

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03812

研究課題名(和文)慢性創傷に対する免疫療法の開発～CLRsを介したアクセル・ブレーキ理論の応用～

研究課題名(英文)Development of immunotherapy through C-type lectin receptors for chronic wounds

研究代表者

館 正弘 (TACHI, Masahiro)

東北大学・医学系研究科・名誉教授

研究者番号：50312004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,400,000円

研究成果の概要(和文)：本課題において申請者らは、難治性創傷における炎症遷延へのC型レクチン受容体(CLRs)の関与の解明、「CLRsを介した免疫療法」の確立を目的とした。

CLRsのうちDectin-1とDectin-2に注目し、両受容体はどちらも免疫細胞の細胞膜上に発現するが、発現時期が異なること、創傷治癒や好中球性炎症反応に対して相反する役割を有する結果を得た。すなわち、Dectin-1は急性期の好中球集積を高めアクセル役として、Dectin-2は後期の好中球遷延に関与しブレーキ役として作用することが示唆された。この相反する役割を応用し、今後は臨床応用に向けた検討を実施する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

褥瘡や糖尿病性下腿潰瘍などの難治性創傷では、好中球性炎症反応が治癒遷延に関与していることが示唆されているが、これまで好中球をターゲットとした治療法は存在しない。

今回の解析により、C型レクチン受容体(CLRs)であるDectin-1、Dectin-2が好中球性炎症反応に拮抗的に関与することが明らかになり、CLRsの免疫応答を介した治療法が確立されれば、長年課題とされている好中球性炎症反応を制御することが可能となり、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：C-type lectin receptors (CLRs) recognize microbial polysaccharides. The precise roles of these CLRs in wound healing remain unclear. This study was conducted to determine the roles of Dectin-1 and Dectin-2 in wound healing, with a particular focus on the kinetics of neutrophilic inflammatory response. Wounds were created on the backs of C57BL/6 mice, and the effects of Dectin-1 or Dectin-2 deficiency. We also analyzed wound closure, histological findings, and neutrophilic inflammatory response, including neutrophil extracellular trap formation. We found that Dectin-1 contributed to the acceleration of wound healing by inducing early-phase neutrophil accumulation, whereas Dectin-2 was involved in prolonged neutrophilic responses and neutrophil extracellular trap formation, leading to delayed wound healing. These results suggest that Dectin-1 and Dectin-2 have different roles in wound healing through their different effects on the neutrophilic response.

研究分野：形成外科学

キーワード：慢性創傷 創傷治癒 好中球 C型レクチン受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 順調に治癒に至る急性創傷では、炎症期、増殖期、再構築期を経て治癒に至る。一方、褥瘡や下腿潰瘍などの慢性創傷は感染や免疫細胞の機能不全により炎症期が遷延し、治癒が停滞する。

急性創傷と慢性創傷の分かれ道(分岐点)は、皮膚が損傷した直後に存在するという指摘がある。

申請者らは、急性創傷と慢性創傷を決定する免疫チェックポイント分子として「C型レクチン受容体(CLRs)」に注目している。

(2) 免疫チェックポイント分子とは、免疫応答を制限、もしくは調整する分子群であり、T細胞に発現するPD-1やCTLA-4がよく知られている。

申請者は創部免疫を制御するチェックポイント分子として、免疫細胞に発現するCLR(治癒促進に働くDectin-1、治癒阻害に働くDectin-2)に着目する。

Dectin-1とDectin-2は、どちらも免疫細胞の細胞膜上に発現するパターン認識受容体(PRR)であり、主に真菌の細胞壁由来の糖鎖認識に関わる。両受容体の相違点としては、創傷治癒に与える影響、認識するリガンド、炎症誘導までのシグナル伝達経路が挙げられるが、治癒過程に与える影響が拮抗するメカニズムは全く解明されていない。

申請者は詳細な解析により、いくつかの慢性創傷モデルで好中球性炎症遷延がみられること、炎症遷延はDectin-2が制御していることを突き止め、2019年に報告した(Miura T, Tachi M, et al. *J Invest Dermatol*, 2019)。

過去に、創傷治癒に関与するシグナルとして、Toll様受容体-MyD88経路を中心に解析されているが、いずれも促進的に働くことが報告されており、申請者の知る限り、治癒促進に働く受容体はDectin-2のみといえる。

(3) 創傷は、皮膚損傷直後に正常な炎症反応が誘導されるか否かがKeyを握る。しかしながら、何が急性創傷と慢性創傷の分岐点を決めるのか、その制御機構は依然として不明である。

申請者は、免疫細胞に発現し、好中球集積を制御するCLR(Dectin-1とDectin-2)に注目している。その理由として、以下の点を挙げる。

### 1. 好中球が治癒遅延・瘢痕形成と関連している点

胎仔の研究より、好中球が存在しない胎生13日までは損傷皮膚が完全に再生するが、14日目より好中球が出現し、瘢痕形成や治癒遅延に関わることが報告されている。このことから、炎症反応が創傷の慢性化や瘢痕形成の主因と据えることができる。

### 2. Dectin-1、Dectin-2は慢性創傷・ケロイドに関わるTreg/Th17バランスを制御する点

近年、ケロイドを炎症性疾患と捉えた解析において、抗炎症に働く制御性T細胞(Treg)と好中球誘導に働くTh17バランスが注目されており、Dectin-1はTreg数と抗炎症性サイトカインIL-10を増加させ抗炎症に働くことが報告されている。

## 2. 研究の目的

「慢性創傷に対する免疫療法」開発に向けた基盤情報を得る。

1. 免疫チェックポイントとしてのDectin-1、Dectin-2機能を解明する。
2. Dectin-1、Dectin-2およびそのリガンド発現について明らかにする。

## 3. 研究の方法

創傷治癒過程における Dectin-1、Dectin-2 機能の解明

< 実験動物 >

Dectin-1KO マウス、Dectin-2KO マウス、野生型 C57BL/6 (対照群)、オス 8-10 週齢

< 実験モデルの作成 >

- ・マウスに直径 3 mm のデルマパンチを用いて全層欠損創を作成し、解析日（創作成 1、3、7、14 日）まで湿潤環境を保つ。

< 解析項目 >

- ・潰瘍部への好中球、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  
皮膚組織を摘出、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™II) にて、細胞数について解析する。※好中球 = Ly6G 陽性、マクロファージ = F4/80 陽性、T 細胞 = CD3 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サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-6 など)、増殖因子 (TGF- $\beta$  など) を ELISA キットで解析し定量化する。

- ・創収縮率、筋線維芽細胞の分化 ( $\alpha$ -SMA)、血管新生 (CD31) の解析

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

- ・Dectin-1、Dectin-2 発現細胞の解析

皮膚組織を摘出、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、Dectin-1、Dectin-2 陽性細胞をフローサイトメトリーで解析する。

さらに、パラフィン切片を用いて、免疫組織学的に Dectin-1、Dectin-2 陽性細胞および各々の受容体のリガンドの発現を確認する。

## 4. 研究成果

(1) 創傷治癒過程における Dectin-1、Dectin-2 発現の推移

Dectin-1 発現は創傷作成 6 時間後に発現のピークを迎え、その後速やかに低下するの

に対し、Dectin-2 は 12 時間後にピークを迎え 7 日目まで中等度の発現が維持された。

#### ( 2 ) 創傷治癒過程における Dectin-1、Dectin-2 発現細胞

Dectin-1、Dectin-2 とともに創部に集積した好中球、マクロファージ、線維芽細胞における発現を免疫染色、フローサイトメトリーで解析した。さらに、NFAT-GFP reporter assay により創部上清中の両受容体のリガンドを解析した。

その結果、WT マウスの創部組織において、Dectin-1、2 の陽性細胞を確認し、その近傍にビメンチン、 $\alpha$ -グルクロニダーゼ発現を認めた。フローサイトメトリーにより、好中球、マクロファージ、線維芽細胞上に両受容体の発現を確認した。Reporter assay により、Dectin-2-expressing reporter 細胞における GFP 発現を確認した。

以上より、無菌的な創傷部位では、Dectin-1、Dectin-2 共に発現しているが、Dectin-2 とそのリガンドが結合しやすく、Dectin-2 を介したシグナルが伝達されやすい可能性が考えられた。

#### ( 3 ) 創傷治癒過程における Dectin-1、Dectin-2 遺伝子欠損の影響

Dectin-1 遺伝子欠損 (KO) マウスと Dectin-2KO マウスに創傷を作成し治癒過程を比較した。Dectin-1KO マウスでは野生型 (WT) マウス、Dectin-2KO マウスと比較し、創閉鎖率、再上皮化率の低下、血管内皮細胞のマーカー CD31 の減少、早期に創部に集積する好中球数の減少を認めた。一方、Dectin-2KO マウスではいずれの指標も有意に高かった。

#### ( 4 ) 創傷治癒過程における Dectin-1、Dectin-2 リガンド投与の影響

創傷作成後、創部に Dectin-1 リガンドである dZymosan、Dectin-2 リガンドである  $\alpha$ -mannan を投与したところ、dZymosan 群では Vehicle 群、 $\alpha$ -mannan 群と比較し、創閉鎖率、再上皮化率の促進、CD31 の増加、早期に創部に集積する好中球数の増加を認めた。一方  $\alpha$ -mannan 群では、いずれの指標も有意に低く、創部への好中球遷延を認めた。以上のことから、創傷治癒において Dectin-1 と Dectin-2 は相反する役割を有する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kenji Yamaguchi, Emi Kanno, Hiromasa Tanno, Ayako Sasaki, Yuki Kitai, Takayuki Miura, Naoyuki Takagi, Miki Shoji, Jun Kasamatsu, Ko Sato, Yuka Sato, Momoko Niiyama, Yuka Goto, Keiko Ishii, Yoshimichi Imai, Shinobu Saijo, Yoichiro Iwakura, Masahiro Tachi, Kazuyoshi Kawakami	4. 巻 141 (1)
2. 論文標題 Distinct Roles for Dectin-1 and Dectin-2 in Skin Wound Healing and Neutrophilic Inflammatory Responses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol	6. 最初と最後の頁 164-176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2020.04.030.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 菅野 恵美、川上 和義	4. 巻 48(2)
2. 論文標題 皮膚創傷治癒におけるDectin-1, Dectin-2の相反する役割	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 38-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丹野寛大, 菅野恵美, 佐々木綾子, 黒坂志歩, 及川ゆかり, 石井恵子, 川上和義, 館正弘
2. 発表標題 Dectin-2シグナルを介した皮膚創傷治癒へのNatural Killer T細胞欠損の影響
3. 学会等名 第50回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 及川ゆかり, 菅野恵美, 山口賢次, 丹野寛大, 後藤友華, 黒坂志歩, 川上和義, 館正弘
2. 発表標題 創傷治癒におけるDectin-1, 2発現細胞と創部上清中リガンドの検証
3. 学会等名 第50回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅野恵美, 山口賢次, 丹野寛大, 佐々木綾子, 石井恵子, 館正弘, 川上和義
2. 発表標題 皮膚創傷治癒におけるDect in-1, 2の役割の相違 - NETosisへの影響に注目して - .
3. 学会等名 第3回東北医真菌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口賢次, 川上和義, 菅野恵美, 佐々木綾子, 庄司未樹, 三浦孝行, 丹野寛大, 高木尚之, 今井啓道, 館正弘
2. 発表標題 皮膚創傷治癒におけるDect in-1, 2の役割とNETs形成との関連
3. 学会等名 第49回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅野恵美
2. 発表標題 免疫を標的とした皮膚創傷治癒・バイオフィルムの制御
3. 学会等名 第33回東北真菌懇話会 (招待講演)
4. 発表年 2021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	川上 和義  (Kawakami Kazuyoshi)  (10253973)	東北大学・医学系研究科・教授    (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	菅野 恵美  (Kanno Emi)  (10431595)	東北大学・医学系研究科・准教授    (11301)	
研究分担者	丹野 寛大  (Tanno Hiromasa)  (10755664)	東北大学・医学系研究科・助教    (11301)	
研究分担者	高木 尚之  (Takagi Naoyuki)  (30569471)	東北大学・医学系研究科・助教    (11301)	

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