

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15744

研究課題名(和文) C型レクチン受容体(Mincle)を介したDAMPsによる創部炎症連鎖機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of inflammatory chain mechanism at the wound site through C type lectin receptor (Mincle)

研究代表者

吉川 慧 (Kei, Yoshikawa)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：20770978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：Mincleと創傷治癒の関連を解析した。C57BL/6マウスの正常皮膚、創作成後の皮膚のMincle発現をPCRと免疫染色で解析した。WTマウスとMincle遺伝子欠損(KO)マウスの背側に創を作成し、経時的に創閉鎖率、肉芽の厚さ、白血球集積数を解析した。

Mincle mRNA発現は、12時間をピークに発現が上昇しその後低下した。正常皮膚ではMincle陽性細胞はみられないが、受傷24時間後にMincle陽性細胞を認めた。Mincle KOでは創閉鎖率、肉芽の厚さ、白血球集積数が有意に増加した。以上より、Mincleは創傷治癒に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Macrophage inducible C-type lectin (Mincle) is an activating receptor, expressed in macrophages and dendritic cells, which senses PAMPs and DAMPs. However, the role of Mincle at the wound sites has not been elucidated. In the present study, we addressed a question how defect of Mincle affected to the healing process of wounds.

Wounds were created on the backs of wild type (WT) C57BL/6 and Mincle-deficient (KO) mice. We analyzed percent wound closure, height of granulation tissue, expression of Mincle by real-time PCR and immunohistochemistry.

The percent wound closure was significantly increased in Mincle KO mice compared to WT mice, which was associated with the increased height of granulation tissues. Mincle was detected at the early phase after wound creation. These results suggest that Mincle may be involved in the regulation of granulation at the wounded tissues, which may lead to delayed wound healing.

研究分野：形成外科学

キーワード：C型レクチン受容体 創傷治癒 炎症反応

## 1. 研究開始当初の背景

慢性創傷では、炎症起因物質がうまく排除されず、炎症が慢性化し、創傷治癒が遅延する。近年、炎症を引き起こすイニシエーターとして、ダメージ関連分子パターン(DAMPs)が注目されている。

DAMPs は、壊死組織・死細胞から放出される内因性因子であり、心筋梗塞や脳梗塞など感染を伴わない炎症への関与が報告されている。

いずれのDAMPsも、細胞の損傷によって初めて放出される点が共通している。申請者も動物実験モデルの創部を免疫染色にて観察したところ、DAMPsの一つであるSAP130とその受容体であるMincleの両者が創傷作成後に初めて検出されることを確認した。

MincleはC型レクチン受容体(CLRs)の一種であり、ストレスに伴ってマクロファージに強く発現が誘導されることから、macrophage inducible C-type lectin (Mincle)と名付けられた。

創傷治癒とDAMPsの関連では、HMGB1についてはよく解析されており、HMGB1がTLRsやRAGEを介して治癒を促進することが明らかになっている。

一方、SAP130と創傷治癒の関連は検証されていないが、*in vitro*の実験により、MincleがSAP130により活性化され、炎症性サイトカインを産生することから、創傷でもMincleを介した影響は計り知れない。

## 2. 研究の目的

本研究では、創傷治癒過程におけるC型レクチン受容体(CLRs)を介したDAMPsの影響にフォーカスをあてて解析し、慢性創傷における炎症遷延メカニズムの解明に繋げる。これまでに様々なDAMPsとその受容体が明らかになっているが、慢性創傷における影響は不明な点が多い。

申請者はDAMPsの認識に関与し、緊急時に発動するCLRであるMincleを欠損したマウスを用い、DAMPsにより、創傷の炎症が慢性化するか否かを解析し、CLRを介した炎症制御法の確立に向けた基礎的情報を得る。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

実験には野生型C57BL/6マウス(日本クレア、東京)、C57BL/6マウスを遺伝的背景に持つMincle遺伝子欠損(KO)マウス(大阪大学免疫学フロンティア研究センター 山崎 晶教授より供与)を7-10週齢で使用した。マウスは東北大学大学院医学系研究科附属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。実験期間中、マウスの鎮痛を図るため飲用水にアセトアミドフェノール(和光純薬工業、大阪)を0.4mg/マウス/日となるように加えた。本研究のすべての実験は、「国立大学法人東北大学動物実験に関する規定」「国立大学法人東北大学遺伝子組換え実験安全管理規程」に準じ、東北大学環境安全委員会動物実験専門委員会及び遺伝子組換え実験安全専門委員会の承認を得た上で実施した。(承認番号:2015医動213-2、2015医組換117-2)

### (2) 創作成及び組織採取

麻酔方法は、麻酔導入にマウスに50mg/kgのベンドバルビタール(ソムノペンチル、共立製薬株式会社、東京)を生理食塩水(大塚生食注、大塚製薬、徳島)に加え腹腔内投与し、持続麻酔にイソフルラン(動物用イソフルラン、マイラン製薬株式会社、大阪)を吸入投与した。その後、背側の体毛を脱毛し皮膚を完全に露出させ、70%エタノールで消毒後、皮膚生検用3mmパンチ(Biopsy Punch、カインダストリーズ、岐阜)とハサミを用いて、マウス1匹につき6ヶ所の皮筋に達する全層欠損創を作成した。創はポリウレタンフィルム(Tegaderm Transparent Dressing、3M Health Care、MN、USA)と弾性粘着包帯(Hi-latex、イワツキ、東京)で閉鎖環境においた。創作成日を0日目とし、創作成から6、12、24時間、3、5、7、10日後にマウスを犠牲死させた後、創部を含む皮膚組織を皮膚生検用の8mmパンチを用いて摘出した。

### (3) 創面積測定

創面積の測定は、デジタルカメラ(CX-4、RICOH、東京)で撮影した画像を用いて行った。創作成直後及び各タイムポイント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、創の辺縁をトレースすることによって創面積を測定し、創閉鎖率を計算した。創閉鎖率は以下の式で算出した。:  
創閉鎖率 =  $(1 - \frac{\text{各タイムポイントの創面積}}{\text{創作成時の創面積}}) \times 100 (\%)$

### (4) 病理組織学的解析

創部皮膚組織は4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で固定後、創部正中で頭尾側方向に半切した後にパラフィンに包埋した。半切した断面から薄切した切片を作成し、各染色を行った。

HE(Hematoxylin-Eosin)染色では再上皮化率と肉芽の厚さを評価した。図1Aに示すように、再上皮化率は創端から進展した表皮細胞の先端までの距離を測定した。肉芽の厚さは創端部2点と中心の3点を測定し、平均値を

算出した。免疫組織化学染色には、非特異的  
反応除去のため正常血清ヒストファイブ  
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、  
各々の切片を抗 Mincle 抗体 (Bioss、MA、  
USA)、抗 SAP130 抗体 (abcam plc、Cambridge、  
UK)、抗  $\alpha$ -SMA (anti- $\alpha$ -smooth muscle actin)  
抗体 (Vector Laboratories、Inc.、CA、USA)、  
抗 PCNA (proliferating cell nuclear antigen ; 増  
殖細胞核抗原) 抗体 (DAKO) 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 (IgG Dako Cytomation Negative Control  
Mouse IgG2a、DAKO) を用いた。抗 Mincle  
抗体染色標本では、創部に存在する Mincle  
陽性細胞を観察した。抗  $\alpha$ -SMA 染色標本で  
は、肉芽組織内に増生する筋線維芽細胞を評  
価し、創部面積あたりの  $\alpha$ -SMA 陽性細胞数  
を測定した。抗 PCNA 染色標本では、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) mRNA 抽出と RT-PCR

抽出した創部組織から total ribonucleic acid  
(RNA) を、ISOGEN (和光化学工業株式会社、  
岡山) から添付文書に基づいて抽出した。抽出  
した RNA は Takara Primerscript RT reagent kit  
(タカラバイオ、大阪) を用いて逆転写反応を  
行い、cDNA (complementary deoxyribonucleic  
acid) を得た。

得られた cDNA は、Mincle 特異的プライマ  
ー (表 1) と SYBR Green (Roche Diagnostics、  
Basel、Schweiz) を用いて、LightCycler® Nano  
システム (Roche Diagnostics) にて増幅し、解  
析した。PCR 反応は、95 10 秒、64 10 秒、  
72 15 秒を 1 サイクルとし、40 サイクル行  
なった。

#### (6) 皮膚破断強度の測定

マウスに創を作製後、14 日目の創部を創幅  
である縦 3 mm、創部より横 4 mm ずつの距離  
で抽出した。横幅 4 mm の健常皮膚をクリッ  
プで挟み、IMS-001 (ケイセイ医科工業株式会  
社、東京) を用い、3 cm/min の速度で創部が  
破断するまで引き、創部が破断するのに必要  
な力 (g) を破断強度とした。

#### (7) 創部ハイドロキシプロリン濃度測定

コラーゲンに特異的なアミノ酸であるハイ  
ドロキシプロリン量を測定することで、創部  
の含有されるコラーゲン量を推定した。創摘  
出後、創を 2 mL の 6N 塩酸とホモジネートし、  
120 分で 21 時間インキュベートし、回収した。  
回収後、サンプルを水酸化ナトリウムで中和  
した。スタンダードには、L-ハイドロキシプ

ロリン (ナカライテスク、京都) を 100  $\mu$   
g/mL に調整し、最低濃度を 0.8  $\mu$ g/mL まで  
2 倍ずつ段階希釈した。サンプル及びスタン  
ダードに 1 mL の 0.05 M クロラミン T (ナカラ  
イテスク) を加え、室温で 20 分間静置した。  
3.15 M 過塩素酸 (ナカライテスク) を 1 mL  
加え攪拌後、5 分間室温で静置した。その後、  
20% p-ジメチルアミノベンズアルデヒド (ナ  
カライテスク) を 1 mL 加え 20 分間 60 度  
でインキュベートし、Smart Spec™3000  
(Bio-Rad、Hercules、CA、USA) を用い吸光  
度 557 nm で測定した。

#### (8) レポーターアッセイ

刺激に用いる創部は、マウスの背側皮膚に  
皮膚生検バイオオプシーパンチで開放創を  
作成後、6 時間後に摘出した。Mincle にリガ  
ンドが結合することにより GFP を発現する  
NFAT-GFP が組み込まれた T 細胞ハイブリ  
ドマの Mincle NFAT-GFP 導入細胞 (山崎 晶  
教授より分与) を創部断片で刺激し、CO<sub>2</sub> 存  
在下で 37 度、20 時間培養した後、細胞を回  
収し CD3 分子が欠落した非特異的な T 細胞  
を除外するため蛍光標識された抗体 APC 標  
識抗 CD3 抗体 (clone 30-F11、BioLegend、CA、  
USA)、死細胞を除外するため 7-AAD  
(BioLegend) で染色した。BD FACS Canto II  
(BD Bioscience、Franklin Lake、NJ) で GFP  
(FITC) 発現が誘導されたかどうかを解析し  
た。ポジティブコントロールとして Mincle  
のリガンドとして知られている TDM を含む  
BCG (Bacille de Calmette et Guérin) (日本ビー  
シージー製造株式会社、東京) を用いた。図  
1B に詳細を示す。

#### (9) 創部皮膚組織中の白血球分離

マウス 1 匹当たり 6 個の創を作成し、12 時間  
後に 8 mm の皮膚生検用パンチで抽出した創  
6 個中の白血球を分離した。各群 5 匹のマウ  
スを用い、抽出した創を細切し、10% FCS  
(fetal calf serum) (Bio west、Nuaille、France) と  
10 mM HEPES  
(4-2-hydroxyethyl-1-piperazineethanesulfonic  
acid) (Sigma-Aldrich、MO、USA)、1 mg/mL  
collagenase (Sigma-Aldrich) と 1 mg/mL  
hyaluronidase (Sigma-Aldrich) を加えた  
RPMI1640 培養液 (Sigma-Aldrich) に入れ、  
37 度で 2 時間インキュベーションした。ホ  
モジネートを 70  $\mu$ m のナイロンメッシュ  
(BD、NJ、USA) を通過させて除去した後遠  
心し、0.1% アジ化ナトリウム、1% FCS 添加  
PBS で 3 回洗浄した。サンプル中の白血球数  
は血球計算盤にて計測した。

#### (10) フローサイトメトリー

Fig. 2 における Mincle 陽性細胞解析では、

前述の方法で得られた細胞を Fc 受容体 (Fc R) をブロックする目的で、抗 Fc R II/III モノクローナル抗体 (mAb) (clone 2.4G2) (BD Bioscience) と氷上で 15 分間インキュベートした。その後、Pacific Blue 標識抗 CD45 抗体 (clone 30-F11、BioLegend、CA、USA)、APC 標識抗 CD11c 抗体 (clone、BioLegend)、APC/Cy7 標識抗 Ly6G 抗体 (clone 1A8、BioLegend)、PE 標識抗 F4/80 抗体 (clone BM8、BioLegend) で染色し、抗 Mincle 抗体 (clone 1B6、MBL、名古屋) と FITC 標識抗 IgG (Rat) 抗体 (MBL) で染色した。対照として、アイソタイプを一致させた IgG にて染色した。染色した細胞は BD FACS Canto II flow cytometer で解析した。CD45+Ly6G+細胞を好中球、CD45+F4/80+細胞をマクロファージ、CD45+CD11c+細胞を樹状細胞、CD45+F4/80-CD11c-Ly6G-をリンパ球とした。

Fig. 5 における白血球分画の解析では、前述の方法で得られた細胞を Fc 受容体 (Fc R) をブロックする目的で、抗 Fc R II/III モノクローナル抗体 (mAb) (clone 2.4G2) (BD Bioscience) と氷上で 15 分間インキュベートした。その後、Pacific Blue 標識抗 CD45 抗体 (clone 30-F11、BioLegend、CA、USA)、APC 標識抗 CD11b 抗体 (clone M1/70、BioLegend)、Alexa Fluor 488 標識抗 F4/80 抗体 (clone BM8、BioLegend)、PE 標識抗 CD3 抗体 (clone 145-2C11、BioLegend)、PE 標識抗 NK1.1 抗体 (clone PK136、BioLegend)、PE 標識抗 TCR

抗体 (clone UC7-13D5、BioLegend)、PE 標識抗 CD45R/B220 抗体 (clone RA3-6B2、BioLegend) で染色した。対照として、アイソタイプを一致させた IgG にて染色した。染色した細胞は BD FACS Canto II flow cytometer で解析した。CD45+CD11b+Ly6G+細胞を好中球、CD45+CD11b+F4/80+細胞をマクロファージ、CD45+細胞中の CD3 +、TCR +、NK1.1+、B220+のいずれかを発現する細胞をリンパ球とした。

#### (11) サイトカイン濃度測定

創部組織を摘出後に生理食塩水を添加してホモジネートした後に、上清中のサイトカイン濃度を測定した。TNF- $\alpha$  (BioLegend) 及び MIP-2 (R&D Systems、MN、USA) の濃度を ELISA キットを用いて測定した。測定における検出限界はそれぞれ 7.8 pg/mL、1.5 pg/mL であった。

#### (12) 統計解析

得られたデータは統計学的解析ソフト (SPSS 13.0J for Windows、SPSS Japan、東京) を用いて解析を行った。全ての数値データは平均 (mean)  $\pm$  標準偏差 (SD: standard deviation) で示した。各実験群間の比較は両

側分布を用い非等分散の 2 標本を対象とする Mann-Whitney U-test を用いて行った。p 値が 0.05 未満のとき、統計学的有意差ありとした。

## 4. 研究成果

### (1) 皮膚創傷治癒過程における Mincle の発現と陽性細胞の集積

皮膚損傷に伴う CLR の発現の推移を確認するため、Real-time PCR 法を用いて WT マウスの正常皮膚と創作成後 6、12 時間、1、3、5 日目の創部における Mincle の mRNA 発現を解析した。Mincle の発現は創作成後 12 時間をピークに上昇しその後低下した。免疫染色を施し創部における Mincle 陽性細胞を観察したところ、創傷を作成していない un-wounded skin では Mincle 陽性細胞は存在しないが、創作成 1 日目の創部皮膚組織に陽性細胞を認めた。さらフローサイトメリーにより Mincle 発現細胞を解析したところ、創作成 1 日目の創部における Mincle 発現細胞は、好中球、マクロファージ、樹状細胞であることを確認した。

### (2) 創傷皮膚における Mincle リガンドの存在の可能性

創部に Mincle リガンドの存在を確認するため、WT マウスの創部を用い、レポーターアッセイを行った。Wounded skin fragment の刺激により、わずかに GFP 発現の上昇を認めた。さらに、免疫染色を施し創部における SAP130 陽性細胞を観察したところ、創傷を作成していない un-wounded skin では陽性細胞が存在しないが、創作成 1 日目の創部皮膚組織において、SAP130 陽性細胞を認めた。

### (3) Mincle 遺伝子欠損が皮膚創傷治癒過程に及ぼす影響

皮膚損傷に伴い、Mincle の発現が高まり、創部への発現細胞の集積が明らかになったことから、Mincle 遺伝子欠損 (MincleKO) マウスと C57BL/6 (WT) マウスの創傷治癒過程を比較検証した。マウスに作成した全層欠損創の創閉鎖率は、創作成 3、5、7 日目の MincleKO マウスにおいて有意に上昇した。病理組織学的により、再上皮化率、新生血管とコラーゲン線維で構成される肉芽組織の厚さを解析したところ、創作成 5 日目の MincleKO マウスで肉芽形成の促進を認めた。再上皮化率は、両群間で同程度であった。コラーゲンに特異的に存在するアミノ酸であるハイドロキシプロリン量は、両群間の同程度の産生を認めた。創作成後 14 日目の破断強度も、同程度の強度であった。その他の創傷治癒指標として、創収縮に関わる筋線維芽細胞のマーカーである  $\alpha$ -SMA、新生表皮に

おけるケラチノサイトの増殖マーカーであるPCNAの発現を免疫染色法にて評価した結果、 $\alpha$ -SMA陽性細胞数、PCNA陽性細胞率は両群間において同程度であった。

(4) Mincle 遺伝子欠損が白血球集積に与える影響

MincleKO マウスと WT マウスを用い、炎症期である創作成後 12、24 時間目における創部への白血球集積数とその分画を解析した。12 時間の白血球数は MincleKO マウスにおいて有意な増加を認めた、好中球数とリンパ球数は増加傾向を示した。また、創作成後 12、24 時間の創部における TNF- $\alpha$ 、MIP-2 の発現量を ELISA 法により解析したところ、24 時間の創部における MIP-2 が、MincleKO マウスで増加傾向を示した。

(5) 好中球除去が Mincle 遺伝子欠損マウスの創傷治癒に与える影響

MincleKO マウスの治癒過程において、好中球が増加傾向を示したことから、抗 Gr-1 抗体を投与し、好中球を除去した状況下での創傷治癒を解析した。マウスに創作成前日及び直前に抗 Gr-1 抗体を腹腔内に投与し、創作成後 5 日目の創閉鎖率を解析した。コントロール群として、同量のラット IgG を腹腔内に投与した群と投与なしの WT マウスと MincleKO マウスの群を同様に解析した。創作成 5 日目の末梢血において、好中球の有無についてフローサイトメトリーを用いて確認し、抗 Gr-1 抗体投与のマウスにおいて好中球が除去できていることを確認した。抗 Gr-1 抗体を投与しても創閉鎖率に影響は認められなかった。

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) Emi Kanno, Kazuyoshi Kawakami, Hiromasa Tanno, Aiko Suzuki, Noriko Sato, Airi Masaki, Ayano Imamura, Naoyuki Takagi, Takayuki Miura, Hideki Yamamoto, Keiko Ishii, Hiromitsu Hara, Yoshimichi Imai, Ryoko Maruyama, Masahiro Tachi: Contribution of CARD9-mediated signaling to wound healing in skin. *Experimental Dermatology*, 26(11): 1097-1104, 2017. doi: 10.1111/exd.

〔学会発表〕(計 4 件)

- 1) SATO Noriko, KANNO Emi, TANNO Hiromasa, MASAKI Airi, MIURA Takayuki, ISHII Keiko, YAMASAKI Sho,

KAWAKAMI Kazuyoshi: Effect of Mincle deficiency on the wound healing process in skin. 第 46 回日本免疫学会学術集会, 2017.

- 2) 菅野恵美: C タイプレクチン受容体を介した皮膚炎症反応の制御. 第 1 回東北医真菌研究会, 2017.
- 3) 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 47 回日本創傷治癒学会, 2017.
- 4) 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, 2016.

〔図書〕(計 2 件)

- 1) 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バトンパスに魅了されて - . 安部正敏 責任編集, *Visual Dermatology*. 秀潤社, 17(2):180, 2018.
- 2) 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  
東北大学医学部形成外科学分野  
<http://www.prs.med.tohoku.ac.jp/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

吉川 慧 (YOSHIKAWA Kei)  
東北大学・医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号：20770978

### (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

丹野 寛大 (TANNO Hiromasa)  
東北大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：10755664

### (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