

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16021

研究課題名(和文)皮膚虚血再灌流障害モデルにおけるサイトカインの役割の研究

研究課題名(英文)A role of cytokine in a cutaneous ischemia-reperfusion injury model of mice

研究代表者

前田 進太郎 (Maeda, Shintaro)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：10707079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：褥瘡の病態を、虚血再灌流傷害モデルで検討した。野生型と比べてIFN- γ 、IL-6欠損マウスでは組織障害が軽減したが、IL-4、IL-10、IL-17A欠損マウスでは差はなかった。IFN- γ 、IL-6欠損マウスではiNOS、TNF- α 、MCP-1等が低下していた。野生型マウスへのIFN- γ 、IL-6抗体の経静脈的投与で潰瘍径が縮小した。マクロファージをIFN- γ で刺激するとNO産生が増加した。IFN- γ 、IL-6マウスでは、マクロファージの浸潤が減少、当初はM1分画優位で、後にM2分画が増加した。IFN- γ 、IL-6等のサイトカインは虚血再灌流障害における組織障害と潰瘍の治癒に関与していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

褥瘡の発生には単に局所の虚血だけでなく、再灌流時の組織障害も重要であり、そのメカニズムを検証することは褥瘡の予防や治療において重要である。褥瘡の誘引として、血流障害、ずれなどの刺激が従来考えられているが、本研究では、サイトカインにより誘導されるM1およびM2マクロファージの浸潤と、引き続いて起こるiNOSの発現とNOの産生も、褥瘡の誘引の一つとして考えられた。サイトカインとそれによる炎症を抑制することが虚血再灌流により引き起こされる皮膚障害を軽減する治療ターゲットとなりうる。

研究成果の概要(英文)：Ischemia-reperfusion (IR) is considered a key mechanism of pressure ulcer. The purpose of this study is to assess a role of cytokines and in the ulcer formation process using a cutaneous IR mouse model. Both IFN- γ -deficient and IL-6-deficient mice that received IR cycles showed improvement of tissue damage. In these mutant mice, reduced macrophage infiltration and increased expression of iNOS, TNF- α and MCP-1 were observed. Wild type mice injected anti-IFN- γ mAb or anti-IL-6 mAb intravenously showed improvement ulcer size. In vitro culture of macrophages from wild type mice stimulated with IFN- γ resulted in increased production of NO. The ratio of M1 macrophages were more dominant in early phase of IR cycles at the wound site, whereas M2 macrophages ratio was gradually increased as time passes. This study indicates that IR injury is mediated by M1 and M2 macrophage infiltration that is induced by inflammatory cytokines including IFN- γ and IL-6.

研究分野：皮膚科学

キーワード：虚血再灌流障害 NO iNOS

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

1. 研究開始当初の背景

虚血再灌流障害とは、虚血状態にある臓器や組織に血液再灌流が起きた際、その臓器・組織内の微小循環においてフリーラジカル等の種々の毒性物質の産生が惹起され引き起こされる障害のことである。代表的なフリーラジカルとしては Nitric Oxide (NO) があり、血液再灌流時に NO synthetase (NOS) から産生され、局所での組織障害を引き起こす。NOS は endothelial NOS (eNOS)、neuronal NOS (nNOS)、inducible NOS (iNOS) の 3 種類が存在する。eNOS は血管内皮細胞から分泌され、nNOS は神経叢に局在している。そして iNOS は、TNF の刺激によりマクロファージから大量に誘導され大量の NO を産生することで虚血再灌流障害において主要な役割を担っている。

虚血再灌流障害については様々な臓器で検討されており、脳梗塞、心筋梗塞、肝臓や腎臓の移植後状態などの病態を理解するためのモデルとして用いられている。そして、それらのモデルの解析により、臓器においては単純に局所の虚血のみだけでなく、再灌流時の組織障害も重要であることが明らかになっている。

我々は皮膚の虚血再灌流障害を再現したマウスモデルを作成し、すなわち炎症細胞の浸潤、サイトカインや NOS の関与について検討した (Saito Y, et al. J Invest Dermatol. 7:1838-1851, 2008)。その結果、皮膚においても他の諸臓器と同様の機序、すなわち monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) がマクロファージの遊走を促進し、それらが産生する TNF 等のサイトカインが、次にマクロファージからの iNOS の発現を増加させることで NO が大量に産生され、組織障害に至る、というメカニズムを明らかにした。さらに、MCP-1 を欠損したマウスでは皮膚の虚血再灌流障害が軽減することを確認し、サイトカインが虚血再灌流障害の程度を調節しうると考えられた。

2. 研究の目的

皮膚における虚血再灌流障害の代表的な疾患は褥瘡である。褥瘡についての研究は、創傷が生じた時点からそれが治癒するまでの期間をいかに短縮するか、いわゆる創傷治癒の観点のみから検討されたものがほとんどであるが、虚血再灌流障害の観点から検討し、創傷 = 褥瘡が形成される過程にも着目する。

また、皮膚においては他臓器とは異なり虚血再灌流障害の検討が進んでおらず、サイトカインが果たす役割も十分に明らかにはされていない。皮膚の炎症性疾患のみならず、創傷治癒などでもサイトカインの関与は大きいいため、虚血再灌流障害においてその病態にサイトカインがどのように関わっているかを検討する。

3. 研究の方法

・皮膚虚血再灌流障害マウスモデル、潰瘍の肉眼的・組織学的検討

C57BL/6 バックグラウンドで 8~12 週齢の雄の野生型及び遺伝子欠損マウス (IFN- γ ^{-/-}マウス、IL-6^{-/-}マウス、IL-4^{-/-}マウス、IL-10^{-/-}マウス、IL-17A^{-/-}マウス) を使用した。マウスの背部皮膚を剃毛し、両側から直径 1cm の 1000 ガウスの円盤型磁石で挟み込んで、50mmHg の圧力が加わるようにした。12 時間挟んで虚血し、12 時間開放して再灌流する操作を ischemia-reperfusion (IR) サイクルとし、そのサイクルを 3 回、計 3 日間行って虚血再灌流傷害モデルとした。最初に磁石を挟み込む時点を Day0 とし、潰瘍の拡大が止まるまで連日その面積を測定した。免疫染色にて局所に浸潤する炎症細胞を評価した。

・NOS およびサイトカイン、ケモカインの発現、iNOS の阻害薬の投与

創傷部位における、Nitric Oxide (NO) の関与を調べるため、NO synthetase (NOS) を real-time PCR で測定した。NOS は nNOS、eNOS、iNOS の 3 種類を測定した。また、創傷部位におけるサイトカイン、ケモカインの発現を real-time PCR、ELISA 法、cytometric bead array assay (CBA) を用いて測定した。iNOS の選択的阻害剤である 1400W (N-[3-(Aminomethyl)benzyl]acetamide) を、磁石の開放時に野生型マウスの局所の皮下に 1 μ g/g、3 日間局注し、IR サイクルを施行した。

・抗体投与およびサイトカイン投与

野生型マウスに IFN- γ 、IL-6 の中和抗体を経静脈的に投与して、IR サイクルを施行し、潰瘍径を測定する。また、TNF- α の抗体と IFN- γ 抗体、もしくは IL-6 抗体の同時投与も行った。次に IFN- γ 、IL-6 の抗体の皮膚への局所投与も行った。

・マクロファージの刺激による NO の産生の変化

野生型マウスから腹腔マクロファージを採取し、IFN- γ 、IL-6 とともに短期培養を行い、培養上清中の NO を、Non-enzymatic Assay Kit で測定した。

・障害部位におけるマクロファージ分画

免疫染色にて障害部位における M1 マクロファージと M2 マクロファージを、それぞれ抗 CD86 抗体、抗 CD163 抗体・抗 CD206 抗体の免疫染色で同定し、その比率を経時的に測定した。

4. 研究成果

1) IR サイクル後の野生型マウスでは、Day5 をピークとした潰瘍を形成し、Day20 で治癒に至った。IFN- γ ^{-/-}マウスと IL-6^{-/-}マウスはいずれも野生型よりも有意に潰瘍径が小さかった(図1)。IFN- γ ^{-/-}マウスは Day16 で治癒したが、IL-6^{-/-}マウスでは Day7 から創治癒に遅延が生じ、結果的に野生型と同程度の期間を要した。なお、IL-4^{-/-}マウス、IL-10^{-/-}マウス、IL-17A^{-/-}マウスでは野生型と比較して差は見られなかった(図2)。以下、IFN- γ ^{-/-}マウスと IL-6^{-/-}マウスで検討を進めた。

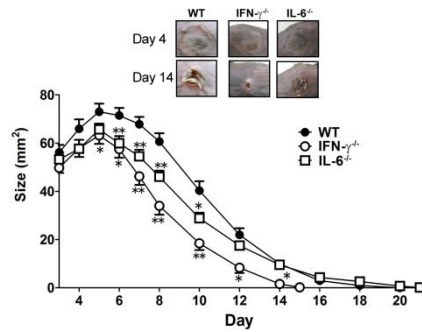


図 1

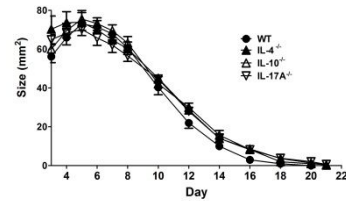


図 2

2) 局所に浸潤する炎症細胞は、IFN- γ ^{-/-}マウスと IL-6^{-/-}マウスは Day1~5 でマクロファージの細胞数が野生型より減少していた。さらに、IL-6^{-/-}マウスにおいては、好中球、リンパ球も細胞数の低下がみられた。

3) NOS の mRNA の発現を調べたところ、IR サイクル期間中に iNOS の発現が著増していた。2 種類の遺伝子欠損マウスでも iNOS の増加がみられたが、野生型よりも発現は低下していた。nNOS、eNOS の発現は、野生型と遺伝子欠損マウスで有意差はみられなかった。TNF- α 、MCP-1、CX3CR1 の mRNA 発現は、IFN- γ ^{-/-}マウス、IL-6^{-/-}マウスで低下していた。CBA でも同様で、TNF- α 、MCP-1 の発現低下がみられた。

iNOS の関与が重要であることが判明したため、その阻害剤である 1400W 野生型マウスに投与したところ、IR サイクル直後から潰瘍径が著明に小さく、Day14 と早期に治癒した。

創傷部位の皮膚においてマクロファージ等炎症細胞の浸潤をフローサイトメトリーでも試みたが、同定されなかった。

4) 野生型マウスに IFN- γ および IL-6 の中和抗体を経静脈的に投与したところ、潰瘍径の縮小がみられた。3) の結果より iNOS が重要であり、かつ iNOS は TNF- α により誘導されることから、TNF- α の抗体と同時投与を行った。TNF- α と IFN- γ を同時投与すると TNF- α 単独よりも潰瘍径が小さかった。次に、中和抗体を磁石を挟み込む部位に局所投与したが、IFN- γ および IL-6 いずれも潰瘍径の縮小はみられなかった。

5) 野生型から採取したマクロファージを IFN- γ ないし IL-6 の存在下で短期培養したところ、IFN- γ で刺激した群では NO が増加した。

6) 局所に浸潤するマクロファージのサブセットを経時的に計測したところ、IR サイクルの初期では M1 マクロファージが優位で、Day1 では M1 マクロファージは野生型と IL-6^{-/-}マウスでは 80%、IFN- γ ^{-/-}マウスでは 50% を占めていた。次第に M2 マクロファージの割合が増加し、Day5 では M2 マクロファージは野生型で 70%、IL-6^{-/-}マウスで 55%、IFN- γ ^{-/-}マウスでは 80% を占めていた。野生型と比して IFN- γ ^{-/-}マウスでは M1 マクロファージの浸潤が少なく、逆に IL-6^{-/-}マウスでは M2 マクロファージの増加が少ない傾向にあった。

以上より、IFN- γ は IR サイクル開始直後から M1 マクロファージを誘導することで、再灌流時の NO の産生を増加させて組織障害を引き起こし、IL-6 は IR サイクル後期からの M2 マクロファージの局所への浸潤を誘導し、形成された潰瘍を治癒させる方向に働く、という機序が考えられた。

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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----