

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591469

研究課題名（和文） 創傷治療における、セレクトインとそのリガンドの関与

研究課題名（英文） Involvement of selectins and their ligands in wound healing

研究代表者 佐藤 伸一 (SATO SHINICHI)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：20215792

研究成果の概要（和文）：創傷治癒は極めて重要な防御機構である。細胞接着分子は白血球の創部への浸潤制御を介して創傷治癒過程に重要な役割を演じている。そこで細胞接着分子である P-selectin glycoprotein-1 (PSGL-1) と、そのリガンドである P/E-セレクトインの、創傷治癒における役割についてノックアウトマウスを用いて解析したところ、PSGL-1 は主として P-selectin と結合することによって創傷治癒を制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Cell adhesion molecules are critical to wound healing through leukocyte recruitment. To clarify a role of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1), one of cell adhesion molecules, in wound healing, we investigated cutaneous wound healing in PSGL-1-deficient mice. The results suggest that PSGL-1 contributes to wound healing predominantly as a P-selectin ligand and partly as an E-selectin ligand by mediating infiltration of inflammatory cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：細胞接着分子、PSGL-1、P-selectin、創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

(1) 創傷治癒過程の理解の必要性

創傷治癒は人体が外界からの脅威を防御する上で、生体にとってきわめて重要なプロセスである。創傷治癒過程が適切に行われないと難治化し、感染症などのリスクに常に曝されるばかりでなく、QOL が著しく障害される。難治化潰瘍の代表例として、糖尿病性潰瘍、褥瘡、膠原病に伴う皮膚潰瘍などがあげられる。

糖尿病ではその微小血管障害、末梢神経障害

などにより、特に下肢に難治性の潰瘍を生じ、しばしば患肢の切断を余儀なくされる。下肢の静脈瘤症候群でも難治性の潰瘍が生じ、患者の QOL を著しく障害している。また高齢者では褥瘡がしばしば生じるが、不良な栄養状態などの様々な要因から難治化する。膠原病、特に全身性強皮症でも血管障害による循環障害によってしばしば潰瘍が難治化する。

これら難治性潰瘍に対して、現在使用されている薬剤よりさらに有効な薬剤の開発が切に望まれ

ている。このためには創傷治癒過程についてより正確な理解と、その理解に基づいて創傷治癒を促進させる因子のさらなる解析が必要となる。

(2) 創傷治癒過程における炎症細胞の重要性

創傷治癒の過程は大きく分けて4つの過程から成ると考えられている。最初の過程は血液凝固期であり、創ができると血小板・フィブリンが凝集し、まず創部を塞ぐ。次いで炎症期となり、好中球、マクロファージ、リンパ球などが創部に浸潤してくる。これら炎症細胞は侵入病原体を除去するのみならず、サイトカインや細胞成長因子を放出することによって、表皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞を活性化させ、次に続く増殖期を誘導する。増殖期では、表皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞などが増殖し、その結果再上皮化、肉芽組織の形成が起こる。その後、いったん生じた癒痕組織などを正常の組織構築に置き換える再構築期という、比較的長く続く過程が生じる。このように、炎症期に創部に浸潤する炎症細胞は、それに続く増殖期や再構築期を適切に誘導することによって創傷治癒の過程に深く関与している。

(3) 炎症細胞の炎症局所への浸潤機序：細胞接着分子の重要性

炎症細胞の局所への浸潤は、①捕捉/ローリング、②活性化、③固着、④血管外へ遊走といった一連のステップを介して行われ、この過程で白血球や血管内皮細胞に発現する細胞接着分子が重要な働きを担っている。浸潤の最初のステップである①捕捉/ローリングは、P、E、L-selectin、といった3つのセレクトリン・ファミリーによって制御される。これらセレクトリンのリガンドとしてはP-selectin glycoprotein-1 (PSGL-1)が同定されている。PSGL-1はP-セレクトリンと強く結合するが、E-セレクトリンやL-セレクトリンとも弱いながら結合する。

これら細胞接着分子は、様々な炎症反応を制御することが明らかにされており、研究代表者もこれまで、各種細胞接着分子のアルサス反応における役割 (Kaburagi Y et al.: *J Immunol* 2002; Yanaba K et al.: *Am J Pathol* 2003 & *Eur J Immunol* 2004)、慢性接触皮膚炎における役割 (Shimada Y et al.: *J Immunol* 2003; Fujita T et al.: *Am J Pathol* 2007)、UV誘導性免疫抑制における役割 (Komura K et al.: *J Immunol* 2003)、肺線維症における役割 (Hamaguchi Y et al.: *Am J Pathol* 2002; Horikawa M et al.: *Am J Pathol* 2006)、皮膚線維化における役割 (Matsushita Y et al.: *J Immunol* 2007)を報告してきた。しかし、各細胞接着分子の役割は炎症モデルによって異なるため、創傷治癒過程において、どの細胞接着分子がどの程度関与しているかを明らかにするためには、個々の細胞接着分子の、創傷治癒過程における役割を系統

的に解析する必要がある。

(4) L-selectin と ICAM-1 の創傷治癒過程における役割

研究代表者は過去に創傷治癒過程における、L-selectin と ICAM-1 の役割をL-selectin や ICAM-1 を欠損するマウスを用いて解析した。その結果、L-selectin/ICAM-1 ダブルノックアウトマウスでは、好中球やマクロファージの創部への浸潤が減少し、その結果著しい創傷治癒が生じることを報告した (Nagaoka T et al.: *Am J Pathol* 157: 237-247, 2000)。しかしながら、E、P-selectin およびそのリガンドであるPSGL-1の、創傷治癒過程における役割とその相互作用については明らかにされていない。

2. 研究の目的

以上より、本研究の目的はE、P-selectin、PSGL-1の創傷治癒過程における役割とその相互作用を明らかにすることである。そのため、それぞれのノックアウトマウスに創を作成し、創傷治癒過程の解析を行う。

本研究の特徴としては、すべてノックアウトマウスを用いて、生体の反応により近いin vivoの環境で行う点である。今回の研究では、PSGL-1とE、P-selectinの相互作用の創傷治癒における重要性が明らかにされることが予想される。特に、E、P-selectinの共通のリガンドであるPSGL-1を欠損するマウスでは、創傷治癒遅延が起こることが予想される。このような解析は、細胞接着分子の機能を活性化することによって難治性潰瘍の新たな治療戦略を考える場合に極めて重要となる。あるいは、難治性潰瘍において難治化の原因として特定の細胞接着分子の機能不全を考える場合にも重要である。

3. 研究の方法

(1) マウスの維持と繁殖

本研究に必要なPSGL-1ノックアウトマウス、P-selectinノックアウトマウス、E-selectinノックアウトマウス、およびその野生型マウスであるC57BL/6マウスは、米国Jackson Labより購入され、長崎大学および東京大学動物実験施設にて繁殖中である。それぞれのマウスは各遺伝子についてホモ接合体同士での繁殖が行われているため、基本的にはスクリーニングの必要はない。しかしながら、実験に用いる際には尾よりmRNAを抽出し、RT-PCR法にて遺伝子の欠損を確認し、結果の正確さを期する。それぞれのマウスはC57BL/6バックグラウンドへ5-10世代戻し交配済みである。7-12週齢のマウスを以下の実験に用いる。

(2) 創傷治癒の評価方法

①創作成

エーテルで麻酔後、マウスの背部を剃毛し、70%

アルコールで消毒する。マウス1匹当たり、背部に4個の全層性の創を、使い捨ての滅菌済み6mm径のパンチバイオプシーを用いて作成する。創作成後、創傷治癒過程に対する、他のマウス影響を除外するために、マウスは一匹ずつケージに入れて観察する。

②肉眼的評価(創面積)

創作成3日後、7日後にマウスに再度麻酔をかけ、創部に透明な紙を乗せ、創縁をふちどりし、その部を切り抜き、その紙の重さを量る。同じ紙で1cm²の面積の重さを量り、それを比較することによって、創面積を算出す。また、創部の感染の有無について定期的にチェックし、感染のある個体は解析から除外する。また、創の形状が類円型ではなく、歪みがあった場合には、その創は解析から除外し、各マウスで残りの創の面積の平均を解析に用いた。各解析についてそれぞれ最低10匹のマウスを用いる。

③組織学的評価(上皮間距離、肉芽組織の面積、浸潤好中球数、血管密度)

創作成3日後、7日後に、創を創縁から2mm離して全層性に採取する。創を半割し、一方を3.5%パラホルムアルデヒドで固定し、次いでパラフィンで包埋する。6μmの厚さのセクションを作り、H&E染色を行う。すべてのセクションは創の中心部より切り出す。好中球は創作成1時間後、4時間後に血管外に浸潤した数をセクション全体(0.07mm²)にて数える。上皮間距離(epithelial gap)は、上皮化のため周囲より遊走してきた上皮細胞の先端の間の距離であり、再上皮化の指標となる。上皮間距離はH&E染色したセクションで測定する。肉芽組織は新たに形成された毛細血管と線維芽細胞およびマクロファージからなる組織である。組織の画像をまずCCDカメラにて映像として取り込み、video micrometerによって上皮細胞間距離および肉芽組織の面積を算出する。血管密度については、H&E染色にて評価し、全創傷治癒面積に対する占有率として計算した。各解析についてそれぞれ最低10匹のマウスを用いる。

④免疫組織学的解析

創部に浸潤してきた炎症細胞数を測定するために免疫組織学的解析を行う。創作成3日後、7日後に採取した創の半割した残りを凍結し、免疫組織学的解析を行う。凍結組織から6μmの厚さのセクションを作り、アセトン固定し、phosphate-buffered saline (PBS)で希釈した10%正常ウサギ血清と37°C、10分間反応させ、非特異的な染色をブロックする。

セクションは次いでマクロファージ特異的な抗体であるF4/80と室温で1時間反応させる。非特異的染色のためのコントロールとしてラット免疫グロブリンGを用いる。セクションは次いでビオチン化ウサギ抗ラット免疫グロブリンG二次抗体と室温で、20分間反応させる。次いで、horseradish peroxidase 標識アビディン-ビオチン複合体と反応させる。各反応間で、セ

クションはPBSで3回洗浄を行う。セクションは3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride と hydrogen peroxide と反応させることによって発色させる。また、メチルグリーンで counterstain を行う。

肥満細胞はトルイジン・ブルー染色にて同定する。浸潤細胞数は、創ベッドにおいて400倍の拡大で、9カ所の視野をランダムに選び、その中の細胞数をカウントした平均値について解析を行う。9カ所の視野のうち、6カ所は創ベッドの両端から選び、残りの3カ所は創ベッドの中央から選ぶ。

(3) Real-time PCRによるサイトカイン、細胞成長因子のmRNA発現の定量的解析

創作成3日後、7日後の創におけるサイトカイン、細胞成長因子のmRNA発現をreal-time PCR法にて定量的に測定する。サイトカインとしては、tumor necrosis factor (TNF)-α、IL-6、IL-10を測定する。細胞成長因子としてはbasic fibroblast growth factor (bFGF)、platelet-derived growth factor (PDGF)、transforming growth factor (TGF)-βについて測定する。

具体的にはまず全RNAを凍結皮膚組織よりQIAGEN RNeasy spin column (QIAGEN社)を用いて単離する。RNAはその後cDNAにReverse Transcription System (Promega社)にて逆転写する。プライマーとプローブはPre-Developed TaqMan® Assay Reagents (Applied Biosystems)にてデザインする。Real-time PCRは以下の条件でABI Prism 7000 Sequence Detector (Applied Biosystems)を用いて行う; 50°C、2分間を1サイクル、95°C、10分間を1サイクル、92°C、15秒間を40サイクル。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を用いてmRNAを標準化する。

GAPDH PCR産物と比較して、ターゲットとなる転写産物の相対発現量をDDCt methodにて算出する。つまり、fold inductionは $2^{-[DDCt]}$ と定義され、ここでCtはthreshold cycle、つまりサンプルの比較蛍光がバックグラウンド蛍光をこえるサイクル数をさす。DDCt = [ターゲットとなる遺伝子のCt (発現量不明のサンプル)] - [GAPDHのCt (発現量不明のサンプル)] - [ターゲットとなる遺伝子のCt (キャリブレーションのサンプル)] - [GAPDHのCt (キャリブレーションのサンプル)]。コントロール抗体投与群ないしは野生型マウスにおけるサイトカインmRNA発現量をキャリブレーションとして使用する。それぞれのサンプルはtriplicateで流し、平均のCtを解析に使用する。

4. 研究成果

(1) 創面積、上皮間距離、肉芽組織の面積、および血管密度(図1、図2)

まず、PSGL-1-/-マウス、P-selectin-/-マウス、E-selectin-/-マウスの皮膚に6mm径のパンチバイオプシーを用いて創を作成し、①創面積、②上

皮間距離、③肉芽組織の面積、④血管密度をパラメータとして創傷治癒過程を評価した。受傷3日後の創面積は、P-selectin^{-/-}マウス、PSGL-1^{-/-}マウス、およびP-selectin^{-/-}マウスに抗 E-selectin 抗体を投与したマウスにおいて野生型マウスと比較して有意に増加していた。E-selectin^{-/-}マウスと野生型マウスの間に有意な差は認められなかった。これらの差は受傷7日後には認められなかった。

また、上皮化のため周囲より遊走してきた上皮細胞の先端の間の距離であり、再上皮化の指標となる上皮間距離も、創面積と同様の創傷治癒遅延が認められた。

一方、受傷3日後の肉芽組織の面積については、PSGL-1^{-/-}マウス、およびP-selectin^{-/-}マウスに抗 E-selectin 抗体を投与したマウスにおいて野生型マウスと比較して有意に減少していた。E-selectin^{-/-}マウス、P-selectin^{-/-}マウス、および野生型マウスの間には差は認められなかった。受傷7日後の肉芽組織の面積は、PSGL-1^{-/-}マウスおよび P-selectin^{-/-}マウスに抗 E-selectin 抗体を投与したマウスにおいて野生型マウスと比較して有意に減少していた。

さらに、受傷3日後の血管密度については、P-selectin^{-/-}マウス、PSGL-1^{-/-}マウスおよびP-selectin^{-/-}マウスに抗 E-selectin 抗体を投与したマウスは野生型マウスと比較して有意な減少を示した。同様の傾向は受傷7日後の血管密度についても認められた。このように、主として PSGL-1 と P-selectin が創傷治癒過程に関与していることが明らかとなった。

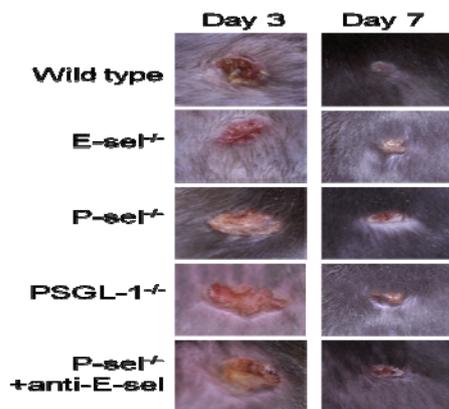


図1. 創面積

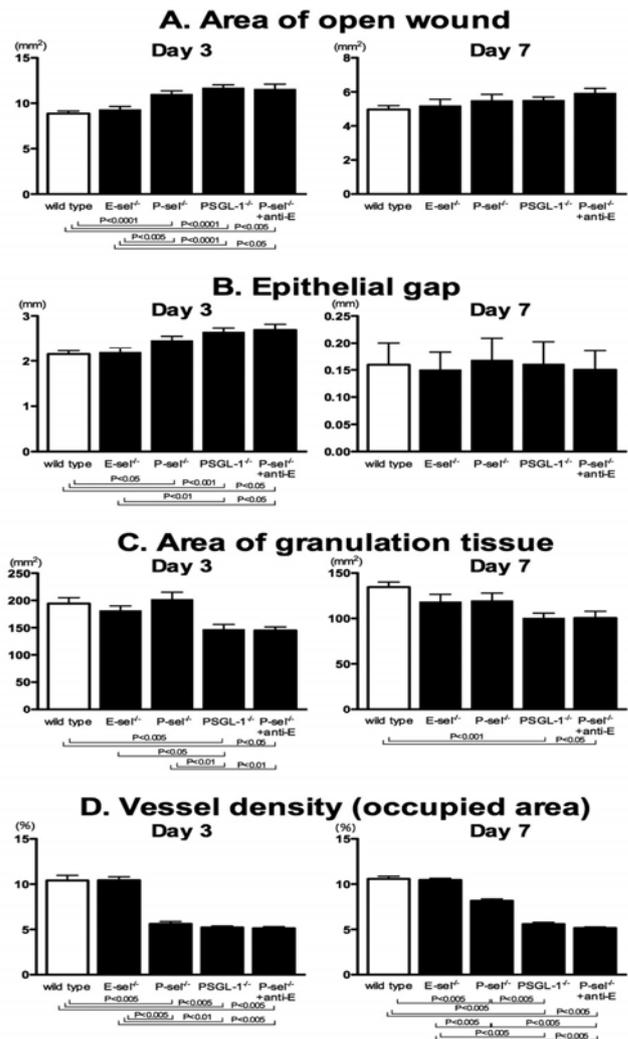


図2. 創面積、上皮間距離、肉芽組織の面積、および血管密度

(2) 創部における炎症細胞浸潤 (図3、図4)

創部における1時間後の好中球浸潤は創傷治癒遅延の認められなかった E-selectin^{-/-}マウスでは野生型マウスと有意差はなかったが、創傷治癒遅延が認められた P-selectin^{-/-}マウスでは有意に減少していた。さらに P-selectin^{-/-}マウスより肉芽組織の形成が障害されていた PSGL-1^{-/-}マウスやP-selectin^{-/-}マウスに抗 E-selectin 抗体を投与したマウスでは、P-selectin^{-/-}マウスと比較してさらに好中球浸潤が減少していた。4時間後の好中球浸潤でも同様の傾向が見られた。

さらに、受傷3日後のマクロファージ浸潤でも同様の結果が得られたが、受傷7日後には、各変異マウスと野生型マウスとの間の有意差は全く認められなくなった。従って、受傷早期のマクロファージの浸潤数が創傷治癒遅延とより強く相関している可能性が示唆された。

受傷3日後の肥満細胞浸潤については、野生型マウスに比べて、P-selectin^{-/-}マウス、PSGL-1^{-/-}マウス、P-selectin^{-/-}マウスに抗 E-selectin 抗

体を投与したマウス全てで有意に肥満細胞浸潤の減少を認めたが、この3種類の間には有意差は見られなかった。受傷7日後の肥満細胞浸潤については、ほぼ同様の結果であったが、野生型マウスと P-selectin^{-/-}マウスとの間の有意差は消失した。以上より各変異マウスにおける創傷治癒遅延は、好中球、マクロファージ、肥満細胞の浸潤と概して相関が認められた。

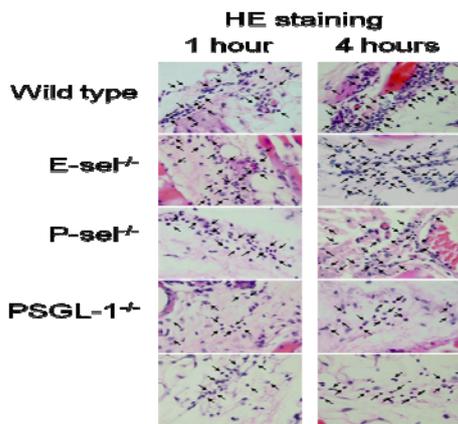


図3A. 創部における好中球浸潤

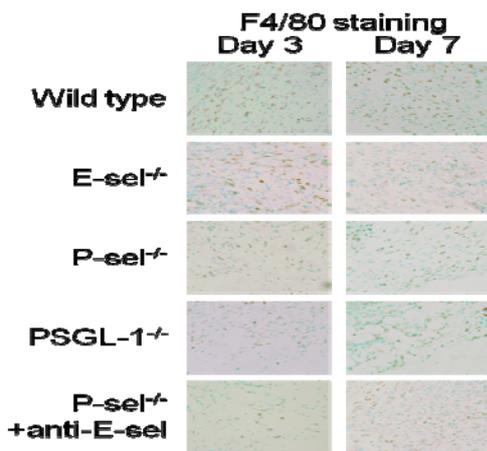


図3B. 創部におけるマクロファージ浸潤

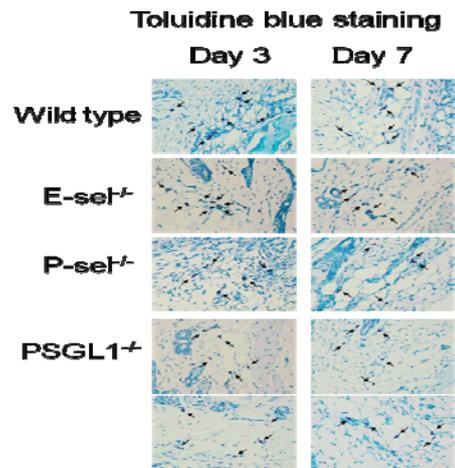


図3C. 創部における肥満細胞浸潤

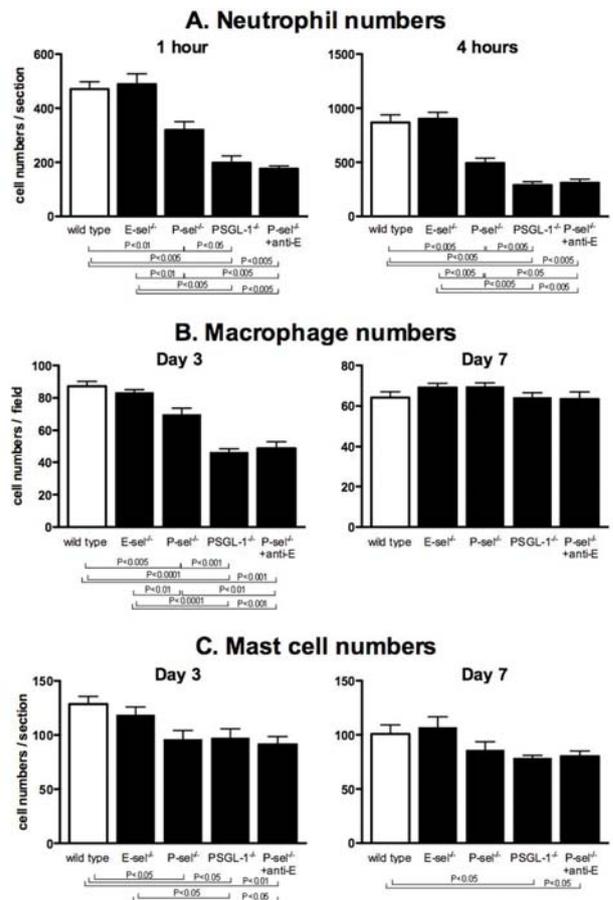


図4. 創部における炎症細胞浸潤

(3)創部のサイトカインおよび細胞成長因子の mRNA 発現 (図 5)

創部のサイトカインおよび細胞成長因子の mRNA 発現を解析したところ、E-selectin^{-/-}マウスと野生型マウスの間には、すべてのサイトカインの mRNA 発現に有意差を認めなかった。対照的に PSGL-1^{-/-}マウス、P-selectin^{-/-}マウス、抗 E-selectin 抗体処理した P-selectin^{-/-}マウスでは、すべてのサイトカインの mRNA 発現が、受傷 3 日、7 日後ともに、野生型マウスと比較して有意に低下していた。ただし、受傷 7 日後の bFGF mRNA 発現はすべての群間で有意差を認めなかった。また、PSGL-1^{-/-}マウス、P-selectin^{-/-}マウス、抗 E-selectin 抗体処理した P-selectin^{-/-}マウスの間では、すべてのサイトカインの mRNA 発現に有意差を認めなかった。ただし、抗 E-selectin 抗体処理した P-selectin^{-/-}マウスでは、P-selectin^{-/-}マウスと比較して、受傷 3 日後の IL-6 mRNA 発現が有意に低下していた。

以上より、本研究では PSGL-1 と P-selectin が創傷治癒過程に関与していることが明らかとなり、その創傷治癒遅延は創部への炎症細胞浸潤(特にマクロファージ)と細胞成長因子(特に bFGF)の発現と関連していることが明らかとなった。

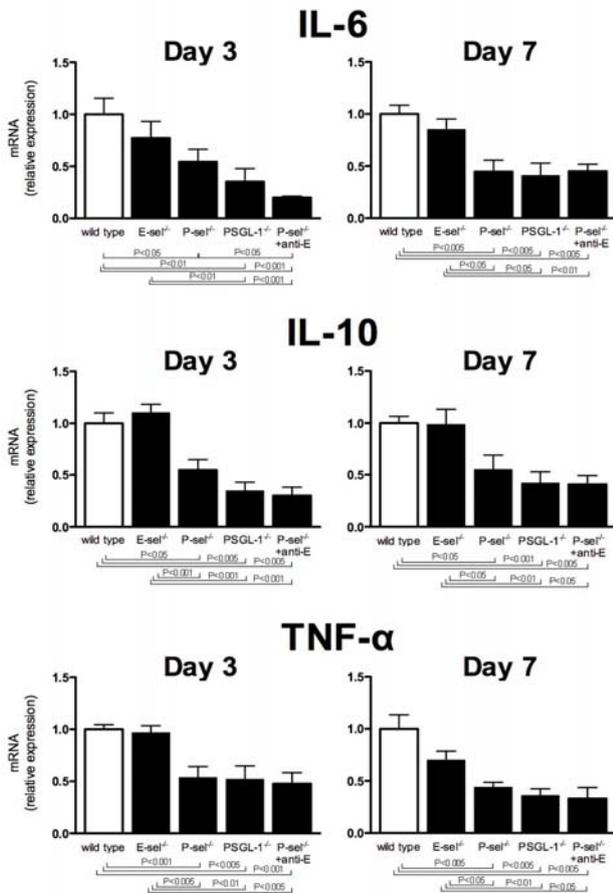


図 5A. 創部のサイトカインの mRNA 発現

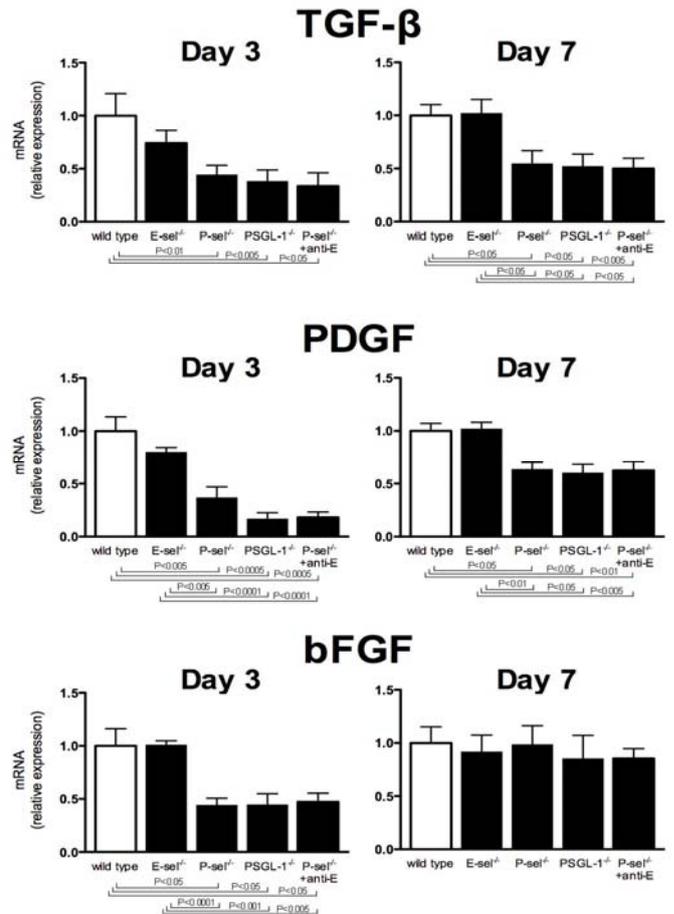


図 5B. 創部の細胞成長因子の mRNA 発現

5. 主な発表論文等

[雑誌論文]

なし

[学会発表]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 伸一 (SATO SHINICHI)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：20215792

(2) 研究分担者

小川 文秀 (OGAWA FUMIHIDE)

長崎大学医学部歯学部付属病院・講師

研究者番号：10333519

吉崎 歩 (YOSHIZAKI AYUMU)

長崎大学医学部歯学部付属病院・講師

研究者番号：40530415