

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10942

研究課題名(和文) AhR内因性リガンドの皮膚における役割の解明

研究課題名(英文) The role of AhR endogenous ligand in skin wound healing

研究代表者

古賀 沙緒里 (KOGA, Saori)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：80590249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年、我々は Aryl hydrocarbon receptor (AhR) の内因性リガンドである 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) が表皮細胞の遊走を増強して、創傷治癒を顕著に促進することを明らかにした。そこで、本研究では FICZ の作用機序の解明を目指した。その結果、FICZ は創傷時のみ MEK/ERK 経路を活性化して、細胞遊走を促進していることが明らかになった。また、この作用は AhR 非依存的事であることも示した。以上より、本研究では、FICZ に AhR に依存しない新規作用機序が存在することを初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Aryl hydrocarbon receptor (AhR) plays crucial roles in the protection against xenobiotics exposure. Recent report showed that 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) was one of the endogenous AhR ligands. We previously revealed that FICZ promoted cutaneous wound healing in various mouse models, including db/db mice, which exhibited delayed wound healing. However, the molecular mechanism underlying the wound healing acceleration by FICZ remains unclear. Here, we first demonstrated that FICZ promoted the migration of human keratinocytes via an increased MEK and ERK phosphorylation under scratch condition. Cell migration induced by FICZ was suppressed by MEK/ERK inhibitors, but not EGFR inhibitor. In addition, FICZ accelerated wound closure irrespective of AhR expression. Our findings indicate that FICZ has potential as an enhancer of cell migration via activation of MEK/ERK pathway in an AhR-independent manner, and might be beneficial for wound healing.

研究分野：皮膚生理学

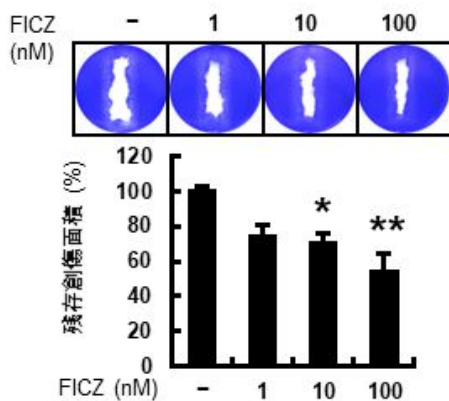
キーワード：ダイオキシン受容体 トリプトファン代謝物 創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

(1) 皮膚は、外界から生体を保護している人体最大の臓器であり、表層から上皮細胞である表皮、結合組織である真皮、主に脂肪からなる皮下組織と皮膚付属器で構成されている。創傷とは、外界からの刺激や外力により皮膚が障害されて欠損を伴った状態である。表皮のみの欠損では、皮膚は完全に再生して損傷の痕跡を残さないが、表皮を超える欠損（潰瘍）では治癒後に癒痕を残すことが知られている。また、潰瘍における創傷治癒が遷延するほど肥厚性癒痕やケロイドなどの病的な癒痕形成が起こりやすいため、創傷治癒を促進して速やかな創閉鎖を誘導する薬剤が望まれている。

(2) 創傷治癒は本来、生体が有している機構であるため、軽度の創傷であれば自然治癒により完治する。しかしながら、前述の通り、医療の介入により創傷治癒までの日数を短縮することで、整容的にも機能的にも良好な癒痕が形成される。また、難治性潰瘍のように積極的な医療の介入が必要な創傷も存在する。難治性潰瘍は、褥瘡や糖尿病性潰瘍などの要因が明確なものから、原因不明のものまで様々であり、感染症のリスクが高いため、早期に適切な処置を行う必要がある。難治性潰瘍の治療において重要なことは、組織損傷を最小限にとどめることであり、そのためには損傷に対する正常の治癒機転を理解し、その阻害因子（全身的因子、局所的因子）を出来る限り除去することが大切である。その上で、創縁の細胞の遊走を促進し、上皮化および創収縮を促進できる薬剤を処置することが重要となる。

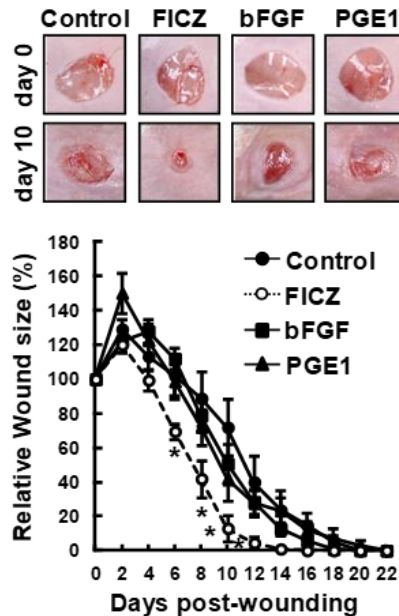
(3) 近年、我々はトリプトファン代謝物である6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) が表皮細胞の遊走を濃度依存的に促進することを見出した (図1)。



(図1) ヒト皮膚表皮細胞に対する FICZ の創傷部位の縮小作用

FICZ は紫外線照射により生体内でトリプトファンから産生されることが知られており、代謝経路も既知であるため、安全性の高い化合物であると考えられる。また、FICZ は Balb/c マウス背部に作成した皮膚欠損創に対しても、有意に早く創を閉鎖させることが明らかになった。さらに、

難治性潰瘍モデルとして汎用される db/db マウス (2 型糖尿病モデルマウス) に作成した創に対しても、FICZ は有意に創閉鎖を促進した。したがって、軽度の創傷に対しては当然ながら、難治性潰瘍に対しても FICZ は奏効する可能性がある。また、2種類の既存薬 (bFGF 製剤、PGE1 製剤) との効果と比較した結果、FICZ はこれら既存薬より有意に創傷治癒を促進した (図2)。したがって、FICZ は競合薬と比較しても有効性が高い可能性があり、臨床応用に向けて展開したいと考えている。



(図2) 既存薬との効果の比較

2. 研究の目的

FICZ は軽度の創傷に対しても、難治性潰瘍に対しても、非常に高い治癒促進効果が期待できる。しかしながら、FICZ の臨床応用を目指す上で、まだ解決すべき点もある。まず 1 点目は、FICZ の作用機序の解明である。FICZ がどのような機序で細胞遊走を促進しているのか、まだ明らかになっていない。作用機序を明らかにすることは、副作用の予想にもつながるため、安全性の面からも必ず解明していきたい。次に、FICZ が生体内で産生される意義を明らかにしたい。前述の通り、FICZ は生体内で産生されて代謝経路も既知であるが、なぜ一過性に産生される必要があるのか、不明である。FICZ が生体内で担う役割の解明を目指したい。

3. 研究の方法

これまでの検討より、我々は、FICZ が表皮細胞の遊走を増強して、マウス皮膚の創傷治癒を顕著に促進することを見出している。したがって、本研究では引き続き表皮細胞に対する FICZ の影響を検討するため、ヒト表皮細胞株である HaCaT 細胞および正常ヒト表皮角化細胞を用いる。

(1) FICZ の作用機序の解明に関して

まず、前提として FICZ が AhR の代表的な

内因性リガンドであるにも関わらず、siAhR を用いた検討により、FICZ による細胞遊走促進効果は AhR を介していないことが示唆されている。そこで、既知の AhR 阻害剤である CH-223191 を用いて、実際に AhR 阻害剤処理下でも FICZ が細胞遊走促進効果を発揮するのか、さらに検討する。また、マウスにおいては、C57BL/6 マウスが AhR 高感受性であり、DBA/2 マウスが AhR 低感受性であることが報告されている。そこで、この 2 系統のマウスの AhR 感受性を確認した後、両系統のマウスに対する FICZ の創傷治癒促進効果を検討する。

次に、細胞遊走に関連する既知の経路を FICZ が活性化し得るか検討する。具体的には、FICZ 処理により Akt, JNK または Erk の活性化が起こるか、western blotting 法により検討する。リン酸化タンパク質の増加が認められた場合は、各阻害剤により FICZ による細胞遊走促進効果が抑制されるか評価する。

(2) FICZ が生体内で産生される意義に関して

FICZ は前述の通り、トリプトファンから産生される。近年、興味深い報告がなされ、トリプトファンにも創傷治癒促進効果があることが示された。そこで、トリプトファンと FICZ の効果の比較を行う。また、生体内には、トリプトファン代謝物が多数存在することから、これらの代謝物においても同様に創傷治癒促進効果があるのか、検討する。同時に、作用機序についても比較検討を行う。これにより、FICZ が生体内で産生される意義を明らかにする。

4. 研究成果

(1) FICZ の作用機序の解明

はじめに、FICZ がどのような機序で細胞遊走を促進しているのか、検討を行った。以前の結果より、FICZ が AhR の代表的な内因性リガンドであるにも関わらず、AhR siRNA を用いた検討により AhR を介さない可能性が示されていた。そこで、既知の AhR 阻害剤である CH-223191 を用いて、FICZ の細胞遊走促進効果に影響を与えるか検討した。その結果、CH-223191 は FICZ による細胞遊走促進効果を阻害しないことが明らかになった。さらに、AhR の外因性リガンド 2 種 (benzo[a]pyrene, -naphthoflavone) で同様の検討を行ったが、これらのリガンドでは、細胞遊走促進効果が認められなかった。したがって、FICZ による細胞遊走促進効果に AhR が関与しないことが示された。続いて、AhR 高感受性マウス (C57BL/6) と AhR 低感受性マウス (DBA/2) で FICZ による創傷治癒促進効果に違いが出るか検討した。その結果、AhR の感受性に依存せず、FICZ は両系統のマウスで創傷治癒を促進することが明らかになった。以上より、FICZ による細胞遊走促進作用は AhR 非依存的であることが証明された。

次に、FICZ が細胞遊走に関連する既知の経路を活性化するのか検討を行った。その結果、FICZ は Akt や JNK のリン酸化タンパク質量

には影響を与えないが、ERK のリン酸化を有意に増加させることが明らかになった。また、この効果は scratch 刺激下でのみ認められた。さらに、FICZ による ERK のリン酸化は、AhR 阻害剤である CH-223191 によって抑制されないことも確認した。そこで、FICZ の直接的な標的分子を明らかにするために、ERK の上流分子の活性化状態を検討した。その結果、FICZ は EGFR および RAF には影響を与えず、MEK と ERK のリン酸化を顕著に増加させていることが示された。したがって、FICZ は scratch 刺激下において、MEK/ERK 経路を活性化していることが明らかになった。続いて、FICZ による細胞遊走促進効果に EGFR 阻害剤 (PD153035) または MEK/ERK 阻害剤 2 種 (U0126, PD98059) が影響を与えるのか検討した。その結果、やはり EGFR 阻害剤では抑制されず、MEK/ERK 阻害剤で FICZ による細胞遊走促進作用が消失することが示された。以上より、FICZ が MEK/ERK 経路を活性化して、細胞遊走を促進するという新たな作用機序を明らかにできた。

(2) FICZ が生体内で産生される意義

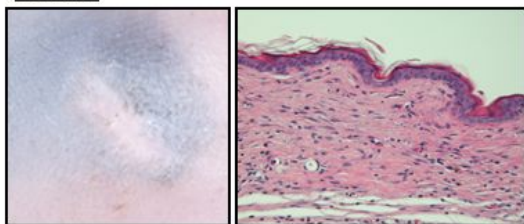
最後に、FICZ がトリプトファンから産生されることに着目し、トリプトファンとの比較実験を行った。近年、慢性ストレス負荷マウスにおいて、トリプトファンが TNF- α およびIDO の発現を抑制して、創傷治癒を促進するという報告がなされた。そこで、FICZ が TNF- α およびIDO の発現に影響を与えるか検討を行った。その結果、FICZ の既知の標的遺伝子である CYP1A1 の発現増加が認められる条件下で、FICZ は TNF- α およびIDO の発現には影響を与えなかった。したがって、FICZ はトリプトファンの代謝物ではあるが、細胞遊走を促進する作用機序は異なることが示された。次に、トリプトファンと FICZ の創傷治癒に対する効果の比較を行った。HaCaT 細胞を用いて遊走能への影響を検討した結果、トリプトファンは 100 μ M で促進傾向を示したのに対して、FICZ はわずか 100 nM で有意に細胞遊走を促進した。したがって、トリプトファンから産生された FICZ は、親化合物とは異なるメカニズムでより顕著な細胞遊走促進能を有することが明らかになった。さらに、生体内に存在するトリプトファン代謝物 7 種にも、細胞遊走促進作用があるのか検討した。その結果、FICZ のように安定した細胞遊走促進効果を示す化合物は認められなかった。したがって、FICZ の効果は非常に特異性が高いことが示唆された。

(3) 総括

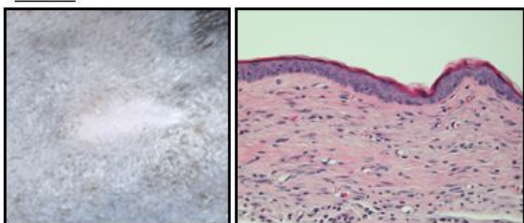
以上、本研究を総括すると、FICZ はこれまで AhR の内因性リガンドとして知られていたが、AhR を介さない作用機序があることが明らかになった。損傷時のみ MEK/ERK 経路を活性化し、細胞遊走を促進することで、治癒促進に寄与することが示された。また、本作用は FICZ 特異的であり、前駆体または類似化合物から同

様の作用は認められなかった。FICZ は UV 照射によって、生体内でトリプトファンから産生され、また自身の標的遺伝子である CYP1A1 によって代謝されて、尿中排泄されることから、安全性の高い化合物であると考えられる。実際に、細胞障害を評価したところ、創傷治癒促進効果が認められる濃度範囲で、FICZ による細胞障害は観察されなかった。また、マウス背部に作製した創傷の治癒後の癒痕を HE 染色により観察した結果、対照群と差はなく、異常な癒痕形成等も起こっていなかった (図3)。

Control



FICZ



(図3) 治癒 1 ヶ月後の癒痕の HE 染色

したがって、FICZ は有効性も安全性も高い新規創傷治癒促進剤になり得ると考えている。

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1件)

(1) Saori Morino-Koga, Hiroshi Uchi, Chikage Mitoma, Zhouwei Wu, Mari Kiyomatsu, Yoko Fuyuno, Konosuke Nagae, Mao Yasumatsu, Mary Ann Suico, Hirofumi Kai, Masutaka Furue., 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) accelerates skin wound healing via activation of ERK, but not aryl hydrocarbon receptor, Journal of Investigative Dermatology, 査読有, Vol.137, Issue 10, 2017, pp. 2217-2226
DOI: 10.1016/j.jid.2016.10.050

[学会発表] (計2件)

(1) 古賀 沙緒里, AhR リガンドが創傷に与える影響、平成 28 年度 全国油症治療研究会議、福岡、2016 年 6 月 30 日

(2) Saori Koga, Endogenous photoproduct, FICZ, promotes cell migration and wound healing, Summer Retreat 2017, Kumamoto, August 4, 2017

6. 研究組織

(1)研究代表者

古賀 沙緒里 (KOGA, Saori)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号: 80590249