

令和 4 年 6 月 30 日現在

機関番号：87102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08795

研究課題名(和文) アリル炭化水素受容体リガンドによる糖尿病性潰瘍の治療効果

研究課題名(英文) Therapeutic effects of aryl hydrocarbon receptor ligands on chronic ulcers

研究代表者

内 博史 (Uchi, Hiroshi)

独立行政法人国立病院機構(九州がんセンター臨床研究センター)・その他部局等・皮膚科医長

研究者番号：50437787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：in vitroでの創傷治癒モデルを用いてアリル炭化水素受容体(AHR)のリガンドをスクリーニングしたところ、藍の色素であるインジゴの異性体indirubinに濃度依存的な創傷治癒促進効果を認められた。indirubinは細胞増殖ではなく細胞遊走を増強すること、またpregnane X receptorを介してJNK/c-jun経路を活性化することで効果を発揮した。In vivoの検討ではBALB/cマウスの背部に直径6mmの皮膚欠損創を作成し、indirubinとコントロールであるDMSOの外用による創傷治癒作用を比較したところ、indirubin群で有意に創閉鎖までの期間が短縮した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の慢性創傷に対する薬剤は、潰瘍底における線維芽細胞の増殖による肉芽形成が主たる作用であるため、潰瘍周囲からの上皮化が進まず、創傷治癒が遅延することが問題である。本研究で見出したindirubinは表皮ケラチノサイトの細胞遊走を促進することで、速やかな創閉鎖を誘導する作用を有している。indirubinは慢性創傷に対する新たな作用機序を持つ局所治療薬の開発につながるのみならず、従来の線維芽細胞を標的とした薬剤との相乗効果も期待される。indirubinは古くから染色に用いられてきた藍に含まれる青色の色素indigoの誘導体であり、安価かつ容易に利用でき、毒性の懸念も少ないと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to discover compounds that promote healing of chronic wounds. In vitro wound healing models using IncuCyte were used to screen ligands for the aryl hydrocarbon receptor (AHR). Indirubin, an isomer of indigo pigments, was found to promote wound healing in a concentration-dependent manner. Indirubin accelerated wound healing by enhancing cell migration, not cell proliferation, and by activating the JNK/c-jun pathway via pregnane X receptor, not AHR. In vivo, we compared the effect of topical indirubin and control DMSO on wound healing in 6 mm diameter skin defects on the backs of BALB/c mice. The indirubin group showed significantly shorter time to wound closure.

研究分野：皮膚科学

キーワード：創傷治癒 ケラチノサイト indirubin

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病の増加、人口の高齢化を背景として、糖尿病性潰瘍などの難治性皮膚潰瘍患者が増加しており、社会的問題となっている。糖尿病性潰瘍の治療は極めて困難であり、しばしば重篤な感染症を発症し大切断に至るなど、患者のQOLを大きく障害するだけでなく、敗血症から不幸な転帰に至ることもしばしばない。また入院治療を含め、長期にわたる関連各科の治療を要するため、多大な医療資源を投入する必要がある、医療現場での負担に加え、社会的損失も大きい。糖尿病性潰瘍の治療には、背景となる糖尿病や末梢動脈疾患のコントロールを前提として、潰瘍局所の治療として、細胞増殖因子製剤、プロスタグランジン外用薬などが用いられているが、十分な治療効果が得られているとは言い難い。糖尿病性潰瘍の治癒過程では潰瘍底での肉芽の増生に引き続き、表皮ケラチノサイトの遊走による上皮化が必須であるが、従来の局所治療薬である塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) やプロスタグランジン E1 は、線維芽細胞や血管内皮細胞の増殖による肉芽形成の促進が主たる効果で、ケラチノサイトへの作用は限定的である。さらに糖尿病性潰瘍辺縁のケラチノサイトは不活化しており、増殖能、遊走能、サイトカイン産生能が低下しているため (J Dermatol Sci 2016;84:121-127)、上皮化を完了させるために、結果として外科的なデブリドマンや遊離植皮を要することが多く、患者の負担は大きい。

そこで本研究課題の核心をなす学術的「問い」として、「表皮ケラチノサイトを標的とした糖尿病性潰瘍治療薬の創成は可能か」を提示する。申請者はこれまでの検討で、表皮ケラチノサイトをアрил炭化水素受容体 (AHR) のリガンドで活性化することで、細胞遊走を促進しうることを明らかにしており、本研究課題は今後の糖尿病性潰瘍に対する、新たな作用機序を持つ局所治療薬の開発に向けた有望な戦略であると考えられる。

2. 研究の目的

以下の3点を目的とする。

- 効率的に表皮ケラチノサイトの遊走を誘導でき、かつ臨床応用を踏まえ安全性の高い AHR リガンドを選択する。
- AHR リガンドが表皮ケラチノサイト遊走を促進するメカニズムを解明する。
- 2型糖尿病マウスを用いた糖尿病性潰瘍モデルを用い、選択したリガンドの *in vivo* での治療効果を明らかにする。

申請者はこれまでに、多施設共同臨床試験を通して bFGF の糖尿病性潰瘍に対する有用性を明らかにしてきた (Eur J Dermatol 2009;19:461-468)。しかし bFGF は肉芽形成が主な作用であるため、上皮化が進行せず治癒が遅延する症例が多い。一方、表皮ケラチノサイトを主な標的とし、細胞遊走を促進させることで早期の創閉鎖に導く薬剤はこれまでに開発されておらず、本研究のアプローチは独創的である。また表皮ケラチノサイトをターゲットとすることで、bFGF など従来の薬剤との相乗効果が期待できるほか、褥瘡、うっ滞性潰瘍など、原因の異なる慢性創傷の治療にも幅広く応用できると考えられる。

3. 研究の方法

1. IncuCyte を用いた AHR リガンドのスクリーニング

IncuCyte は生細胞の解析システムで、本研究では *in vitro* での創傷治癒モデルとして利用する。ヒト表皮ケラチノサイトをシステム内で単層培養し細胞シートが作成されると、一定面積のケラチノサイトが自動的に剥離され無細胞領域が形成される。この無細胞領域はケラチノサイトの増殖・遊走により次第に閉鎖するが、IncuCyte により経時的に無細胞領域の面積が計測される。検証する薬剤を培養液に添加しコントロールと比較することで、創傷治癒促進効果を持つ可能性がある薬剤を選択することができる。

2. 表皮ケラチノサイトに対する AHR リガンドの作用機序の解析

まずスクリーニングにより選択された AHR リガンドによる細胞遊走能の促進効果が、AHR を介しているかを確認するために、siAHR あるいは AHR の阻害剤である CH-223191 を用いて AHR をブロックし、選択された AHR リガンドが作用しうるか検討する。次に細胞遊走に關与するシグナル経路を AHR リガンドが活性化し得るか western blotting 法により検討する。その結果、活性化の指標であるリン酸化タンパク質の増加が認められた場合は、該当するシグナル分子の阻害剤により AHR リガンドによる細胞遊走促進効果が抑制されるか評価する。

3.2 型糖尿病マウスを用いた *in vivo* での AHR リガンドの効果の検討

マウス背部皮膚を剃毛後に、セボフルラン吸入麻酔下に皮膚用トレパンを用いて径 6mm の円形の皮膚欠損創を作成する。臨床的に皮膚潰瘍モデルとして評価できるように、表皮から筋膜上までの皮膚全層にわたる欠損創とする。AHR リガンドは DMSO に溶解したのち白色ワセリンに一定

の濃度で加え AHR リガンド含有軟膏を作成する。溶媒のみを混和した軟膏も用意しコントロールとして使用する。正常の創傷治癒機転を阻害しないために、フィンチャンバーに一定量の軟膏を塗布し創を閉鎖密封することで、創の湿潤環境を維持する。軟膏は1日おきに交換し、創の面積を経時的に測定する。創が全て上皮化した時点を治癒とし、全てのマウスが治癒に至るまで観察を続ける。1で選択された AHR リガンドが期待通りの作用を発揮すれば、皮膚潰瘍の治癒に要する時間が、AHR リガンド含有軟膏塗布群でコントロール群に比べて短縮する。

4. 研究成果

IncuCyte を用いた *in vitro* の創傷治癒モデルを用いてアリル炭化水素受容体 (AHR) のリガンドとして作用する化合物のスクリーニングを実施したところ、藍の色素であるインジゴの異性体 indirubin に濃度依存的な創傷治癒促進効果を認めた。indirubin は表皮ケラチノサイトの細胞増殖に有意な影響を与えなかった。また indirubin の IncuCyte における創傷治癒促進作用はマイトマイシン C による処理では阻害できなかったが、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン処理では完全に阻害されたことから、indirubin は細胞遊走作用を増強することで、創傷治癒を促進していると考えられた。さらに細胞遊走に関わるシグナル経路について検討を行ったところ、indirubin はケラチノサイトの JNK/c-jun 経路を有意に活性化し、JNK の特異的阻害薬である SP600125 により indirubin 誘導性の JNK, c-jun のリン酸化が抑制された。また IncuCyte による *in vitro* の創傷治癒モデルにおいて、indirubin による創傷治癒促進効果が SP600125 により阻害されることが明らかになった。In vivo の検討では BALB/c マウスの背部に全身麻酔下に直径 6mm の皮膚欠損創を作成し、indirubin とコントロールである DMSO の外用による創傷治癒作用を比較したところ、indirubin 群で有意に創閉鎖までの期間が短縮された。Indirubin は AHR のほかに pregnane X receptor (PXR) にも結合する。特異阻害剤あるいは siRNA を用いた検討で、indirubin は AHR ではなく PXR を介して創傷治癒促進作用を発揮することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuka Tanaka, Hiroshi Uchi, Takamichi Ito, Masutaka Furue	4. 巻 9
2. 論文標題 Indirubin-pregnane X receptor-JNK axis accelerates skin wound healing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-54754-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------