

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15647

研究課題名（和文）皮膚-肝臓間ネットワークによる創傷治癒制御機構の解明

研究課題名（英文）The analysis of skin-liver network during skin wound healing

研究代表者

山内 彩記子（Yamauchi, Sakiko）

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：10747091

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：近年、臓器疾患と中枢神経系の関与などの臓器間ネットワークが注目されているが、現在まで創傷治癒と肝臓等の腹腔内臓器との関連を検討した報告はない。本研究では、創傷治癒過程における皮膚-肝臓間ネットワークの存在を予想し、解析を行った。皮膚創傷作成後、肝臓でのNKT細胞および好中球の増加を認めた。さらに、皮膚への創作成後、肝臓でのケモカイン産生の増加を認めた。皮膚から肝臓へのシグナル伝達機構を解明するため、DAMPsや神経伝達物質阻害剤を使用した。創作成後の肝NKT細胞増加を打ち消すことは出来なかった。これらの結果より、皮膚-肝臓ネットワークが存在する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）： Recently, the interaction between multiple organs and tissues have been clarified. However skin-liver network have not been reported. In the present study, we analyzed the network between skin and liver after wound creation. Hepatic NKT cells and neutrophils were increased after wounding. In addition, MIP-2 expression was also increased after wounding. These results suggest that skin-liver network may be existed.

研究分野：医歯薬学

キーワード：創傷治癒学 臓器間ネットワーク

1. 研究開始当初の背景

肝臓は体内最大重量をなす実質臓器であり、代謝、血清タンパク産生、生体防御など様々な機能を担う。しかし、肝臓と創傷治癒との関係は注目されていない。肝硬変患者の難治性褥瘡が、肝臓移植後に劇的に改善した報告はあるが、肝臓の創傷治癒に対する役割・関連については明らかにされていない。我々は、免疫細胞と創傷治癒について研究を続けており、その中で Natural Killer T 細胞 (以下 NKT 細胞) に特に注目してきた。NKT 細胞は感染防御に深くかかわり、大量のサイトカイン産生能力を有する。皮膚では殆ど検出されず、肝臓に豊富に存在する細胞である。我々はこれまでに、NKT 細胞を欠損させたマウスでは創傷治癒が遅延し、NKT 細胞活性化物質である α -Galactosylceramide を投与したマウスでは創傷治癒が促進することを見出してきた。さらに、マウス皮膚に創を作成し、肝臓白血球を回収し、フローサイトメトリーで解析したところ、皮膚損傷後早期において NKT 細胞と好中球の増加を認めた。我々はこれらの結果から、皮膚損傷後の何らかのシグナルを肝臓が感知し、免疫系・炎症細胞を介して皮膚損傷を修復する機構、すなわち皮膚→肝臓→皮膚といった恒常性維持のネットワークが存在する可能性が高いと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、創傷治癒過程における皮膚—肝臓ネットワークおよび肝臓の免疫細胞の創傷治癒への役割について解析し、創傷刺激により増殖した肝臓の免疫細胞が創傷治癒に与える影響について解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 情報収集

臓器間ネットワークを研究した最新の知見をタイムリーに把握するため、文献検索、資料の収集を実施した。

このため、当該分野(創傷、免疫)の学会や研究会へ参加した。

(2) 動物実験

創作成後の他臓器への炎症波及に関する解析

野生型マウス(C57BL/6J)の背部皮膚に皮膚生検用の3mmバイオプシーパンチを用いて全層欠損創を6つ作成し、テガダーム、ハイラテックスを用いて閉鎖環境とし、創作成3, 6, 12, 24時間後の肝臓を摘出し肝臓での白血球分画を解析した。コントロールには創を

作成しない正常マウスの肝臓を用いた。また、併せて脾細胞も回収を行った。各臓器から回収した細胞をフローサイトメトリーにより同定した。T細胞=CD3、NK細胞=NK1.1、NKT細胞=CD3、NK1.1の両方が陽性となる。また、創作成後の肝臓でのサイトカイン、ケモカイン産生についてELISA法、またはリアルタイムPCR法を用いて解析を行った。

神経伝達物質阻害・疼痛ストレス除去およびダメージ関連分子パターンズが創作成後の肝臓白血球分画に与える影響に関する解析

と同様のモデルに、 β 遮断薬プロプラノロール、 μ オピオイド受容体アンタゴニスト・ナロキソン、またはダメージ関連分子パターンズの一つであるHigh mobility group box-1(HMGB-1)を阻害するリコンビナントトロンボモジュリンを投与し、それらが創作成後の肝臓白血球分画に与える影響についてフローサイトメトリーを用い解析した。

NKT細胞欠損マウスへ移植されたNKT細胞が皮膚受傷後に肝臓へ集積するかの解析
NKT細胞欠損マウスに創作成1日前に野生型マウスより分離したNKT細胞を20~30%含む肝臓単核球:Liver mononuclear cells(LMNCs)を経静脈的に移植し、創作成後にNKT細胞が肝臓に集積するか検討した。

4. 研究成果

(1) 創作成後の他臓器への炎症波及に関する解析

マウスに創を作成し、創作成後の肝臓、脾臓より白血球を分離し、フローサイトメトリーにて解析を行ったところ、肝臓でのNKT細胞が創作成6, 12, 24時間で創を作成しない、正常マウスと比較し、有意に増加した。肝臓NK細胞には変化は認められなかったが、T細胞は減少した。一方、脾臓NKT細胞は創作成12時間後に増加したが、肝臓と比べ、大きな変化はみられなかった。

次に創作成後の肝臓でのサイトカイン・ケモカイン産生について解析を行った。創作成後の肝臓よりmRNAを抽出し、NKT細胞を遊走するケモカインとして報告されているMIP-2、MCP-1、CXCL16をリアルタイムPCR法で解析した結果、創作成6時間後の肝臓において、正常な肝臓より有意なMIP-2発現の増加を認めたが、CXCL16発現には変化は認められなかった。一方、MCP-1発現は皮膚への創作成後の肝臓で低下した。さらに、創作成後の肝臓を回収し、ホモジネート上清中のIFN- γ およびIL-4をELISA法で測定したとこ

る、肝臓での IFN- γ 産生は、創作成 3 時間後に正常肝臓と比較し、有意に増加した。一方、IL-4 産生は創作成後に、産生の変動はみられたが、有意な差は認められなかった。

(2) 神経伝達物質阻害・疼痛ストレス除去およびダメージ関連分子パターンズが創作成後の肝臓白血球分画に与える影響に関する解析

脳梗塞後に肝臓の NKT 細胞が神経伝達物質による刺激を介してサイトカインを産生することが報告されているため、 β 遮断薬プロプラノロールを投与し、創作成後の肝 NKT 細胞増加に与える影響を解析したが、プロプラノロール投与により、肝 NKT 細胞増加の打ち消し効果は認められなかった。このことから β 受容体の関与は否定的であると考ええる。

さらに、NKT 細胞からのサイトカイン産生を誘導すると報告されているダメージ関連分子パターンズの一つである HMGB-1 の吸着を阻害するリコンビナントトロンボモジュリン投与の影響についても解析したが、こちらも創作成後の肝 NKT 細胞増加の打ち消し効果は認められなかった。

また、創作成後に鎮痛効果を得るために β エンドルフィンのような内因性オピオイドが誘導されると仮定し、 μ オピオイド受容体のアンタゴニストであるナロキソンをマウスに投与し、内因性オピオイドの結合を阻害し、その影響について解析したところ、ナロキソン投与によって、肝 NKT 細胞集積が、創作成単独よりもさらに増加することが明らかとなった。また、創作成せず、ナロキシソンのみを投与した群では、肝 NKT 細胞の増加は認められなかった。

(3) NKT 細胞欠損マウスへ移植された NKT 細胞が皮膚受傷後に肝臓へ集積するかの解析

創作成前日に、NKT 細胞欠損マウスに野生型マウスより分離した NKT 細胞を豊富に含む細胞集団である LMNC を養子移植し、移植された NKT 細胞が創作成後に肝臓に集積するか解析を行ったところ、NKT 細胞を移植されただけの NKT 細胞欠損マウス(LMNC 移植有+創作成無)より、創作成を施した NKT 細胞欠損マウス (LMNC 移植有+創作成有) の肝臓で NKT 細胞が増加した。

これらの結果より、皮膚が受傷することにより、何らかのシグナルが肝臓へと伝わり肝臓への NKT 細胞集積およびサイトカイン・ケ

モカイン産生を促すこと、それには、オピオイドが関与す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)

研究者番号： 30333800

〔学会発表〕(計1件)

1. 丹野寛大, 川上和義, 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 NKT 細胞活性化の影響. 第 45 回日本創傷治癒学会, 東京, JP タワーホール&カンファレンス, 2015 年 11 月 29 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.prs.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山内 彩記子 (YAMAUCHI SAKIKO)
東北大学・医学系研究科・非常勤講師
研究者番号：10747091

(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

武田 睦 (TAKEDA ATSUSHI)
東北大学・医学系研究科・非常勤講師

(3)連携研究者

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

(4)研究協力者

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