

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月27日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19730

研究課題名(和文) Tsukushiによる創傷治癒メカニズムの分子基盤解明

研究課題名(英文) Molecular basis elucidation of wound healing mechanism by Tsukushi

## 研究代表者

新森 大佑 (Niimori, Daisuke)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤医師

研究者番号：70635789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：創傷治癒時の再上皮化の観察、評価。TSK-KOマウスではWTマウスに比べ、再上皮化がみられる5日目以降、再上皮化のスピードが有意差をもって遅いことが判明した。Real time PCRにて、TSK-KOマウスでは、Wnt5やShhの下流分子であるGli1,PTCH1など再上皮化に関わるシグナル伝達分子の発現量が優位に低下していることが判明した。

創傷治癒時の線維化の観察、評価。TSK-KOマウスではWTマウスに比べ、創傷5,7,10日目のHE染色にて肉芽増生が少なく、また  $\alpha$ -SMA(筋線維芽細胞のマーカー)の発現低下が認められた。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚創傷治癒過程は、炎症期、細胞増殖期、成熟期(組織再構築期)の連鎖反応により、創閉鎖が完結する。その間、好中球、マクロファージ、線維芽細胞、筋線維芽細胞といった複数の細胞が出現し、放出するサイトカインや増殖因子が複雑に関与している。申請者は、マウスの創傷治癒時にTsukushiが再生表皮や筋線維芽細胞にも発現しており、創傷治癒に重要な働きをしているのではないかと考えた。今回、TSK-KOマウスを用いた研究でTsukushiが再上皮化や肉芽増生に貢献していることが示された。このことは、臨床的に重症熱傷や潰瘍後搬痕、ケロイドなどの治療に再生医療の面から新たなヒントを与えられられる。

研究成果の概要(英文)：1 Observation and evaluation of re-epithelialization during wound healing. It was revealed that the speed of re-epithelialization was significantly slower in TSK-KO mice after day 5 compared to WT mice. Real time PCR revealed that in TSK-KO mice, the expression levels of signal transduction molecules involved in re-epithelialization such as Gli1 and PTCH1, which are downstream molecules of Shh, and Wnt5 were significantly reduced.

2 Observation and evaluation of fibrosis during wound healing. In TSK-KO mice, compared with WT mice, HE staining at day 5, 7 and 10 of the wound showed less granulation growth, and decreased expression of  $\alpha$ -SMA (a marker for myofibroblasts) was observed.

研究分野：皮膚科学

キーワード：Tsukushi Wound healing

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

皮膚の創傷治癒は、非常にダイナミックな過程であり、細胞外マトリックス(ECM)、液性因子、周辺の細胞群や炎症性細胞が複雑に関与する (Eming et al,2007)。創傷治癒は、一般に炎症期・増殖期・成熟期の3つの段階に分けられている (Gurtner et al,2008)。炎症期においては、受傷12~24時間目で好中球が浸潤し、細菌・異物の除去に働いた後に、受傷3~7日目で大半の好中球はアポトーシスとなる。その後、マクロファージが遊走し、貪食作用を發揮し、TGF- $\beta$ 、IL-6といったサイトカインや細胞増殖因子を放出することにより、表皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞を活性化させ、次に続く増殖期を誘導する。増殖期(受傷3,4日~2週間)では、毛細血管が新生し、線維芽細胞はコラーゲンなどの細胞外基質を合成し、肉芽形成が起こる。その後、筋線維芽細胞により創収縮が起こる。成熟期においては、創辺縁から表皮細胞が移動し、再上皮化がおこる。結合組織内では、ゆっくりと細胞外マトリックスの再編成が行われ、耐久性のある組織に変わる。

しかしながら、各時相間のスイッチング制御機構に関しては、傷治癒に反映される上で極めて重要な研究テーマであるにも関わらず、依然不明な点が多い。また、これらの過程で、コラーゲンなどの基質を分解するマトリックス・メタロプロテアーゼ(MMPs)とその活性を抑制するtissue inhibitor of metaroprotease(TIMP)のバランスが崩れると、過剰な線維化を引き起こすことが知られている。さらに、近年、創傷治癒における線維化と上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition;EMT)の関係性が指摘されており、その中心的役割である筋線維芽細胞の制御も重要な課題となっている。創傷治癒過程の増殖期から成熟期においての、Tsukushiの機能を解明することは、これらのプロセスの基盤となる分子調節機構に対する知見を提供する。

Tsukushiは我々の研究グループがニワトリ胚のレンズを用いたシグナルシーケンストラップ法を行い、単離してきた分泌型蛋白質であり、その発現パターンが土筆に似ていることからその名が命名された(図1)。これまでTsukushiが分泌型のsmall leucine-rich repeatプロテオグリカンファミリーの一員であり、重要なシグナルカスケードを制御していることを報告している (Hocking et al., 1998; Schaefer and Iozzo, 2008; Merline et al., 2009)。アフリカツメガエル胚を用いたmRNA微量注入法や生化学的解析では、Tsukushiが新しいタイプのBMPアンタゴニストであることが明らかになった(Ohta et al, 2004)。さらにTransforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )ファミリーに属するVg1と相互作用して、原始線条とオーガナイザーの形成に関与することを見出した(Ohta et al, 2006)し、Wnt受容体であるFrizzledに細胞外で直接結合して、Wntシグナリングを阻害する機能を持つことが明らかとなった(Ohta et al, 2011)。このように、Tsukushiは細胞外領域において様々なシグナル伝達経路に属する分子群と特異的に結合し、これら“シグナル経路の相互連絡を仲介する鍵分子”であるといえる。皮膚においても、TGF- $\beta$ 1の活性化を調節することで毛周期中の細胞分化を制御することを示した (Niimori et al., Developmental Biology, 2012; 研究業績欄-発表論文1)

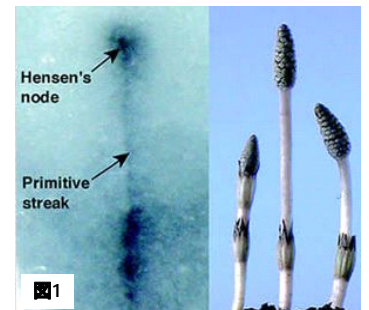


図1  
ニワトリ初期胚におけるTsukushiの発現パターンが土筆に似ていることから命名された。

### 2. 研究の目的

皮膚創傷治癒過程は、炎症期、細胞増殖期、成熟期(組織再構築期)の3時相に大別され、正常ではこれらの連鎖反応により、創閉鎖がスムーズに完結する。その間に、好中球、マクロファージ、線維芽細胞、筋線維芽細胞といった複数の細胞が出現し、これらの放出するサイトカイン、増殖因子が複雑に関与し、治癒過程を制御している。先行研究により申請者は、マウスの創傷治癒時にTsukushiがマクロファージから分泌され、TGF- $\beta$ 1やサイトカインを調節し創傷治癒に関与することを明らかにした。また、Tsukushiは、再生表皮や筋線維芽細胞、新生血管および組織再構築期における線維組織にも発現しており、創傷治癒過程全体を通して創傷治癒に重要な働きをしているのではないかと考えた。本申請は、Tsukushiの機能を明らかにし、将来の創傷再生医療に役立つ分子メカニズムを解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

Tsukushi KOマウスを用いた創傷治癒時の再上皮化の観察、評価。

Tsukushi KO マウスを用いた創傷治癒時の線維化の観察、評価。

#### 4 . 研究成果

WT マウスに比べ、TSK-KO マウスにおいて、再上皮化がみられる 5 日目以降、肉眼的および組織学的に再上皮化のスピードが有意差をもって遅いことが判明した。Real time PCR にて、WT に比べ TSK-KO マウスでは、Wnt5 や Shh の下流分子である Gli1, PTCH1 など再上皮化に関わるシグナル伝達分子の発現量が優位に低下していることが判明した。

TSK-KO マウスでは WT マウスに比べ、創傷 5, 7, 10 日目の創部切片作成後の HE 染色にて肉芽増生が乏しく、また  $\alpha$ -SMA (筋線維芽細胞のマーカー) の発現低下が認められた。

以上より、Tsukushi は、再上皮化に關与する Wnt や Shh などのシグナル伝達分子を正に制御している可能性が考えられた。肉芽増生に関しては、準備実験 (Real time PCR) では TSK-KO マウスで TGF- $\beta$ 、IL-6、STAT3 が増加していたが、今回の結果は、TGF- $\beta$  の肉芽増生効果よりも、過剰な炎症による抑制がおこったことが推測される。

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

著者名: Niimori-Kita K, Tamamaki N, Koizumi D, Niimori D.

論文名: Matrin-3 is essential for fibroblast growth factor 2-dependent maintenance of neural stem cells.

掲載雑誌名: Scientific Reports

巻, 最初と最後の頁: 1, 13412

発表年: 2018 年

著者名: Sawamura S, Makino T, Johno T, Yamashita J, Niimori D, Fukushima S, Ihn H.

論文名: Severe bacterial sepsis results in delayed diagnosis of tuberculous lymphadenitis in a rheumatoid arthritis patient treated with adalimumab.

掲載雑誌名: Intractable Rare Dis Research

巻, 最初と最後の頁: 2, 138-140

発表年: 2018 年

著者名: Sawamura S, Niimori D, Ihn H.

論文名: A case of leg cellulitis by multidrug-resistant *Streptococcus pseudoporcinus*.

掲載雑誌名: Intractable Rare Dis Research

巻, 最初と最後の頁: 4, 280-282

発表年: 2018 年

著者名: Shimada S, Fukushima S, Niimori D, Miyashita A, Setoyama H, Sasaki Y, Ihn H.

論文名: Dabrafenib and trametinib combination therapy safely performed in a patient with metastatic melanoma after severe liver toxicity due to vemurafenib.

掲載雑誌名: The Journal of Dermatology

巻, 最初と最後の頁: 6, 280-282

発表年: 2018 年

[学会発表](計 0 件)

[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:

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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6．研究組織

(1)研究分担者：無

(2)研究協力者：無

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。