

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10958

研究課題名(和文) 高齢者の創傷治癒における活性酸素とその不活化酵素の役割

研究課題名(英文) Role of reactive oxygen species and antioxidant on wound healing with aging

研究代表者

藤原 敏宏 (Fujiwara, Toshihiro)

兵庫医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：00423179

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)：高齢者の創傷治癒における活性酸素および不活化酵素の役割を調査するために、若齢マウスおよび高齢マウスを用いて実験をした。皮膚線維芽細胞を用いた各種実験および皮膚潰瘍モデルを用いた実験結果から、創傷治癒過程で炎症期に発生する活性酸素ストレスが刺激となり皮膚線維芽細胞を筋線維芽細胞に分化誘導し創収縮を促進ことが示唆された。高齢マウスは若齢マウスに比べ活性酸素不活化酵素の発現が少なく、活性酸素ストレス刺激に対する細胞の耐性能が低下しており、そのことが応答能の低下につながり、創傷治癒能力の低下の一因となっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate a role of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant on wound healing with aging, young and aged mice were utilized for the assessment. The results of in vitro and in vivo experiments suggested that ROS during inflammatory phase of wound healing process induced wound contraction via differentiation of dermal fibroblasts into myofibroblasts, leading to promotion of wound healing. Appropriate amount of ROS can promote wound healing. But, excessive amount of ROS can cause cell dysfunction and apoptosis, resulting in impairment of wound healing. The expression of antioxidant in aged mice and the dermal fibroblasts was decreased with aging. Therefore, the intolerance against ROS in aged mice may contribute to impairment of wound healing in aged mice.

研究分野：創傷治癒

キーワード：高齢 皮膚創傷治癒 活性酸素 活性酸素不活化酵素 線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

高齢者は若齢者に比べ創傷治癒能力が低下している。その理由としては、老化に伴う皮膚の解剖学的変化、栄養不良、糖尿病などの内科疾患、血流障害など様々な要因が挙げられる。近年注目されている活性酸素も創傷治癒に深く関わっていることが報告されており、高齢者の創傷治癒能力低下の一因となっている可能性が考えられる。

活性酸素はタンパク質や脂質、核酸を酸化することで細胞の機能障害やアポトーシスを引き起こすが、細胞内外にある抗酸化物質によって酸化ストレスが軽減、調整される。それゆえ活性酸素は組織障害性や老化の原因という負の効果にのみ注目が集まっていたが、細菌に対する殺菌効果や免疫システムにおいて重要な役割を担うだけでなく、細胞のシグナルカスケードとして機能するなど重要な役割を担っていることがここ最近分かってきた。

創傷治癒過程の炎症期において創部に好中球やマクロファージなどの炎症細胞が遊走して大量の活性酸素を産生することが分かっているが、活性酸素と創傷治癒の関わりについては不明な点が未だ多い。

過剰な活性酸素は細胞毒性が強いため、その不活化酵素による制御が生体維持、細胞の恒常性において重要であるが、その不活化酵素の発現は老化と共に低下することが報告されている。

2. 研究の目的

活性酸素とその不活化酵素が皮膚創傷治癒においてどのように機能するか不明な点が多い。本研究において高齢者の創傷治癒能力の低下に活性酸素およびその不活化酵素がどのように影響しているかを調査する。

3. 研究の方法

2ヶ月齢の若齢マウスおよび20ヶ月齢の高

齢マウスを用いて活性酸素とその不活化酵素、創傷治癒の関連について調査した。

In vitroの実験として各マウスから皮膚線維芽細胞を採取、培養して、活性酸素ストレス負荷における細胞の動態変化を調査した。またマウスの背部に皮膚潰瘍を作成し、活性酸素ストレスおよび不活化酵素の発現、創傷治癒期間について調査した。負荷する活性酸素として Superoxide を使用し、Superoxide の不活化酵素である Superoxide Dismutase(SOD)について調査した。

4. 研究成果

細胞外 Superoxide ストレス下において若齢マウスに比べ高齢マウスの皮膚線維芽細胞の増殖能は低く、細胞内の SOD の発現量は低かった。このことから高齢マウスは活性酸素ストレスに対する耐性が低下していることが分かった。また適度な濃度の細胞内 Superoxide ストレス刺激により皮膚線維芽細胞を包埋したコラーゲングルは筋線維芽細胞への分化誘導を通して収縮したが、若齢マウスに比べ高齢マウスの方が収縮能は低かった。またこれらの収縮は細胞内に移行する SOD の添加により抑制された。また過剰な細胞内 Superoxide ストレス下ではコラーゲングルは全く収縮を示さなかった。これらの原因として過剰な活性酸素ストレスは各物質に酸化ストレスをもたらし、それらが蓄積することで細胞の機能障害やアポトーシスを誘導したと思われる。これらの結果は細胞外 Superoxide ストレス刺激下でも同じであった。

次に背部の皮膚潰瘍モデルの実験結果より、高齢マウスの方が若齢マウスに比べ、創閉鎖に至る期間が長く、炎症期の創部における活性酸素ストレスが高く、細胞外 SOD の発現が低いことが分かった。また創収縮に関わる皮膚線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化能も低下していた。

以上の実験結果から創傷治癒過程において高齢マウスでは活性酸素不活化酵素の発現が少なく、創傷治癒過程で発生した活性酸素刺激が相対的に過剰となり、線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化能が低下し、創傷治癒遅延につながった可能性が示唆された。創傷治癒過程に発生する活性酸素を制御することで高齢者の創傷治癒能力の向上に寄与する可能性が示唆された。

また、伸展刺激が活性酸素発生に関わる報告があり、皮膚線維芽細胞に伸展刺激を加えた実験を追加で行った。皮膚線維芽細胞に伸展刺激を加えると NGF の分泌を促進するが、筋線維芽細胞に分化誘導してから伸展刺激を加えると NGF の分泌量がさらに増加した。これらの結果は、ケロイド周囲において神経線維密度が高いとするこれまでの報告に合致するものであり、ケロイドの要因として慢性炎症、伸展刺激、活性酸素、線維芽細胞の分化誘導、末梢神経再生に注目し、今後詳細な研究が必要と思われた。

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)

Fujiwara Toshihiro, Dohi Teruyuki, Maan Zeshaan N., Rustad Kristine C., Kwon Sun Hyung, Padmanabhan Jagannath, Whittam Alexander J., Suga Hirota, Duscher Dominik, Rodrigues Melanie, Gurtner Geoffrey C. Age-associated intracellular superoxide dismutase deficiency potentiates dermal fibroblast dysfunction during wound healing. *Experimental Dermatology*. 2017: Epub ahead of print. (査読有)

{ 学会発表 } (計 5 件)

藤原敏宏、河合建一郎、石瀬久子、外岡真紀、藤田和敏、曾束洋平、西本聡、垣淵正男 伸展刺激を付加した末梢神経が創傷治癒に及ぼす影響 第9回創傷外科学会総会・学術集会 2017年7月6日～7日(岐阜県)

藤原敏宏、Gurtner Geoffrey C、石瀬久子、外岡真紀、藤田和敏、曾束洋平、河合建一郎、西本聡、垣淵正男 高齢に伴う活性酸素耐性低下が創傷治癒に及ぼす影響 第46回日本創傷治癒学会 2016年12月9日～10日(東京都)

藤原敏宏、Gurtner Geoffrey C、河合建一郎、藤田和敏、曾束洋平、西本聡、垣淵正男 創傷治癒における細胞外Superoxide Dismutaseの影響 第24回日本形成外科学会基礎学術集会 2015年10月8日～9日(岩手県)

Toshihiro Fujiwara, Gurtner Geoffrey C. Extracellular Superoxide Dismutase promotes wound healing in aged mice by regulation of ROS homeostasis. 7th European Plastic Surgery Research Council Meeting. 2015年8月27日～30日(Germany, Hamburg)

藤原敏宏、Gurtner Geoffrey C、藤田和敏、曾束洋平、河合建一郎、西本聡、垣淵正男 創傷治癒における細胞外Superoxide Dismutaseの役割 第7回日本創傷外科学会総会・学術集会 2015年7月24日～25日(東京都)

{ 図書 } (計 0 件)

{ 産業財産権 }

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 敏宏 (FUJIWARA, TOSHIHIRO)
兵庫医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：00423179

(2) 研究分担者

垣淵 正男 (KAKIBUCHI, MASAO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：50252664

西本 聡 (Nishimoto, Soh)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：30281124

河合 建一郎 (Kawai, Kenichiro)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80423177

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()