

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：21102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650447

研究課題名(和文) 心筋梗塞の新規治療法開発のための心臓の胎仔創傷治癒機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of scarless wound healing in the fetal myocardium: therapeutic implications of myocardial infarction.

研究代表者

今 淳 (Kon, Atsushi)

青森県立保健大学・健康科学部・教授

研究者番号：60271798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円、(間接経費) 630,000円

研究成果の概要(和文)：心筋の胎仔創傷治癒機構(FWH)が成獣創傷治癒機構(AWH)へ移行する時に、遺伝子がどう変動するか網羅的に解析した。その結果、多数の変動遺伝子を検出し、特に、Has-2, MMP, fibromodulinの抗線維化に関連する遺伝子は抑制し、I型コラーゲン、アクチン、TGF-betaの線維化に関連する遺伝子、toll-like receptor、シクロオキシゲナーゼ等の免疫に関与する遺伝子は上昇した。次に、抑制した遺伝子を心筋壊死組織に導入したところ、軽度に抗線維化を認めたが、何れも完全なFWHは誘導されなかった。従って、各遺伝子はFWHのマスター遺伝子ではなく、更なる遺伝子の関与が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the specific gene expressed in fetal wound healing (FWH) in mice, characterized by without scar formation. By using DNA microarray analysis, anti-fibrosis related genes, Has-2, MMP, and fibromodulin genes, highly expressed in FWH, whereas the expression of these genes down-regulated in adult wound healing (AWH) with scar formation. On the contrary, fibrosis-related genes including gene for type I collagen, actin, and TGF-beta up-regulated in AWH. Immune reaction related genes such as Toll-like receptor and cyclooxygenase also increased in AWH. Next, we injected strongly expressed genes in fetal wound healing into myocardial infarction tissue of adult mice. As the result, each gene did not induce perfect scarless reaction but slight anti-fibrotic reaction, suggesting alone administration of each gene was not effective, and cocktail therapy, the combination of multiple genes, are necessary of inducing of FWH.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：胎仔創傷治癒 心臓 心筋梗塞 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞は致死率の非常に高い疾患である。医療技術の進歩で救命率は向上したが、救命後の心筋壊死部は線維化を認める組織の癒痕に置き換わるため、正常な心拍動は失われてしまい、患者のQOLは著しく低下することになる。従って、癒痕形成を阻止して、正常な心筋組織を再生させることが治療上の目標となるが、その有効な治療法は現時点では全く無いのが現状である。

哺乳類動物では、組織が強い損傷を受けると、癒痕を形成して治癒し、この部の機能は失われる。しかしながら、胎生期のある時期までには、臓器がどのような強い損傷を受けても、癒痕を全く形成することが無く、完全に再生できる機構が存在する。この機構を胎仔創傷治癒機構と言う。この胎仔創傷治癒機構を解析し、大元締めマスター遺伝子を同定することができれば、この遺伝子を心筋壊死部に導入すると、全く癒痕を形成せず、心筋が完全に再生され、患者のQOLを向上させる画期的な治療法の開発に繋がると大いに期待される。

これまで胎仔創傷治癒機構の研究は主に皮膚に関して進められてきた。事実、皮膚の胎仔創傷治癒機構が存在する時期、そして癒痕が形成される通常の成獣創傷治癒機構に転換する時期は報告され、関与する遺伝子も報告されている。しかし研究報告は個々の遺伝子に関する単発的な報告が殆どであり、他の遺伝子との相関関係など、詳細な解析は十分には行われておられない。しかも胎仔創傷治癒機構の大元締めであるマスター遺伝子も同定されていない。このような状況において、心臓の胎仔創傷治癒機構に関しては、機構の存在することは報告されている。しかしながら殆ど解析が進んでいないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、マウスの心筋組織の胎仔創傷治癒機構を解析する。胎仔創傷治癒機構から成獣創傷治癒機構へ移行する時、どのような遺伝子の発現が変動しているのか、その網羅的解析を最初に行う。そして次に、検出した遺伝子の内、著明に変動する遺伝子を、人工的に作製したマウスの心筋壊死組織に導入し、どの遺伝子が癒痕形成の阻止と心筋の再生能を有しているのかを評価し、マウス心臓の胎仔創傷治癒機構のマスター遺伝子の同定を試みる。

3. 研究の方法

最初に、胎仔創傷治癒機構及び成獣創傷治癒機構を認める各胎生期のマウス胎仔の心臓を実体顕微鏡で観察しながら摘出する。次いで心臓に切開創を作製し、各心臓の器官培養を行う。各マウスの切開創の創傷治癒を観察してから、心筋組織における mRNA を抽出し、マイクロアレー法に掛けて、各心筋組織で発現している全遺伝子の発現が胎仔創傷

治癒機構から成獣創傷治癒機構へ移行すると、どのように変動するのか網羅的に解析する。次に、この結果を基にして、発現変動の著明な遺伝子の発現制御機構の詳細をリアルタイム PCR 法で解析した。そして最後に、各遺伝子の発現ベクターを構築し、心筋壊死を人工的に作製した成獣マウスの心筋組織内に導入した。どの遺伝子を導入すると癒痕の形成が阻止され、癒痕部が正常な心筋組織へと再生されているのかの解析し、マウス心臓における胎仔創傷治癒機構のマスター遺伝子の発掘を試みる。

4. 研究成果

最初に、胎仔創傷治癒機構及び成獣創傷治癒機構を認めるマウスの心臓を摘出し、それぞれに切開創を作製した。次いで各心臓の器官培養を行い、切開創が完全に再生できるかどうかを観察した。その結果、切開創は両マウスにおいても多少なりとも残存しており、完全な再生は行われていなかった。しかし胎仔創傷治癒機構では、癒痕形成が成獣創傷治癒機構よりも抑制されていた。成獣創傷治癒機構では創傷治癒が非常に遅延すると共に、癒痕形成を認め、組織学的にもⅠ型コラーゲンを主体とした過剰沈着を認め、癒痕組織の形成が観察された。

そこで次に、胎仔創傷治癒機構から成獣創傷治癒機構へと移行するとマウスの心筋組織で発現している全遺伝子の発現がどのように変動しているのか、マイクロアレー法で網羅的に解析した。その結果、胎仔創傷治癒機構から成獣創傷治癒機構へ移行する際に著明に変動する 170 種類以上の多数の遺伝子が検出された。注目すべきものとしては、癒痕形成を抑制する作用のあるヒアルロン酸の代謝に関する遺伝子が検出された。特にヒアルロン酸の合成に関わる酵素のヒアルロン酸合成酵素遺伝子の発現が著明に抑制していた。ヒアルロン酸合成酵素の遺伝子には 3 種類 (Has-1 ~ -3) が知られているが、胎仔創傷治癒機構では、その中の Has-2 遺伝子のみが強く発現していた。しかし、成獣創傷治癒機構へと移行すると、この Has-2 遺伝子の発現は非常に低下した。その他の Has-1 及び Has-3 の発現は、胎仔創傷治癒機構から成獣創傷治癒機構へと移行しても変動は認められなかった。一方、ヒアルロン酸の分解酵素であるヒアルロニダーゼに関しては、Hyal-1 ~ -5 までの分子種が検出されたが、その発現は胎仔創傷治癒機構から成獣創傷治癒機構へ移行する際に軽度が増強していた。胎仔創傷治癒機構では、成獣創傷治癒機構に比較してヒアルロン酸含量が豊富に存在することが知られている。従って、マウスの心筋組織においても、胎仔創傷治癒機構では Has-2 遺伝子の発現が非常に増強し、他の Has-1 や Has-3 は変動しないこと、また、ヒアルロニダーゼ遺伝子の発現が軽度に抑制されていることから、マウス心筋組織においてもこれらの遺

伝子の変動によってヒアルロン酸含量が豊富になり、ヒアルロン酸が癒痕形成を抑制する重要なモジュレーターになっている可能性が考えられた。

その他には、コラーゲンを分解して癒痕形成を抑制するマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)や、既に皮膚の胎仔創傷治癒機構から成獣創傷治癒機構へと移行する際に発現量が減少する fibromodulin の各遺伝子が、マウスの心筋組織の胎仔創傷治癒機構では強く発現していたが、成獣創傷治癒機構に移行すると皮膚と同様に発現が抑制された。その一方、癒痕の本体である線維化を促進する遺伝子の I 型コラーゲンやアクチンの各遺伝子は成獣創傷治癒機構に移行すると著明に促進していた。その他、癒痕に関わるサイトカインの TGF-beta も成獣創傷治癒機構では著明に発現が促進した。また toll-like receptor, シクロオキシゲナーゼといった免疫や炎症に関連する遺伝子は成獣創傷治癒機構において強く発現していた。炎症反応に対する感受性は皮膚の胎仔創傷治癒機構では弱く、このことが癒痕形成を抑制する一因と考えられている。我々の結果からもマウスの心筋組織においても同様の結果が得られた。

最後に、胎仔創傷治癒機構において発現の変動が著明であった遺伝子に着目し、その発現ベクターを構築した。そして心筋組織に導入し、癒痕形成を抑制して完全に心筋組織を再生できるか否かを解析した。上述の Has-2 や MMP, fibromodulin など、胎仔創傷治癒機構において発現が強く、しかも抗線維化能を有している遺伝子に注目し、それぞれの発現ベクターを作製した。そして各発現ベクターは、人工的に壊死を作製した成獣マウスの心筋組織へと導入した。その結果、何れの遺伝子を導入しても、心筋壊死部の癒痕が消失して、心筋組織が新たに完全に再生される胎仔創傷治癒機構を再現することは困難であった。しかも創傷治癒自体の回転が非常に遅く、明らかな完全再生も肉眼的には認められなかった。しかし、組織学的には、MMP の遺伝子の導入を行った場合、成獣創傷治癒機構に認める線維化は依然として認め、胎仔創傷治癒機構が誘導されることは無かった。しかし、Has-2 遺伝子や fibromodulin 遺伝子を導入すると、軽度ではあるが、線維化の軽減を認めた。従って、以上から、癒痕組織の型コラーゲンを分解する方法だけでは癒痕を除去することはできず、少なくとも、ヒアルロン酸や fibromodulin の各遺伝子を導入することが、癒痕形成を阻止して心筋組織を完全に再生できる可能性に繋がると考えられた。今後は、これらの遺伝子の強発現や持続的発現の条件を設定することや、各種遺伝子の組み合わせ法の検討が克服すべき点と考えられた。

今回の研究から、Has-2, fibromodulin 単独ではともに心筋組織の完全な抗線維化及

び心筋再生を誘導するとは結論付けることができなかった。従って、マウスの心筋組織における胎仔創傷治癒機構のマスター遺伝子は、他の更なる未知の遺伝子が可能性の一つとして考えられた。また、胎仔創傷治癒機構の作動には、単一のマスター遺伝子が作動するのではなく、複数の遺伝子が相互作用を有しながら作用している可能性も考えられた。

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 5 件)

Shimizu Y, Ogawa Yasushi, Sugiura K, Sakai K, Yanagi T, Kon A, Sawamura D, Shimizu H: ABCA12 expression is regulated by an AP1 element in cultured human keratinocytes. FEBS Letters, in press.

Watanabe T, Kon A, Watanabe I: Noninvasive observation of peripheral capillary blood flow after aerobic exercise. Biomedical Thermology 33, 60-65, 2014.

URL: <http://www.tjsot.jp/>

Watanabe T, Kon A, Watanabe I: Observation of capillaries in proximal nail folds and thermography.

Biomedical Thermology 31, 39-43, 2012.

URL: <http://www.tjsot.jp/>

Shinkuma S, Sawamura D, Fujita Y, Kawasaki H, Nakamura H, Inoie M, Nishie W, Shimizu H: Long-term follow-up of cultured epidermal autograft in a patient with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. Acta Derm Venereol, 94, 98-99, 2014.

DOI: 10.2340/00015555-1592

Ohshika S, Ishibashi Y, Kon A, Kusumi T, Kijima H, Toh S: Potential of exogenous cartilage proteoglycan as a new material for cartilage regeneration. Int Orthop, 36, 869-877, 2012.

DOI: 10.1007/s00264-011-1335-2

[学会発表](計 3 件)

木村美穂, 今 淳: ヒアルロン酸ノックダウンマウスにおけるヒアルロン酸関連遺伝子の発現, 2013 年度青森県保健医療福祉研究発表会, 2013 年 12 月, 青森市

田中 翠, 今 淳: 胎仔創傷治癒機構におけるヒアルロン酸関連遺伝子の発現調節, 2013 年度青森県保健医療福祉研究発表会, 青森 2013 年 12 月, 青森市

今 淳, 板先解子: 4-メチルウンペリフェ
ロンによるヒアルロン酸関連遺伝子の発
現調節について, 2011 年度青森県保健医療
福祉研究発表会, 2012 年 2 月, 青森市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今 淳 (KON ATSUSHI)
青森県立保健大学・健康科学部・教授
研究者番号: 60271798

(2) 連携研究者

澤村 大輔 (SAWAMURA DAISUKE)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 60196334