

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390407

研究課題名(和文)皮膚創傷治癒過程におけるKeap1-Nrf2システムの役割と新規瘢痕予防薬の開発

研究課題名(英文)Role of Keap1-Nrf2 system in skin wound healing process

研究代表者

関堂 充 (Sekido, Mitsuru)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：40372255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：近年、酸化ストレスの防御系としてKeap1-Nrf2システムが注目されている。本研究では、皮膚創傷治癒過程と本システムとの関係を明らかにするために、Nrf2の活性化に伴い発現が変動する代表的な遺伝子であるパーオキシレドキシニンI(PrxI)に着目した。また皮膚の創傷モデルとしてアポトーシスおよび炎症を惹起する紫外線照射を用いた。その結果、PrxIを欠損させたマウス胎児由来線維芽細胞(MEF)は紫外線に対する感受性が有意に高く、易感受性であった。パーオキシレドキシニンIは皮膚に生じる酸化ストレス、アポトーシス、過剰な炎症反応を防ぐ重要な役割を持つことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The Keap1-Nrf2 system has been identified as an important for preventing cells from oxidative stress damage. In this study, we analyzed peroxiredoxin I(PrxI) which expression is regulated by Keap1-Nrf2 system. We used UVA irradiation as skin wound model, that causes cell apoptosis and inflammation. As a result, the cells derived from PrxI-knockout mice were significantly susceptible to UVA irradiation. It is revealed that PrxI is crucial factor to protect skin from oxidative stress, apoptosis and excess inflammatory response.

研究分野：形成外科学

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：酸化ストレス 紫外線 炎症

1. 研究開始当初の背景

皮膚に形成された創傷は、実質細胞の再生と細胞外マトリクスの産生を介し修復される。この過程の調節には、IL-1、IL-6をはじめとして TGF- β などの様々なサイトカインが関与し、急性期反応、滲出期の炎症細胞の遊走、血小板による止血作用や生理活性物質の分泌を経て、修復期、増殖期の血管新生、線維芽細胞増殖、肉芽組織が形成され、癒痕期でコラーゲンが架橋されるという転帰をたどる。

従来、それらの治癒機転についての各段階での検討を行っていたが、創傷治癒の開始点である受傷時のストレスから始まり、治癒過程における免疫応答のストレスなどの治癒過程における一連の創部環境のストレスの変化という視点から考えることは少なかった。

実際のところ、創傷の形成時には細胞レベルで強い酸化ストレスが惹起されていることが報告されており、治癒過程における酸化ストレスの意義は明らかになっていない。さらに、臨床上日常的に見られる糖尿病患者の術後創傷治癒の遅延に対し、糖尿病性細小血管症による微小循環障害がその原因の一つと言われており、それに伴う酸化ストレスの重要性が指摘されているが、その詳細は明らかではない。

本研究は、ストレスと創傷治癒との関係を、酸化ストレス応答遺伝子との関連から捉えることを考え、Nrf2-Keap1 システムに着目した。

活性酸素の消去や親電子性物質の代謝には、抗酸化物質・酵素系が重要であるが、これに加えて遺伝子の発現調節によっても酸化ストレスに対する防御反応がなされる。その鍵となるタンパク質が転写因子 Nrf2 である。Nrf2 は非酸化ストレス下ではその抑制タンパク質である Keap1 と結合することにより、細胞質内でユビキチン化を受け、プロテアソームにより速やかに分解されているが、酸化ストレス下では Keap1 のシステイン残基が修飾を受け、構造変化を起こすことにより、Nrf2 のユビキチン化が滞る。これにより新たに合成される Nrf2 は、Keap1 に捕捉されることなくフリーな状態で存在できるようになり蓄積し、核移行する。核移行した Nrf2 はコファクター小 Maf と共に抗酸化剤応答配列と呼ばれるシスエレメントに結合し、遺伝子の発現を正に制御する。抗酸化剤応答配列は多くの抗酸化酵素、異物代謝酵素遺伝子の発現調節

領域に存在するため、Nrf2 の活性化によりこれらの防御系遺伝子発現が統一的に誘導されることとなる。すなわち、酸化ストレス下では、Keap1 がセンサーとなり Nrf2 が蓄積、活性化され、生体防御遺伝子の転写が誘導される。

2. 研究の目的

本研究で着目する酸化ストレス防御システムである Keap1-Nrf2 は、数多くの遺伝子の発現を制御している。我々はその中から、パーオキシレドキシシン (PrxI) に焦点を当てた。PrxI は細胞内に豊富に存在する抗酸化酵素として知られており、活性酸素種である過酸化水素を始め、パーオキシサイドを消去する酵素活性を持つ。

PrxI 欠損 (KO) マウスは、鉄錯体の投与後の腎、肝に残存する活性酸素量が多い、すなわち活性酸素消去能が低い一方、肺においては薬剤誘導性の炎症が軽減されることが報告されており、酸化ストレス、炎症における PrxI の役割については統一的な理解が得られていない。特に、皮膚組織における PrxI の役割や紫外線照射、創傷との関係については未解明のままである。

本研究は PrxI 欠損マウスを用いて、紫外線照射による皮膚障害における PrxI の役割を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

WT、PrxI-KO マウスより、胎児由来線維芽細胞(MEF)を調製した。

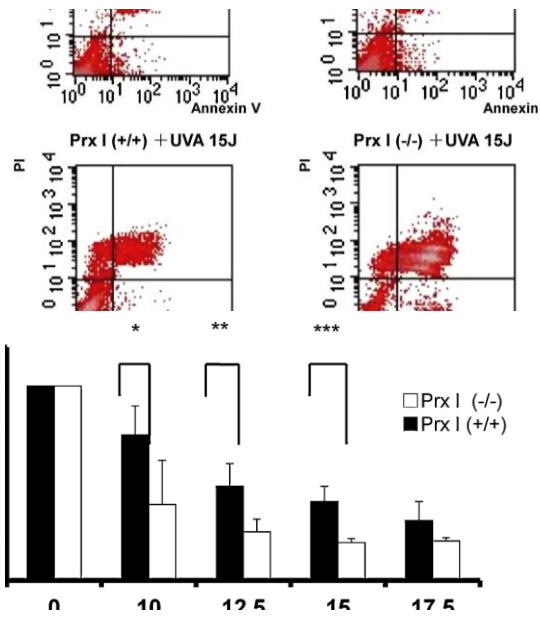
紫外線を照射後、生存率を MTT アッセイ、アポトーシス細胞存在率をフローサイトメトリー、アポトーシス、炎症関連タンパク質の発現レベルをウエスタンブロットおよびリアルタイム PCR、活性酸素の発生については、蛍光顕微鏡を用いて評価した。

4. 研究成果

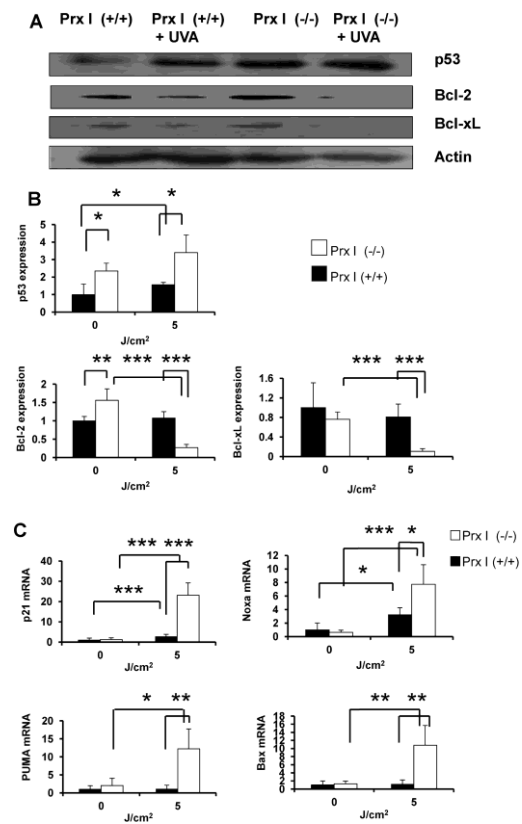
以下に示す通り、紫外線 (UVA) 照射により、照射量依存的に細胞死が観察されたが、その程度は PrxI-KO (PrxI $-/-$) 細胞でより顕著であった。

また、フローサイトメトリーによる解析からは、UVA 照射により起きる細胞死はアポトーシスであり、その率は PrxI-KO 細胞で明らかに増加していた。

以上の結果より、PrxI の欠損により細胞は UVA 照射に対する感受性が亢進し、アポトーシス細胞死を起こし易くすることが明らかとなった。

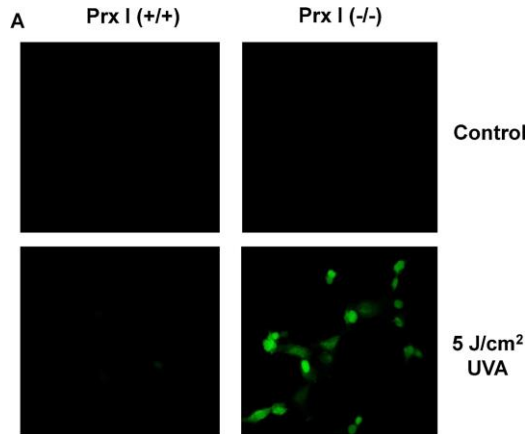


このとき、アポトーシスシグナルに関与するタンパク質発現をウエスタンブロット、リアルタイムPCRにより調べたところ、KO細胞で促進タンパク質発現の増加、抑制タンパク質の低下が認められ、シグナル伝達レベルでアポトーシスが亢進していることがわかった (下図)。

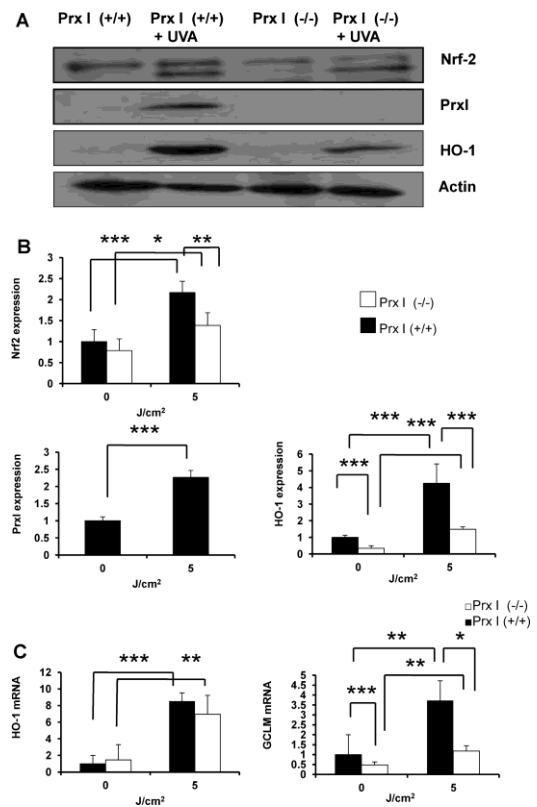


さらに、UVA 照射による活性酸素の発生を解析したところ、KO 細胞では、WT 細胞ではほとんど検出されないレベルの紫外線照

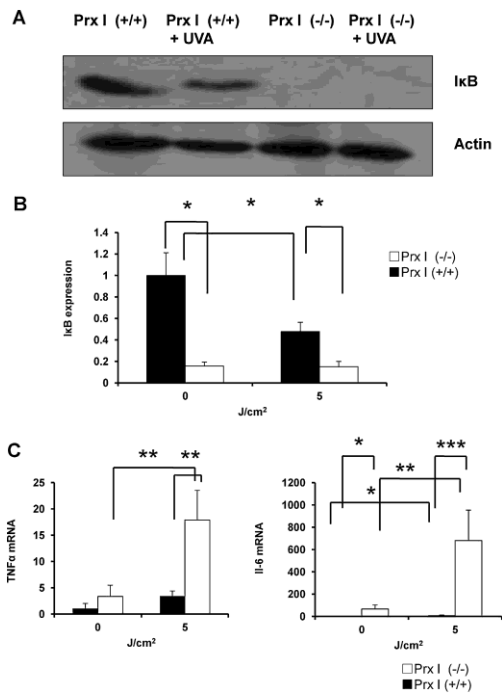
射下においても、著明な活性酸素の生成を認めることがわかり (下図)、これが細胞死に結びついている可能性が示唆された。



次に、紫外線照射の Keap1-Nrf2 システムへの影響を調べたところ、紫外線は Nrf2 を活性化させる刺激となっていることが明らかとなった。このとき、Prx1 の誘導も惹起されていた。興味深いことに、Nrf2 制御下の遺伝子発現誘導は、Prx1-KO 細胞で顕著に低下していた (下図)。



最後に、炎症反応との関連を解析した。炎症シグナル NF- κ B 経路は、Prx1-KO 細胞で紫外線照射により顕著に活性化しており、炎症性サイトカインの産生についても KO 細胞で亢進していた (次頁図)。



以上の結果から、パーオキシレドキシニン I は、紫外線照射下で生じる活性酸素の除去に重要であり、アポトーシス、過剰な炎症反応を抑制する働きがあることが明らかとなった。

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 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 20 件)

1. 佐々木 薫, 足立 孝二, 関堂 充, 古川 洋志, 東 隆一: 下腿、足部に用いる皮弁の選択, 第 4 回茨城形成外科研究会 (水戸), 2013 年 11 月 2 日
2. 関堂 充, 足立 孝二, 佐々木 薫, 阿部 加代子, 坂東 裕子, 田中 優子, 井口 研子, 池田 達彦, 原 尚人, 佐々木 正浩: 乳房全摘後の皮弁選択—広背筋皮弁と腹部皮弁, 第 1 回日本乳房オンコプラスティックサージャリー学会総会 (福岡), 2013 年 9 月 20 日
3. 藤 栄治, 柳川 徹, 正田 純一. p62/Sequestosome1 欠損によるメタボリ

ックシンドローム発症機序の解析. 第 66 回日本酸化ストレス学会 2013 年 6 月 13 日

4. 佐々木 薫, 足立 孝二, 佐々木 正浩, 會沢 哲士, 大島 純弥, 今井 裕季子, 富樫 真二, 関堂 充: 遊離皮弁による頭頸部再建の周術期合併症の検討, 第 56 回日本形成外科学会総会・学術集会 (東京), 2013 年 4 月 4 日
5. 佐々木 正浩, 関堂 充, 佐々木 薫, 足立 孝二, 富樫 真二, 會沢 哲士, 笠井 丈博, 今井 裕季子: 瘻痕のある下腹部皮弁での乳房再建の経験, 第 56 回日本形成外科学会総会・学術集会 (東京), 2013 年 4 月 4 日
6. 佐々木 薫, 久保 論, 関堂 充, 清澤 智晴: 手掌部デグロージング損傷の 2 例の経験, 第 39 回日本マイクロサージャリー学会学術集会 (福岡), 2012 年 12 月 7 日
7. 関堂 充, 佐々木 薫, 足立 孝二, 佐々木 正浩, 富樫 真二: 微小血管吻合を用いた乳房一次、二次再建の問題点, 第 39 回日本マイクロサージャリー学会学術集会 (福岡), 2012 年 12 月 6 日
8. 大島 純弥, 佐々木 正浩, 佐々木 薫, 足立 孝二, 富樫 真二, 関堂 充: 遊離深下腹壁動脈穿通枝皮弁を用いた肥満患者の巨大乳房即時再建の一例, 第 39 回日本マイクロサージャリー学会学術集会 (福岡), 2012 年 12 月 6 日
9. 足立 孝二, 佐々木 薫, 富樫 真二, 佐々木 正浩, 會沢 哲士, 今井 裕季子, 大島 純弥, 笠井 丈博, 関堂 充: 幼児期よりレーザー治療を開始した色素血管母斑症の 2 例, 第 33 回日本レーザー医学会総会 (大阪), 2012 年 11 月 10 日

10. Eiji Warabi, Airi Ueda, Tetsuro Ishii. Estradiol prevents obesity formation in Sqstm1/p62-KO mice. 16th SFRR Biennial Meeting, London, September 6, 2012
11. Mitsuru Sekido, Koji Adachi, Kaoru Sasaki, Shinji Togashi, Kenta Tanakura, Yuhei Yamamoto: FREE FLAP TRANSFER FOR REFRACTORY FISTULA AFTER HEAD AND NECK SURGERY, 4th Congress of the World Union of Wound Healing Societies, Yokohama, September 6, 2012
12. 江藤 綾乃, 佐々木 薫, 関堂 充: 小耳症助軟骨移植後の軟骨露出に対する V.A.C.ATS®治療システムの有用性, 第 4 回日本創傷外科学会総会・学術集会 (博多), 2012 年 7 月 27 日
13. Mitsuru Sekido, Koji Adachi, Kaoru Sasaki, Shinji Togashi, Takakazu Tamada, Go matsumoto: Is A Neck Fixation really necessary after Microsurgical Head and Neck Reconstruction? -From an Anatomical Study- The 11th Japan-Korea Congress of Plastic and Reconstructive Surgery, Hyogo, May 17, 2012
14. 佐々木 正浩, 関堂 充, 足立 孝二, 佐々木 薫, 富樫 真二, 川井 啓太, 渋谷 陽一郎, 高橋 典子: T4 乳がんにおける乳房一期再建の経験, 第 55 回日本形成外科学会総会・学術集会 (東京), 2012 年 4 月 11 日
15. 佐々木 薫, 渋谷 陽一郎, 富樫 真二, 足立 孝二, 関堂 充, 久保 諭, 東 隆一, 清澤 智晴: 手指 3 度熱傷 4 例の検討, 第 55 回日本形成外科学会総会・学術集会 (東京), 2012 年 4 月 11 日
16. Kosuke Okada, Eiji Warabi, Ken Itoh, Tetsuro Ishii, Masayuki Yamamoto, Junichi Shoda. Nrf2 plays protective roles against nutritional steatohepatitis. Molecular Mechanisms of Stress Response in Disease, Tsukuba, April 6, 2012
17. Norihiko Kikuchi, Yukio Ishii, Toru Yanagawa, Eiji Warabi, Tetsuro Ishii. The role of peroxiredoxin I in the development of bleomycin-induced acute lung injury and pulmonary fibrosis. Molecular Mechanisms of Stress Response in Disease, Tsukuba, April 6, 2012
18. 軽部 令, 柳川 徹, 富樫 真二, 足立 孝二, 大和地 正信, 篠塚 啓二, 石橋 直美, 後藤 麻希子, 佐々木 裕芳, 山縣 憲司, 鬼澤 浩司郎, 武川 寛樹: Hausdorff 距離を用いた唇裂手術後の鼻孔形態に関する新しい評価方法, 第 56 回日本口腔外科学会総会・学術集会 (大阪), 2011 年 10 月 21 日
6. 研究組織
 (1)研究代表者
 関堂 充 (SEKIDO, Mitsuru)
 筑波大学・医学医療系・教授
 研究者番号: 40372255
- (2)研究分担者
 柳川 徹 (YANAGAWA, Toru)
 筑波大学・医学医療系・准教授
 研究者番号: 10312852
- 藤 栄治 (WARABI, Eiji)
 筑波大学・医学医療系・講師
 研究者番号: 70396612
- 正田 純一 (SHODA, Junichi)
 筑波大学・医学医療系・教授
 研究者番号: 90241827
- 石井 哲郎 (ISHII, Tetsuro)
 筑波大学・医学医療系・教授
 研究者番号: 20111370
 (H23)
- (3)連携研究者
 なし