

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592706

研究課題名(和文)新しいメタボリックシンドロームモデルマウスを用いた創傷治癒メカニズムの解析

研究課題名(英文)Analysis of wound healing mechanism in novel metabolic syndrome model mice

研究代表者

佐々木 薫 (Sasaki, Kaoru)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：10536220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：p62遺伝子欠損マウスは過食、肥満を引き起こすメタボリックシンドロームモデルマウスである。本研究はp62欠損マウスおよび初代培養細胞を用いて、紫外線誘導性アポトーシスに対する感受性を検討した。その結果、p62欠損によりアポトーシス抵抗性となることが細胞レベル、個体レベル両面から示された。そのメカニズムとして、p62欠損により抗アポトーシスタンパク質の発現が転写因子Stat3の活性化亢進によって引き起こされることによるものであることが示された。これらのことから、p62はStat3の活性化を制御する新規な因子であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：p62 gene knockout mice exhibit obesity and metabolic syndrome due to hyperphagia. In this study, we analyzed sensitivity to ultraviolet irradiation induced apoptosis using p62-KO mice and primary cells isolated from mice. As a result, we found deletion of p62 cause apoptosis resistance in both in vitro and in vivo level. The enhancement of transcription factor Stat3 activity seems to be involved in this phenotype by inducing anti-apoptotic protein induction. These results suggest that p62 is a novel factor to regulate Stat3 activity.

研究分野：形成外科学

キーワード：創傷治癒 紫外線 アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

創傷治癒 wound healing は、生体に生じた損傷が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過程である。その調節には IL-1、IL-6 をはじめとして TGF- $\beta$  などのサイトカインが深く関与し、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から、修復期、増殖期の血管新生、線維芽細胞増殖、肉芽組織形成となり、癒着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。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いるが、その詳細は明らかではない。申請者らはこれまで、同年齢の同様な症例、同様な皮膚の傷害を受けているにもかかわらず、その治癒の過程が異なり、臨床の場での創傷治癒に影響を与える因子を分子生物学的手法で明らかにできないかと考えていたが、臨床のアウトプットと、従来の静的な分子自体の関係で見ると、ギャップを埋めることができず、苦慮していた。そこで今回、ストレス応答遺伝子 p62 が関わる代謝異常という新しい概念から創傷治癒を捉えることを考え、この p62 遺伝子の欠損マウスに着目して本研究の着想に至った。

p62 は、Nrf2-Keap1 に制御されている遺伝子であり、申請者らは、Nrf2-Keap1 システムの研究過程で、血流やメスによる切開などにより生じる物理的外力に伴い発現変動する遺伝子をマイクロアレイにより網羅的に探求したところ、p62 が動くことを発見した。

p62 の分子機能を明らかにすべく、その遺伝子欠損 (KO) マウスを作製し、解析を行ってきた。その結果、驚くべきことに p62-KO マウスは過食となり、それに伴うメタボリックシンドロームを呈した。申請者らの最新の知見からは、この KO マウスは摂餌量を通常量に制限すると病態の発症が抑制されることから、病態の発症は摂食抑制ホルモンのシグナル伝達異常による過食が病態の主因であると考えられる。しかし興味深いことに、p62 は摂食調節に関わることが知られている組織以外にも、皮膚組織を含むほぼ全身で発

現認められ、それらの組織における役割は明らかでない。

従来、メタボリックシンドロームのモデルとして、野生型動物への高脂肪食の負荷や、激的な過食を呈する ob/ob マウスなどが用いられてきた。本研究で用いる A170 KO マウスは通常食下で比較的穏やかな過食が積み重なることによってメタボリックシンドロームを発症するもので、ヒトにおける病態と酷似しており、得られた結果の臨床応用へのフィードバックに極めて有用なモデル動物であると考えられる。

## 2. 研究の目的

p62-KO マウスおよび胎児線維芽細胞(MEF)を用いて *in vivo*, *in vitro* の両面からアポトーシスに対する感受性を調べ、そのメカニズムを明らかにするとともにアポトーシスにおける p62 の機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

野生型 (WT)、p62 欠損 (KO) マウスより調製した胎児線維芽細胞 (MEF) を実験に用いた。個体を用いた実験では、各種雄性 8-10 週齢のマウスを用いた。

### (1) UVB 誘導性アポトーシスにおける p62 の役割

各種 MEF に UVB を照射し、一定時間経過後に起きるアポトーシスを FACS、MTT アッセイにより調べた。

### (2) アポトーシス、抗アポトーシス関連遺伝子、タンパク質の解析

リアルタイム PCR 法、ウエスタンブロット法により Src, Stat3, Bcl-2, Bcl-xL の発現量、およびリン酸化状態を解析した。

### (3) UVB による DNA 障害の検出

DNA 修復応答遺伝子である ATM の発現量をリアルタイム PCR 法により定量することで評価した。

### (4) 個体レベルにおける UVB による皮膚障害の評価

雄性マウスを除毛し、麻酔下で UVB を照射した後に皮膚病理切片を作製した。HE 染色により凝集した核を持つ表皮細胞をカウントすることでアポトーシスの度合いを調べた。

## 4. 研究成果

### (1) UVB 誘導性アポトーシスにおける p62 の役割

p62-KO マウス由来 MEF は UVB 照射により誘導されるアポトーシスを起こしにくいことが明らかになった。この現象は、WT MEF を siRNA によりノックダウンした細胞においても確認され、UVB 誘導アポトーシスにおける p62 の関与が明確になった (図 1)。

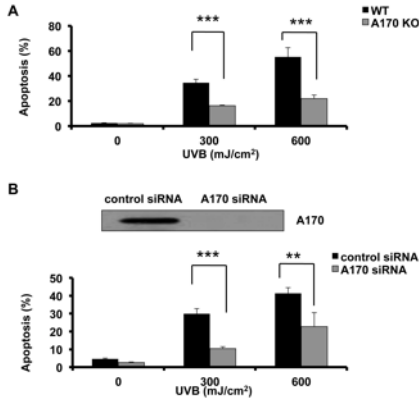


図1 UVB障害に対するWTとA170欠損MEFの比較

(A) WTとA170-KO MEFにUVBを300あるいは600 mJ/cm<sup>2</sup>それぞれ照射し、24時間後の細胞をAnnexinV/PIで染色しアポトーシス細胞をFACSで解析した。(B) siRNAによりA170をノックダウン(KD)したMEFとコントロールMEFにUVBを300あるいは600 mJ/cm<sup>2</sup>それぞれ照射し、24時間後の細胞をAnnexinV/PIで染色しFACSでアポトーシス細胞を定量化した。 \*\*P<0.01 \*\*\*P<0.005

(2) アポトーシス、抗アポトーシス関連遺伝子、タンパク質の解析

抗アポトーシスに関わることが知られている因子についてウエスタンブロットによる解析を行なった。p62-KO細胞は、Srcのリン酸化、Stat3のリン酸化が基底状態で亢進していた(図2)。

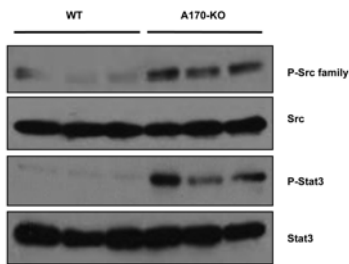


図2 WTとA170-KO MEFにおけるSrcとStat3のリン酸化レベルの比較

WTとA170-KO MEFでSrcとその基質の一つであるStat3のリン酸化レベルをそれぞれに特異的な抗体を使用しウエスタンブロットにより検出した。

また、Srcの阻害剤を処理すると、KOマウスのUVBに対する感受性は顕著に高まった(図3)。これにより、Src経路の亢進が関与していることが明らかになった。さらに、KO MEFでは抗アポトーシス因子であるBcl-2,xlのmRNA発現量の亢進が見られた(図4)。

(3) UVBによるDNA障害の検出

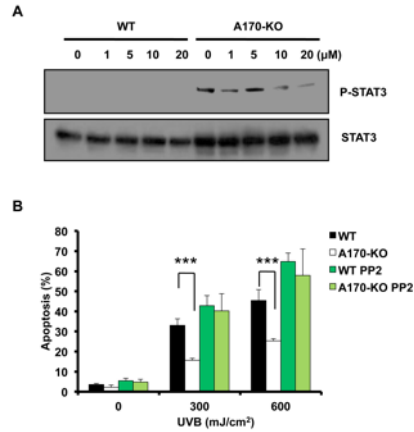


図3 Srcキナーゼ阻害剤PP2によるStat3のリン酸化阻害とUVB障害への影響

(A) WTとA170-KO MEFをSrc阻害剤PP2を1-20 μMで処理し、ウエスタンブロットによりStat3とP-Stat3を比較した。(B) WTとA170-KO MEFをPP2(20 μM)で12時間処理し、UVBを300と600 mJ/cm<sup>2</sup>それぞれ照射し、24時間後の細胞をAnnexinV/PIで染色しアポトーシス細胞をFACSで定量化した。 \*\*\*P<0.005

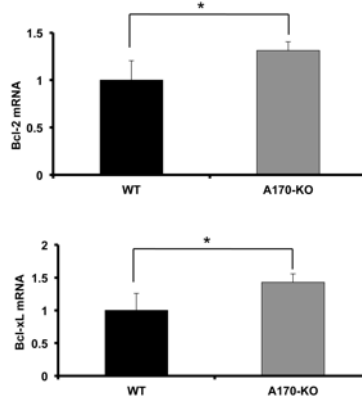


図4 WTとA170-KO MEFにおけるBcl-2とBcl-xL mRNA発現量の比較

WTとA170-KO MEFで転写因子Stat3によって転写誘導される抗アポトーシス因子であるBcl-2とBcl-xLのmRNAの発現量をリアルタイムPCRにより定量化した。 \*P<0.05

UVBによるATMの発現量は、WTとKOで変わらなかったことから、UVBによるDNAの障害はKO MEFでも同程度に起きると考えられた(図5)。

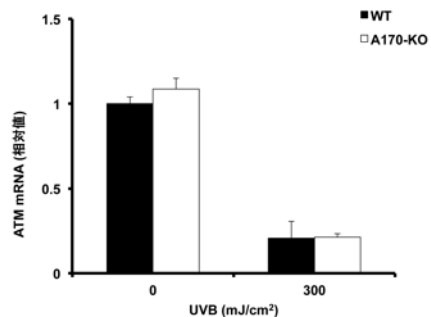


図5 WTとA170-KO MEFにおける修復応答遺伝子ATM mRNAの相対的発現量

WTとA170-KO MEFにUVBを300 mJ/cm<sup>2</sup>照射し、12時間後のDNAダメージにより応答する遺伝子であるATMのmRNAの発現量をリアルタイムPCRにより検出した。

#### (4) 個体レベルにおける UVB による皮膚障害の評価

マウス個体に UVB を照射し、皮膚組織の障害の程度を組織学的に観察した。p62-KO マウスは培養細胞での検討の結果と同様に、障害がより軽微であった (図6)

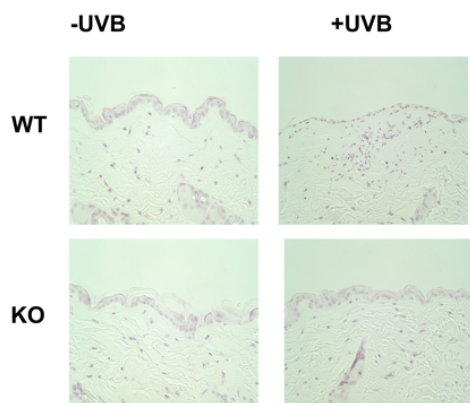


図6 UVB皮膚障害の比較

WTとA170-KOマウスにUVBを200 mJ/cm<sup>2</sup>照射し、24時間後の皮膚をホルマリン固定後、切片をHE染色し光学顕微鏡で観察した。UVB照射したWTの表皮では核の凝縮が起こっているが、A170-KOの表皮では核の凝縮が見られない。

#### 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]

なし

[学会発表] (計 21 件)

1. 藤 栄治. 生活習慣病と p62/Sqstm1. 第 31 回臨床フリーラジカル会議 2014.12.5, 京都
2. Kentaro Akiyama, Eiji Warabi, Kosuke Okada, Miho Ikeuchi, Katsumi Kose, Junichi Shoda. Deletion of both p62 and Nrf2 spontaneously leads to development of steatohepatitis in mice. AASLD, Boston 2014.11.7, Boston, USA
3. 秋山健太郎, 藤 栄治, 正田 純一. 非アルコール性脂肪性肝炎自然発症モデルマウスにおける腸肝相関からみた病態評価と機序の解明. JDDW 2014.10.23, 神戸
4. 秋山健太郎, 池内 美穂, 正田 純一, 藤 栄治. p62: Nrf2 遺伝子二重欠損

マウスは kupffer 細胞の貪食能が低下し、脂肪性肝炎を発症する. 第 87 回日本生化学会 2014.10.15, 京都

5. 藤 栄治. ノックアウトマウスから見る p62/Sqstm1 の分子機能. 第 67 回日本酸化ストレス学会 2014.9.4, 京都
6. 秋山健太郎, 藤 栄治, 正田純一. p62 および Nrf2 遺伝子の二重欠損マウスにおける NASH 発症機序の解明-肝と腸管の臓器連関の観点より. 第 50 回日本肝臓学会総会 2014.5.29, 東京
7. 藤 栄治, 秋山健太郎, 正田純一. p62, Nrf2 遺伝子二重欠損マウスにおける腸肝相関よりみた NASH 発症機序の解明. 第 100 回日本消化器病学会 2014.4.23, 東京
8. Kentaro Akiyama, Akira Ikeda, Kosuke Okada, Junichi Shoda, Eiji Warabi. p62 and Nrf2 deficiency is associated with progression of nonalcoholic steatohepatitis. SFRRRI, Kyoto, 2014.3.23, Kyoto
9. Tetsuro Ishii, Eiji Warabi, Richard C. Siow, Giovanni E. Mann. Regulation of arterial remodeling through interaction of Sequestosom1/p62 with redox-sensitive Kv channels. SFRRRI, Kyoto, 2014.3.23, Kyoto
10. Tetsuro Ishii, Eiji Warabi, Toru Yanagawa, Rie Yanagisawa. Proinflammatory functions of extracellular Peroxiredoxin 1 : A case in ozone induced acute lung inflammation in mice. SFRRRI, Kyoto, 2014.3.23, Kyoto
11. Eiji Warabi, Kentaro Akiyama, Junichi Shoda and Tetsuro Ishii. Obesity in p62-KO mice is prevented by estradiol. The Environmental Response, 2014.2.28, Sendai
12. 藤 栄治, 石井哲郎, 正田純一. p62/Sqstm1 欠損は中枢におけるレプチン抵抗性により過食を引き起こす. 第 8 回臨床ストレス応答学会 2013.11.15, 松本
13. 藤 栄治, 秋山健太郎, 正田純一. p62:Nrf2 遺伝子二重欠損マウスは過食により NASH を自然発症する. JDDW 2013.10.9, 東京

14. 秋山健太郎、岡田浩介、正田純一、蕨 栄治. p62:Nrf2 遺伝子二重欠損マウスは脂肪性肝炎を自然発症する. 第 68 回日本生化学会 2013.9.11、横浜
  15. Tetsuro Ishii, Eiji Warabi, Richard C.M. Siow and Giovanni E. Mann. Interaction of Sequestosomel/p62 with voltage-activated potassium channels in arterial smooth muscle cells in injury-induced arterial remodeling. IUPS2013, 2013.6.21, Birmingham, UK
  16. 蕨 栄治、柳川徹、正田純一. p62/Sequestosomel 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 2013.6.13、名古屋
  17. 秋山健太郎、正田純一、蕨 栄治. 過食肥満により脂肪性肝炎を自然発症する p62:Nrf2 遺伝子二重欠損マウスの腸管病変とその病態的意義. 第 21 回肝病態生理研究会 2013.6.5、東京
  18. 秋山健太郎、正田純一、蕨 栄治. 過食肥満により脂肪性肝炎を自然発症する p62:Nrf2 遺伝子二重欠損マウスの腸管病変とその病態的意義. 第 49 回日本肝臓学会 2013.6.6、東京
  19. 池田瑛、蕨 栄治、正田純一. 脂肪性肝炎を自然発症する過食肥満マウスの腸管病変と病態的意義. 第 99 回日本消化器病学会総会 2013.3.21、鹿児島
  20. 蕨 栄治、岡田浩介、正田純一. Nrf2 : p62 遺伝子二重欠損マウスは脂肪性肝炎を自然発症し、肝腫瘍を発生する JDDW 2012.10.10、神戸
  21. 蕨 栄治、岡田浩介、徳重克年、橋本悦子、正田純一. Nrf2/p62 遺伝子二重欠損マウスは脂肪性肝炎を自然発症し、肝腫瘍を発生する. 第 20 回肝病態生理研究会 2012.6.6、金沢
  22. 蕨 栄治、岡田浩介、徳重克年、橋本悦子、正田純一. Nrf2/p62 遺伝子二重欠損マウスは脂肪性肝炎を自然発症し、肝腫瘍を発生する. 第 48 回日本肝臓学会総会 2012.6.7、金沢
  23. Eiji Warabi, Airi Ueda, Tetsuro Ishii. Estradiol prevents obesity formation in Sqstm1/p62-KO mice. 16<sup>th</sup> SFRRRI Biennial Meeting, 2012.9.6, London, UK
  24. Sechang Oh, Eiji Warabi, Masayuki Yamamoto, Kiyoji Tanaka, Junichi Shoda. Nrf2 activation remarkably improves exercise endurance capacity in mice. 16<sup>th</sup> SFRRRI Biennial Meeting, London, 2012.9.6, London, UK
  25. Eiji Warabi. Non-dipper-like hypertension in sequestosomel deficient mice, Molecular Mechanisms of Stress Response in Disease, 2012.4.6, Tsukuba
  26. Satoshi Sakai, Eiji Warabi, Satoru Katayanagi, Toru Yanagawa, Tetsuro Ishii. Deficiency of sequestosomel accelerates neointimal hyperplasia and carotid artery remodeling, Molecular Mechanisms of Stress Response in Disease, 2012.4.6, Tsukuba
  27. 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, 2012.4.6, Tsukuba
  28. 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, 2012.4.6, Tsukuba
6. 研究組織  
 (1) 研究代表者  
 佐々木 薫 (SASAKI, Kaoru)

筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号：10536220

(2)研究分担者

蕨 栄治 (WARABI, Eiji)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号：70396612

柳川 徹 (YANAGAWA, Toru)  
筑波大学・医学医療系・准教授  
研究者番号：10312852

(3)連携研究者

なし