

令和元年5月28日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05492

研究課題名(和文) 免疫制御を応用した慢性創傷の新規治療法の開発～NKT細胞は炎症・治癒を支配する～

研究課題名(英文) Development of innovative wound care using applied immune regulation on chronic wounds

研究代表者

館 正弘 (Tachi, Masahiro)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50312004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,000,000円

研究成果の概要(和文)：褥瘡などの慢性創傷は、炎症が遷延し難治化する症例が多い。感染が疑わしい慢性創傷の局所治療法として、銀イオン製剤などが選択されているが、ターゲットが曖昧であり、さらに細胞障害性を併せ持つ。我々は、慢性創傷の新規治療法として、「NKT細胞を起点とした免疫制御法」に注目した。本研究において、NKT細胞を特異的に活性化させる  $\alpha$ -GalCerを創部局所に投与することにより、創閉鎖率、肉芽組織形成、血管新生が促進することが明らかになった。さらに、 $\alpha$ -GalCerを創部に投与することにより、炎症期が早期に収束し、増殖期へのスムーズな移行を認めた。 $\alpha$ -GalCerは治癒促進剤として有効である可能性が高い。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、慢性創傷における炎症遷延に対する治療法としては、抗菌薬などを用いた病原微生物に対する治療法が主流となっており、宿主免疫をターゲットとした治療法は存在しない。本研究により、 $\alpha$ -Galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer)によるNKT細胞の活性化が炎症反応を速やかに収束させ、創傷治癒を促進することが明らかになり、新規治療法の可能性が高まった。

研究成果の概要(英文)：In chronic wounds, the inflammatory responses are prolonged with persistent neutrophil infiltration. Recently, we showed that skin wound healing was delayed and the healing process was impaired under conditions lacking invariant natural killer T (iNKT) cells, an innate immune lymphocyte with potent immuno-regulatory activity.

In the present study, to identify the possible contribution of NKT cells activation, the effects of  $\alpha$ -Galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) administration on wound healing, specific activator of iNKT cells, were examined. Administration of  $\alpha$ -GalCer at the wound sites significantly promoted wound closure, granulation tissue formation, angiogenesis compared with vehicle treatment. In addition, the inflammatory cells were rapidly decreased and granulation tissue were enhanced in  $\alpha$ -GalCer administered mice.

研究分野：創傷治癒学

キーワード：創傷治癒 ナチュラルキラー(NKT)細胞  $\alpha$ -Galactosylceramide 免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 慢性創傷における炎症遷延の問題

褥瘡や糖尿病性下腿潰瘍など慢性創傷の 60-70% に細菌感染(バイオフィーム)が関与し(急性創傷: 6%)、慢性創傷を有する患者は健常者の 3 倍、全身性感染のリスクが高い。持続する細菌感染は炎症を遷延させる。これまでに、バイオフィームに包まれた細菌は、好中球のアポトーシスを誘導し、正常な炎症反応を阻害することが報告されている。

現在、感染が疑わしい慢性創傷の局所療法として、洗浄、デブリードマン、抗菌剤入りの軟膏が選択されている。その中で、カデキソマーヨウ素や銀イオンは感染・バイオフィームを抑制することが報告されているが、これらはターゲットが曖昧であり、強い細胞障害性を併せ持つ。申請者らは、新たな慢性創傷の感染制御法として、今、改めて、宿主免疫療法に注目している。

### (2) 炎症を統括するナチュラルキラー(NKT)細胞

申請者の教室では、感染創の炎症、免疫応答に注目した研究を 10 年間継続し、これまでに慢性創傷では、初期の炎症、速やかな炎症収束が重要であることを明らかにしてきた。また近年、Natural Killer T (NKT) 細胞欠損マウスを用いた解析より、NKT 細胞が創傷治癒の炎症から治癒まで広範囲に関与することを突き止め、*Am J Pathol* に報告した。

NKT 細胞は、NK 細胞や T 細胞と同様に、初期防御を行う自然免疫リンパ球と考えられてきたが、2014 年 8 月に免疫記憶能をもつ NKT 細胞の存在が明らかになった。すなわち、「自然免疫」と「獲得免疫」に関わる万能な細胞といえる。すでに、頭頸部癌や肺癌では、NKT 細胞を標的とした免疫療法の臨床研究がスタートしている。

### (3) NKT 細胞を特異的に活性化する $\alpha$ -ガラクトシルセラミド(GalCer)による免疫療法の可能性

申請者らは癌治療で用いられている免疫療法を慢性創傷に応用したいと考えている。

この新規治療法のメリットは、ターゲットを NKT 細胞、免疫に絞り、創周囲への派生効果を狙う。慢性創傷の分野では、未だ宿主免疫を標的とした治療法は存在せず、線維芽細胞に作用する bFGF 製剤では効果が限定的であり、炎症・感染制御、免疫賦活化能に限界がある。

ここで、「果たして、糖尿病、低栄養、超高齢者など、創傷が慢性化しやすい対象の免疫を賦活化できるのか?」という疑問が浮上する。これまでに、1 型糖尿病マウス、2 型糖尿病マウスを用いた実験から、糖尿病状態でも NKT 細胞の活性化、サイトカイン産生制御(誘導 or 抑制)が可能であることが報告されており、NKT 細胞が免疫制御のトリガーとなり得る可能性は非常に高い。

## 2. 研究の目的

本研究では以下の点を明らかにすることを当初の目的とした。

### (1) 急性創傷における NKT 免疫療法の効果の検証

申請者らがすでに確立した  $\alpha$ -GalCer を投与した「マウス急性創傷モデル」を用い、治癒過程、炎症反応について明らかにする。

本研究では 2 種類の NKT 細胞活性化法を検証(下記、A. により効果が得られなかった場合は B.を試みる。)

A.  $\alpha$ -GalCer の単独投与(静脈、腹腔、創局所投与)

B. 宿主自身の末梢血から誘導した樹状細胞に  $\alpha$ -GalCer をパルスしたものを静脈内投与

### (2) 慢性創傷(感染モデル)における NKT 免疫療法の効果の検証

慢性創傷モデルとして、創傷作成後、緑膿菌 PA01 を接種し摘出日まで湿潤環境を保持したモデルを用い、治癒過程、炎症反応について明らかにする。

本研究により、NKT 細胞を起点とした慢性創傷の感染・炎症制御機序が明らかになれば、免疫制御を応用した新規治療法の確立、救済できる慢性創傷の増加に繋がる。また、肺炎や骨髄炎など他の炎症性疾患への応用も可能であり、研究の意義は計り知れない。

## 3. 研究の方法

NKT 細胞活性化が急性創傷に与える影響

今回、臨床応用を鑑み、NKT 細胞を特異的に活性化させる  $\alpha$ -GalCer を創部局所に投与し、効果について検証した。

#### (1) 実験モデルの作成

・全身麻酔下で野生型マウス(C57BL/6、オス、8-10週齢)の背側皮膚に6mmパンチで開放創を作成し、摘出日まで連日 $\alpha$ -GalCerを投与し、閉鎖環境を保持した。対照として、 $\alpha$ -GalCerの希釈溶媒であるDMSO投与群を用いた。

#### (2) 各種解析項目に関する検証

##### < 治癒過程の解析 >

創収縮率、筋線維芽細胞の分化( $\alpha$ -SMA)、血管新生(CD31)、コラーゲン合成量の解析  
マウスに開放創を作成後、1、3、7日目に組織を摘出し、以下の解析を行う。

- ・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
- ・創部破断強度：創部を摘出し、IMS-001を用い3cm/minで牽引し、破断した強度を測定

##### < 炎症反応の解析 >

創部における好中球、マクロファージ、リンパ球の集積数、細胞内サイトカイン産生  
皮膚組織を、ホモジナイズし、酵素処理後、比重遠心法により白血球を回収し、直ちに蛍光標識された抗体により染色を行い、共通機器室に設置されたフローサイトメトリー(FACS Canto™)にて、細胞数、細胞内サイトカイン(IFN- $\gamma$ 、IL-4、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17)について解析する。

好中球=Gr-1 陽性、マクロファージ=F4/80 陽性、T細胞=CD3 陽性・NK1.1 陰性、NK細胞=CD3 陰性・NK1.1 陽性、iNKT細胞=CD3 陽性・NK1.1 陽性・ $\alpha$ -GalCer-CD1d テトラマー陽性となる。白血球共通抗原CD45抗体で同時に染色することで、上皮系細胞は除去することが出来る。

##### サイトカイン・ケモカイン産生の解析

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、IFN- $\gamma$ )、抗炎症性サイトカイン(IL-4、IL-10)および白血球遊走に關与するケモカイン(MIP-2、KC、MCP-1、RANTES)産生をELISA法とPCR法で測定し定量化

#### 4. 研究成果

これまで、創傷治癒の遅延要因として、病原微生物由来のPAMPsの影響が広く注目され、PAMPsによる感染や炎症期遷延が問題視されてきた。その一方、免疫細胞の活性化が治癒に与える影響が大きいことは報告されているが、不明な点が多い。

今回我々は、 $\alpha$ -GalCerによって特異的に活性化することのできるNKT細胞に注目した。我々のグループはこれまで、 $\alpha$ -GalCer腹腔内投与によりIFN- $\gamma$ 産生やコラーゲン合成を介して皮膚創傷治癒が促進することを明らかにしている。今回、創部局所への投与による効果を詳細に解析した。

#### (1) $\alpha$ -GalCer創部投与が創傷治癒過程に与える影響

##### 創閉鎖への影響

$\alpha$ -GalCerを創作成直後から3日目まで連日、マウスの創部に投与し、創作成3、5日目における創閉鎖率を算出した結果、創作成3、5日目ともに、Vehicle群と比較し $\alpha$ -GalCer群において、肉眼的に創部の縮小がみられ、創閉鎖率が有意に増加した。

##### 再上皮化への影響

$\alpha$ -GalCerを創作成直後から3日目まで連日、マウスの創部に投与し、創部を含む皮膚組織を摘出し、HE染色を施し再上皮化の観察を行った。創作成3日目の再上皮化率を算出した結果、Vehicle群と $\alpha$ -GalCer群は、ほぼ同等の再上皮化率を示した。

##### 肉芽形成への影響

$\alpha$ -GalCerを創作成直後から3日目まで連日、マウスの創部に投与した後、創部を含む皮膚組織を摘出し、HE染色を施し肉芽組織の高さについて観察を行った。Vehicle群と $\alpha$ -GalCer群で肉芽組織の高さを比較したところ、 $\alpha$ -GalCer群で有意に厚い肉芽組織の形成を確認した。

## 血管新生への影響

-GalCer/Vehicle 群の創作成 3 日目の皮膚切片を抗 CD31 抗体で染色し、肉芽組織中の血管について観察した。その結果、-GalCer の創部投与により、血管数の有意な増加を認めた。

## 筋線維芽細胞への影響

-GalCer/Vehicle 群の創作成 3 日目の皮膚切片を抗 -SMA 抗体で染色し、創部の筋線維芽細胞を観察した結果、両群間に同等数の -SMA 陽性細胞数を認めた。

## (2) -GalCer 創部投与が白血球集積に与える影響

-GalCer/Vehicle 群の創作成 1, 3 日目の創部を含む摘出皮膚組織を HE 染色し、創部への白血球集積を観察した結果、創作成 1 日目の -GalCer 群において Vehicle 群と比較し集積した白血球が少ない傾向がみられた。創作成 3 日目では両群間で同程度の白血球および線維芽細胞の集積を認めた。

## (3) -GalCer 創部投与による mRNA 発現への影響

-GalCer 創部投与による効果について、より詳細に解析するため、創部における mRNA 発現について解析を行った。創作成 1, 3 日目の mRNA 発現を解析した結果、-GalCer 創部投与により、IFN- $\gamma$  発現が有意に増加していることが分かった。また、TNF- $\alpha$ 、IL-1 および MIP-2 は創作成 1 日目に -GalCer 群で有意に発現が低下した。IL-6, KC, MCP-1, TGF- $\beta$ 1, bFGF, VEGF, COL1A1, COL3A1 に関しては、2 群間で有意な差はみられなかった。IL-4 は検出されなかった。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計2件)

Emi Kanno, Hiromasa Tanno, Kenji Yamaguchi, Ayako Sasaki, Ryoko Maruyama, Masahiro Tachi: Experimental wound ischemia does not promote *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *J Dermatol Dermatologic Surg*, 22(2): 68-71, 2018.

DOI: 10.4103/jdds.jdds\_33\_18. 査読有

Hiromasa Tanno, Kazuyoshi Kawakami, Emi Kanno, Aiko Suzuki, Naoyuki Takagi, Hideki Yamamoto, Keiko Ishii, Yoshimichi Imai, Ryoko Maruyama, Masahiro Tachi: Invariant NKT cells promote skin wound healing by preventing a prolonged neutrophilic inflammatory response. *Wound Repair and Regeneration*, 25(5): 805-815, 2017.

DOI: 10.1111/wrr.12588. 査読有

### [学会発表](計5件)

Hiromasa Tanno, Emi Kanno, Ayako Sasaki, Keiko Ishii, Kazuyoshi Kawakami: Contribution of iNKT cells to the clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from skin wounds. 第 47 回日本免疫学会学術集会, 福岡, 2018 年 12 月 12 日.

丹野寛大, 菅野恵美, 佐藤すずな, 霜野瑞葵, 佐々木綾子, 山口賢次, 石井恵子, 丸山良子, 川上和義, 館正弘: 緑膿菌接種創の治癒過程における Natural Killer T 細胞の役割. 第 48 回日本創傷治癒学会, 東京, 2018 年 11 月 29-30 日.

丹野寛大, 菅野恵美, 佐藤すずな, 山口賢次, 石井恵子, 丸山良子, 川上和義, 館正弘: 緑膿菌接種創の治癒過程と菌排除における NKT 細胞欠損の影響. 第 20 回日本褥瘡学会学術集会, 横浜, 2018 年 9 月 28-29 日.

丹野寛大, 菅野恵美, 佐藤紀子, 正木愛梨, 三浦考行, 山口賢次, 石井恵子, 丸山良子, 川上和義, 館正弘: 皮膚創傷治癒過程における NKT 細胞の役割 - 好中球性炎症に注目して -. 第 47 回日本創傷治癒学会, 京都, 2017 年 11 月 27-28 日.

丹野寛大, 菅野恵美, 三浦孝行, 石井恵子, 中山俊憲, 谷口克, 丸山良子, 館正弘, 川上和義: NKT 細胞は好中球性炎症を制御し皮膚創傷治癒を促進する. 第 28 回日本生体防御学会学術総会, 相模原, 2017 年 6 月 29 日-7 月 1 日.

### [図書](計7件)

丹野寛大, 菅野恵美: 急性創傷と慢性創傷の治癒過程. 菅野恵美 企画編集, WOC Nursing. 医学出版, 6(7): 5-12, 2018.

菅野恵美: バイオフィーム制御による創傷治癒へのアプローチ. 菅野恵美 企画編集, WOC Nursing. 医学出版, 6(7): 20-25, 2018.

菅野恵美: Part3 column 4. 研究者の目から見た皮膚科学の面白さ! - 創傷治癒過程の華麗なるパトンプラスに魅了されて -. 安部正敏 責任編集, Visual Dermatology. 秀潤社, 17(2):180, 2018.

菅野恵美, 館正弘: 第7章足のアセスメントと検査. 1. プライマリケアで必要なアセスメント. 潰瘍・感染徴候のアセスメント. 一般社団法人日本フットケア学会編集, フットケアと足病変ガイドブック. 医学書院, 71-76, 2017.

山口賢次, 館正弘: Part2 創部感染のアセスメントとケア 5) 重症下肢虚血 (CLI). 菅野  
恵美編集, 看護技術 第1特集 創部感染の予防とケア. メディカルフレンド社,  
63(9):29-33, 2017.

菅野恵美: Part2 創部感染のアセスメントとケア 3) 褥瘡. 菅野恵美編集, 看護技術 第1  
特集 創部感染の予防とケア. メディカルフレンド社, 63(9):20-23, 2017.

丹野寛大, 菅野恵美: Part1 創傷治癒と細菌感染. 菅野恵美編集, 看護技術 第1特集 創  
部感染の予防とケア. メディカルフレンド社, 63(9):4-7, 2017.

〔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:  
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:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ: <http://www.prs.med.tohoku.ac.jp/>  
(東北大学大学院医学系研究科形成外科学分野)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 川上 和義  
ローマ字氏名: (KAWAKAMI, kazuyoshi)  
所属研究機関名: 東北大学  
部局名: 大学院医学系研究科  
職名: 教授  
研究者番号 (8桁): 10253973

研究分担者氏名: 菅野 恵美  
ローマ字氏名: (KANNO, emi)  
所属研究機関名: 東北大学  
部局名: 大学院医学系研究科  
職名: 准教授  
研究者番号 (8桁): 10431595

研究分担者氏名: 丹野 寛大  
ローマ字氏名: (TANNO, hiromasa)  
所属研究機関名: 東北大学  
部局名: 大学院医学系研究科  
職名: 助教  
研究者番号 (8桁): 10755664

(2) 研究協力者

連携研究者氏名: 風間 逸郎  
ローマ字氏名: (KAZAMA, itsurou)  
所属研究機関名: 宮城大学  
部局名: 看護学群 (部)  
職名: 教授  
研究者番号 (8桁): 60593978

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。