

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11588

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 targeting TGF beta /Smad for skin scarring

研究代表者

木田 真紀 (KIDA, MAKI)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：00326381

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)：オステオポンチン(OPN)の構成タンパクSLAYGLRの皮膚の創傷治癒における役割についての研究を行った。OPNノックアウトマウス(KO)のマウス胎児線維芽細胞(MEF)にSLAYGLRを投与するとコラーゲン1α、TGFβの発現が増強していた。さらにTGFβ中和剤、TGFβ受容体阻害剤、MAP kinase 阻害剤投与下ではコラーゲン1αの発現およびRNAレベルでの発現は抑制されていた。SLAYGLR投与によりJun,p-Junの発現はやや増加していた。以上よりOPNの構成タンパクであるSLAYGLRはTGFβ受容体を介してTGFβを制御し、皮膚の創傷治癒に寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚の創傷治癒のメカニズムを解明は、生体防御の面からも美容的面からも社会的に意義がある。今回、オステオポンチン(OPN)の構成タンパクであるSLAYGLRの皮膚創傷治癒における役割についての研究を行った。OPNノックアウトマウス(KO)の胎児線維芽細胞(MEF)を使用した研究ではTGFβ1の作用を増強させていた。さらにTGFβ中和抗体、TGFβ受容体阻害薬、MAP kinase阻害薬によりSLAYGLRの効果は抑制されていた。SLAYGLRはTGFβ受容体を介して、TGFβの制御しており、皮膚の創傷治癒に寄与するタンパク質であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：I researched a role of SLAYGLR, the protein compounds osteopontin(OPN), during cutaneous wound healing. Using mouse embryonic fibroblast(MEF)of OPN knock out mice(KO), the function of SLAYGLR was investigated in cutaneous wound healing. SLAYGLR increased the expression of collagen1α and TGFβ1 in MEF. In addition, the expression of collagen1α was suppressed under TGFβ neutralizing antibody, inhibitor of TGFβ receptor, and inhibitor of MAP kinase. SLAYGLR enhanced the expression of JUN and p-Jun in MEF of KO. Therefore SLAYGLR may control the expression and function of TGFβ via TGFβ receptor in the process of cutaneous wound healing. SLAYGLR may contribute to the cutaneous skin wound healing.

研究分野：救急

キーワード：オステオポンチン TGFβ 皮膚創傷治癒 SLAYGLR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

課題：TGF ベータ/Smad シグナルを標的とした皮膚の癒傷化の薬物療法の開発

1. 研究開始当初の背景

皮膚の創傷治癒は生体防御の観点および美容整容の面からの重要である。OPN 欠損マウス (KO) を使用した研究では、全層皮膚欠損モデルにおいて、創部閉鎖が野生型に比べ著しく遅延していた。その原因として、OPN が欠如した状態では TGF b の発現が抑制されていた。よって TGFb が制御しているマクロファージの機能やコラーゲンの形成が抑制され、線維芽細胞の形成が著しく低下した結果、皮膚の創傷治癒が遅延したと考えられた。今回、我々は OPN の SVVYGLR 配列に注目した。皮膚のマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を使用した先行研究では SVVYGLR が TGF と同様な生物活性があることが分かっている OPN の構成蛋白質である SLAYGLR が皮膚の創傷治癒を制御していると推測した。

2. 研究の目的

OPN を構成しているタンパク質である SLAYGLR の皮膚の創傷治癒に関する役割を明らかにする。

3. 研究の方法

1. TGF 1 と SLAYGLR の相互作用の検討

Mouse embryonic fibroblast (MEF) による線維芽細胞モデルの作成
C57BL/6 のバックグラウンドの OPN ノックアウトマウス (KO) のマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を使用し、SLAYGLR の線維芽細胞への遊走、増殖、線維化に及ぼす影響を調べた。KO マウスの胎児の内臓をトリプシンで溶解し、MEF を作成した。3 継代後より使用した。

SLAYGLR と TGFb1 の相互作用

MEF に a. TGF b 1 (1ng/mL) b. SLAYGLR (10ng/mL) を添加し、c. TGF b 1(-)、SLAYGLR(-) と比較した。

(1) Western blot

Western blot にてコラーゲン I 1 の発現を検討した。

(2) Real-time RT-PCR

Mammalian Total RNA Mini-prep Kit® (Sigma) を使用し、培養細胞の mRNA を抽出した。抽出した mRNA で Real-time RT-PCR を行い、相対定量法にてリン酸化 Smad2、Smad7 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、7300 Fast Real-time PCR system (Applied Biosystem™) にて測定を行った。

SLAYGLR のシグナル伝達経路の検討

TGF b 中和剤、TGF b 受容体阻害剤、MAP kinase 阻害剤を使用し、SLAYGLR の作用が抑制されるかを調査し、皮膚の創傷治癒における SLAYGLR の作用についての詳細を検討した。

(1) Western blot

Western blot にて Jun、p-jun の発現を検討した。

(2) Real-time RT-PCR

培養細胞の mRNA を抽出し、Real-time RT-PCR を行う。相対定量法にて TGFb1、コラーゲン I 1、リン酸化 Smad2、Smad7 を測定した。

4. 研究成果

1. TGF 1 と SLAYGLR の相互作用の検討

a. TGF b 1 (1ng/mL) b. SLAYGLR (10ng/mL) の両群は c. TGF b 1(-)、SLAYGLR(-) と比較してコラーゲン I a1 の発現が増強していた。また、TGF b 1、SLAYGLY を投与によりリン酸化 Smad2、Smad7 の発現は促進していた。

2. SLAYGLR のシグナル伝達経路の検討

SLAYGLY (10ng/mL) 投与後、TGF b 中和剤、TGF b 受容体阻害剤、MAP kinase 阻害剤を投与し Jun、p-jun の発現を Western blot で調べた。Jun、p-jun の発現は TGF b 中和剤、TGF b 受容体阻害剤、MAP kinase 阻害剤投与で抑制されていた。また Real-time RT-PCR にて

TGF β 1 と SLAYGLRGF β 1、コラーゲン I α 1、リン酸化 Smad2、Smad7 の発現は SLAYGLY 単体投与に比べ、明らかに抑制されていた。

以上より SLAYGLR は TGF β 1 と同様の作用を有していた。そのメカニズムとして、SLAYGLR が TGF β 1 の発現を増加させるだけではなく、SLAYGLR が TGF β 受容体に直接作用し、TGF β 1 の作用の増強している可能性があると考えられた。予備研究では OPN の欠落により TGF β 1 の発現が抑制されており、SLAYGLR が TGF β 1 を制御し肉芽形成に影響していることが考えられた。

OPN の構成タンパクである SLAYGLR は TGF β を制御に関与し、皮膚の創傷治癒に寄与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------