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［全文の要約］
Author(s)	牧田，啓史
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2409 他
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	https://hdl.handle.net/2115/70559
Type	doctoral thesis
File Information	Keishi_Makita_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文（要約）

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)

2018 年 3 月

北　海　道　大　学

牧田　啓史

緒言

褥瘡は皮膚の長時間の圧迫によって生じる病変で，臨床的には，急性期病棟から長期療養施設，在宅医療の現場まで広く認められる疾患である．高齢化が進む現代においては，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．褥瘡は多因子疾患であり，大きくは内的要因と外的要因の二つに分けられ，重要な外的要因としては圧力 (pressure)，摩擦 (friction)，剪断力(shearing forces)，そして湿潤 (moisture) が挙げられる．古典的には圧迫に伴う慢性虚血が褥瘡の形成に最も重要であると考えられてきたが，近年，虚血後の再灌流障害の影響が注目されている．虚血再灌流障害は虚血部位への血流の再開によって生じる細胞障害と定義されており，血管内皮細胞障害や浮腫，血管狭窄，好中球や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を生じる．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，皮膚虚血再灌流障害においても，浸潤する好中球やマクロファージによる IL-1β や IL-6，TNF-α 等の炎症性サイトカインの産生が見られるとともに，酸素由来フリーラジカルによって皮膚線維芽細胞の壊死や障害が発生するとされている．

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な創傷治癒を妨げ，そのバランスが創傷治癒阻害側に傾いている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．NKG2D は NK 細胞以外にも大部分の NKT 細胞や $CD8^+$ αβT 細胞，一部の γδT 細胞などにも存在しており，これらの細胞では共刺激分子あるいは単独の活性化レセプターとして機能している．一方，そのリガンドである NKG2DL は腫瘍化や感染，熱刺激などのストレスによって発現が誘導され，NKG2D 陽性エフェクター細胞を活性化させる．単一のレセプターに対して複数の NKG2DL が存在し，ヒトにおいては 8 つが，マウスでは 9 つが同定されており，臓器特異的な分布や細胞ストレスの要因ごとに発現が制御されている可能性が考えられている．

NKG2D はその“デンジャーシグナル”としての役割から，感染，腫瘍，自己

免疫疾患，臓器移植まで幅広い病態でその関与が報告されている．しかし，創傷治癒における役割についての報告は未だ少なく，特に褥瘡での NKG2D の関与についての報告は認められない．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，マグネットを使用したマウス皮膚虚血再灌流障害モデルを用い，NKG2D 欠損マウスと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．NKG2D 欠損マウスでは創傷治癒の遅延が示されたことから，I-R 創傷部における NKG2D 陽性細胞の浸潤と NKG2DL 発現の検討を行なった．さらに，酸化ストレス可視化マウスを用いた生体イメージングと *in vitro* での線維芽細胞への酸化ストレス負荷実験により，NKG2DL の誘導因子の一つとして報告されている酸化ストレスの Rae-1 発現への関与を検討した．

実験方法

実験動物

NKG2D 欠損マウス，C57BL/6J (B6) マウス，OKD-Luc マウスはいずれも北海道大学大学院医学研究院附属動物実験施設または医歯学総合研究棟実験生物部門 SPF (specific pathogen-free) 環境下で飼育された．実験時のマウスの週齢は 10～16 週齢である．

虚血再灌流障害モデル

褥瘡モデルとして，背部皮膚をマグネット（直径 12 mm，厚さ 5 mm，1176 G）で挟む虚血再灌流 (I-R) モデルを用いた．本研究では Stadler らの方法を改変し，5 時間虚血 - 2 時間再灌流 - 5 時間虚血 - 12 時間再灌流を 2 回繰り返すモデルと，Real-time RT-PCR，免疫組織化学，生体イメージングの実験に対しては 12 時間の虚血を 1 回のみ加えるモデルを用いた．

組織標本の作製と免疫組織化学

採取した皮膚組織の標本作製と免疫組織化学は一般的な方法で行った．

Real-time RT-PCR

創部皮膚を採取し，液体窒素で凍結・粉砕して total RNA を抽出した．DNase

I 処理後，作製した cDNA を鋳型として，目的遺伝子の三重測定を行った．遺伝子発現の内部コントロールとして HPRT 遺伝子を用いた．

細胞分離及び細胞培養

I-R 創傷部からの細胞分離は, 創傷を全て含む一定の大きさで皮膚組織を採取し，メスによる細断後，組織分散酵素を用いて施行した．得られた細胞懸濁液を調整しフローサイトメトリー解析に用いた．また, 野生型マウスから皮下組織を採取し, 線維芽細胞を分離培養し，トリプシン処理後の細胞浮遊液をフローサイトメトリー解析に用いた．

フローサイトメトリー

I-R 創傷部より得られた細胞浮遊液は各種蛍光標識抗体を加え，洗浄後にフローサイトメトリー解析を行った．一定の大きさの皮膚組織から得られた細胞懸濁液の 1/4 を全量解析することで, 組織中に含まれるターゲット細胞の絶対数を推定した．酸化ストレス負荷を行った線維芽細胞浮遊液は，isotype control あるいは Rae-1 に対する蛍光標識抗体，7-ADD と反応後に同様にフローサイトメトリー解析を行った．

酸化ストレス負荷試験

培養線維芽細胞を用いて，亜ヒ酸ナトリウム (ASN) 添加による酸化ストレス負荷試験を行った．通常培養条件下で 80%コンフルエントとなった線維芽細胞を 3 日間無血清培地で培養した後，通常培地あるいは通常培地に ASN を添加した培地で 12 時間培養を行った．

生体イメージング

皮膚 I-R によって生じる酸化ストレスを，酸化ストレス可視化マウス OKD-Luc と IVIS® Spectrum CT で解析した．虚血 15 時間，再灌流 9 時間後の創部を撮像した．Luciferin の腹腔内投与から 15 分後，2 分間の撮像を行った．

統計解析

統計解析は Student’s *t*-test および Fisher’s exact test を用い，*P* 値 0.05 以下を有意差ありと判定した．

実験結果

NKG2D 欠損マウスでは野生型マウスより創傷サイズが大きくなる

皮膚 I-R 障害における NKG2D システムの関与を検討するため，NKG2D 欠損マウスと TCRδ 欠損マウス，および野生型マウス (B6) で I-R によって生じる創傷の組織学的検討を行った.

I-R モデル A の皮膚変化として，48 時間経過時 (I-R 4 サイクル終了直後) と 96 時間経過時 (同 48 時間後) の 2 点で，表皮の萎縮ならび脱落部の距離と再生肥厚部の距離を顕微鏡下で計測した．48 時間経過時点では，NKG2D 欠損マウスおよび TCRδ 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萎縮・脱落や再生肥厚部の距離に統計学的な有意差は認められなかった．一方，96 時間経過時点では，NKG2D 欠損マウスでは野生型マウスおよび TCRδ 欠損マウスと比較して萎縮・脱落領域が拡大していた (P = 0.0119)．TCRδ 欠損マウスでは野生型マウスと比較して統計学的な有意差は認められなかった. 皮膚 I-R における NKG2D の関与が示唆されたが，表皮再生に関与すると報告されている γδT 細胞 (DETCs) の関与は限定的と考えられた.

NKG2D 欠損マウスでは炎症の遷延が認められる

続いて，NKG2D 欠損マウスと野生型マウスで創傷部の炎症細胞浸潤を比較検討した．萎縮・脱落領域に有意差が認められた I-R モデル A 96 時間経過時において, 炎症細胞浸潤は I-R 創傷の辺縁や底部の皮下脂肪組織から皮筋層直下に強く認められた．辺縁部における好中球の浸潤強度を mild， moderate，severe の 3 段階に分けて組織学的に評価したところ，NKG2D 欠損マウスでは野生型マウスと比較してより高度な好中球浸潤が認められた (P = 0.0204).

一方，I-R モデル B 60 時間経過時 (12 時間虚血後，48 時間再灌流後) で採取した I-R 創傷を用いてフローサイトメトリー法による検討を行った．NKG2D 欠損マウスと野生型マウスで好中球の浸潤数に統計学的な有意差は認められなかった．しかし，NKG2D 欠損マウスではマクロファージの浸潤数が有意に増加していた (P = 0.006).

皮膚 I-R 創傷部で NKG2D 陽性細胞が増加している

フローサイトメトリー法にて，I-R モデル B 60 時間経過 (12 時間虚血後，48 時間再灌流) 時点における NKG2D 陽性細胞を検討した．虚血再灌流群ではコントロールの無処置群と比較して有意に NKG2D 陽性細胞数の増加が認められた ($P = 0.034$)．一方，統計学的な有意差は得られなかったが，虚血持続群と比較して NKG2D 陽性細胞数に増加傾向が認められた ($P = 0.066$)．以上から，皮膚 I-R 処置は創傷部に NKG2D 陽性細胞を増加させることが明らかとなった．

皮膚 I-R 創傷部に Rae-1 の発現増強が認められる

皮膚 I-R における NKG2DL の発現検討を行った．再灌流による影響をより明確にするため，I-R モデル B を用いた．Rae-1 mRNA は虚血開始から 12 時間まで有意な増加は認められず，虚血持続群では 24 時間以降に mRNA の軽度な増加が認められた．一方，12 時間虚血後に再灌流を行った群では，24 時間 (再灌流開始後 12 時間) をピークとして Rae-1 mRNA の増加がみられ，24 時間虚血持続群と比較しても有意な増加を認めた (虚血持続群：再灌流群 = 2.687：9.489, $P = 0.015$)．Mult-1 mRNA は虚血開始から 12 時間で mRNA の減少がみられ，その後虚血持続群では mRNA の軽度な増加が認められた．一方，再灌流群では虚血持続群と比較して mRNA の上昇が認められ，48 時間時点において虚血持続群と比較して増加が有意であった (虚血持続群 : 再灌流群 = 1.409 : 2.445, $P = 0.033$)．以上より，Rae-1 ならび Mult-1 のいずれにおいても再灌流群で虚血持続群と比較して mRNA に有意な上昇が認められ，再灌流による mRNA の上昇が示唆された．尚，NKG2DL の一つである H60c については，RT-PCR にて明らかな mRNA の増加が認められなかった．

NKG2DL mRNA の発現増加は Rae-1 でより高度であったことから，続いて Rae-1 の発現をタンパク質レベルで確認した．mRNA の上昇が最も強く認められた I-R モデル B 24 時間 (12 時間虚血後，12 時間再灌流後) の I-R 創傷を用いて Rae-1 の免疫組織化学染色を施行した．コントロールの健常皮膚では明らかな陽性細胞は認められないが，虚血再灌流後の皮膚では I-R 創傷部の辺縁や底部の皮筋層周囲に Rae-1 陽性細胞が認められた．Rae-1 陽性細胞はその細胞形態から線維芽細胞や白血球と考えられた．以上より，I-R 創傷部に Rae-1 の発現が確認され，mRNA 発現の増加を認めることから，再灌流による Rae-1 の発現誘導が局所に見られることが示唆された．

皮膚 I-R による酸化ストレスと Rae-1 の発現誘導について

I-R による組織障害には酸化ストレスが関与していることが報告されていることから，酸化ストレスと Rae-1 の発現について検討を行った．まず，I-R 創傷部の酸化ストレスの有無とその分布を検討するため，酸化ストレス可視化マウスである OKD-Luc マウスに対して 15 時間の虚血後に 9 時間の再灌流を施行し，*in vivo* イメージングシステム (IVIS® Spectrum CT) を用いて解析した. その結果，I-R 創傷と一致して背部に環状の発光が認められ，シグナル強度はリング中央より増加していた．以上より，I-R 創傷の辺縁部でより強い酸化ストレスが生じていることが明らかとなり，この結果は好中球浸潤と Rae-1 の発現が I-R 創傷の辺縁部に強く認められた結果と合致していると考えられる.

次に，酸化ストレスにより Rae-1 が誘導されうることを *in vitro* で検討した．I-R 創傷の免疫組織化学染色において線維芽細胞が Rae-1 陽性を示していることから，野生型マウスから作製した初代線維芽細胞株を用いて亜ヒ酸ナトリウム (ASN) による酸化ストレス負荷実験を行った．線維芽細胞株は通常培養下で Rae-1 を発現することが報告されており，また無血清培養により Rae-1 の発現が低下することが報告されている. 作製した線維芽細胞を無血清培地で培養後，血清を添加した通常培地に戻す群と，通常培地に加えて ASN を投与する群 (5 mmol/l, 10 mmol/l) で Rae-1 の発現をフローサイトメトリーにて検討した. 結果，通常培地に ASN を 10 mmol/l 加えた群では通常培地に戻した群と比較して有意に MFI が高値であった．統計学的な有意差は認められなかったが，ASN 濃度依存性に MFI の増加傾向が認められ，線維芽細胞への酸化ストレスの負荷による Rae-1 誘導が考えられた.

以上の結果を総合して，I-R 創傷部において酸化ストレスが誘因となって線維芽細胞が Rae-1 を発現し，NKG2D 陽性細胞を活性化している可能性が示唆された.

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，近年は NKG2D に関して皮膚の deep injury や角膜 abrasion の研究が報告されており，マウス皮膚 γδ T 細胞である樹枝状表皮 T 細胞 (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．

褥瘡は慢性皮膚創傷の代表であり，創傷治癒と同時に進行する慢性炎症状態により正常な創傷治癒のバランスが崩れた状態と考えられている．皮膚の組織障害機序として虚血再灌流障害が注目されており，NKG2D の褥瘡における役割を明らかにする目的で本研究を行った．

I-R 障害の組織学的な比較では，NKG2D 欠損マウスでは TCRδ 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た．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 TCRδ 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なかった．褥瘡は皮膚を構成する組織の虚血への抵抗力の差から，皮膚深部により高度な障害が生じることが報告されており，深部に比して表皮の障害が相対的に弱い褥瘡においては DETCs を介した表皮再生への関与が限定的であった可能性が考えられる．

今回, NKG2D 欠損マウスで I-R 後の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遷延が示唆された．角膜 abrasion の研究では，NKG2D が関与して NK 細胞が病変部の好中球浸潤の程度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，NKG2D 陽性細胞が老化した細胞の除去や望ましくない炎症の抑制などに関与しているとの報告があり，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が考えられる．詳細な機序の解明のためには，NKG2D 陽性細胞の同定と炎症細胞の制御に関わる炎症性サイトカイン等の検討が必要と考えられるが，本研究では十分な細胞数のターゲット細胞を得ることができず，特定には至らなかった．

本研究では，皮膚 I-R による Rae-1 mRNA の産生亢進が認められ，免疫組織化学的検討では，Rae-1 陽性細胞は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．今回用いたマグネットの脱着による I-R モデルでは，再灌流は周囲の健常皮膚組織から供給されるため，再灌流に伴う酸化ストレスは創傷辺縁部により強く生じると推測される．生体イメージングの検討では，I-R 創傷の辺縁部に酸化ストレスがより強く生じていることが確認された．可視化された酸化ストレス反応と Rae-1 発現部位，さらには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 の上昇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．一方，NKG2DL を誘導する要因として E2F 転写因子を介した細胞の過剰増殖が報告されており，治癒過程の創傷部など細胞増殖が活発な部位で Rae-1 の発現が報告されている．Rae-1 は酸化ストレスと細胞増殖の双方による発現誘導が加わり，創傷治癒に働いている可能性も考えられる．

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 のブロッキングは細胞障害の軽減につながったと報告されている．すなわち，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，皮膚の 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を促進性に働くことが示唆された．これは，皮膚の特性として内臓諸臓器に比べて酸化ストレスに耐性がある点や，皮膚の圧迫虚血では他の移植モデルの研究と異なり血流遮断が緩徐である点などが影響していると考えられる．

本研究は，褥瘡における NKG2D システムの関与を明らかにし，その欠損が創傷治癒の遅延につながることを提示した．また，NKG2D リガンドが酸化ストレスにより誘導されることを示した．これまで，他臓器における検討では NKG2D の抑制は I-R 障害の軽減につながるとの報告がなされてきたが，皮膚の I-R 病変である褥瘡においては，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示された．本研究は褥瘡をはじめとする難治性創傷のメカニズム解明の一端となり，NKG2D システムの活性化等を介した新しい治療戦略への道筋を拓くことが期待される．

総括および結論

本研究によって得られた新知見は以下の通りである．

・NKG2D 欠損マウスでは野生型マウスと比較して皮膚虚血再灌流障害の早期には創傷の大きさに有意差は見られないが，2 日後には創傷サイズが大きくなり，創傷治癒の遅延が認められる．
・NKG2D 欠損マウスでは野生型マウスと比較して好中球浸潤が高度に認められ，炎症の遷延による創傷治癒の遅延が示唆される．
・TCRδ 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ず，皮膚虚血再灌流障害においては DETCs を介した表皮再生への関与は限定的と考えられる．
・虚血再灌流による Rae-1 mRNA の増加，免疫組織化学的検討における局所への Rae-1 誘導，さらに酸化ストレス可視化マウスを用いた生体イメージングの検討から，酸化ストレスが誘因となり線維芽細胞等に Rae-1 が発現誘導される．

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の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なままであり，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．