様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月 ２２ 日現在

機関番号：２４７０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2013～2015
課題番号：２５４６２８２９

研究課題名（和文）TGFベータ/Smadシグナルを標的とした皮膚の瘢痕化の薬物療法の開発

研究課題名（英文）Development of pharmacotherapy which targets TGF beta /Smad signal for skin scarring.

研究代表者
木田　真紀（MAKI, KIDA）

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：００３２６３８１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,900,000円

研究成果の概要（和文）：TGFベータ／Samdシグナルを標的とした皮膚の瘢痕化に対する薬物療法の開発のため。オステオポンチン（OPN）ノックアウトマウスを用い、皮膚の創傷治癒を研究した。OPNが欠如した状態では、皮膚の創傷治癒は遅延し、肉芽形成およびTGFベータシグナルが抑制されていた。
OPN中和抗体は、線維芽細胞のフィブロネクチン、コラーゲンIa１、aSMAの発現は抑制されていた。OPN中和抗体は、肉芽組織形成の抑制に働き、瘢痕化を抑制する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：For development of scarring skin wound pharmacotherapy of which a target is TGF β / Smad signals, we studied skin wound healin osteopontin (OPN) knockout mice.
The wound healing of skin delayed, formation of granuration and TGFb signal were inhibited in OPN mice.OPN neutralizing antibody inhibited expressions of fibronectin,collagen Ia1,aSMA in wild type (WT) mice.OPN neutralizing antibody suppresed the formation of the granulation tissue and may inhibit scarring in skin wound.

研究分野：集中治療

キーワード：瘢痕　創傷治癒　TGFβ　オステオポンチン

１．研究開始当初の背景

近年、広範囲熱傷治療は、局所成長因子製剤、創傷被覆材、人工真皮などの熱傷創に対する使用が一般化し、熱傷創管理が向上し、救命率上昇した。一方、皮膚移植後の瘢痕収縮は、ADL の低下をきたし、社会問題となっている。しかし、皮膚の創傷治癒における瘢痕収縮のメカニズムの詳細は未だ完全に解明されていず、瘢痕収縮の予防および治療法の開発が必要である。

われわれは、腫瘍壊死因子アルファノックアウト（TNFαKO）マウスを用いた皮膚の全層欠損モデルの研究で、TGFβの発現が促進し、その結果、Smad2/3 が活性化され、肉芽の過形成および欠損部の閉鎖遅延を来したことを報告した。細胞外マトリックスであるオステオポンチンノックアウト（OPN KO）マウスを用いた皮膚全層欠損モデルでは、TGFβは抑制され、肉芽形成は抑制されていたにも関わらず、TNFαKO マウスと同様に欠損部の閉鎖遅延を来した。細胞外マトリックスは、細胞間に沈着した構成物として考えられていたが、これらの研究より、OPN は、実質細胞の筋線維芽細胞への形質転換、すなわち上皮-間葉系移行に関与していると考えられた。つまり、OPN は、TGFβ/ Smad シグナルを介し、肉芽の形成、瘢痕化に関与していることが示唆された。皮膚の全層欠損モデルの創傷治癒は、OPN を介した TGFβ/ Smad シグナルの関与は明らかである。さらに皮膚全層欠損モデル詳細なメカニズムを解明するため、OPN KO マウスの骨髄を移植し、骨髄由来のマクロファージが皮膚の創傷治癒に与える影響を検討した。創部閉鎖は、OPN KO マウの骨髄を移植したマウスで遅延した。

近年、OPN を含む matricellular protein と呼ばれる細胞外マトリックスの一群は、インテグリン受容体を介した細胞との相互作用により、創傷治癒をダイナミック調節していることが明らかになってきている。皮膚の創傷治癒は、OPN を介した骨髄由来のマクロファージと TGFβ/Smad シグナルが関与している可能性が高い。TGFβ/Smad シグナルを標的にした上皮-間葉系移行の阻害による皮膚の瘢痕収縮の予防法の確立には、細胞内シグナル伝達における MAP キナーゼ系（古典的MAPK、JNK、p38）や細胞外マトリックス、インテグリン由来のシグナルの役割を理解する必要があると考えられる。

しかし、細胞間の相互作用や調節に関する詳細なメカニズムの解明は不明である。

２．研究の目的

今回申請する研究では、皮膚の創傷治癒において、細胞外マトリックスである OPN を介した細胞内シグナル伝達の詳細を明らかにする。WT マウスに OPN KO マウスの骨髄を移植し、皮膚全層欠損部の細胞外マトリックス、サイトカインの発現の有無とシグナル伝達レベルでの上皮 - 間葉系移行の機序解明について検討し、細胞培養モデルの結果をもとに皮膚の創傷治癒過程における上皮 - 間葉系移行制御因子を明らかにすることを目的とした。

さらに OPN 中和抗体を投与し、骨髄由来のマクロファージに及ぼす効果を研究し、骨髄由来のマクロファージを標的としたシグナル伝達のレベルでの上皮 - 間葉系移行の抑制に有効であるかを調査した。

３．研究の方法

（１）細胞培養研究

① Mouse embryonic fibrobrast (MEF)による線維芽細胞モデルの作成

WT マウスと KO マウスの胎児をトリプシンで処理し、作成した mouse embryonic fibrobrast (MEF)を線維芽細胞モデルとして使用した。細胞は、35mm のディッシュに 10％ウシ胎児血清の Dulbecco’s modified Eagle’s medium （DMEM）に抗菌剤（ストレプトマイシ

ン、ペントシリン、アンホテリシンB）を加えた培地で培養した。培養後、TGFβ1（1ng/mL）を添加した。

② Real-time RT-PCR

Mammalian Total RNA MIniprep Kit® (Sigma)を使用し、培養細胞の mRNA を抽出する。抽出した mRNA で Real-time RT-PCR を行い、相対定量法にて TNFα、コラーゲンⅠα2、connective tissue growth factor(CTGF)、vascular endotherial growth factor(VEGF)およびリン酸化 Smad2 を測定した。測定は TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix Reagents および TaqMan® Gene Expression Assays を使用し、当院に既存する 7300 Fast Real-time PCR system (Applied Biosystem™)にて測定を行なった。

③ Western blot

Western blot にて TNFα、コラーゲンⅠα2、CTGF、VEGF およびリン酸化 Smad2 の発現を検討した。

④免疫組織化学検査

スライドチャンバーに 1ng/mL の TGFb1を添加し、フィブロネクチン、リン酸化 Smad2 の発現を観察した。

（2） In vivo 研究

① 骨髄移植骨髄の採取を行う（ドナーマウス）。

WT マウス、KO マウスを安楽死させ、大腿骨を採取し、遠位端を切断する。切断面を下にして、遠心し、骨髄を採取した。採取した骨髄を PBS 500μL に混注し、セルカウントにて 2×10~10/mL であることを確認し、当院に既存する Faxitron RX-650 型 X 線照射装置（Faxitron X-ray Corporation）を使用し、12Gy で野生株（C57BL/6）マウス（WT マウス）とオステオポンチン（OPN）欠如（KO）マウスの骨髄を照射する（レシピエントマウス）。レシピエントマウスを鎮静した後に 30G 針で骨髄を静注した。WT マウスには KO マウスの骨髄を移植し、KO マウスには WT マウスの骨髄を移植した。

② マウスの皮膚全層欠損モデルの作成

移植 3 週間後、トレパンとはさみを使用し、OPN KO マウスと WT マウスの背中の皮膚を径 5mm に全層切除し、皮膚全層欠損モデルを作成した。組織学的検討創作成日を 0 日とし、3、6、8、10 日後の創部組織切片を作成し、HE 染色を行った。

③ 免疫組織化学的検討

筋線維芽細胞のマーカーであるαSMA、マクロファージのマーカーである F4/80 陽性細胞、リン酸化 Smad2 陽性細胞の観察を行なった。

免疫染色はウシ血清でブロッキングした後に一次抗体をスライドに添加し、12 時間 4 度で反応させた。その後、二次抗体を添加し、1 時間、室温で反応させた後に VECTASTAIN ABC IgG Kit（フナコシ株式会社）を使用し、DAB、PBS、H_2O_2 を加え、メチルグリーンで染色し、アルコールで処理を行なう。10 分間、60 度で乾燥させた。

④Real-time RT-PCR および Western blot

3、6、8、10 日後の創部を径 5mm に切除し、治癒部分の mRNA を抽出する。切除した組織は冷却しながらホモジュナイズした後、Mammalian Total RNA MIniprep Kit□ (Sigma)を使用し mRNA 抽出した。

（3）OPN 中和抗体の影響

OPN 中和抗体を MEF に添加し、細胞外マトリックス、サイトカインおよび Smad の発現を検討した。

4．研究成果

（1）細胞培養研究

① Real-time RT-PCR

OPN KO マウスの MFB に TGFβ1（1ng/mL）を添加し、Real-time RT-PCR

を行った。OPN が欠如した状態では、TNFα、コラーゲンⅠα１、CTGF、VEGF、リン酸化 Smad2 はいずれも TGFβ1 の投与で促進していたが、WT マウスの MFB に比べると、明らかに抑制されていた。

② Western blot

Western blot にても Real-time RT-PCR と同様に OPN が欠如した状態では、TNFα、コラーゲンⅠα1、CTGF、VEGF、リン酸化 Smad2 の発現は抑制されていた。

③免疫組織化学検査

スライドチャンバーに 1ng/mL の TGFb１を添加し、フィブロネクチン、リン酸化 Smad2 の発現を観察した。OPN KO マウスの MFB は、WT マウスの MFB に比べ、明らかにフィブロネクチン、リン酸化 Smad2 の発現は抑制されていた。

（３） In vivo 研究

①骨髄移植後の皮膚の創傷治癒

背中の皮膚を径 5mm に全層切除し、皮膚全層欠損モデルを作成し、皮膚の創傷治癒を観察した。肉眼的には、WT ドナーマウスにくらべ、OPN KO ドナーマウスのほうが、皮膚の閉鎖は明らかに遅延していた。また、肉芽組織は OPN KO マウスの方が薄い傾向であった。

②免疫組織化学的検討

面積当たりのαSMA、F4/80 陽性細胞、リン酸化 Smad2 陽性細胞は、OPN KO ドナーマウス、WT ドナーマウスともに差はなかった。

④Real-time RT-PCR および Western blot

新生肉芽の mRNA を抽出し、Real-time RT-PCR および Western blot

を行い、αSMA、F4/80 の発現の経時的な変化を観察した。OPN KO ドナーマウスの方がαSMA、F4/80 の発現は抑制されていた。

（３）OPN 中和抗体の影響

OPN 中和抗体を MEF に添加し、フィブロネクチン、コラーゲンⅠα1, αSMA、リン酸化 Smad2 の発現を検討した。

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）

〔学会発表〕（計 1 件）

１． Maki Kida*[1], Yuka Okada[2], Takayoshi Sumioka[2], Osamu Yamanaka[2], Seiya Kato[1], Shizuya Saika[2].Lacking osteopontin impairs TGFβ/Smad signal and attenuates healing of a full-thickness cutaneous wound in mice. Keystone Symposia, 2016, CO

〔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
木田 真紀 （ KIDA , Maki ）
和歌山県立医科大学 医学部 講師
研究者番号：00326381

(2)研究分担者
上田 健太郎 （ Ueda, Kentaro ）
和歌山県立医科大学 医学部 講師
研究者番号： 20438279