

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 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：15K15648

研究課題名(和文) Type I インターフェロンによる慢性創傷の炎症制御法の開発

研究課題名(英文) Involvement of type I interferons on the wound healing in skin

研究代表者

相澤 貴之 (Takayuki, Aizawa)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：00747107

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)：抗ウイルス作用を有するI型IFNの創傷治癒過程における役割には不明な点が多い。今回、マウス創傷モデルを用いてI型IFNの役割を解析した。その結果、野生型マウスに比べ、I型IFN受容体欠損(IFNAR1KO)マウスでは、受傷5日後の創閉鎖率とCD31陽性細胞数が有意に低下し、それに先立ち創部へのマクロファージ集積数が有意に少なかった。

今回の研究により、I型IFNが創傷治癒過程においてマクロファージ集積と血管新生に関与し、炎症期から増殖期にわたって創傷治癒に促進的に関与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Type I interferons (IFNs) are secreted by many cells upon stimulation via pattern recognition receptors like TLR3 and TLR7, and deliver the activation signal through a specific cell surface IFN- γ receptor (IFNAR) that consists of IFNAR1 and IFNAR2 chains. Although type I IFNs are well known in their antiviral activity, limited information is available in their role during wound healing. In the present study, we analyzed how defect of IFNAR-mediated signaling affected the wound healing. Wounds were created on the backs of C57BL/6 mice, we examined the percent wound closure and accumulation of leukocytes were compared between IFNAR1 gene-disrupted (KO) mice and wild type mice. The percent wound closure was significantly delayed in IFNAR1KO mice compared to WT mice on day 5, which was associated with decreased macrophage accumulation. These results suggest that type I IFNs may be involved in the regulation of the wounds healing.

研究分野：形成外科学

キーワード：創傷治癒 Type I インターフェロン

1. 研究開始当初の背景

急性創傷は炎症、細胞増殖、再構築を経て治癒に至る。一方、慢性創傷では、好中球など炎症性細胞の集積遷延、炎症性サイトカイン・プロテアーゼの過剰産生により難治化する症例が多い。

近年、免疫学の領域では、炎症に対する Type I インターフェロン (IFN) の免疫調整作用が注目されている。IFN- α 、IFN- β を含む Type I IFN はウイルス排除に重要なサイトカインとしてよく知られているが、創傷治癒における機能は十分に解明されていない。関与する疾患の種類は多岐にわたり、癌や多発性硬化症などでは Type I IFN のポジティブな関与が報告されている一方、炎症性腸疾患 (IBD) や SLE などの自己免疫疾患では Type I IFN のネガティブな関与が報告されている。また、緑膿菌や黄色ブドウ球菌の排除に関わることも報告されている。

創傷治癒と Type I IFN に関する報告は、Gregorio らの一報 (Gregorio J. J Exp Med. 2010;207:2921-30.) に限られる。Gregorio らは IFNAR1 欠損マウスにテープストリッピングで作成した創傷においては上皮化が遅延し、Interleukin (IL)-6、IL-17、IL-22 の mRNA 発現が減少したことを報告している。

Type I IFN はマクロファージや樹状細胞など炎症性細胞をはじめ、線維芽細胞や血管内皮細胞など多様な細胞から産生され、IFNAR1 および IFNAR2 から成る IFN- α/β 受容体 (IFNAR) に認識されることにより、活性化シグナルを伝達する。

2. 研究の目的

研究目的は以下の2点である。

- (1) 急性創傷における Type I IFN の機能および産生制御機構の解明
- (2) 慢性創傷における Type I IFN の機能・産生 (急性創傷との相違点) と Type I IFN 制御による創傷治癒促進効果の検証

以上を検証することにより、急性・慢性創傷における Type I IFN の機能を明らかにし、創傷難治化と Type I IFN の関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

IFNAR1 欠損 (KO) マウス (Prof. Aguet, University Hospital Zürich, Switzerland から分与) は、C57BL/6J マウスに8世代以上戻し交配させたものを用いた。コントロールに C57BL/6J (WT) (日本クレア, 東京) マウスを使用し、どちらも6 - 10週齢の雄または

雌マウスを用いて実験を行った。マウスは東北大学大学院医学系研究科動物実験施設において SPF 環境下で飼育されたマウスを使用し、餌と水は常時摂取できる環境とした。本研究の全ての実験は、「国立大学法人東北大学動物実験に関する規定」に準じ、東北大学環境安全委員会動物実験専門委員会の承認を得た上で実施した (2014 医動-089、遺伝子組換え: 2013 医組換-124-2)。

(2) 創傷モデルの作成と組織採取

全身麻酔下で背側の体毛を除毛後、皮膚生検用 6mm パンチとハサミを用いて、全層欠損創を作成した。創部は組織回収日まで閉鎖環境に置いた。

(3) 創閉鎖率の算出

創面積の測定は、デジタルカメラで撮影した画像を画像解析ソフト Axio vision Release 4.6 (Carl Zeiss Micro Imaging, Jena, Germany) を使用して創面積を測定し、創閉鎖率を計算した。

(4) 免疫組織学的解析

摘出した創部皮膚組織を正中から半切した後、4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋した。半切した面から厚さ 3 μm の切片を作成し、免疫組織化学染色には、非特異的の反応除去のため正常血清ヒストファインブロッキング試薬 10%ウサギ正常血清 (ニチレイバイオサイエンス, 東京) を反応させた後、各々別の切片を抗 CD31 抗体、抗 anti- α -smooth muscle actin (α -SMA) 抗体、抗 PCNA (proliferating cell nuclear antigen; 増殖細胞核抗原) 抗体によって反応させた。対照の一次抗体としてコントロール IgG を用いた。抗 CD31 染色標本は創端部、創床部の左右計 4 視野 (0.8 mm^2) 中から CD31 陽性細胞をカウントし新生血管を評価した。抗 α -SMA 染色標本では標本中の陽性細胞をカウントした。さらに、新生表皮におけるケラチノサイトの増殖能を評価するため、創端部から新生表皮末端の細胞 500 個中の PCNA 陽性細胞の割合をカウントし、PCNA 陽性細胞の割合として表記した。

(5) 創部ハイドロキシプロリン量の測定

作成後の創部を回収し、2 ml の 6N 塩酸とホモジネートし、120 で 21 時間インキュベートして回収した。回収後、サンプルを水酸化ナトリウムにて pH6-7 に調整し 1 ml の 0.05 M クロラミン T を加え、室温で 20 分間静置し 3.15 M 過塩素酸を 1 ml 加え攪拌後 5 分間室温で静置する。その後、20% p-ジメチルアミノベンズアルデヒドを 1 ml 加え 20 分間 60 でインキュベートしハイドロキシプロリンを発色させ Smart SpecTM3000 を用い

吸光度 550nm にて測定、皮膚の重さにて補正しハイドロキシプロリン量を算出した。

(6) 創部強度測定

創作成の創部を縦は創辺縁より 5mm、横は創部分のみの幅に切り出した皮膚片を生理食塩水に回収し、創部を中心に水平方向に引張り、創部が断裂するまでの強度を測定した。

(7) 創部白血球回収

創作成後の創部を 10%FCS/RPMI 1 mg/ml dispase 5mL に回収し、ステンレスのメッシュですりつぶし、プレートにて 4 で 16 時間培養した。16 時間後 10%FCS/RPMI/1mg/mL Collagenase/1mg/mL hyaluronidase/ 1mg/mL DNase 5 mL に回収し、37 で 2 時間培養。その後、プレートを PBS とトリプシンで洗浄、回収し、組織片や主要な死細胞を取り除くために 40 μ l のセルストレナーに通した。遠心分離し、ペレットを再懸濁した後、抗体を添加しフローサイトメーターにて解析を行った。

(8) mRNA 抽出とリアルタイム PCR

ISOGE を使用し回収した創部皮膚組織の RNA 抽出を行った。抽出した RNA は逆転写を行い、逆転写により得られた cDNA は house-keeping gene である Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) と各種プライマーを用いて LyghtCycler®Nano にてリアルタイム PCR を行った。

4 . 研究成果

(1) 創作成後における I 型 IFN 発現の推移

創作成後の創部中の IFN- α 、 β の mRNA 発現を解析したところ、IFN- α 、 β ともに 6h で発現の上昇がみられ、その後低下した。その後の mRNA 発現に著しい上昇はみられなかった。

(2) I 型 IFN シグナルが創傷治癒に与える影響

創作成後の創閉鎖率を算出したところ、WT マウスと比較して受傷 5 日目に IFNAR1 KO マウスでの創閉鎖率の有意な遅延がみられた。

創作成後 5 日目の α -SMA、CD31、PCNA 陽性細胞数を測定したところ、創収縮に關する筋線維芽細胞を示す α -SMA に有意な差はみられなかったが、肉芽中の新生血管を示す CD31 陽性細胞数が IFNAR1 KO で有意に減少していた。また上皮中の増殖細胞を示す PCNA 陽性細胞数は IFNAR1 KO で減少傾向を示していた。

創作成後の創部中のコラーゲン量を示すヒドロキシプロリン量と創作成後 10 日目の肉芽組織の強度を測る創部強度を測定したが各日で両群間における有意な差はみられ

なかった。

(3) I 型 IFN シグナルが創部白血球集積に与える影響

創作成後 24 時間、3 日目の白血球分画をフローサイトメーターで解析したところ、創作成後 24 時間の総白血球数とマクロファージ数が IFNAR1 KO で有意に減少していた。また、24 時間の好中球とリンパ球数、3 日目の創部白血球集積に有意な差はみられなかった。

(4) I 型 IFN シグナルが受傷後のサイトカイン・ケモカイン mRNA 発現に与える影響

創作成後 12、24 時間における創部中の炎症性サイトカイン・ケモカインの mRNA 発現を解析したところ、WT と比較して IFNAR1 KO は創作成後 IL-10 の発現が創作成後 6 時間、5 日後において有意に低下し、12 時間後には低下傾向がみられた。その他の炎症性サイトカイン、ケモカインにおいては創作成 12 時間後の IL-1 β が IFNAR1 KO で mRNA の発現が増加傾向にあった。また創作成後 3、5 日目の増殖期に關するサイトカイン mRNA 発現を解析したところ、WT と比較して IFNAR1 KO は創作成 3 日後の COL1A1、5 日後の bFGF と α -SMA が有意に増加し、創作成 3 日後の VEGF、TGF- β が増加傾向にあった。

以上をまとめると、I 型 IFN シグナル欠損マウスにおいて創作成 5 日後の創閉鎖率と CD31 陽性細胞数が低下すること、創作成 24 時間後の総白血球数とマクロファージ数が低下すること、6 時間後と 5 日後の IL-10 の発現が低下すること、3 日後の COL1A1、5 日後の bFGF と α -SMA が増加することが明らかとなった。

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 1 件)

- 1) Ritsu M, Kawakami K, Kanno E, Tanno H, Ishii K, Imai Y, Maruyama R, Tachi M: Critical role of tumor necrosis factor- α in the early process of wound healing in skin. Journal of Dermatology and Dermatologic Surgery, 21(1): 14-19, 2017. 査読有, <https://doi.org/10.1016/j.jdds.2016.09.001>

[学会発表](計 4 件)

- 1) 上松野りな, 菅野恵美, 川上和義, 丹野寛大, 鈴木愛子, 高木尚之, 石井恵子, 丸山良子, 館正弘: 創傷治癒過程における型インターフェロンの影響に関する研

- 究. 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
- 2) KAMIMATSUNO Rina, KANNO Emi,
TANNNO Hiromasa, TAKAGI Naoyuki,
ISHII Keiko, UNO Kazuko, KAWAKAMI
Kazuyoshi: Effect of interferon- /
receptor deficiency on the wound healing in
skin. 第 44 回日本免疫学会学術集会, 札
幌(札幌コンベンションセンター), 2015
年 11 月 18-20 日
- 3) KAMIMATSUNO Rina, KANNO Emi,
TANNNO Hiromasa, SUZUKI Aiko,
TAKAGI Naoyuki, ISHII Keiko, UNO
Kazuko, KAWAKAMI Kazuyoshi:
Involvement of type I interferons on the
wound healing 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
- 4) 上松野 りな, 菅野 恵美, 川上 和義,
丹野 寛大, 鈴木 愛子, 高木 尚之, 石
井 恵子, 丸山 良子, 館 正弘: 創傷治癒
過程における 型インターフェロンの関
与. 第 44 回日本創傷治癒学会(ホテルメ
トロポリタン仙台), 仙台, 2014 年 12 月
2, 3 日

〔図書〕(計 3 件)

- 1) 菅野恵美, 館正弘: Part1 術後ケア. 第 3
章 創管理 創傷治癒過程. 竹末芳生, 藤
野智子編集, 術後ケアとドレーン管理の
すべて. 照林社, 88-92, 2016.
- 2) 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.
- 3) 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.

〔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
相澤 貴之 (AIZAWA, Takayuki)
東北大学・医学系研究科・非常勤講師
研究者番号 : 00747107
- (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