

氏 名	金 美 娟 ^{じん めい じゅあん}
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 633 号
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 15 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	褥瘡の病態における IL-33 の役割及び治療への応用についての研究
論 文 審 査 委 員	(委員長) 吉 村 浩太郎 教 授 (委 員) 出 光 俊 郎 教 授 早 川 盛 禎 講 師

論文内容の要旨

1 研究目的

褥瘡は、要介護高齢者においては重大な医療上の問題であり、その病態解明、治療や予防法の開発は重要な課題である。褥瘡の病態についての研究はこれまでも報告があるが、主に創傷治癒を改善する研究が主体であり、褥瘡発生にかかわる分子の解明には至っていない。褥瘡の発生には虚血－再灌流傷害が関与していることが想定されており、皮膚の虚血再灌流傷害マウスモデルを用いて褥瘡の発生機序にかかわる因子を解明することを目的とした。IL-33 は IL-1 ファミリーメンバーのひとつであり、上皮細胞や血管内皮細胞に発現し核内因子として他の遺伝子の転写に影響することが報告されている。IL-33 は創傷治癒過程に関与し、創傷治癒を促進させることが報告され、また IL-33 が肝臓の虚血再灌流障害における重要な内因性調節因子である可能性が報告されている。しかし、褥瘡の病態に関する IL-33 の役割については未解明である。この研究では、褥瘡マウスモデルを用いて褥瘡の病態における IL-33 の役割について明らかにすることを目的とした。

2 研究方法

- ①8-10 週齢のマウスの背部を除毛し、2つの円盤状磁石で背部の皮膚を外から挟み込んで虚血状態をつくる。12時間後磁石を取りはずし、2日、8日、14日目をタイムポイントとして磁石装着部分に生じる皮膚潰瘍を観察・計測した。野生型マウス Balb/cA と IL-33 ノックアウトマウス (K0) を用いて、比較することにより、褥瘡の病態への IL-33 関与について検討した。
- ②潰瘍形成面積が一番大きいタイムポイントの皮膚を採取し、qPCR 解析を行い、褥瘡形成にかかわる分子について解析し、褥瘡の病態について検討した。
- ③褥瘡部の皮膚を生検し、ホルマリン固定、パラフィン包埋して薄切し、薄切標本をヘマトキシリン&エオジン染色して、浸潤細胞の程度と種類、表皮肥厚、真皮の浮腫、潰瘍の程度について、組織学的に検討した。潰瘍部の病理切片の作成し、各種特殊免疫染色を行い、褥瘡の病態について検討した。
- ④免疫染色にて total マクロファージを染めた結果、IL-33K0の方が野生型マウスより多く浸潤したので M1 と M2 マクロファージを分けて免疫染色を行った。
- ⑤褥瘡の皮膚からマクロファージを単離し、フローサイトメトリーでサブタイプ (M1, M2) を分析

した。

⑥ST2 トランスジェニックマウス (Tg) と野生型マウスに褥瘡を作り、皮膚潰瘍を観察・計測した。

⑦野生型マウスに IL-33、ST2 の中和抗体を皮下注射し、コントロール群と潰瘍面積を比較した。

⑧in vitro で褥瘡の組織から単離したマクロファージを培養し、IL-33 の刺激後、炎症性サイトカインなどの mRNA 発現レベルをを検討した。

3 研究成果

1. IL-33KO マウスでは皮膚の圧迫による潰瘍（褥瘡）形成が野生型マウスに比べて抑制された。
2. 病理組織学的検討により、IL-33KO では、炎症細胞の浸潤は少なく、マクロファージ数が野生型マウスに比べて多かった。免疫染色にて M1 と M2 マクロファージを染めた結果、IL-33KO では、M2 マクロファージ数が野生型マウスより多かったことから M2 マクロファージが IL-33KO マウスの褥瘡抑制機序に関与している可能性を考えた。
3. 可溶性 ST2 を過剰に発現し IL-33 シグナルを抑制するマウスである ST2Tg マウスにおいても褥瘡形成が抑制された。
4. 野生型マウスに IL-33 及び ST2L の中和抗体を投与し、コントロール群と比較した結果、中和抗体群では褥瘡を抑制する傾向を示した。
5. 野生型マウスと IL-33KO マウスの褥瘡の組織から RNA を抽出し real-time PCR を行った結果、野生型マウスは IL-1 β や IL-5 などの炎症性サイトカインが IL-33KO マウスより多く、CCL17, CCL22 などのケモカインが少なかった。
6. 野生型マウスと IL-33KO マウスの褥瘡の組織から単離したマクロファージは IL-33 の刺激で IL-1 β を誘導しなかったが IL-33KO マウスの組織の IL-1 β の発現が野生型マウスより少なかった。

4 考察

IL-33KO マウス、sST2 Tg マウスでは野生型マウスより圧迫による皮膚潰瘍形成が抑制され、また IL-33、ST2 の中和抗体を注射することで IL-33 のシグナルをブロックした結果、潰瘍が抑制されたことから IL-33 はマウス褥瘡の形成過程に関与すると考える。

潰瘍部分の免疫染色にて IL-33KO では野生型よりマクロファージが多く浸潤し、M2 マクロファージが多く染められた。qPCR の結果では、IL-33KO マウスの褥瘡の組織に M2 マクロファージへの分化にかかわるケモカイン CCL17, CCL22 が多かった。FACS の解析結果からも、M2 マクロファージの割合が多いことから IL-33KO マウスでは M2 マクロファージが褥瘡形成の抑制に関わると考えた。また、qPCR の結果では IL-33KO マウスの褥瘡の組織に IL-1 β 、IL-5 などの炎症性サイトカインが少ないことから、野生型マウスでは皮膚の圧迫によって表皮細胞や血管内皮細胞から IL-33 が放出され、マクロファージなどからの IL-1 β 産生が誘導され、その結果好中球浸潤やその他の細胞浸潤が誘導されて炎症が亢進する結果褥瘡の形成に至ると推測した。

5 結論

IL-33 は褥瘡の形成過程に重要な役割を果たしており、その下流ではマクロファージ、IL-1 β が褥瘡形成に関与している。また IL-33 シグナルを阻害することが褥瘡の早期治療に有効である可

能性がある。

論文審査の結果の要旨

改善点

- 1) 褥瘡についての動物モデルが、皮膚欠損モデルと異なる結果となっている点についての考察を加える。それぞれが、虚血再灌流と創傷のモデルである（この違いの本質については、十分に世の中に認識されていないと思われる）ことから、その違いについて。虚血再灌流モデルでは創傷モデルに比べて、壊死細胞が組織内に多数存在して IL33 を放出する影響が創傷モデルよりも大きいと考えられることなど、本研究と過去の研究成果から、理解されることを加える。
- 2) 本研究結果から、褥瘡の予防と治療に分けて、臨床応用への展望を加える。
- 3) CD80 陽性である M2 マクロファージの表現を修正し、典型的な M2 マクロファージが出現していないこととともに、文献上の考察を加える。

最終試験の結果の要旨

褥瘡の病態の解明、その予防や治療に対して、IL-33 の役割を明らかにし、IL-33 やその中和抗体を利用した新しいアプローチを用いています。申請者は、動物モデルを用いて、臨床的に応用可能であることを示しました。

審査発表を通じて、その理解や周辺知識も十分であり、その能力と態度からも、学位に相当するものと判断いたしました。