

平成 21年 5月 31日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790795
 研究課題名 (和文) ヘッジホッグによるリンパ管新生を介した難治性皮膚潰瘍治療の基礎研究
 研究課題名 (英文) The effects of sonic hedgehog on lymphangiogenesis in impaired wound healing
 研究代表者
 浅井 純 (ASAI JUN)
 京津府立医科大学・医学研究科・助教
 研究者番号：50438222

研究成果の概要：ヘッジホッグがマクロファージを介したリンパ管新生を促進することを示した。その機序として、マクロファージ自身のリンパ管内皮細胞への分化を誘導することが明らかになった。ソニックヘッジホッグがリンパ管新生を介した難治性皮膚潰瘍の新しい治療法として有効な治療法となる可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚生理学

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性潰瘍、下腿潰瘍や膠原病に伴う皮膚潰瘍などの難治性皮膚潰瘍に対する治療法としては、血流改善剤等の全身投与、種々の外用剤の使用、植皮術などの外科的治療が行われているが、これらの治療に抵抗性の場合も多い。最近ではこれらの治療法に加え、人工皮膚や細胞増殖因子製剤などが使用されるようになり、培養皮膚や遺伝子治療などの治療

法が開発されつつあるが、今後さらに有効な治療法の開発が望まれる。

近年、創傷治癒過程において、リンパ管は間質余剰水分の排泄や免疫機構の維持などの働きにより重要な役割を果たしていることが知られるようになり、創傷治癒過程におけるリンパ管再生の重要性が認識されはじめてきた(参考文献 1,2)。糖尿病性潰瘍をはじめとした難

治性皮膚潰瘍では、多くの症例で潰瘍周辺部の顕著な浮腫や細菌感染を認めるが、これらの原因として血流障害だけでなく、リンパ管還流障害による間質への余剰水分の貯溜や、炎症細胞・debrisの排泄不良があると考えられる。従来の難治性潰瘍に対する治療法の多くは血流改善・新生血管誘導に主眼がおかれているが、これらの治療法が高い臨床効果を得ることができなかった原因として、血流改善に伴う間質液貯溜に対し、余剰水分排泄機構であるリンパ管の不足により起こる還流障害が一つの可能性として考えられる。つまり、創傷治癒においてリンパ管を誘導することは、血管を誘導することと同様、非常に意義の大きくまた高い臨床効果が望める可能性を持っているといえる。

多細胞生物の発生過程において、形態形成に重要な役割を演じる分子のうち位置情報を与えるものをモルフォゲンと呼び、代表的なものにショウジョウバエの翅形成におけるヘッジホッグ (Hedgehog; Hh) がある。脊椎動物においても、Sonic hedgehog (Shh)、Desert hedgehog、Indian hedgehog の3つのHhファミリータンパク質が知られている。Shhは哺乳類において脊索、および脳の神経上皮、枝芽の間葉組織、肺芽上皮、神経管底板、毛包などに発現しており、枝芽の前後軸パターンニング、神経管の背腹軸パターンニング、気管の分枝、左右軸決定、毛形成などを司ることが知られている。最近の研究で、このShhが血管形成に重要な役割を担っていることが知られるようになってきた。

2. 研究の目的

Shhのリンパ管新生に対する作用について、特にマクロファージに対する作用について検討することを目的とする。

て、特にマクロファージに対する作用について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Shhのマクロファージによる脈管形成能に対する作用の検討

糖尿病モデルマウスおよびその野生型マウスよりマクロファージを採取し、Shhタンパクによる刺激を加え、マクロファージの脈管形成能をtube formation assayにより検討した。

(2) ShhおよびGli遺伝子導入によるマクロファージの脈管形成能の検討

(1)と同様のマクロファージに対し、Shh遺伝子、その下流の転写因子であるGli-1、Gli3遺伝子を導入し、脈管形成能をtube formation assayにて検討した。

(3) Shh刺激によるマクロファージのリンパ関連因子発現の検討

マクロファージにShh刺激を加え、LYVE-1、Prox1、VEGF-C、VEGF-R3といったリンパ管関連因子発現をWestern blottingにて検討した。

(4) 上記と同様の実験を、DN-Gliプラスミド、Akt/PI3K阻害剤などを用いてShhシグナルの下流にあたる経路の解析を行った。

4. 研究成果

(1) Shhタンパク刺激によりマクロファージの脈管形成能は亢進する。

図1 Tube formation assay (12 hours)

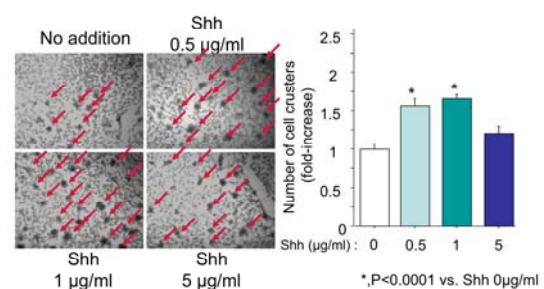


図2 Tube formation assay (12 hours)

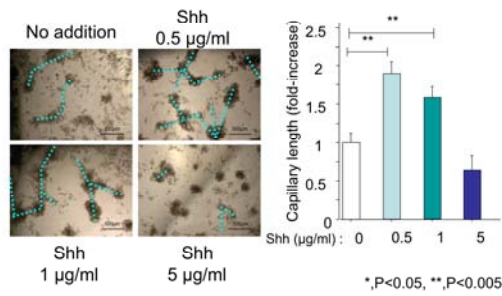


図1、2 Shh タンパクにて刺激を加えたマクロファージは対照群に比べて刺激 12 時間後、24 時間後ともに有意に tube 構造を形成した。

(2) Shh 遺伝子導入によりマクロファージの脈管形成能は亢進する。

図3 Shh promotes macrophages tube formation

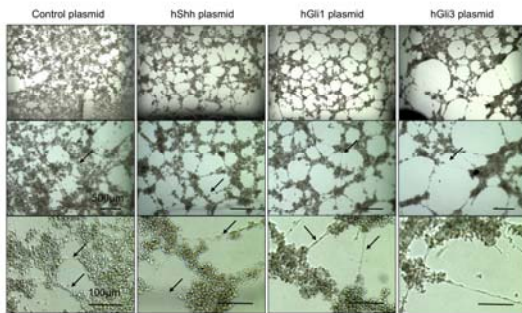


図4 Shh promotes macrophages tube formation

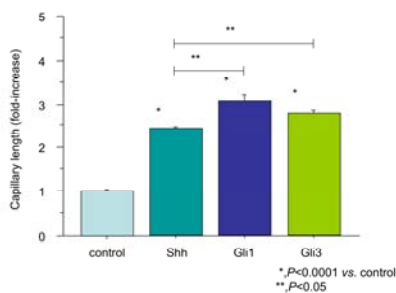


図3、4 Shh, Gli-1, Gli-3 のそれぞれのプラスミドをマクロファージに遺伝子導入して行った tube formation assay。Shh, Gli-1, Gli-3 のそれぞれの遺伝子を導入した群では、

対照群にくらべて有意にマクロファージの脈管系性能を亢進させた。

(3) Shh, Gli 遺伝子導入によりマクロファージの LYVE-1 の発現が亢進する。

図5 Shh upregulates LYVE-1 expression in macrophages

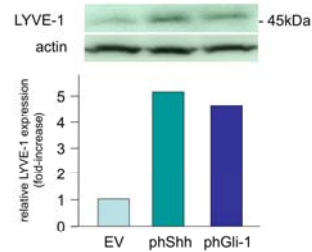


図5 Shh, Gli-1 プラスミドを用いて遺伝子導入を行ったマクロファージでは、LYVE-1 の発現が対照群と比べて有意に亢進した。

(4) Akt/PI3K 阻害剤により Shh 刺激マクロファージの脈管系性能は低下する。

図6 Tube formation assay

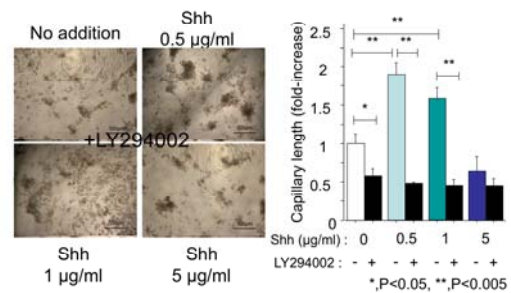


図6 LY294002 による Akt/PI3K 阻害により、マクロファージの脈管形成は対照群と比較して有意に阻害された。

結語 ; Shh はマクロファージのリンパ管への脈管形成、分化を促進することが示された。その伝達経路として、Shh の下流のシグナルである転写因子 Gli-1,3 を介し、さらには Akt/PI3K により調節されていることが示された。以上のことより、Shh は血管だけでなく、マクロファージをかいしてリンパ管新生

をも促進させ、難治性皮膚潰瘍などの新たな創傷治癒促進剤として臨床応用できる可能性を秘めていることが示唆された。

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8件)

- ① Daito J, Katoh N, Asai J, Ueda E, Takenaka H, Ishii N, Hashimoto T, Kishimoto S. Brunsting-Perry cicatricial pemphigoid associated with autoantibodies to the C-terminal domain of BP180. *Br J Dermatol*. 2008;159(4):984-6. 査読有
- ② Daito J, Hanada K, Katoh N, Katoh S, Sakamoto K, Asai J, Takenaka H, Kishimoto S. Symmetrical drug-related intertriginous and flexural exanthema caused by valacyclovir. *Dermatology*. 2009;218(1):60-2. 査読有
- ③ Maruyama K, Asai J (co-first author), Ii M, Thorne T, Losordo DW, D'Amore PA. Decreased macrophage number and activation lead to reduced lymphatic vessel formation and contribute to impaired diabetic wound healing. *Am J Pathol*. 2007; 170(4): 1178-91. 査読有
- ④ Ichihashi K, Takenaka H, Asai J, Morihara K, Kimura O, Morishima Y, Katoh N, Kishimoto S. Infantile myofibromatosis of the scrotum. *Eur J Dermatol*. 2007 Dec 18;18(1):82-83.
- ⑤ 竹中秀也、浅井 純、岸本三郎. 創傷治癒のメカニズム 骨髄由来細胞の寄与 京津府立医大雑誌 116(9);611-618, 2007.
- ⑥ 浅井 純、竹中秀也. 創傷治癒と局所因子. *MB Derma* 129; 18-23, 2007.
- ⑦ 岸本三郎、浅井 純、竹中秀也. 難治性皮膚潰瘍-病態解明とあらたな治療戦略-. *皮膚病診療* 29 ; 253-259, 2007.
- ⑧ 浅井 純、竹中秀也. 創傷治癒と局所

因子. *MB Derma* 129; 18-23, 2007.

[学会発表] (計4件)

- ① Asai J, Maruyama K, Renault M, Ii M, Takenaka H, Thorne T, Kishimoto S, Losordo DW. Hedgehog signaling promotes lymphatic differentiation of macrophages. *J Invest Dermatol*. 2007;127: suppl S1.
- ② Katoh N, Mineoka-Tamagawa R, Nara T, Soga F, Asai J, Masuda K, Kishimoto S. Topical P2Y12 purinoreceptor antagonists reduce inflammation in irritant and allergic contact dermatitis models. *J Invest Dermatol*. 2007; 127: suppl S113.
- ③ Nishimura Y, Ii M, Asai J, Takenaka H, Katoh N, Hamada H, Qin G, Losordo DW, Kishimoto S. CXCR4-selective antagonist AMD3100 accelerates impaired wound healing in diabetic mice. (69th Annual meeting of the Society for Investigative Dermatology, Montreal, Canada) *J Invest Dermatol* 2009, in press.
- ④ 浅井 純. 創傷治癒におけるリンパ管新生. 第58回日本皮膚科学会中部支部学術大会. 2007年10月20日;京都.

[その他]

ホームページ;

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/dermatol/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅井 純 (ASAI JUN)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号: 50438222