



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                                     |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | 皮膚虚血再灌流障害におけるNKG2Dシステムの役割に関する研究〔論文内容及び審査の要旨〕                                                                        |
| Author(s)           | 牧田, 啓史                                                                                                              |
| Description         | 配架番号 : 2409                                                                                                         |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                               |
| Degree Name         | 博士(医学)                                                                                                              |
| Dissertation Number | 甲第13030号                                                                                                            |
| Issue Date          | 2018-03-22                                                                                                          |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/70558">https://hdl.handle.net/2115/70558</a>                                   |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                     |
| File Information    | Keishi_Makita_abstract.pdf, 論文内容の要旨                                                                                 |



## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称      博士（医 学）                      氏 名      牧田 啓史

### 学 位 論 文 題 名

皮膚虚血再灌流障害における NKG2D システムの役割に関する研究  
(Studies on the role of NKG2D-NKG2D ligand interaction in cutaneous ischemia-reperfusion injury)

【背景と目的】褥瘡は皮膚の長時間の圧迫によって生じる病変で、医療現場において広く認められる疾患である。高齢化が進む現代において、患者予後はもちろん医療経済に与える影響の観点からもますます重要な問題となっている。褥瘡が発生する外的要因としては慢性虚血が最も重要と考えられてきたが、近年、虚血再灌流 (I-R) 障害の影響が注目されている。I-R 障害では、血管内皮細胞障害や好中球・マクロファージの浸潤、炎症性サイトカインの産生によって組織のアポトーシスと壊死が生じ、特に好中球や再灌流障害組織から生じる活性酸素に起因する酸化ストレスがその中心的役割を担っているとされる。褥瘡などの慢性皮膚創傷では、創傷治癒と同時に持続する慢性炎症状態が正常の創傷治癒を妨げ、そのバランスが創傷治癒阻害側に傾いた状態が考えられている。それゆえ、褥瘡においては炎症細胞の制御がその治療戦略に重要であると考えられるが、近年、活性化レセプターである NKG2D を有する NK 細胞等のエフェクター細胞が炎症動態を制御し、創傷治癒に促進的に関与している可能性が示されている。本研究では、褥瘡における NKG2D システムの関与を明らかにするため、マウス皮膚 I-R 障害モデルを用い、NKG2D 欠損マウスと TCR $\delta$  欠損マウス、野生型マウスにおける I-R 創傷の組織学的な検討を行った。また、I-R 創傷部における NKG2D 陽性細胞の浸潤と NKG2DL の発現の有無について検討を行なった。さらに、NKG2DL の誘導因子として酸化ストレスの関与について検討を加えた。

【材料と方法】マグネットを使用した皮膚 I-R モデルを用い、NKG2D 欠損マウスと TCR $\delta$  欠損マウス、野生型マウスにおける皮膚 I-R 障害を組織学的に比較検討した。I-R 創傷における NKG2D 陽性細胞の増加と NKG2D リガンドの発現をフローサイトメトリー法、real-time PCR 法、免疫組織化学的手法を用いて検討した。また、酸化ストレス可視化マウス OKD-Luc を用いた *in vivo* イメージングや、*in vitro* で培養線維芽細胞への酸化ストレス負荷実験を行い、酸化ストレスが NKG2D リガンド誘導因子である可能性を検討した。

【結果】組織学的な検討では、NKG2D 欠損マウスならび TCR $\delta$  欠損マウスのいずれにおいても、野生型マウスと比較して I-R サイクルの直後では創傷の大きさに有意差を認めなかった。一方、I-R サイクル終了後 48 時間では NKG2D 欠損マウスで創傷サイズが有意に大きく、創傷治癒の遅延が認められた。TCR $\delta$  欠損マウスと野生型マウスでは創傷の大きさに有意差は認められなかった。NKG2D 欠損マウスでは野生型マウスと比較して I-R 創傷の辺縁部に高度な好中球の浸潤が認められ、炎症細胞浸潤の遷延が認められた。

フローサイトメトリー法を用いた NKG2D 陽性細胞の検討では、創傷部に NKG2D 陽性細胞の増加を認めた。しかしながら、エフェクター細胞の分画の特定には至らなかった。

NKG2DL の発現について、皮膚 I-R により NKG2DL、特に Rae-1 mRNA の増加が認められた。免疫組織化学的検討では、I-R 創傷の辺縁部を主体に線維芽細胞や白血球に陽性像が確認され、皮膚 I-R による局所への Rae-1 の誘導が確認された。

*In vivo* イメージングシステムを用いた酸化ストレスと *Rae-1* の発現についての検討では、酸化ストレス可視化マウスである OKD-Luc マウスにおいて、I-R 創傷と一致した環状の発光が認められ、I-R における酸化ストレスが辺縁部でより強いことが明らかとなった。線維芽細胞に対する酸化ストレス負荷実験では、*in vitro* で酸化ストレスによる線維芽細胞への *Rae-1* 誘導が確認された。

【考察】NKG2D システムは NK 細胞や NKT 細胞、DETCs の活性化因子であり、腫瘍や感染等のストレスを受けた細胞を排除する細胞傷害性を有する。一方、近年の報告では NKG2D は DETCs や NK 細胞を介して創傷治癒に促進的に働いていると報告されている。

I-R 障害の組織学的な検討では、NKG2D 欠損マウスにおいて TCR $\delta$  欠損マウスや野生型マウスと比べて創傷治癒に遅延が認められる。これは、これまでに報告されている NKG2D システムの創傷治癒における役割と合致している。DETCs が欠損した TCR $\delta$  欠損マウスで創傷治癒の遅延が報告されているが、今回の研究では創傷治癒の遅延は認められず、褥瘡においては DETCs を介した表皮再生への関与は限定的と考えられた。

NKG2D 欠損マウスで創傷治癒に遅延が認められた成因として、急性炎症細胞の浸潤の遅延が示唆された。過去の報告では、NKG2D が関与して NK 細胞が病変部の好中球浸潤を制御している可能性が報告されている。NK 細胞による好中球浸潤動態への関与の詳細なメカニズムは明らかになっていないが、過剰に集簇した好中球やリンパ球の除去を介して創傷治癒に関与している可能性などが考えられる。

本研究では、皮膚 I-R による *Rae-1* mRNA の増加が認められ、免疫組織化学的検討では、*Rae-1* 陽性細胞は I-R 創傷の辺縁から底部の線維芽細胞や白血球を主体に認められた。生体イメージングにて可視化された酸化ストレス反応の分布と *Rae-1* 発現部位、さらには組織学的に好中球集簇像の高度な領域の分布に一致が認められた。I-R 創傷部での *Rae-1* mRNA の増加と線維芽細胞に対する酸化ストレス負荷実験の結果から、酸化ストレスが *Rae-1* の誘導因子であることが示された。酸化ストレスによる NKG2D の誘導についてはいくつかの報告があるが、その分子メカニズムについては未だ不明な点が多く、今後の解明が望まれる。

I-R 障害における NKG2D システムの関与についての報告は少なく、腎臓や心臓、肝臓を対象とした移植関連モデルでの研究が少数認められるのみである。いずれの研究においても NKG2D のブロックは細胞障害の軽減につながったと報告されており、これらの内臓諸臓器では NKG2D システムがエフェクター細胞を介して細胞傷害性に働いたと捉えることができる。しかし本研究では、皮膚 I-R 障害における NKG2D システムは細胞傷害性よりもむしろ創傷治癒に対し促進的に働くことが示唆された。

【結論】褥瘡における NKG2D システムの関与が示され、NKG2D が創傷治癒促進的に働いていることが示された。また、NKG2D リガンドが酸化ストレスにより線維芽細胞などに誘導される可能性が示された。

【総括】褥瘡の病態において NKG2D システムが創傷治癒促進的に働いている可能性が示された。これまで、他臓器における検討では NKG2D の抑制は虚血再灌流障害の軽減につながるという報告がなされてきたが、褥瘡病変においては NKG2D の抑制は創傷治癒の遅延による病態の悪化につながる可能性が考えられる。皮膚虚血再灌流障害における NKG2D システムのメカニズムについては依然として不明であり、今後は NKG2D 陽性エフェクター細胞の同定とサイトカイン発現等による炎症制御機構の解明、酸化ストレスによる *Rae-1* 誘導のメカニズムについて検討が必要と考えられる。本研究は褥瘡をはじめとする難治性創傷のメカニズムの解明に寄与し、その治療戦略の一端となることが期待される。