

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09496

研究課題名（和文）podoplanin陽性細胞が創傷治癒に果たす役割とは何か？

研究課題名（英文）Role of podoplanin positive cells in wound healing model

研究代表者

清水 一彦（Shimizu, Kazuhiko）

帝京大学・医療技術学部・教授

研究者番号：90385394

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：Podoplanin (PDPN)はリンパ管マーカーとして汎用されているが、炎症の際にPDPN陽性細胞が現れることも知られている。しかし、炎症の場におけるPDPNの発現メカニズムや機能については不明な点が多い。本研究においてはマウス創傷治癒モデルを用いて、PDPN陽性細胞の同定とその細胞の特徴を調査した。その結果、PDPN陽性細胞の多くは筋線維芽細胞マーカーを発現しており、かつ、ある免疫系細胞を呼び寄せるケモカインも発現していた。しかし他の炎症モデルでは筋線維芽細胞以外の細胞であるとの報告もあり、PDPN陽性細胞群として捉える必要があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、創傷治癒の場に現れるPDPN陽性細胞の細胞種を同定し、この細胞が創傷治癒の場においてどのような役割を果たしているのかを解明することを目的としてPDPN陽性細胞の性状を調査した。創傷治癒のメカニズムは過去に多くの研究がなされているが、PDPNの発現に注目して行われた研究は少なく、創傷治癒の新たな知見として学術的意義は高い。また、PDPNの抗体を用いることで炎症の場におけるケモカインの発現をコントロールできる可能性が示されたことは将来的な新たな治療法の開発にもつながり、社会的意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Podoplanin (PDPN) is commonly used as a lymphatic endothelial marker, but it is also known to be expressed on PDPN-positive cells that appear in inflammatory areas. However, there is still much unknown regarding the types and roles of PDPN-positive cells in the inflammation area. In this study, we investigated the identification of PDPN-positive cells and their characteristics using a mouse wound healing model. As the results, many PDPN-positive cells expressed myofibroblast markers and chemokines. Furthermore, in other inflammation models, it has been suggested that the cells are different from myofibroblasts, suggesting that PDPN should be regarded as a PDPN-positive cell group rather than being expressed in a specific cell type.

研究分野：顕微解剖学

キーワード：podoplanin 炎症 創傷治癒

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

創傷治癒は生体反応として非常に重要な働きをしており、現在までに創傷治癒のメカニズムについては数え切れないほどの報告がなされている。我々はリンパ管再生機構を明らかにするためにマウス舌創傷治癒モデルを用いて研究を行ってきた。この研究過程で、創傷作製早期に、リンパ管マーカーの一つである podoplanin (PDPN) を発現する間質細胞が創傷部位に多数出現し、創傷が治癒すると消えていくことを見出した(科研費基盤研究(C) JP15K10935)。

PDPN はリンパ管マーカーとして汎用されているが、リンパ管以外にも I 型肺胞上皮細胞、脾臓・リンパ節・胸腺などの細網細胞にも発現している他、中皮腫や大腸癌などの腫瘍細胞にも発現が認められている。PDPN の機能としては、血小板上に存在する CLEC-2 のリガンドとして血小板を凝集させることが知られている。しかし、創傷の場における PDPN の機能についてはほとんど分かっていない。我々は以前より PDPN 陽性細胞の存在意義について研究を行ってきた。そして、正常の脾臓においては PDPN 陽性細胞がケモカインを発現することで免疫系細胞を間質からリンパ管まで遊走させる、いわゆる「脈管外通路」としての機能を果たしていることを明らかにした。また、他のグループの報告によると、腫瘍組織内で PDPN の発現を実験的に減少させると腫瘍の転移や生着が減少するという報告があった。更に、我々のグループは舌創傷治癒モデルにおいて、PDPN 陽性細胞が多数出現し、これらの細胞周囲に多数の免疫系細胞が集積することも見出した。これらの結果から、「炎症の場においても PDPN が発現することで正常リンパ臓器同様に「種々の細胞の遊走させる働きがあるのではないか?」という疑問を抱くことになった。

### 2. 研究の目的

本研究の最終目標は「PDPN の発現を制御することで炎症をコントロールする」ことであるが、その一環として本課題においては「創傷治癒モデルを用いて PDPN が細胞移動に関与するメカニズムを解明する」ことを目的とする。この目的を達成するために、創傷治癒モデルで急激に現れる PDPN 陽性細胞の同定と、PDPN 陽性細胞の発現因子と PDPN との関連性を詳細に明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 創傷モデルの作製

麻酔下でシェーバーを用いてマウス背部を剃毛し、背部皮膚に長さ 7mm の切傷、または生検パンチを用いた全層欠損を作成した。その後、経時的にサンプリングした。サンプルは必要に応じて 4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定を行った。

#### (2) 創傷治癒モデルの組織学的検索

創傷部位のパラフィン切片、または凍結切片を作製した。パラフィン切片にて作成された標本については、H&E 染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。作製された凍結切片は、抗 PDPN 抗体と他の細胞マーカー等に対する抗体を組み合わせた多重蛍光免疫染色を行った。免疫蛍光染色を行った標本は共焦点レーザー顕微鏡、または蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。

#### (3) 抗 PDPN 抗体 Pmab-1 を用いた PDPN 機能障害の試み

(1)と同様に創傷モデルを作製した直後に Pmab-1 抗体 (Rat IgG) を尾静脈より投与した。また、対照群として、Control Rat IgG を尾静脈より投与した。受傷後 1 日目に凍結切片を作製し、種々の抗体を用いた多重蛍光免疫染色法により創傷部の形態的な変化を観察した。

#### (4) Pmab-1 投与による創傷部位における遺伝子発現の変化の解析

Pmab-1 投与群及び Control Rat IgG 投与群の創傷部位より total RNA を抽出し、逆転写反応を行った。得られた cDNA を鋳型として PDPN やその他の因子に対するプライマーを用いて定量的 RT-PCR を行った。解析には delta-delta CT 法を用いた。

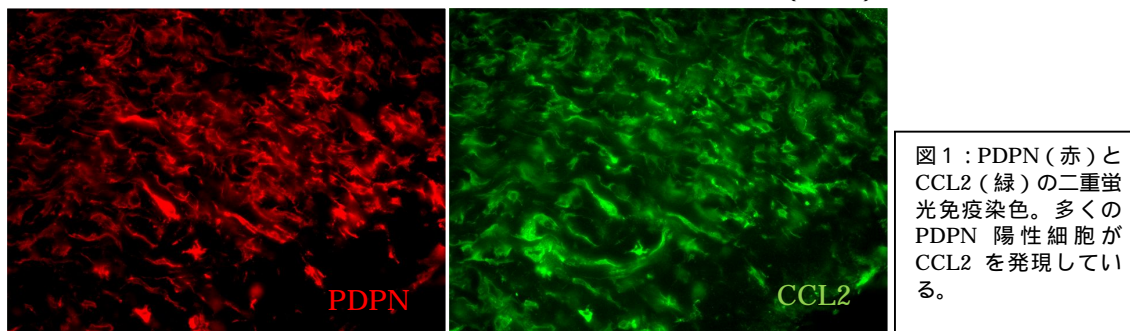
### 4. 研究成果

#### (1) 創傷部位の形態学的解析

マウス作創後 1 日目における創傷部皮膚 anti-PDPN の免疫組織化学の結果から、創傷部周囲に PDPN 陽性細胞が出現することが確認できた。これらの細胞の正体を知るために、PDPN と種々のマーカーを用いた多重免疫染色をした。その結果、PDPN 陽性細胞は FAPA を共発現していることが確認された。同様に、PDPN 陽性細胞は  $\alpha$ -SMA も共発現していることが確認された。さらに、anti-PDPN、anti-FAPA、anti- $\alpha$ -SMA を用いて三重免疫染色を行ったところ、そのすべてを共発現している部位が確認できた。以上のことから創傷部に現れる PDPN 陽性細胞の多くは、筋線維芽細胞である可能性が考えられた。

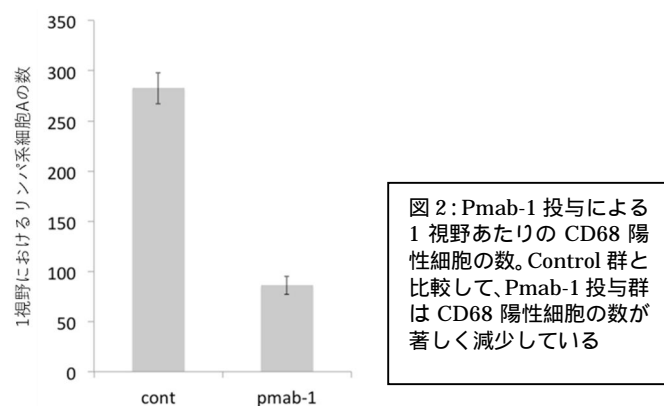
また、PDPN 陽性細胞の周囲には CD68 陽性細胞が多数集積していた。そこで、PDPN と種々の因

子に対する抗体を用いて多重蛍光免疫染色を行ったところ、これらの CD68 陽性細胞を集積すると思われる CCL2 を PDPN 陽性細胞が発現していることが分かった ( 図 1 )。



## (2) 抗 PDPN 抗体 Pmab-1 を用いた PDPN 陽性細胞の機能調査

マウス創傷作製直後に Pmab-1 を投与した個体と control 群を比較したところ、Pmab-1 投与群で創傷部に集積する CD68 陽性細胞の数が現象した ( 図 2 )。また、定量的 RT-PCR を行ったところ、CD68 を集積すると思われる CCL2 の発現量は減少傾向にあった。



以上の結果から、創傷治癒の過程で出現する PDPN 陽性細胞は CCL2 を発現することで CD68 陽性細胞を創傷部位に集積して創傷治癒過程に積極的に関与している可能性が示唆された。しかし他の報告では炎症の場で PDPN を発現する細胞として、筋芽細胞や T 細胞などの報告もあり、PDPN 陽性細胞は特定の細胞ではなく細胞群としてとらえる必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kazuhiko Shimizu, Fumi Sato	4. 巻 7
2. 論文標題 Angiogenic and lymphangiogenic factors in wound healing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Research Archives	6. 最初と最後の頁 open access
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18103/mra.v7i12	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水一彦、有村裕、川島友和、星秀夫、石原義久、加藤幸成、佐藤二美
2. 発表標題 Podoplaninは炎症の場でCCL2の発現を制御する
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水一彦、江崎太一
2. 発表標題 炎症局所におけるpodoplanin陽性細胞の役割
3. 学会等名 第43回日本リンパ学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水一彦、近藤千里、佐藤伊桜里、江崎太一
2. 発表標題 DNFB接触過敏反応におけるポドプラニンの役割
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	菊田 幸子  (Kikuta Sachiko)  (10367089)	東京女子医科大学・医学部・助教   (32653)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------