

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：24701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15264

研究課題名(和文) 損傷における体内時計とオートファジーのクロストーク解析-新規損傷診断指標の開発-

研究課題名(英文) Cross talk analysis of biological clock and autophagy in wound tissue

研究代表者

近藤 稔和 (Kondo, Toshikazu)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70251923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚損傷組織では受傷後極めて早期にautophagyが抑制されることを見出し、法医実務に有用な創傷の生活反応となり得ることを報告した。逆に、皮膚損傷組織で時計遺伝子のRev-erb-alphaとROR-gammaがタンパクレベルで著しく増加することを見出した。3-Methyladenineによるautophagyの抑制によりROR-gammaは増加したことから、創傷組織でのautophagyの抑制がROR-gammaの増加を引き起こすと考えられた。創傷組織でのこれらの変化はKeap1/Nrf2システムに作用して抗酸化遺伝子の発現を誘導し創傷治癒の促進に寄与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We found that autophagy was quickly suppressed in the skin wound tissue after infliction, which might be a useful marker for wound vitality in the forensic practice. Conversely, we found that Rev-erb-alpha and ROR-gamma of clock genes markedly increased at the protein level in the wound tissue. Since suppression of autophagy by treatment with 3-Methyladenine increased ROR-gamma, autophagy suppression seemed to induce an increase of ROR-gamma protein in the wound tissue. These changes in the wound tissue revealed that they act on Keap 1/Nrf 2 system and induce the expression of antioxidant genes, thereby contributing to promotion of wound healing.

研究分野：法医学

キーワード：autophagy 体内時計 創傷治癒 損傷の生活反応 法医診断

1. 研究開始当初の背景

損傷の診断は法医実務において必須の項目であり、その中でも受傷後経過時間の推定と損傷の生活反応は特に重要である。これまでに多くの有用な損傷診断の指標が報告されているが、現在においても未だ診断を確実にを行うには不十分と言わざるを得ない。一方、臨床医学においても、高齢化社会の進行や食生活の欧米化にともなう生活習慣病の増加が、臨床の場における難治性創傷の問題を大きくしており、この問題は今後更に重大さを増すことが確実である。これまでの多くの基礎研究により創傷治癒の細胞生物学的、免疫学的および分子生物学的機構の多くが解明されて来たが、研究結果が法医損傷診断や臨床応用に至った例は少なく、この問題の解決には創傷治癒に関する基礎研究におけるブレークスルーが必須な状況にある。

2. 研究の目的

本研究は、皮膚損傷部における体内時計(時計遺伝子とその産物)の変化と、それに伴う autophagy の変化を詳細に検討することで体内時計と autophagy の cross talk を明らかにし、受傷後経過時間推定のための新規指標と新しい生活反応を見出すことを目的とする。さらに、創傷治癒過程における体内時計変化に関する基礎的研究で得られた知見を基に、難治性創傷治療における新規分子標的を見出す事も目的の一つとする。

3. 研究の方法

1) マウス皮膚切除損傷モデルの作製

8週齢雄のBALB/c マウスを12時間の明暗サイクル環境下で飼育し、イソフルラン麻酔下に背部を剃毛した後、0時から2時間間隔で4mmの biopsy punch で背部に打ち抜き損傷を作製した。各マウスは受傷後24時間に過麻酔により安楽死させ、背部皮膚を採取し、8mmの biopsy punch で損傷部位の周囲を打ち抜いて試料を得た。また、別の実験では、14時から16時の間にマウス背部に同様に抜き損傷を作製した。創作製後0.5時間と、その後24時間まで2時間間隔でマウスを安楽死させた後、8mmの biopsy punch で損傷部位周囲の組織を採取した。さらに、皮膚損傷作製後1、3、6、9および12日目のマウスからも同様に損傷部位周囲の組織を採取した。採取した皮膚組織の一部をホルマリン固定、残りを液体窒素で急速に凍結し-80度で保存した。

2) 皮膚損傷が体内時計および autophagy 関連遺伝子の発現に及ぼす影響の解析

採取したマウスの損傷皮膚組織から Isogen を用いて total RNA を抽出し random 6 oligonucleotide を primer として逆転写した。得られた cDNA を鋳型として、種々の時計遺伝子、autophagy 関連遺伝子、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子、転写因子、シグナル伝達分子に特異的なプライマーセットを用

いて Real-time RT-PCR を行い、損傷が体内時計および autophagy に及ぼす影響を遺伝子発現レベルで解析した。

3) 皮膚損傷が体内時計および autophagy に関わるタンパク発現に及ぼす影響の解析

マウスの損傷皮膚組織からタンパクを抽出し、時計遺伝子産物および autophagy に関わるタンパクに対する特異抗体を用いて Western blotting を行い、densitometry により定量して、損傷が体内時計および autophagy に及ぼす影響をタンパクレベルで解析した。

4) Reverb- $\alpha$  agonist の創傷治癒促進作用の解析

マウスの打ち抜き皮膚損傷を作製し、受傷直後に Reverb- $\alpha$  agonist (GSK 4112, 250  $\mu$ M/PBS) あるいは対照として PBS を創に1日1回、受傷9日目まで塗布した。創作製後1-12日目までの治癒過程を撮影して外表から創傷治癒へのGSK4112の効果の評価するとともに、損傷皮膚組織を採取して、種々の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 皮膚損傷が体内時計に及ぼす影響

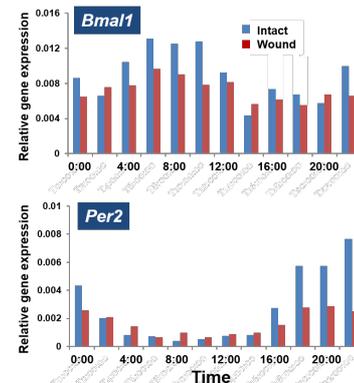


図1. 皮膚損傷が時計遺伝子の発現に及ぼす影響。正常皮膚組織(Intact)および受傷1日後(Wound)における Bmal1 と Per2 の遺伝子発現。

受傷1日後の皮膚打ち抜き損傷部における時計遺伝子(Bmal1, Per2)を real-time RT-PCR で解析すると図1に示す様に、両時計遺伝子の発現は対照皮膚組織に比較して有意に抑制され、創傷が時計遺伝子発現に強く影響することが示された。

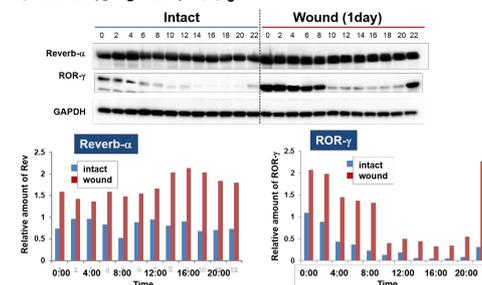


図2. 皮膚損傷が時計 Rev と ROR- $\gamma$  のタンパク発現に及ぼす影響。受傷後1日の皮膚組織では対照皮膚組織に比較して著明な Rev および ROR- $\gamma$  タンパクの発現増加が認められた。

一方、体内時計を制御する transcriptional feed back loop の sub-loop を構成する Rev $\beta$ - $\alpha$  (Rev)と ROR- $\gamma$ の受傷 1 日後の皮膚組織におけるタンパク発現は有意に亢進していた(図2)。

(2) 皮膚損傷が autophagy に及ぼす影響  
受傷 1 日後の皮膚打ち抜き損傷部における autophagy を western blotting で解析すると図3に示す様に、正常皮膚組織で autophagy は概日性にそのレベルが振動しており、LC3-II は夕方に増加し、一方 p62 は未明に多いことが示された。

受傷 1 日後の損傷部では autophagy は著しく抑制され、それに伴って p62 の増加が著明であった。また、HO-1 も顕著な増加を示した。これらの変化は何れも受傷後経過時間推定および損傷の生活反応の新しい指標として有用と思われる。

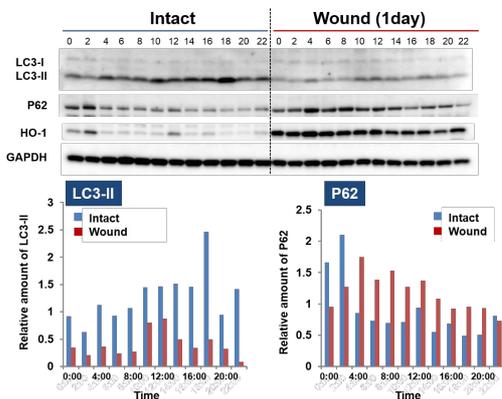


図3. 皮膚損傷が autophagy に及ぼす影響。受傷後 1 日の皮膚組織では対照皮膚組織と比較して著明な autophagy の抑制が認められた。

(3) autophagy および Rev, ROR- $\gamma$ の創傷部位における経時的变化

皮膚損傷部における autophagy と時計遺伝子の変化が損傷診断の新規指標となり得る可能性が示唆されたことから、これらの変化を経時的に解析した(図3)。Autophagy の抑制に伴う LC3-II の減少、p62 の増加および Rev と ROR- $\gamma$ の増加は、何れも受傷後 0.5 時間で認められ、受傷後 5 日目まで続いていた。

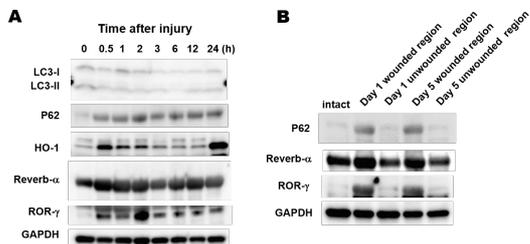


図4. 皮膚損傷部位における autophagy および Rev, ROR- $\gamma$ のタンパク発現の経時的变化。受傷後 0.5 時間から 24 時間(A)、1 日および 5 日目(B)。

(4) autophagy および ROR- $\gamma$ の創傷部位における変化の生活反応としての有用性の検証

法医実務において、損傷の生活反応は重要な意味を持つ。これまでに示してきた損傷部位における急速な autophagy の抑制や、時計遺伝子 (Rev および ROR- $\gamma$ ) の増加が、死後に生じた損傷において認められないことが重要である。図5に示す様に死後の損傷ではこれらの変化を認めないことから、autophagy および ROR- $\gamma$ の創傷部位における変化は新規生活反応としての有用性が示された。

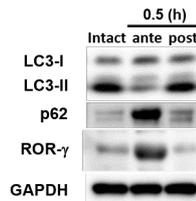


図5. 死後に生じた損傷における autophagy および ROR- $\gamma$ の変化。

(5) 皮膚損傷における autophagy と体内時計の関係

皮膚損傷における autophagy の抑制が体内時計の変化を誘起するのか、あるいは体内時計の変化が autophagy の抑制を引き起こすのかを明らかにするために、autophagy の阻害剤、3-methyladenine (3-MA)を腹腔内に投与して、全身的に autophagy を抑制したマウスの皮膚における Rev, ROR- $\gamma$ および HO-1 の発現を解析すると、ROR- $\gamma$ と HO-1 は有意にタンパクレベルで発現が増加したが、Rev は有意な増加を示さなかった(図6)。損傷組織では少なくとも ROR- $\gamma$ と HO-1 は autophagy の抑制の結果としてタンパクレベルでの発現が増加するものと思われる。

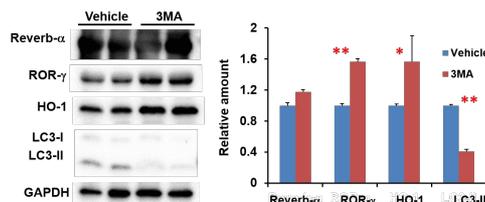


図6. Autophagy の抑制が皮膚における Rev, ROR- $\gamma$ および HO-1 のタンパク発現レベルに及ぼす影響。

\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$

(6) Rev antagonist の皮膚創傷治癒の及ぼす影響

Rev, ROR- $\gamma$ および HO-1 は損傷組織において受傷後速やかにタンパクレベルが上昇する。よって、これらの分子は創傷治癒に寄与しているものと考えられる。HO-1 は創傷治癒を促進することが既に報告されている。また、ROR- $\gamma$ 陽性 innate lymphoid cell が創傷治癒に促進的に機能するとの最近の報告があるが、創傷の早期に発現する ROR- $\gamma$ についてはその機能は明らかではない。一方、Rev については創傷治癒における役割について全く報告が無い。そこで、マウスの創傷治癒モデルにおいて、Rev antagonist を損傷部位に塗布する実験を行った(図7)。

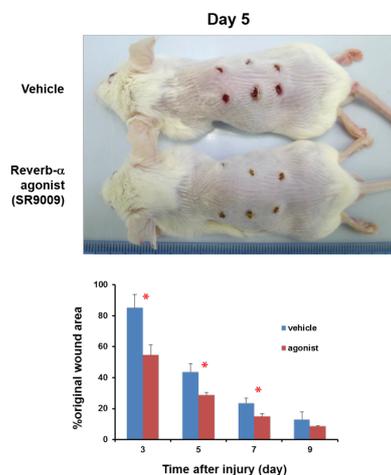


図7. Rev antagonist (SR9009)のマウス皮膚創傷治癒に及ぼす影響。Rev antagonist は有意に創傷治癒を促進した。\*,  $p < 0.05$

Rev antagonist の損傷部への塗布は vehicle 塗布に比較して有意に創傷治癒を促進し、その効果は特に受傷後早期で著明であった。Rev は骨格筋において mitochondrial biogenesis と autophagy を調節して運動耐用能を向上させるとの最近の報告があり、autophagy を抑制することで創傷治癒を促進していると考えられる。

#### (7)皮膚損傷部位における Akt の活性化と autophagy および抗酸化遺伝子発現

皮膚損傷において受傷後早期に autophagy が抑制される分子機構を探る目的で、autophagy を制御する mTOR の上流にある Akt の活性化を解析すると、少なくとも受傷後 0.5 時間で有意に Akt のリン酸化が亢進していた (図 8)。

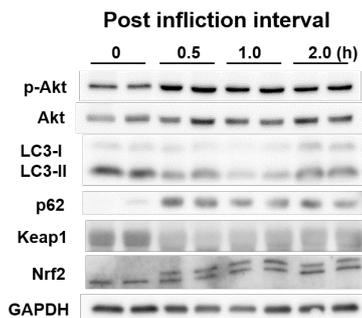


図8. 皮膚損傷部における Akt のリン酸化とその下流のシグナル変化。

この Akt の活性化は mTOR の活性化を介して autophagy を抑制し、それに伴う p62 の蓄積は Keap1/Nrf2 complex の解離を誘起して Nrf2 の核内移行を促進し、H0-1 等の抗酸化遺伝子の発現に繋がると考えられる (図 9)。

更に、損傷組織で早期に増加が認められる Rev も autophagy を抑制して Akt のシグナルと相加的あるいは相乗的に Nrf2 による抗酸化遺伝子発現を亢進して初期の創傷治癒を

促進すると考えている (図 9)。

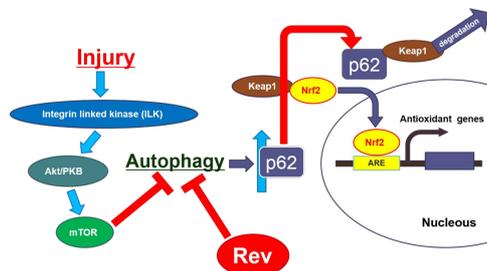


図9. 皮膚創傷治癒における autophagy 抑制の分子機構とその役割。

#### 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. Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Shiraki M, Hama M, Kawaguchi T, Kuninaka Y, Shimada E, Yamamoto H, Takayasu T, Kondo T. Autophagy in skin wounds: a novel marker for vital reactions. Int J Legal Med. 査読有, Vol. 129, 2015 pp. 537-41, doi: 10.1007/s00414-015-1168-4.

[学会発表](計 3 件)

1. 木村章彦, 石田裕子, 野坂みずほ, 山本寛記, 國中由美, 近藤稔和. 皮膚創傷治癒における Akt/autophagy axis と Keap1/Nrf2 相互作用の役割. 第 46 回日本創傷治癒学会. 東京, 2016.12.9
2. Kimura A, Nosaka M, Ishida Y, Yamamoto H, Kawaguchi T, Kuninaka Y, Furuta M, Kondo T. The roles of autophagy in skin wound healing. IALM2016. Italy (Venice). 2016. 6.21-24
3. 木村章彦, 石田裕子, 野坂みずほ, 國中由美, 近藤稔和. 皮膚創傷治癒における autophagy の役割. 第 45 回日本創傷治癒学会. 東京, 2015.11.30

[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

近藤 稔和 (Kondo Toshikazu)  
和歌山県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70251923

### (2)研究分担者

木村 章彦 (Kimura Akihiko)  
和歌山県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：60136611

石田 裕子 (Ishida Yuko)  
和歌山県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：10364077

野坂みずほ (Nosaka Mizuho)  
和歌山県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00244731