

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462723

研究課題名(和文) 創傷治癒におけるIL-17の役割と産生制御機構の解明及び慢性創傷における意義

研究課題名(英文) Elucidation of IL-17 function and production in the wound healing and the role in chronic wounds

研究代表者

武田 睦 (TAKEDA, ATSUSHI)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：30333800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Interleukin-17 (IL-17)は炎症性サイトカインの一種であるが創傷治癒への影響については十分に解明されていない。本研究により、IL-17A遺伝子欠損マウスにて創傷治癒の促進、好中球集積の低下を認め、またリコンビナントIL-17A投与による創傷治癒の遅延、好中球集積の亢進、好中球エラスターゼ阻害剤投与による遅延した創傷治癒の回復を明らかにした。また、野生型マウスにおいて好中球、マクロファージおよびT細胞におけるIL-17Aの産生を明らかにした。これらの結果より、IL-17が好中球性炎症を介して創傷治癒を阻害することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Interleukin-17 (IL-17) is a proinflammatory cytokine. The role of this cytokine in the wound healing process is not fully clarified. In this study, IL-17A knockout mice showed promoted wound healing and decreased neutrophil accumulation compared with wild-type mice, and the administration of recombinant IL-17A led to delayed wound closure, accelerated neutrophilic accumulation and improved wound repair with treatment of a neutrophil elastase inhibitor. Neutrophils, macrophages and gamma-delta T cells showed IL-17A expression after wounding in wild-type mice. These results indicated that IL-17A hampered the wound healing process and neutrophilic inflammation caused by IL-17 led to impaired wound healing in skin.

研究分野：創傷治癒学

キーワード：創傷治癒 IL-17 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

IL-17(interleukin -17;インターロイキン 17)は1993年に発見されたサイトカインであり、線維芽細胞や上皮細胞、マクロファージなどに作用し炎症性サイトカインやケモカインの産生による好中球の遊走を促すことで好中球性炎症を誘導する。これまでの研究により、IL-17は感染防御に寄与する一方で、慢性関節リウマチや乾癬、炎症性腸疾患といった炎症性疾患にも関与することが知られている。しかし創傷治癒過程におけるIL-17の機能については、十分に解明されておらず、本研究では創傷治癒におけるIL-17について注目した。

2. 研究の目的

本研究では、IL-17の創傷治癒過程における役割を解明するために、マウスの背部皮膚全層欠損創モデルを用いて以下の点について明らかにすることを目的とした。

- (1) 皮膚創部におけるIL-17産生動態の解明
- (2) IL-17A欠損による創傷治癒への影響およびそのメカニズムの解明
- (3) IL-17A投与による創傷治癒への影響およびそのメカニズムの解明

3. 研究の方法

(1) IL-17A産生細胞の解析

マウス創部における皮膚組織より細胞を回収し、細胞内IL-17A発現を解析した。

(2) IL-17A欠損マウスによる解析

IL-17A欠損(KO)マウスにおける創閉鎖率、病理組織学的所見、創部白血球集積、サイトカインおよびケモカイン発現、創傷治癒関連分子発現について野生型(WT)マウスと比較検討し解析した。

(3) IL-17A投与による解析

リコンビナントIL-17A(rIL-17A)投与マウスにおける創閉鎖率、創部白血球集積、サイトカインおよびケモカイン発現、創傷治癒関連分子発現について、rIL-17A非投与マウスと比較検討し解析した。

4. 研究成果

(1) 創部組織におけるIL-17A産生細胞

創部におけるIL-17Aの産生は創作成後に増加がみられた。IL-17A産生細胞をWTマウスにおいて解析し、創作成後24時間において、好中球、マクロファージ、 $\gamma\delta$ T細胞のIL-17A産生を認めた。

(2) IL-17A欠損による影響

①創傷治癒への影響

図1、図2に示すように、WTマウスと比べIL-17AKOマウスにおいて有意に創閉鎖率の増加を認めた。また、IL-17AKOマウスに

おいて有意な肉芽組織の増大、筋線維芽細胞分化の亢進も認め、IL-17A欠損により創傷治癒は促進した。

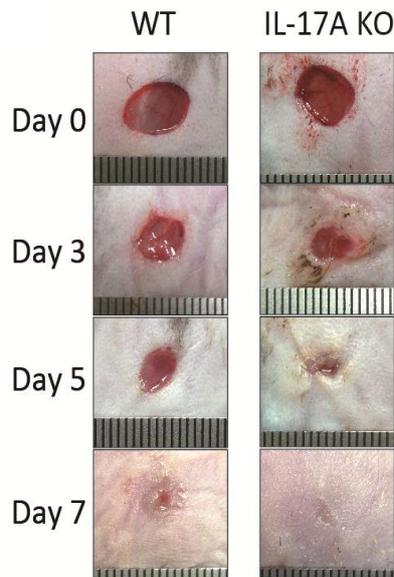


図1 IL-17A欠損による創治癒への影響

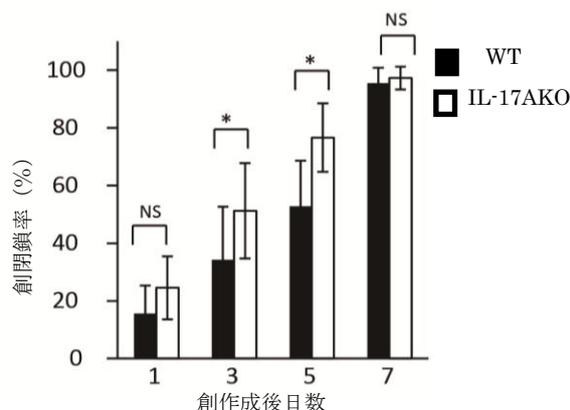


図2 IL-17A欠損による創閉鎖率への影響

②創部の白血球集積への影響

創部における白血球集積および白血球分画の解析をWT、IL-17A KOマウス両群間で比較検討した。図3に示すように、WTマウスと比べIL-17A KOマウスにおいて、創作成後24時間での好中球数の有意な減少を認めた。マクロファージ数は、創作成後3時間においてIL-17A KOマウスでの有意な増加を認めた。リンパ球および総白血球数は、両群間で有意な差を認めなかった。

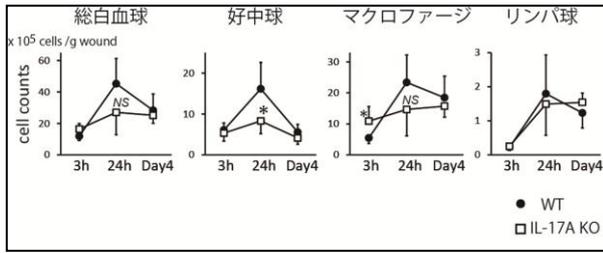


図3 IL-17A欠損による創部白血球集積への影響

また、白血球集積に中心的な役割を果たすケモカインの創部での発現を両群間で比較した。好中球集積に関与するKC (keratinocyte-derived chemokine) のmRNA発現は、創作成後6時間においてIL-17A KOマウスで有意に発現が低かった。また、マクロファージ、リンパ球集積に関与するMCP (monocyte chemotactic protein) -1、MIP (macrophage inflammatory protein) -1 α 、MIP-1 β のmRNA発現は両群間で有意な差は認めなかった。これらの結果から、IL-17Aは創部への好中球遊走に関与することが示唆された。

(3) IL-17A投与による影響

①創傷治癒への影響

図4に示すように、rIL-17A投与により創作成後3日目の創閉鎖率が低下した。また、コラーゲン合成の指標となるヒドロキシプロリン産生量もrIL-17A投与群において減少した。以上より、IL-17A投与により創傷治癒は遅延した。

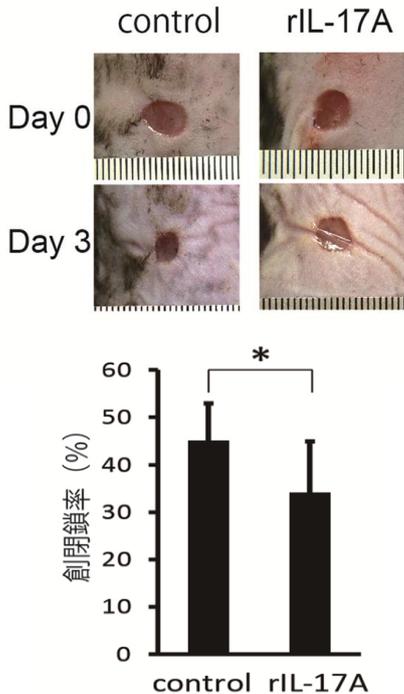


図4 IL-17A投与による創治癒への影響

②創部の白血球集積への影響

rIL-17A投与による創部白血球集積への影響を解析した。図5に示すように、コントロール群と比べrIL-17A投与群において、創作成後24時間で総白血球数と好中球数の有意な増加を認めた。一方、マクロファージ数とリンパ球数は両群間で有意差を認めなかった。また、ケモカインのmRNA発現を両群間において解析したところ、KCのmRNA発現がコントロール群と比べrIL-17A投与群において創作成後12時間で有意に高かった。これらの結果より、IL-17Aによる創部好中球集積の促進作用が示された。

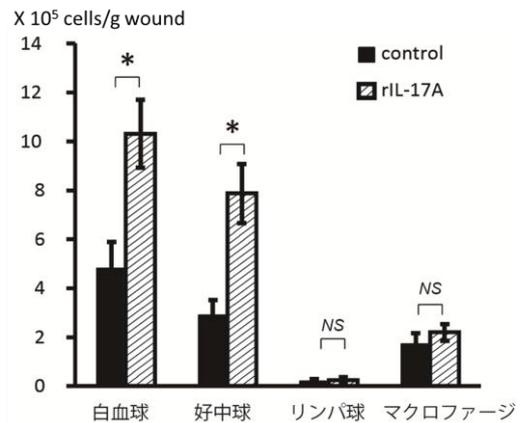


図5 rIL-17A投与による創部白血球集積への影響

③好中球エラスターゼ阻害剤投与の影響

rIL-17A投与群における創傷治癒遅延の原因の一つとして、好中球エラスターゼによる正常組織傷害の可能性を考え、rIL-17A投与マウスに好中球エラスターゼ阻害剤を投与することで遅延した創傷治癒が回復するかを検討した。好中球エラスターゼ阻害剤であるシベレスタットナトリウムをrIL-17A投与マウスの腹腔内に投与し、rIL-17A+シベレスタット投与群、rIL-17A+生食投与群、およびrIL-17Aでなく溶媒のみ創部投与したコントロールマウス群の3群間で創閉鎖率を比較検討した。図6に示すように、rIL-17A+生食投与群ではコントロール群と比べ創閉鎖率は有意に低下したが、rIL-17A+シベレスタット投与群では創閉鎖率がコントロール群と同程度に改善した。この結果から、rIL-17Aの投与により集積した好中球からの好中球エラスターゼは創傷治癒を遅延する一因となることが示唆された。

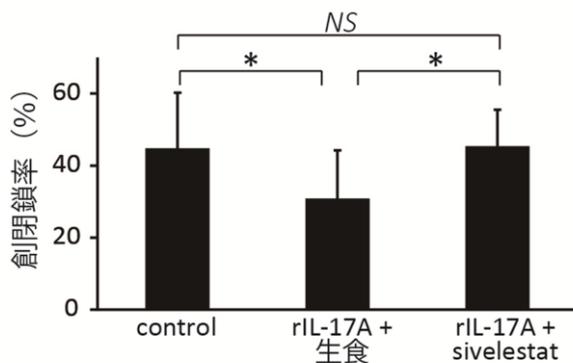


図6 rIL-17A 投与による創傷治癒遅延に対する好中球エラスターゼ阻害剤の影響

これらの結果より、IL-17A は創傷治癒過程において、好中球集積を誘導することにより治癒を阻害することが明らかとなり、この好中球集積による治癒阻害には、好中球の分泌する好中球エラスターゼの関与が示唆された。これにより、IL-17A 制御による新たな創傷治療法の可能性が示された。

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 Takagi N, Kawakami K, Kanno E, Tanno H, Takeda A, Ishii K, Imai Y, Iwakura Y, Tachi M: IL-17A promotes neutrophilic inflammation and disturbs acute wound healing in skin. *Exp Dermatol.* 2017 Feb; 26(2): 137-144. 査読有
DOI: 10.1111/exd.13115

[学会発表] (計 5 件)

① 高木尚之, 川上和義, 菅野恵美, 丹野寛大, 武田睦, 上松野りな, 石井恵子, 館正弘. IL-17A による好中球性炎症を介した創傷治癒遅延機構の解明. 第 17 回日本褥瘡学会学術集会 若手シンポジウム(2015.8.28) 仙台 (仙台国際センター)

② 高木尚之, 川上和義, 菅野恵美, 丹野寛大, 武田睦, 石井恵子, 館正弘. 創傷治癒過程における IL-17 の役割に関する研究. 第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会 (2014.10.9-10) 松本 (キッセイ文化ホール)

③ Takagi N, Kanno E, Tanno H, Takeda A, Ishii K, Iwakura Y, Kawakami K. IL-17A deficiency leads to attenuated neutrophilic inflammation and promoted wound healing in skin. 第 43 回日本免疫学会 (2014.12.10-12) 京都 (国立京都国際会館)

④ 高木尚之, 川上和義, 菅野恵美, 丹野寛大, 武田睦, 鈴木愛子, 上松野りな, 石井恵子, 館正弘. 創傷治癒における IL-17 の役割に関する研究. 第 44 回日本創傷治癒学会

(2014.12.2-3) 仙台 (メトロポリタン仙台)
⑤ 高木尚之, 川上和義, 丹野寛大, 菅野恵美, 石井恵子, 館正弘. 創傷治癒における IL-17 欠損に関する研究. 第 43 回日本創傷治癒学会 (2013.11.14-15) 大分 (別府湾ロイヤルホテル)

[その他]

ホームページ等

<http://www.prs.med.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 睦 (TAKEDA, Atsushi)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：30333800

(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

川上 和義 (KAWAKAMI, Kazuyoshi)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10253973

菅野 恵美 (KANNO, Emi)

東北大学・医学系研究科・講師

研究者番号：10431595

(3) 研究協力者

高木 尚之 (TAKAGI, Naoyuki)

東北大学・医学系研究科・助教

丹野 寛大 (TANNO, Hiromasa)

東北大学・医学系研究科・助教