GalCerを投することにより創傷治癒が促進した。これらの結果より、NKT細胞が皮膚創傷治癒過程において重要な役割を担うことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Natural Killer T (NKT) cells, an unique lymphocyte with a potent regulatory ability in various inflammatory responses, produce IFN- γ and IL-4 upon stimulation with α -galactosylceramide (α -GalCer). However, it is not understood how this lymphocyte is involved in skin wound healing. In this study, we elucidated the role of NKT cells in the skin wound healing process. In J 18KO mice lacking NKT cells, wound healing was impaired compared with wild-type (WT) mice. The adoptive transfer of liver mononuclear cells (LMNCs) from WT, but not from J 18KO mice, resulted in the reversal of this impaired wound healing in J 18KO mice. Administration of α -GalCer resulted in the acceleration of wound healing. These results indicate that NKT cells play important roles in wound healing.

研究分野：医歯薬学

キーワード：創傷治癒学 NKT細胞 感染

1. 研究開始当初の背景

形成外科領域で問題になる疾患には褥瘡や糖尿病性潰瘍など慢性創傷が挙げられる。このような創傷では炎症が遷延し治癒が進行しない症例がしばしば見られる。炎症期の創部には好中球、マクロファージに続き、リンパ球の浸潤が見られる。好中球やマクロファージについては詳細な解析がなされている。その一方、リンパ球については皮膚の $\gamma\delta$ T 細胞が治癒を促進することが報告されている。しかしながら、他のリンパ球については、ほとんど解析されていない。本研究では、リンパ球の中でも感染制御に深く関与し、強力な免疫増強効果を有する Natural Killer T (NKT)細胞に注目した。

2. 研究の目的

皮膚は生体防御において第一線のバリアを構成し、創傷はそれを脅かすものとして大きな問題となる。創傷治癒過程は炎症期を含む多様な過程からなり、様々な炎症性細胞が創面に遊走し、生体防御機能において重要な役割を担うことが知られている。しかし、皮膚創傷治癒過程における NKT 細胞の関与についての詳細な研究はなされていない。NKT 細胞は T 細胞と NK 細胞の特性を併せ持つユニークな細胞であり、腫瘍、感染、アレルギーなど様々な疾患の制御に深く関わり、 α -galactocylceramide(α -GalCer)により活性化すると速やかに大量の IFN- γ 、IL-4 を産生することが報告されている。本研究では、マウス創傷治癒モデルを用いて創傷治癒過程における NKT 細胞の役割に注目し解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 動物実験

皮膚創傷治癒過程における NKT 細胞の役割

NKT 細胞欠損 $J\alpha 18$ KO マウスと野生型マウス (WT) (C57BL/6) の背部皮膚に全層創を作成し、その治癒過程について比較検討した。

NKT 細胞欠損マウスへの肝臓リンパ球移植の効果

NKT 細胞を 20~30% 程度含む Liver Mononuclear cell (LMNC) を創作成 1 日前に $J\alpha 18$ KO マウスへ移植し、全層創を作成し、その治癒過程について比較検討した。

α -GalCer による NKT 細胞活性化の皮膚創傷治癒過程への影響

創作成 1 日前に WT マウスに α -GalCer を腹腔内投与し、全層創を作成後、治癒過程を比較検討した。

(2) 解析項目

・創収縮率、筋線維芽細胞の分化 (α -SMA) 、血管新生 (CD31) の解析

マウスに開放創を作成後、1、3、5、7、10 日目に組織を摘出し、4%パラホルムアルデヒドにて固定、パラフィン包埋、マイクロトームにて $3\mu\text{m}$ の切片を作成し、以下の解析を行った。

創収縮率：創作成時と摘出時に創部の肉眼写真をデジタルカメラで作成し、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である抗 α -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である抗 CD31 抗体により免疫染色し、陽性細胞を同定評価

4. 研究成果

WT マウスと $J\alpha 18$ KO マウスに創傷を作成し、治癒過程を比較すると、WT マウスに比べ、 $J\alpha 18$ KO マウスで創閉鎖率の遅延を認めた (図 1, 2)。

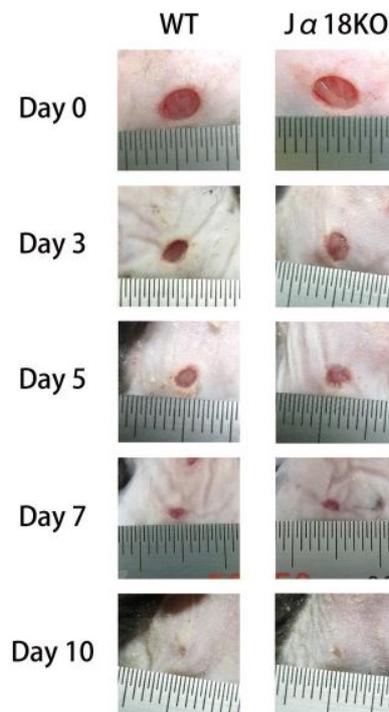


図 1

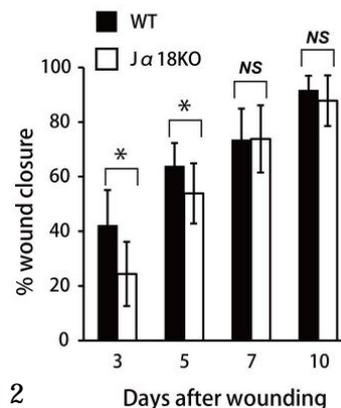


図 2

さらに、WT マウスと比べ、Jα18KO マウスでは、筋線維芽細胞数 (α-SMA)、血管新生 (CD31) が有意に低下した (図 3, 4)。

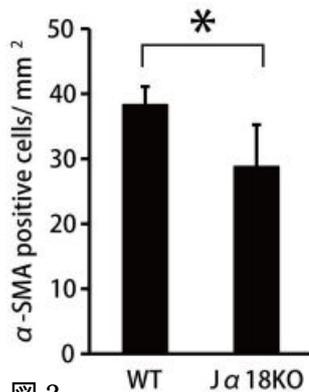


図 3

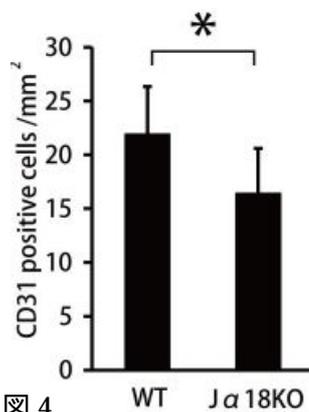


図 4

この Jα18KO マウスでの創傷治癒の遅延は WT マウス由来 LMNC (NKT 細胞が存在する) の移植により完全に回復したが、Jα18KO マウス由来 LMNC (NKT 細胞が存在しない) を移植された Jα18KO マウスではそのような効果がみられなかった (図 5)。

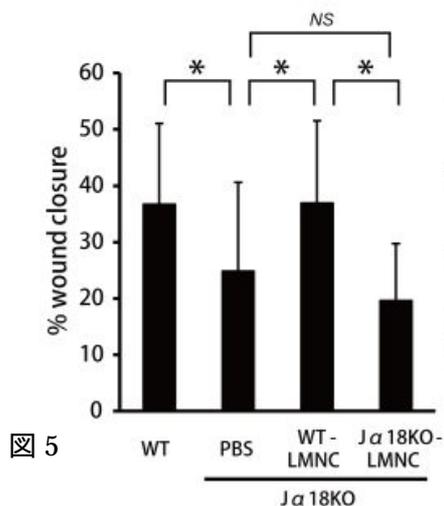


図 5

皮膚創傷治癒過程における NKT 細胞の役割をより明確にするため、NKT 細胞を活性化させる α-GalCer を投与し、その治癒過程を

比較したところ、対照群と比べ、α-GalCer 投与群において、創作成 3 日目の治癒促進効果を認めた (図 6)。

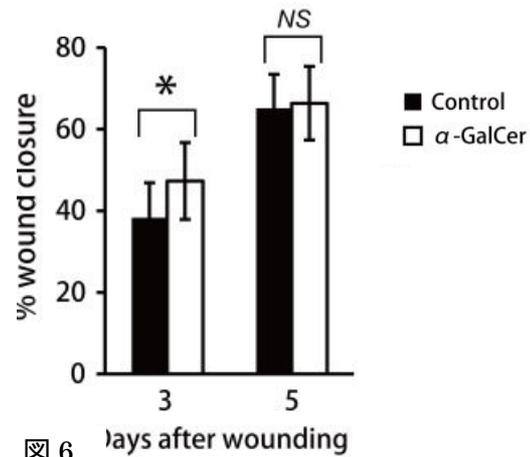


図 6

これらの結果より、NKT 細胞が皮膚創傷治癒過程に促進的に関与することが明らかとなった。また、NKT 細胞を活性化させる α-GalCer 投与により、治癒が促進することが明らかとなった。α-GalCer を用い、NKT 細胞を活性化させる新たな創傷治療法の可能性が示された。

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 1 件)

1. Tanno H, Kawakami K, Kanno E, Ishii K, Hayashi D, Maruyama R, Tachi M: Role of invariant natural killer T cells in the skin wound healing. **東北医誌**, 125: 144-145, 2013 (査読あり)

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Tanno H, Kanno E, Suzuki A, Takagi N, Kamimatsuno R, Ishii K, Nakayama T, Taniguchi M, Kawakami K: Lack of NKT cells leads to persisted infiltration of neutrophils and delayed wound healing process in skin. 第 43 回日本免疫学会学術集会, 京都(国立京都国際会館), 2014 年 12 月 10-12 日
2. 丹野寛大, 川上和義, 菅野恵美, 鈴木愛子, 上松野りな, 石井恵子, 古和田雪, 丸山良子, 館正弘: NKT 細胞による好中球性炎症制御を介した皮膚創傷治癒の促進. 第 44 回日本創傷治癒学会(メトロポリタン仙台), 仙台, 2014 年 12 月 2, 3 日
3. 丹野寛大, 川上和義, 鈴木愛子, 菅野恵美, 高木尚之, 上松野りな, 石井恵子, 丸山良子, 館正弘: 創傷治癒過程におけ

- るサイトカイン, ケモカイン産生と NKT 細胞の関与. 第 25 回日本生体防御学会(東北大学 片平さくらホール), 仙台, 2014 年 7 月 9-11 日
4. Tanno H, Kawakami K, Kanno E, Suzuki A, Ishii K, Maruyama R, Tachi M: Involvement of invariant natural killer T cells in the acute wound healing in skin. Wound Healing Society, (Orland, USA), April 23-27. 2014
 5. 丹野寛大, 川上和義, 鈴木愛子, 中山史子, 菅野恵美, 高木尚之, 石井恵子, 古和田雪, 丸山良子, 館正弘: 創傷治癒過程におけるサイトカイン, ケモカイン産生と NKT 細胞の関与. 第 43 回日本創傷治癒学会, 大分(別府湾ロイヤルホテル), 2013 年 11 月 14, 15 日
 6. Tanno H, Kawakami K, Kanno E, Hayashi D, Ishii K, Maruyama R, Tachi M: Role of invariant Natural Killer T cells in the skin wound healing. 4th Congress of World Union of Wound Healing Societies, (パシフィコ横浜, Yokohama, Japan), September 2-6. 2012.
 7. Tanno H, Kanno E, Ishii K, Nakayama T, Taniguchi M, Kawakami K: Involvement of invariant Natural Killer T cells in the acute wound healing in skin. 第 41 回日本免疫学会学術集会, 神戸(神戸ポートピアホテル), 2012 年 12 月 5-7 日
 8. 丹野寛大, 川上和義, 立雅恵, 菅野恵美, 林殿聡, 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 Natural Killer T 細胞: IFN- γ と IL-4 の関与について. 第 42 回日本創傷治癒学会, 札幌(かでの 2.7), 2012 年 12 月 2-4 日
 9. 丹野寛大, 川上和義, 立雅恵, 菅野恵美, 林殿聡, 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 Natural Killer T 細胞と IFN- γ , IL-4 の役割. 第 23 回日本生体防御学会学術集会, 東京(品川区総合区民会館きゅりあん小ホール), 2012 年 7 月 9-11 日

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 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:
 出願年月日:
 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/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東北大学・大学院医学系研究科・
 非常勤講師
 古和田 雪 (KOWATA YUKI)
 研究者番号: 90623190

(2) 研究分担者

館 正弘 (TACHI MASAHIRO)
 東北大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号: 50312004

川上 和義 (KAWAKAMI KAZUYOSHI)
 東北大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号: 10253973

菅野 恵美 (KANNO EMI)
 東北大学・大学院医学系研究科・講師
 研究者番号: 10431595

(3) 連携研究者

()

研究者番号: