

平成 22 年 6 月 3 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791320

研究課題名 (和文) 創傷治癒過程における Adiponectin, Calreticulin の役割

研究課題名 (英文) The role of Adiponectin and Calreticulin in the wound healing process

研究代表者

蔭山 晶子 (KAGEYAMA AKIKO)

兵庫医科大学・医学部・病院助手

研究者番号：00454760

研究成果の概要 (和文)：糖尿病状態では、創傷治癒機能に障害が起こることが知られているがその詳細なメカニズムは十分に解明されたとは言い難い。本研究では糖尿病で減少する Adiponectin、また Adiponectin に結合しさらに創傷治癒に関わることが示唆されている Calreticulin の創傷治癒における役割について調査した。

研究成果の概要 (英文)：It is well known that impaired wound healing occurs in diabetic state. However, the detailed mechanism of the dysfunction of wound healing in diabetes still remains unclear. Adiponectin is thought to be the one of the key factor related diabetes because it decreases in diabetic state. Calreticulin has been found to binds to Adiponectin and is presumably suggested that it is related wound healing. In this study, the role of Adiponectin and Calreticulin during wound healing process was investigated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：糖尿病、外科

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は先進国において深刻な疾病であり、生活習慣の西洋化から我が国でも増加傾向にある。糖尿病には様々な合併症があるが、なかでも創傷治癒遅延は日常の診療にて頻繁に経験するものである。

しかしながら、創傷治癒そのものの機構が

完全には解明されてはならず、さらに糖尿病の分子メカニズムについても不明な点が多い。

2. 研究の目的

Calreticulin はほぼすべての組織の小胞体内に存在するカルシウム結合蛋白である。

Calreticulin を創部に投与すると、創傷治癒が促進されるなど、創傷治癒へも関わる可能性が示唆されており、これまで考えられていた小胞体内での機能以外にも重要な役割があるのではないかと考えられている。

Calreticulin に結合する蛋白の一つに Adiponectin がある。Adiponectin は細胞膜上の Calreticulin と特異的に結合し、アポトーシスとなった細胞の除去に関与することが発見されている。Adiponectin は血清中に $\mu\text{g/ml}$ のオーダーで存在し、きわめて血中濃度が高いが、糖尿病では Adiponectin の血中濃度が低下し、糖尿病によって惹起される様々な病態の原因となる。

表皮は基底層から有棘層、顆粒層、角質層と常に Turn Over を繰り返している組織であり、これはアポトーシスの一種である。糖尿病における低 Adiponectin 血症がこの正常な Turn Over を阻害し、胼胝や上皮化障害を引き起こす可能性が示唆される。

一方、Adiponectin, Calreticulin 単体の働きの他に、前述のように、Adiponectin は極めて血清中での濃度の高い蛋白でありかつ Calreticulin と結合することが知られているため、これらが体内で複合体を形成する可能性もある。

生物の全く新しい一形態であり、生体内の石灰化等の一因としてこれまで考えられてきた Nanobacteria が、実は血清内のカルシウム結合蛋白とカルシウムなどのイオンを主成分とする血清由来 Nanoparticle であることが最近報告された(Purported nanobacteria in human blood as calcium carbonate nanoparticles. Martel J, Young JD. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 105(14):5549)。

血清由来 Nanoparticle は、生体内で動脈硬化や尿路結石の病変部に存在し、さらに In Vitro で増殖する(ように見える)など、これまで Nano“bacteria”というナノスケールの生命システムと考えられて来た。Nanobacteria は抗生物質の投与などの条件で粘液を分泌することが報告されていたが、血清由来 Nanoparticle の由来を考えると、この粘液の正体は Nanoparticle を形成していたイオンと結合蛋白であると考えられる。カルシウム結合蛋白やカルシウムイオンの創傷治癒への影響はこれまでも多数報告されている。血清由来 Nanoparticle の創傷治癒への関与を示す報告は未だないものの、創傷治癒に影響を与える可能性は高い。

Calreticulin を大量に投与した場合に創傷治癒が促進されることは報告されているものの、未だ直接の関与は不明である。Calreticulin が血清中に大量に存在する Adiponectin などとともに生体内でカルシウムを始めとするイオンと Nanoparticle を形成し、創部でのこれらの蛋白やイオンの供給源あるいは余剰イオンのバッファのような作用を及ぼすこ

とで創傷治癒過程に影響をあたえる可能性もあるため、血清由来 Nanoparticle の性状についても調査を行った。

3. 研究の方法

(1) Recombinant Adiponectin 蛋白の添加実験

マウス背部皮膚より Fibroblast を初代培養する。また Keratinocyte として HaCat cell を培養する。これらに対し、Recombinant Adiponectin 蛋白を添加し、keratinocyte, fibroblast の増殖能などを観察した。また、RNA を回収し、コラーゲンの遺伝子発現を確認した。さらに別に lysate を回収し、Western blot 法にて Calreticulin のシグナル伝達経路である ERK のリン酸化等を観察した。

(2) マウス創部における Adiponectin, Calreticulin 蛋白の観察

マウス背部に皮膚全層欠損創を作成し、経時的に組織を採取する。凍結及びパラフィン包埋した切片に対し、抗 Adiponectin 抗体及び抗 Calreticulin 抗体を用いて免疫染色を行いマウス創部におけるこれらの蛋白の状態を観察した。

(3) 血清由来 Nanoparticle の形成

文献(Purported nanobacteria in human blood as calcium carbonate nanoparticles. Martel J, Young JD. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 105(14):5549, Putative nanobacteria represent physiological remnants and culture by-products of normal calcium homeostasis. Young JD, Martel J, Young L, Wu CY, Young A, Young D. PLoS One. 2009;4(2):e4417) をもとに血清由来 Nanoparticle を In Vitro にて作成する。

(4) 血清由来 Nanoparticle の投与実験

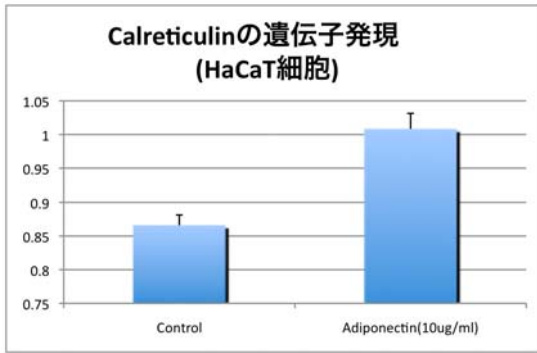
作成した Nanoparticle を創傷マウスに投与し、創傷治癒に与える影響を観察する。

4. 研究成果

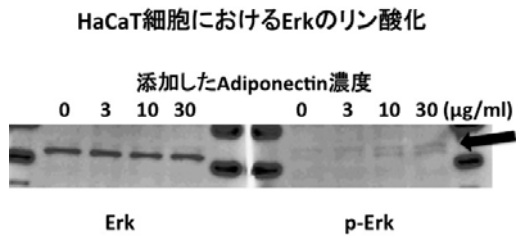
(1) Recombinant Adiponectin 蛋白の添加実験

初代培養 Fibroblast および HaCat Cell に対し、Recombinant Adiponectin 蛋白の添加実験を行った。細胞数をカウントしたが、Adiponectin 添加群とコントロール群では細胞数に有意差はみられなかった。また遺伝子発現については、Adiponectin 蛋白を $10\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加後 12 時間培養すると、HaCaT 細胞においては、Real time PCR にて Calreticulin 遺伝子の発現増加が認められた。

しかしながら、Fibroblast においては、そのような遺伝子変化はみられなかった。

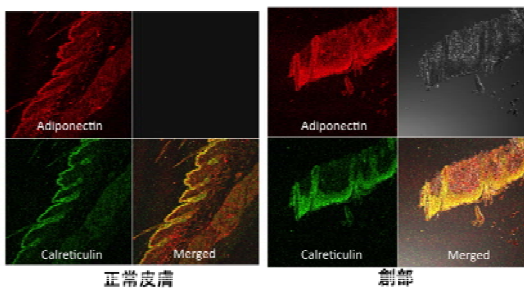


また、同様に培養細胞に Adiponectin 蛋白を添加し、同じく 1 2 時間の培養後、細胞の Lysate を回収し、ERK がリン酸化されるかを Western Blot 法にて観察した。HaCaT 細胞においては ERK が Adiponectin 蛋白の濃度依存的にリン酸化されることを確認した。



(2) マウス創部における Adiponectin, Calreticulin 蛋白の観察

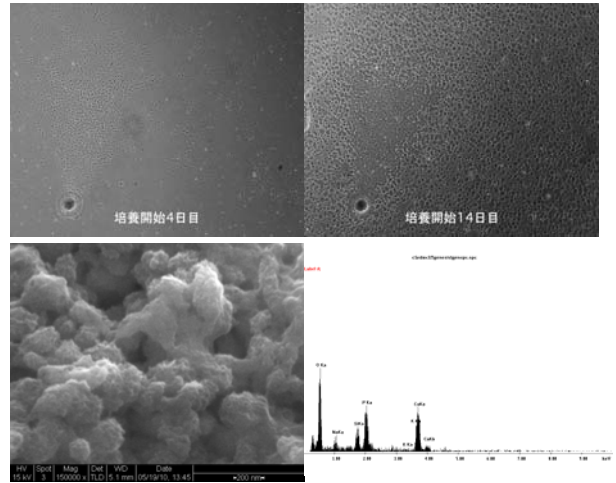
免疫染色法を用いて、マウス皮膚創部において Adiponectin 蛋白、Calreticulin 蛋白が集積しているかを調査した。いずれの蛋白も対照である正常皮膚との差を見いだすことができなかった。



(3) 血清由来 Nanoparticle の形成

文献をもとに牛血清由来 Nanoparticle を作成した。培養開始後、1 週間前後から顕微鏡下にて Particle の形成が確認でき、その後血清入り培地内での培養にて、Particle が増加してくることも確認した。この Particle を走査型電子顕微鏡およびエネルギー分散型 X 線分光法にて観察を行い、これまでに報告されている血清由来 Nanoparticle と同様のものである

ことを確認した。

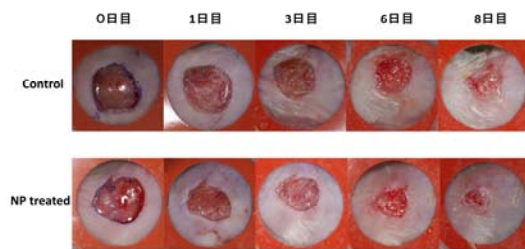


(4) 血清由来 Nanoparticle の投与実験

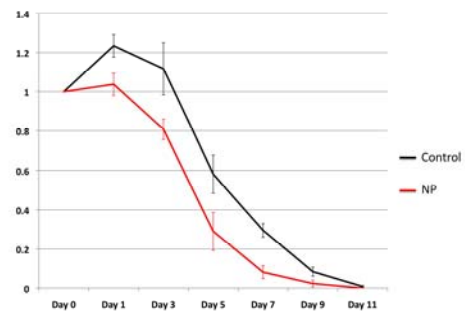
作成した Nanoparticle を培養皿からはがし、生理食塩水にて溶き、Nanoparticle 溶液を作成した。8 週齢の雌 Balb/C マウスの背部に径 8mm の皮膚全創欠損を作成した後、尾静脈から Nanoparticle 溶液を注入した。その後創部の状態を経時的に観察した。

その結果、Nanoparticle 投与群では有意差を持って創治癒が促進された。

創傷治癒



創傷の大きさ



今後の展開

現在、in vivo で見られた血清由来 Nanoparticle の作用について詳細なメカニズムを調査中である。具体的には Fibroblast populated collagen lattice 法を行い、Nanoparticle 添加によって、Fibroblast の収縮

力が増強するかについて観察中である。また、カルシウムの関与が考えられるため、**Nanoparticle** を投与した細胞内へのカルシウム取り込みを観察している。今後は**Calreticulin** 投与によって観察される創傷治癒促進作用が、**Calreticulin** が血清中にある**Adiponectin** と結合し、さらに**Nanoparticle** を形成することを介しているという可能性について研究を進め、**Nanoparticle** が創傷治癒に及ぼす影響について精査する。最終的に糖尿病などにおける創傷治癒遅延に対する病態の解明や、新たな治療法の確立を目指す。

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1)研究代表者

蔭山 晶子 (KAGEYAMA AKIKO)
兵庫医科大学・医学部・病院助手
研究者番号：00454760

(2)研究協力者

河合 建一郎 (KAWAI KENICHIRO)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：80423177