



|                     |   |
|---------------------|---|
| 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   |
| 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  |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k13030">https://doi.org/10.14943/doctoral.k13030</a> |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/88826">https://hdl.handle.net/2115/88826</a>               |
| Type                | doctoral thesis   |
| File Information    | Keishi_Makita.pdf   |



# 学 位 論 文

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

# 目 次

|                           |      |
|---------------------------|------|
| 発表論文目録および学会発表目録 . . . . . | 1 頁  |
| 緒言 . . . . .              | 2 頁  |
| 略語表 . . . . .             | 5 頁  |
| 実験方法 . . . . .            | 6 頁  |
| 実験結果 . . . . .            | 10 頁 |
| 考察 . . . . .              | 19 頁 |
| 総括および結論 . . . . .         | 22 頁 |
| 謝辞 . . . . .              | 23 頁 |
| 引用文献 . . . . .            | 24 頁 |

## 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Keishi Makita, Noriyuki Otsuka, Utano Tomaru, Masanori Kasahara  
Involvement of NKG2D-NKG2D Ligand Interaction in Cutaneous Ischemia-  
Reperfusion Injury. *Experimental and Molecular Pathology*, submitted.

## 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<sup>1</sup>。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<sup>2,3</sup>。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が発生に関与している。100以上のリスクファクターが報告されているが<sup>4</sup>、最も重要な内的要因としては不動 (immobility)、低栄養 (malnutrition)、灌流障害 (reduced perfusion)、そして感覚消失 (sensory loss) が挙げられる。一方、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<sup>5</sup>。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<sup>6,7</sup>。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<sup>8</sup>。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<sup>9</sup>、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-1 $\beta$  や IL-6, TNF- $\alpha$  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<sup>10</sup>。

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<sup>11</sup>。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<sup>12,13</sup>。NKG2D は NK 細胞以外にも大部分の NKT 細胞や CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$ T 細胞、一部の  $\gamma\delta$ T 細胞などにも存在しており<sup>14,15</sup>、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<sup>16-18</sup>。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<sup>15</sup> (図 1)。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<sup>15</sup> (図 2), 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<sup>15</sup>.

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<sup>14</sup>. 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<sup>14</sup> の Rac-1 発現への関与を検討した.

**NKG2D** (Natural-killer group 2, member D)

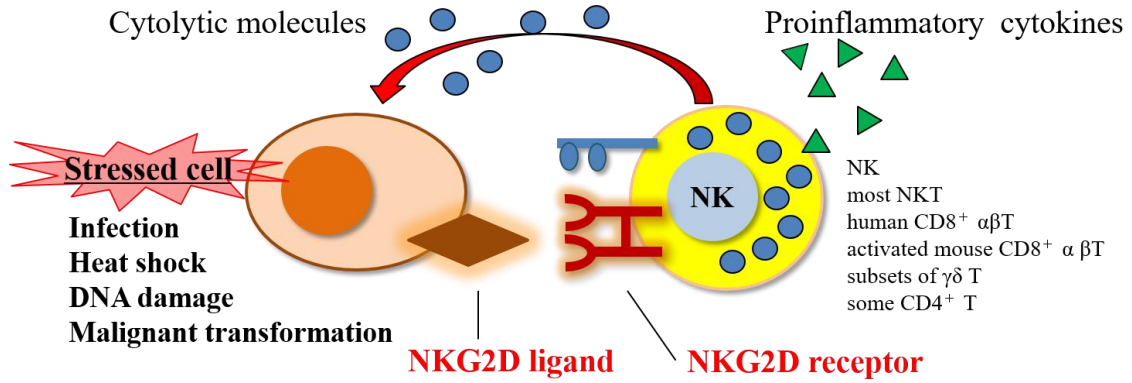
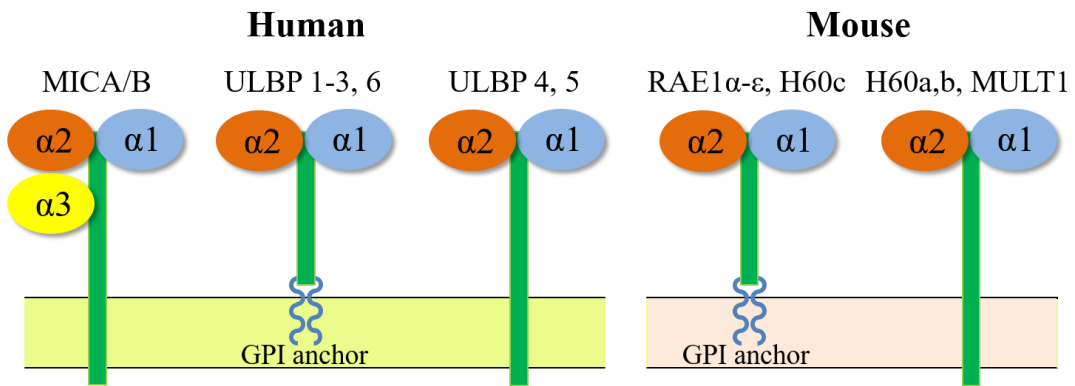


図 1. NKG2D システムの概要 感染，DNA 損傷，腫瘍化等のストレスを受けた細胞は NKG2DL を発現し，NKG2D を介して NK 細胞等を活性化し，細胞傷害を受ける。



MICA/B, MHC class I-related chains A/B; ULBP1-6, UL16-binding protein 1-6; RAE1 $\alpha$ - $\epsilon$ , retinoic acid early inducible 1  $\alpha$ - $\epsilon$ ; H60a-c, histocompatibility 60a-c; MULT1, murine UL-16 binding protein-like transcript 1

図 2. ヒト，マウス NKG2DL の多様性 ヒトでは 8 種，マウスでは 9 種の NKG2DL が同定されており，MHC 様  $\alpha$  ドメインの共有を特徴としている．臓器特異的あるいは細胞ストレス要因別の発現制御の可能性が考えられている．

## 略語表

本文および図中で使用した略語は以下のとおりである.

|        |   |
|--------|---|
| DETCs  | dendritic epidermal T cells                     |
| FBS    | fetal bovine serum                              |
| H60    | histocompatibility-60                           |
| HPRT   | hypoxanthine phosphoribosyltransferase          |
| I-R    | ischemia-reperfusion                            |
| MFI    | mean fluorescence intensity                     |
| MHC    | major histocompatibility complex                |
| MICA   | MHC class I-related chains A                    |
| MICB   | MHC class I-related chains B                    |
| MULT-1 | mouse UL16-binding protein-like transcript 1    |
| NK     | natural killer                                  |
| NKG2D  | natural killer group 2 member D                 |
| PCR    | polymerase chain reaction                       |
| Rae-1  | retinoic acid early inducible-1                 |
| RT-PCR | reverse transcription-polymerase chain reaction |
| SDF    | stromal cell derived factor                     |
| ULBP   | UL16-binding protein                            |
| VEGF   | vascular endothelial growth factor              |



## 実験方法

### 実験動物

NKG2D 欠損マウスは Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), C57BL/6J (B6) マウスは日本チャールズリバー (Yokohama, Japan), OKD-Luc マウスは株式会社トランスジェニック (Fukuoka, Japan) より購入した。いずれのマウス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) 環境下で繁殖させた。実験時のマウスの週齢は 10 ~16 週齢である。動物実験は北海道大学動物実験委員会の承認を受け、国立大学法人北海道大学の動物実験に関する規定に従い施行した。

### 抗体

実験に用いた抗体は以下のとおりである。

Mouse Rae-1 Pan Specific Antibody (R&D systems, Minneapolis, MN), anti-mRae-1 (pan-specific) Phycoerythrin Conjugated Rat IgG (R&D systems), APC anti-mouse CD314 (NKG2D) (BioLegend, San Diego, CA), Brilliant Violet 510™ anti-mouse NK-1.1 (BioLegend), APC anti-mouse Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) (BioLegend), PE Rat Anti-Mouse CD45 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), Hamster Anti-Mouse CD3e-FITC (BECKMAN COULTER, Brea, CA), 7-AAD Viability Staining Solution (BioLegend), PE/Cy7 anti-mouse CD68 (BioLegend), HRP-conjugated rabbit anti-mouse secondary Ab (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)

### 虚血再灌流障害モデル

褥瘡モデルとして、マグネットの着脱を用いた虚血再灌流 (I-R) モデル (図 3C) <sup>19</sup> を用いた。ジエチルエーテルによる麻酔下でマウス背部体毛をバリカンで刈り、背部皮膚を直径 12 mm, 厚さ 5 mm, 平均重量 2.82 g, 1176 G のマグネット (マグファイン, Sendai, Japan) で圧迫した。マグネットにより圧迫されるのは表皮, 真皮, 皮下脂肪組織, 皮筋層とその直下の結合組織である。この操作により 50 mmHg の圧力がマグネットの間の皮膚に加わり, 血流の 80%が減少し, 皮膚の壊死を生じさせるのに十分であると報告されている <sup>7,19</sup>。本研究では Stadler らの方法 <sup>19</sup> を改変し, より臨床的状況に則した虚血と再灌流の繰り返しを想定して 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。

返すモデル (4 回の I-R が加わる) を採用した (図 3A). Real-time RT-PCR, 免疫組織化学, IVIS®を用いた生体イメージングの実験においては, I-R の影響を単純化して比較するため, 12 時間の虚血を 1 回のみ加える操作を行った (図 3B). マグネットを装着中のマウスは自由給餌・給水とし, ケージ内での行動制限は行わなかった. 上記の処置により左右の背部に正常皮膚を挟んで 2 ヶ所の円形の創が形成された (図 3D). すべての組織は麻酔による安楽死後に採取した.

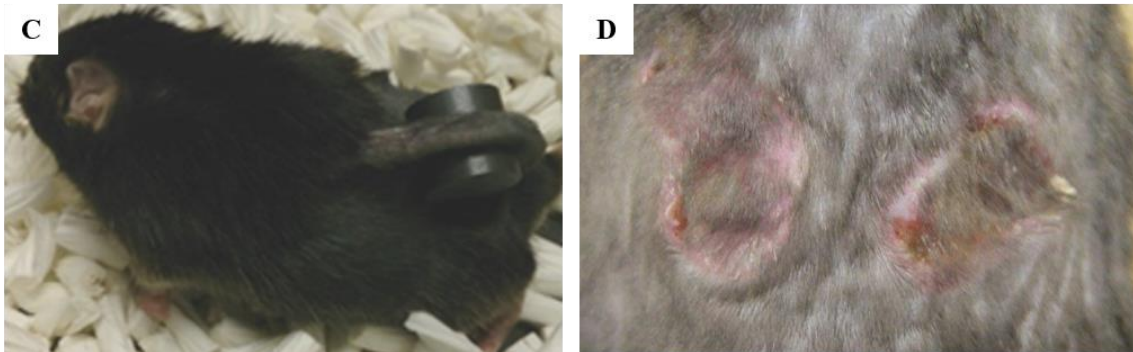
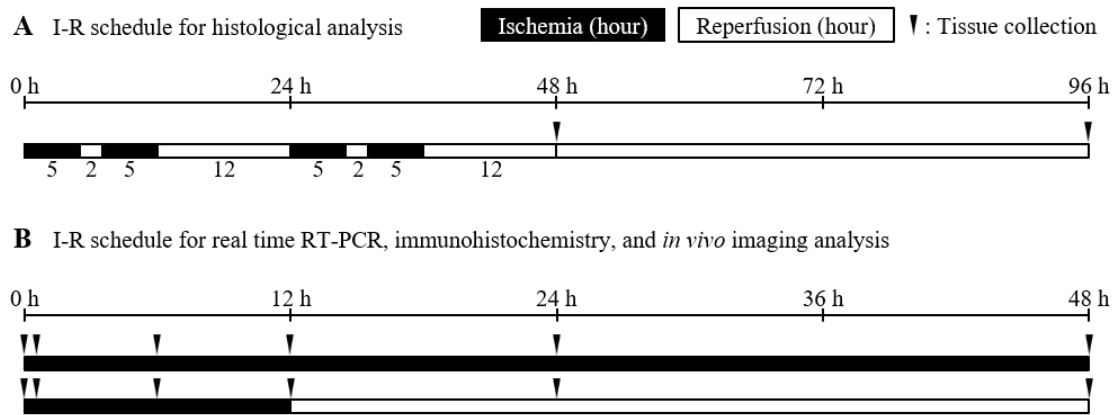


図 3. マウス皮膚虚血再灌流モデル (A) (B) 本研究に用いた I-R モデルの実験スケジュール. (C) 背部皮膚をマグネットで圧迫した状態のマウス. (D) I-R 終了後の背部皮膚.

### 組織標本の作製と免疫組織化学

採取した皮膚組織は, ろ紙に張り付けた後, 10%中性ホルマリンで 16~48 時間固定し, 創部中央を含む 5 mm 幅で切り出してパラフィン包埋を行った. 切片の厚さは 4  $\mu\text{m}$  で薄切し, 標本の作製と hematoxylin and eosin 染色は一般的な方法で行った. 免疫組織化学では, 未染標本を脱パラフィン後, 3%過酸化水素による内因性ペルオキシダーゼ処理を 5 分間行い, pH6.0, 97°C で 20 分間抗原賦

活化処理 (EnVision FLEX, Dako, Denmark) を行った。室温で1時間, 10%正常ウサギ血清にてブロッキングを行った後, 一次抗体 (抗 Rae-1 抗体) を 4°C で一晚反応させた。HRP 標識二次抗体を室温で 45 分反応させた後, DAB (Dako) を用いて発色させ, マイヤーヘマトキシリン溶液にてカウンター染色を行った。

## Real-time RT-PCR

創部皮膚を採取し, 液体窒素で凍結・粉砕して isogen (ニッポンジーン, Tokyo, Japan) を用いて total RNA を抽出した。未処置正常背部皮膚を対照群とした。DNase I (Invitrogen, Waltham, MA) 処理後, GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI) を用いて cDNA を合成した。作製した cDNA を鋳型として, GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) を用いて三重測定を行った。PCR 条件は 95°C - 2 分の後, 95°C - 15 秒, 60°C - 1 分を 40 サイクルとした。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。

表 1. 使用したプライマーの塩基配列

| 遺伝子名   | 方向      | 塩基配列 (5'-3')          |
|--------|---------|-----------------------|
| Rae1   | Forward | TGGACACTCACAAGACCAATG |
|        | Reverse | CCCAGGTGGCACTAGGAGT   |
| Mult-1 | Forward | CAATGTCTCTGTCCTCGGAA  |
|        | Reverse | CTGAACACGTCTCAGGCACT  |
| HPRT   | Forward | GTTGGGCTTACCTCACTGCT  |
|        | Reverse | TAATCACGACGCTGGGACTG  |

## 細胞分離及び細胞培養

I-R 創傷部からの細胞分離には, I-R 創傷を全て含む一定の大きさで皮膚組織を採取し, メスにより細断した後, 組織分散酵素 {1% FCS, liberase TL 0.2 mg/ml (Roche, Indianapolis, IN), DNase I 0.26 WU/ml (Roche) 添加 RPMI} を用いて 37°C, 2 時間酵素消化を施行した。得られた細胞懸濁液を MACS buffer で 2 回洗浄後に細胞浮遊液を調整しフローサイトメトリー解析に用いた。また, 野生型マウスの背部より皮下組織を採取し, 線維芽細胞を分離培養した。培養は 10% FBS, Penicillin-Streptomycin (GIBCO, Waltham, MA) を含む RPMI1640 (SIGMA, St. Louis, MO) を用いた。酸化ストレス負荷実験には 4~5 passages の細胞を用い, 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、4°C、30 分間反応させ、MACS buffer による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。測定には FACS Cant II フローサイトメーター (BD Bioscience) を用い、得られたデータは CELL QUEST software (BD Bioscience) で解析した。

## 酸化ストレス負荷試験

培養線維芽細胞を用いて、亜硝酸ナトリウム (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 (図 12 の 0%に相当, 以下同様), 通常培地 (0-10%), 通常培地に ASN 5 mmol/ml を添加した培地 (0-10%+ASN5), 通常培地に ASN 10 mmol/ml を添加した培地 (0-10%+ASN10) で 12 時間培養を行った。

## 生体イメージング

酸化ストレス可視化マウス OKD-Luc を用いて、皮膚 I-R によって生じる酸化ストレスを IVIS<sup>®</sup> Spectrum CT (PerkinElmer, Waltham, MA) で解析した。OKD-Luc マウスの背部皮膚にマグネットによる虚血を 15 時間加え、再灌流後 9 時間の創部を撮像した。マウスに luciferin (promega) 150 mg/kg を腹腔内投与し、5 分後に三種混合麻酔 (medetomidine chloride 0.3mg/kg + midazolam 4mg/kg + butorphanol tartrate 5mg/kg) を腹腔内投与した。Luciferin の投与から 15 分後、IVIS Spectrum CT で 2 分間の撮像を行った。得られた測定結果より photon/second/cm<sup>2</sup> を算出して luciferase 活性を定量化して解析した。

## 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 TCR $\delta$  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 (図 4).

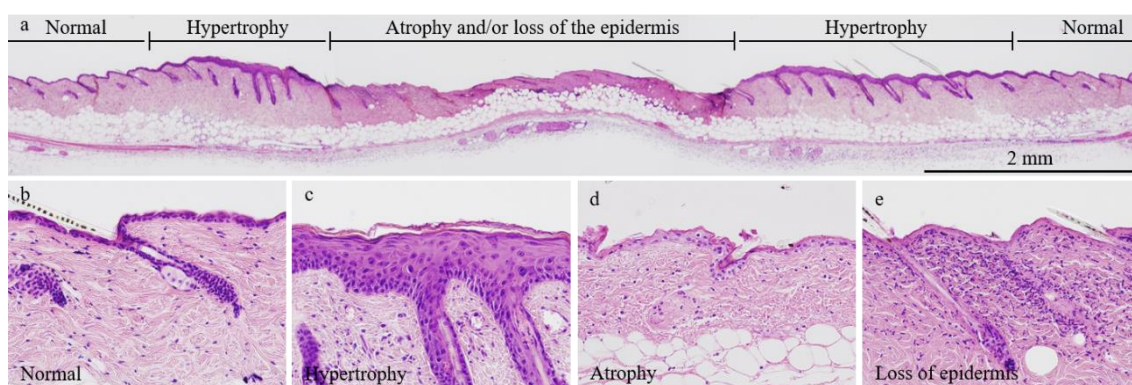


図 4. I-R によって生じる皮膚病変 上段 : (a) B6 マウス, I-R モデル A 96 時間経過時 (4 回の I-R サイクル後, 48 時間経過) における代表的な組織像. 中央部に表皮の萎縮 (Atrophy)・脱落 (Loss of epidermis) を認め, その外側に再生肥厚 (Hypertrophy), 健全部 (Normal) が連続する. 下段 : (a) の各部の拡大像. 左から (b) 健全部, (c) 再生肥厚, (d) 萎縮, (e) 表皮脱落の代表的組織像を示す.

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 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 (図 5). 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 TCR $\delta$  欠損マウスと比較して萎縮・脱落領域が拡大していた ( $P=0.0119$ ) (図 5). TCR $\delta$  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  $\gamma\delta$ T 細胞 (DETCs) の関与は限定的と考えられた.

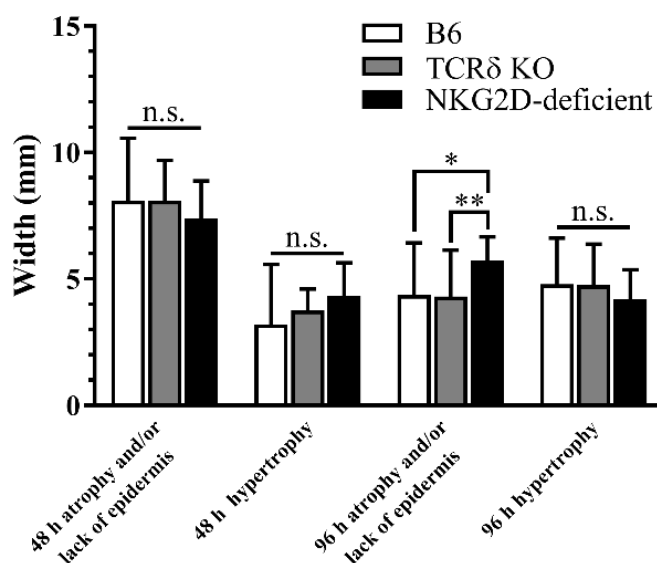
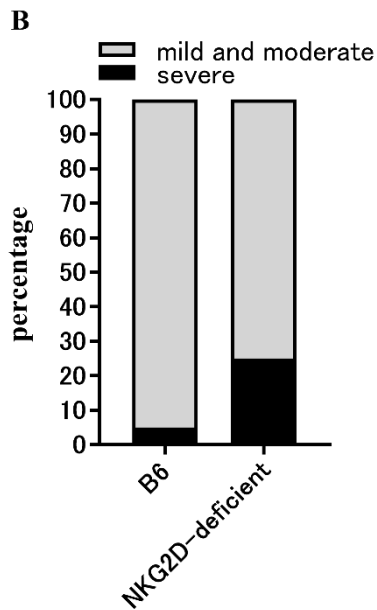
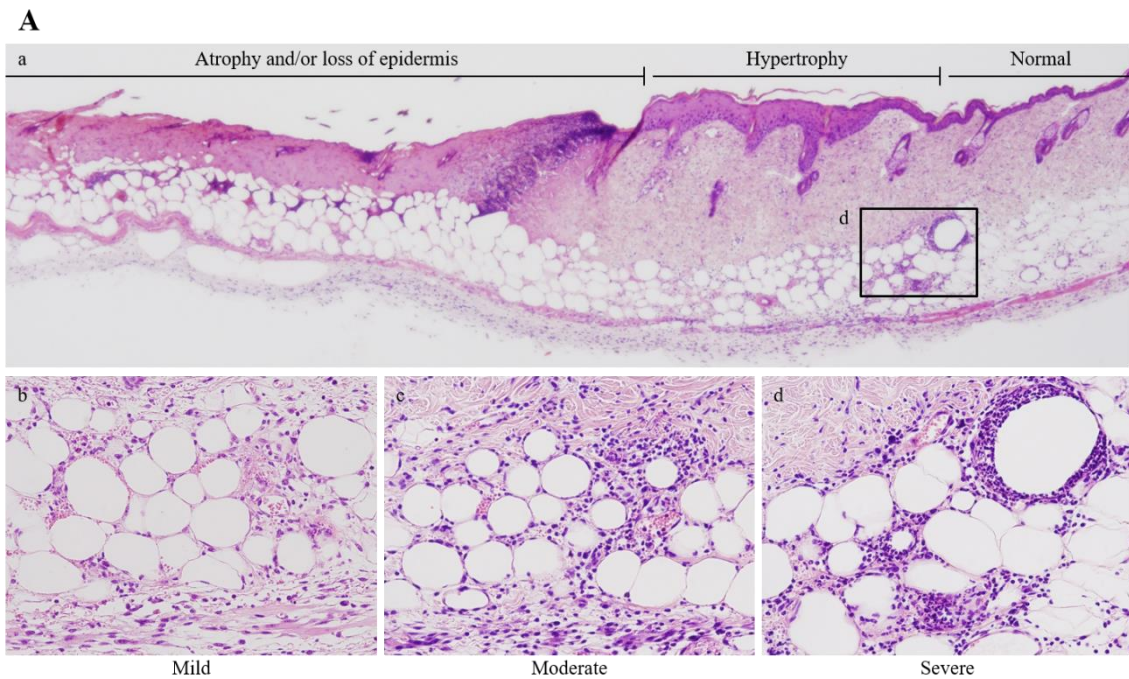


図 5. I-R 創傷の組織学的検討 表皮の萎縮・脱落，再生肥厚の距離を顕微鏡下で計測した．各系統各時間あたり  $n = 10-21$ . \* $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

### 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 (図 6Aa)．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 (図 6Ab~d)，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 ( $P = 0.0204$ ) (図 6B)．

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 (図 7A)．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 ( $P = 0.006$ ) (図 7B)．



**図 6. I-R 創傷辺縁部における好中球浸潤**

(Aa) 炎症細胞浸潤は I-R 創傷の辺縁や底部に強く認められる. (Ab-d) 好中球の浸潤強度を mild, moderate, severe の三段階で評価した. それぞれの代表的組織像を示す. (B) NKG2D 欠損マウスでより高度な好中球の浸潤が認められる (Fisher's exact test,  $P=0.0204$ ). 野生型マウス:  $n=40$ , NKG2D 欠損マウス  $n=36$ .

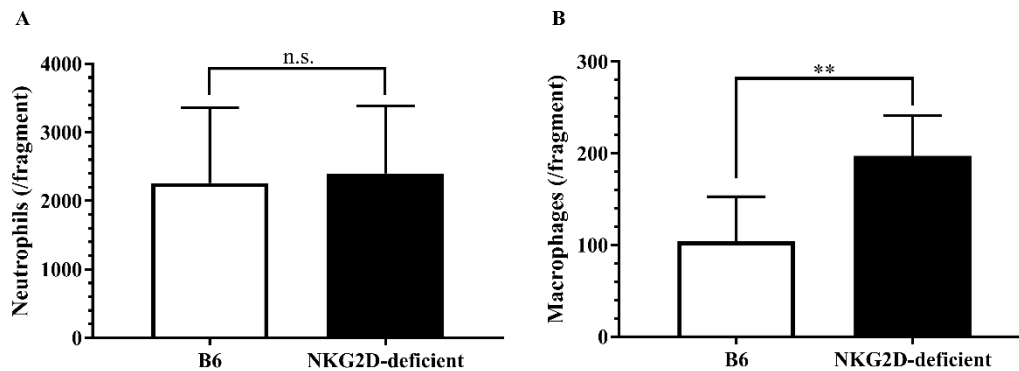


図7. フローサイトメトリー法による炎症細胞浸潤の評価 I-R モデル B 60 時間経過時 (12 時間虚血後, 48 時間再灌流後) の炎症細胞浸潤. 一定の大きさの皮膚組織から得られた細胞懸濁液の 1/4 を全量解析することで, 組織中に含まれるターゲット細胞の絶対数を推定した. (A) NKG2D 欠損マウスと野生型マウスの好中球の浸潤数に統計学的な有意差は認められなかった. (B) NKG2D 欠損マウスではマクロファージの浸潤数が有意に増加していた. 各系統  $n = 6$ . \*\* $P < 0.01$ .

### 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 ( $P = 0.034$ ) (図 8). 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 ( $P = 0.066$ ) (図 8). 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.



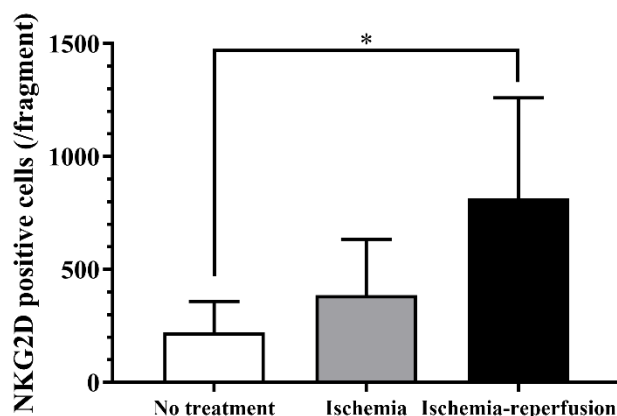


図 8. I-R 創傷部における NKG2D 陽性細胞浸潤数 虚血再灌流障害により NKG2D 陽性細胞数の増加が認められる. 各条件  $n = 4-6$ .  $*P < 0.05$ .

### 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 (図 3) 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 (図 9A). 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,  $P = 0.015$ ) (図 9A). 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 (図 9B). 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,  $P = 0.033$ ) (図 9B). 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 (データ未掲載).

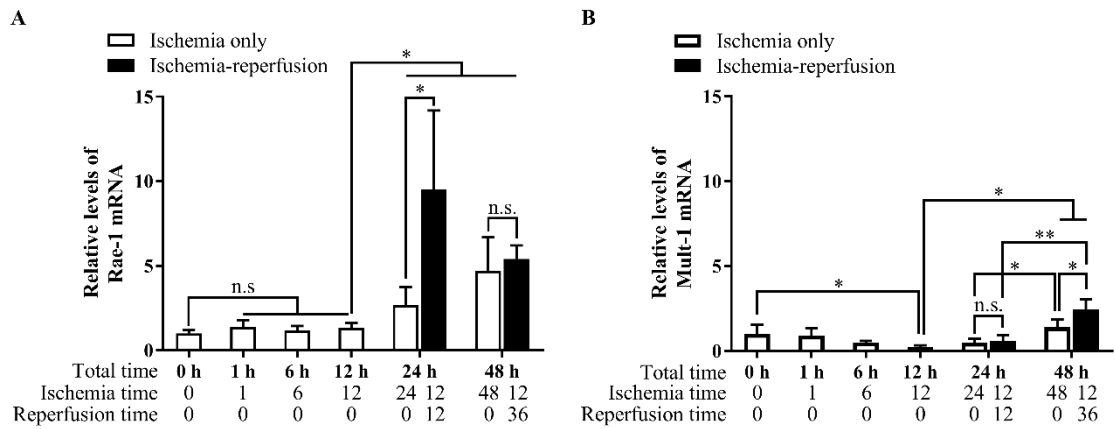


図9. 皮膚虚血再灌流における NKG2DL mRNA の変動 (A) Rae-1 mRNA, (B) Mult-1 mRNA. それぞれ 0-12 時間虚血後, 12 時間以降は再灌流群 (黒) と虚血持続群 (白) に分けて検討した. いずれも野生型マウスで, 各条件  $n = 4-6$ .  $*P < 0.05$ .

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 (図 10j), 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 (図 10d, g). 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 (図 10f, i). 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.

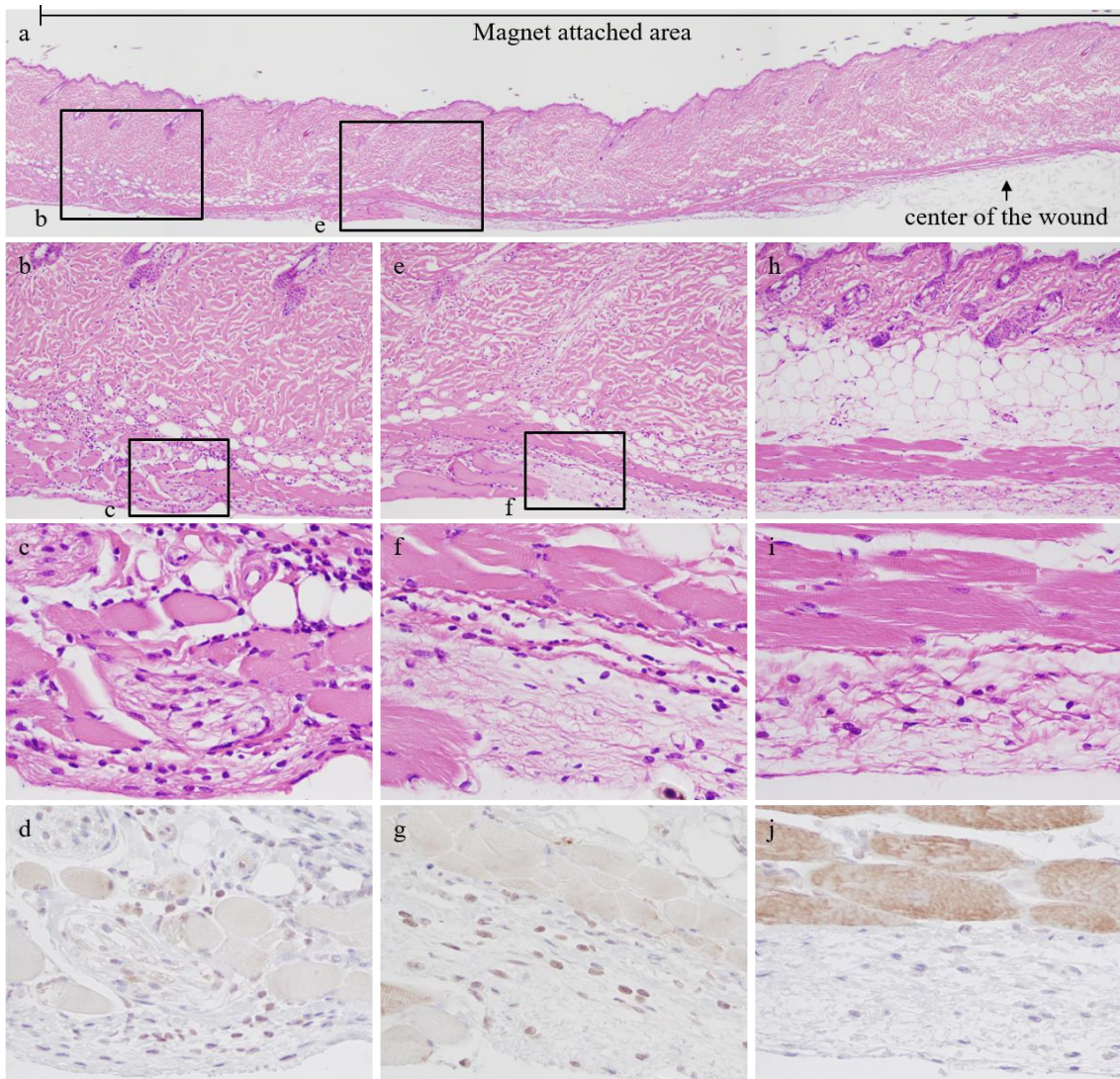


図 10. I-R 創傷部における **Rae-1** の免疫組織化学 (a) I-R モデル B 24 時間における病変部の弱拡大像. (b~d) I-R 創傷の辺縁. (e~g) 底部. (a-c, e, f, h, i) HE 染色. (d, g, j) 免疫組織化学 **Rae-1** 染色. 辺縁部 (d) と底部 (g) において **Rae-1** 陽性紡錘形細胞と白血球が認められる. (h~j) は健常部コントロール. (c) と (f) と (i) はそれぞれ **Rae-1** 免疫組織化学の (d) と (g) に (j) に対応している. 皮筋層の染色は非特異的な染色と考えられる.

### 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<sup>9</sup>, 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<sup>®</sup> 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 (図 11), 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。

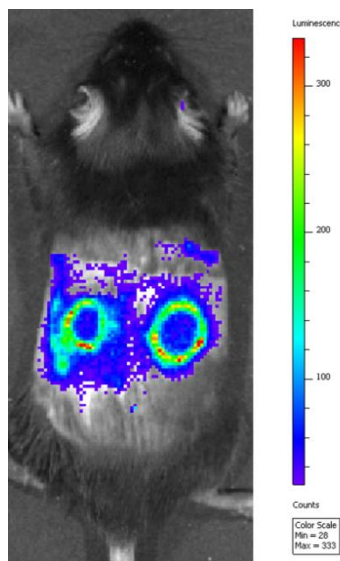


図 11. 皮膚 I-R による酸化ストレスの生体イメージング解析

次に、酸化ストレスにより **Rae-1** が誘導されることを *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 (図 10), 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硝酸ナトリウム (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<sup>20</sup>。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、通常培地に加え 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 (図 12)。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。

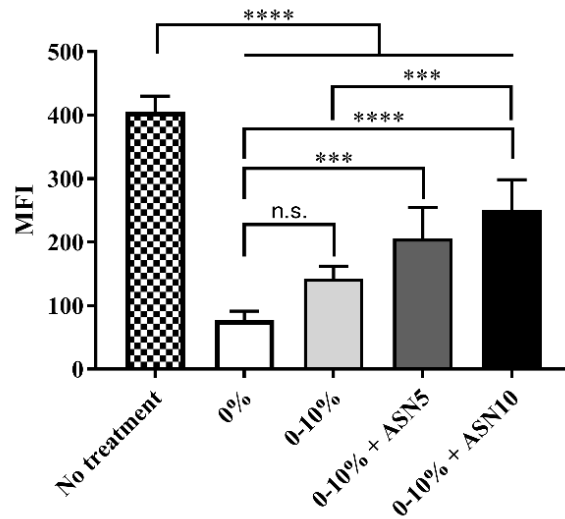


図 12. 線維芽細胞に対する酸化ストレス負荷実験 線維芽細胞を無血清培地で 3 日間培養後 (図の 0%に相当, 以下同様), 通常培地に戻した群 (0-10%) と通常培地に ASN を加えた群 (0-10%+ASN5, 0-10%+ASN10) に分けて MFI を測定した. ASN に続く数字は ASN の投与量 (mmol/l)を示す. 各条件  $n = 5$ . \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

## 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<sup>12</sup> や角膜 abrasion<sup>13</sup> の研究が報告されており, マウス皮膚  $\gamma\delta$  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<sup>11</sup>. 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 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 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<sup>21</sup>, 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<sup>13</sup>. 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<sup>22,23</sup> や望ましくない炎症の抑制<sup>24,25</sup> 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. 今回, I-R 創傷部に浸潤する NKG2D 陽性細胞の分画を確定するために十分な細胞数のターゲット細胞 (NK1.1<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>: NK cells, NK1.1<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>: NKT cells, NK1.1<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>: conventional T cells) を得ることができず, 特定に至らなかった.

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 (図 9), 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 (図 10). 今回用いたマグネットの脱着による I-R モデルでは, 再灌流は周囲の健全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. 酸化ストレス可視化マウスを用いた生体イメージングでは, 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 (図 11). 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 (図 12) 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<sup>26-29</sup>, 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<sup>20</sup>. 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<sup>30-32</sup> や心臓<sup>33</sup>, 肝臓<sup>34</sup> 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。
- 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。

## 謝辞

稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えて下さいました北海道大学大学院医学研究院分子病理学教室 笠原正典教授に感謝いたします。

また，本研究において直接ご指導を下さいました北海道大学大学院医学研究院分子病理学教室 大塚紀幸助教ならびに外丸詩野准教授に深く感謝いたします。

最後に，本研究を支えて下さった，分子病理学教室，北海道大学病院病理診断科の皆様にご心より御礼申し上げます。

## 引用文献

- 1 Kanj, L. F., Wilking, S. V. & Phillips, T. J. Pressure ulcers. *J Am Acad Dermatol* **38**, 517-536(1998).
- 2 Gorecki, C., Brown, J. M., Nelson, E. A., Briggs, M., Schoonhoven, L., Dealey, C., Defloor, T. & Nixon, J. Impact of pressure ulcers on quality of life in older patients: a systematic review. *J Am Geriatr Soc* **57**, 1175-1183(2009).
- 3 Bickers, D. R., Lim, H. W., Margolis, D., Weinstock, M. A., Goodman, C., Faulkner, E., Gould, C., Gemmen, E. & Dall, T. The burden of skin diseases: 2004 a joint project of the American Academy of Dermatology Association and the Society for Investigative Dermatology. *J Am Acad Dermatol* **55**, 490-500(2006).
- 4 Lyder, C. H. Pressure ulcer prevention and management. *Jama* **289**, 223-226(2003).
- 5 Reuler, J. B. & Cooney, T. G. The pressure sore: pathophysiology and principles of management. *Ann Intern Med* **94**, 661-666(1981).
- 6 Salcido, R., Donofrio, J. C., Fisher, S. B., LeGrand, E. K., Dickey, K., Carney, J. M., Schosser, R. & Liang, R. Histopathology of pressure ulcers as a result of sequential computer-controlled pressure sessions in a fuzzy rat model. *Adv Wound Care* **7**, 23-24, 26, 28 passim(1994).
- 7 Peirce, S. M., Skalak, T. C. & Rodeheaver, G. T. Ischemia-reperfusion injury in chronic pressure ulcer formation: a skin model in the rat. *Wound Repair Regen* **8**, 68-76(2000).
- 8 Eltzschig, H. K. & Eckle, T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med* **17**, 1391-1401(2011).
- 9 Carden, D. L. & Granger, D. N. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* **190**, 255-266(2000).
- 10 Saito, Y., Hasegawa, M., Fujimoto, M., Matsushita, T., Horikawa, M., Takenaka, M., Ogawa, F., Sugama, J., Steeber, D. A., Sato, S. & Takehara, K. The loss of MCP-1 attenuates cutaneous ischemia-reperfusion injury in a mouse model of pressure ulcer. *J Invest Dermatol* **128**(2008).
- 11 Zhao, R., Liang, H., Clarke, E., Jackson, C. & Xue, M. Inflammation in Chronic Wounds. *Int J Mol Sci* **17**(2016).
- 12 Yoshida, S., Mohamed, R. H., Kajikawa, M., Koizumi, J., Tanaka, M., Fugo, K., Otsuka, N., Maenaka, K., Yagita, H., Chiba, H. & Kasahara, M. Involvement of

- an NKG2D ligand H60c in epidermal dendritic T cell-mediated wound repair. *J Immunol* **188**, 3972-3979(2012).
- 13 Liu, Q., Smith, C. W., Zhang, W., Burns, A. R. & Li, Z. NK cells modulate the inflammatory response to corneal epithelial abrasion and thereby support wound healing. *Am J Pathol* **181**, 452-462(2012).
- 14 Carapito, R. & Bahram, S. Genetics, genomics, and evolutionary biology of NKG2D ligands. *Immunol Rev* **267**, 88-116(2015).
- 15 Raulet, D. H., Gasser, S., Gowen, B. G., Deng, W. & Jung, H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol* **31**, 413-441(2013).
- 16 Whang, M. I., Guerra, N. & Raulet, D. H. Costimulation of dendritic epidermal gammadelta T cells by a new NKG2D ligand expressed specifically in the skin. *J Immunol* **182**, 4557-4564(2009).
- 17 Girardi, M., Oppenheim, D. E., Steele, C. R., Lewis, J. M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R. E. & Hayday, A. C. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* **294**, 605-609(2001).
- 18 Groh, V., Rhinehart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M. S., Riddell, S. R. & Spies, T. Costimulation of CD8alpha beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* **2**, 255-260(2001).
- 19 Stadler, I., Zhang, R. Y., Oskoui, P., Whittaker, M. S. & Lanzafame, R. J. Development of a simple, noninvasive, clinically relevant model of pressure ulcers in the mouse. *J Invest Surg* **17**, 221-227(2004).
- 20 Jung, H., Hsiung, B., Pestal, K., Procyk, E. & Raulet, D. H. RAE-1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by E2F transcription factors, which control cell cycle entry. *J Exp Med* **209**, 2409-2422(2012).
- 21 Thomas, D. R. Does pressure cause pressure ulcers? An inquiry into the etiology of pressure ulcers. *J Am Med Dir Assoc* **11**, 397-405(2010).
- 22 Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R. A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L. & Lowe, S. W. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* **134**, 657-667(2008).
- 23 Radaeva, S., Sun, R., Jaruga, B., Nguyen, V. T., Tian, Z. & Gao, B. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology* **130**, 435-452(2006).
- 24 Cerboni, C., Zingoni, A., Cippitelli, M., Piccoli, M., Frati, L. & Santoni, A. Antigen-activated human T lymphocytes express cell-surface NKG2D ligands

- via an ATM/ATR-dependent mechanism and become susceptible to autologous NK- cell lysis. *Blood* **110**, 606-615(2007).
- 25 Rabinovich, B. A., Li, J., Shannon, J., Hurren, R., Chalupny, J., Cosman, D. & Miller, R. G. Activated, but not resting, T cells can be recognized and killed by syngeneic NK cells. *J Immunol* **170**, 3572-3576(2003).
- 26 Yamamoto, K., Fujiyama, Y., Andoh, A., Bamba, T. & Okabe, H. Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in the human colon carcinoma cell line (CaCo-2). *Biochim Biophys Acta* **1526**, 10-12(2001).
- 27 Borchers, M. T., Harris, N. L., Wesselkamper, S. C., Vitucci, M. & Cosman, D. NKG2D ligands are expressed on stressed human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **291**, L222-231(2006).
- 28 Soriani, A., Iannitto, M. L., Ricci, B., Fionda, C., Malgarini, G., Morrone, S., Peruzzi, G., Ricciardi, M. R., Petrucci, M. T., Cippitelli, M. & Santoni, A. Reactive oxygen species- and DNA damage response-dependent NK cell activating ligand upregulation occurs at transcriptional levels and requires the transcriptional factor E2F1. *J Immunol* **193**, 950-960(2014).
- 29 Hedlund, M., Nagaeva, O., Kargl, D., Baranov, V. & Mincheva-Nilsson, L. Thermal- and oxidative stress causes enhanced release of NKG2D ligand-bearing immunosuppressive exosomes in leukemia/lymphoma T and B cells. *PLoS One* **6**, e16899(2011).
- 30 Zhang, Z. X., Wang, S., Huang, X., Min, W. P., Sun, H., Liu, W., Garcia, B. & Jevnikar, A. M. NK cells induce apoptosis in tubular epithelial cells and contribute to renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol* **181**, 7489-7498(2008).
- 31 Feng, L., Cheng, F., Ye, Z., Li, S., He, Y., Yao, X., Tang, Q. & Li, Y. The effect of renal ischemia-reperfusion injury on expression of RAE-1 and H60 in mice kidney. *Transplant Proc* **38**, 2195-2198(2006).
- 32 Song, H., Kim, Y., Park, G., Kim, Y. S., Kim, S., Lee, H. K., Chung, W. Y., Park, S. J., Han, S. Y., Cho, D. & Hur, D. Transforming growth factor-beta1 regulates human renal proximal tubular epithelial cell susceptibility to natural killer cells via modulation of the NKG2D ligands. *Int J Mol Med* **36**, 1180-1188(2015).
- 33 Shen, B., Li, J. & Yang, B. NKG2D blockade significantly attenuates ischemia-reperfusion injury in a cardiac transplantation model. *Transplant Proc* **45**, 2513-2516(2013).
- 34 Cheng, F., Feng, L., Li, S., Tan, J., Cao, L., He, Y., Ye, Z. & Li, Y. Yisheng injection decreases the expression of H60 and RAE-1 genes in ischemic mice

liver. *Transplant Proc* **38**, 2210-2213(2006).