

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08401

研究課題名(和文) 強皮症の皮膚潰瘍に対する体外衝撃波療法の分子的機序の解明

研究課題名(英文) The elucidation of molecular mechanism of extracorporeal shock wave therapy for skin ulcer in systemic sclerosis

研究代表者

藤井 博司 (Fujii, Hiroshi)

東北大学・大学病院・准教授

研究者番号：30531321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚微小血管内皮細胞に対する衝撃波照射の遺伝子変化をマイクロアレイにて解析したところ、FosBが10倍以上の上昇を示していた。ラットの大腿部に衝撃波照射後の遺伝子変化をマイクロアレイにて解析したところ、FosB、CXCL2が照射後著明に上昇していた。IPAによるupregulator解析では、PMAにより誘導される遺伝子群と有意な相関が認められた。FosBの強制発現により遺伝子変化の検証を行った。FosB遺伝子を強制発現させたのみではCXCL2、VEGFAの有意な上昇は認められなかったが、PMA共刺激下では、CXCL2、VEGFA共に有意な上昇を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性強皮症に合併する指尖潰瘍に対する種々の薬剤の治療効果は限定的であり、新たな発想に基づく新規治療法の開発を要する。本研究で皮膚細胞、皮膚組織への体外衝撃波照射により、転写因子FOSBの誘導が引き起こされ、その後、血管新生ケモカインであるCXCL2の誘導が起こることが示された。このFOSB-CXCL2-血管新生の機序が、創傷治癒に寄与している可能性がある。体外衝撃波照射後の早期の遺伝子変化を示したのは、本研究が初めてである。PDE4阻害剤などFOSBの発現を促進する可能性のある薬剤を併用することにより強皮症における体外衝撃波療法の治癒効果改善効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Gene expression profiling analysis of human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) with microarray revealed that the transcriptional factor FOSB was more than 10-folds increased after irradiation of shock wave. Shock wave treatment induced the gene expression of FOSB and CXCL2 in rat skin. Up-regulator analysis showed that the gene set induced by shock wave treatment highly correlated with PMA-induced genes. The aberrant expression of FOSB in HDMEC revealed that both of VEGF and CXCL2 were increased co-cultured with PMA, whereas none of these genes were changed without PMA.

研究分野：膠原病

キーワード：強皮症 体外衝撃波 皮膚潰瘍 FOSB

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症に合併する指尖潰瘍は微小血管の線維化に伴う虚血により引き起こされ、時に難治性となる。一般的に免疫抑制療法は効果が無く、この難治性潰瘍に対して、外用剤、血管拡張薬、交感神経ブロックなどが行われている。近年皮膚潰瘍再発予防としてボセンタンが保険収載されたが、その治療効果は限定的であり、新たな発想に基づく新規治療法の開発を要する。

衝撃波とは超音速で伝播する圧力の波であり、媒質が急速に圧縮されることによって急激な圧上昇を伴う圧波形の非線形現象が生じ、組織や細胞に物理学的刺激を与える。その物理学的破壊作用を用いて尿管結石破碎術として臨床応用が開始され、非侵襲性で有害事象のほとんどない治療法として急速に普及した。その後、体外衝撃波療法は泌尿器科領域にとどまらず創傷治癒不全、虚血性心疾患など多様な領域で臨床応用されている。これらの疾患に対する治療効果は、何らかの液性因子の放出などを介して組織や細胞に血管新生効果を及ぼすことによるものと考えられている。

我々は、強皮症に伴う難治性皮膚潰瘍に対する体外衝撃波療法の治療効果検証のためのパイロット試験を行った。衝撃波照射により指尖潰瘍数は有意に減少したが潰瘍は残存し、衝撃波照射中止後に潰瘍数が再出現する症例もあった。その分子レベルでの機序を解明し、重要な分子を標的とする治療法を併用することにより、体外衝撃波療法の治療効果を更に改善できる、あるいは衝撃波照射以外の新たな治療法となりうる可能性があると考えた。

#### 2. 研究の目的

衝撃波照射された皮膚組織は主としてケラチン細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞より構成されている。皮膚細胞において、衝撃波による圧変化という物理的刺激がどのようにして遺伝子発現の誘導、液性因子放出という生物学的反応へ転換されていくかの分子レベルでの機序は明らかでない。この機序を解明することにより、強皮症皮膚潰瘍における新たな治療戦略の開発につながる。本研究では、衝撃波照射後早期に活性化される転写因子、それに引き続く液性因子の発現誘導、に焦点を当てることにより皮膚構成細胞における衝撃波照射に対する遺伝子応答反応と創傷治癒効果の機序を解明する。衝撃波照射の *in vivo*, *in vitro* における遺伝子変化の発現解析はいくつかの報告はすでに存在する。しかし、衝撃波照射後2時間以内の早期の遺伝子発現変化に着目した研究はなく、遺伝子発現誘導における master regulator として機能する転写因子の同定や液性因子の網羅的解析は行われていない。我々は、衝撃波の物理的特性を考慮した *in vitro* での衝撃波照射系を独自に確立した。この系を用いて皮膚微小血管内皮細胞における遺伝子発現プロファイルの解析を行ったところ、転写因子 AP-1 ( activator protein-1 ) の構成因子である FosB 遺伝子 ( FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B ) の著明な上昇を認めた。この結果からは、FosB が master regulator として機能する事が考えられ、皮膚細胞における FosB 遺伝子の遺伝発現応答における役割の解明も併せて行う。

#### 3. 研究の方法

##### (1) 皮膚培養細胞における体外衝撃波照射に対する遺伝子応答の網羅的解析

*in vitro* で皮膚培養細胞 ( 皮膚微小血管内皮細胞、皮膚線維芽細胞、皮膚ケラチノサイト ) を flat plate 上で培養し、体外衝撃波装置 ( STORZ MEDICAL 社、DUOLITH SD1 T-TOP ) を用

いて細胞に衝撃波を照射した。照射 2 時間後の細胞の mRNA 発現量変化をマイクロアレイ (Agilent) により解析した。発現変動した遺伝子を Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ソフトウェアにて解析し、血管新生あるいは血管拡張に關与する液性因子の抽出を行った。また upstream 解析機能を用いて上流で機能している可能性のある転写因子を抽出した。

### (2) ラット衝撃波照射モデルを用いた衝撃波照射に対する遺伝子応答反応解析

ラット臀部に体外衝撃波を照射し、その遺伝子変化を RT-PCR、マイクロアレイにて解析する。

### (3) FosB 遺伝子の皮膚培養細胞における遺伝子応答の役割

レトロウィルスベクター-pMX を用いて皮膚培養細胞 (皮膚微小血管内皮細胞、皮膚線維芽細胞、皮膚ケラチノサイト) に FosB 遺伝子を導入する系を構築した。FosB 過剰発現細胞における遺伝子発現の変化をマイクロアレイにて解析し、FosB によって誘導される下流の遺伝子とそのシグナル経路を同定した。

## 4. 研究成果

### (1) 皮膚培養細胞における体外衝撃波照射に対する遺伝子応答の網羅的解析

我々が独自に開発した接着細胞への衝撃波照射方法を用いて、衝撃波未照射と衝撃波照射 (1.24 mJ/mm<sup>2</sup>, 3 Hz, 20 発) 2 時間後の HDMEC の mRNA の発現量の変化をマイクロアレイにて解析した。細胞のロットの違いによる反応性の違いを考慮し、3 つの異なるロットを用いて独立した実験を行い、全実験で共通して変動している遺伝子を抽出した。12 個の遺伝子が 2 倍以上の上昇、19 個の遺伝子が 0.5 倍以下の低下を示した (上位 5 位。Table 1)。上昇した遺伝子の中に液性因子はなかった。AP-1 の構成因子である FosB は転写因子として作用する可能性があり、10 倍以上の上昇を示していたが、IPA による upregulator 解析では有意 (Z score >2 あるいは 0.5、P<0.01) な分子は認められなかった。

**Table1 Genes changed >2 folds or <0.5 folds in HMVEC by SW treatment**

Gene Symbol	Gene Name	Exp.1	Exp.2	Exp.3
<b>FOSB</b>	<b>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B</b>	<b>21.3</b>	<b>13.4</b>	<b>10.3</b>
<b>GRIP1</b>	<b>glutamate receptor interacting protein 1</b>	<b>5.87</b>	<b>2.05</b>	<b>3.88</b>
<b>BMPRI1A</b>	<b>bone morphogenetic protein receptor, type IA</b>	<b>5.51</b>	<b>2.16</b>	<b>3.18</b>
<b>CA1</b>	<b>carbonic anhydrase I</b>	<b>4.79</b>	<b>2.55</b>	<b>5.77</b>
<b>CPVL</b>	<b>carboxypeptidase, vitellogenic-like</b>	<b>4.12</b>	<b>3.58</b>	<b>12.88</b>

### (2) 衝撃波照射によるラット皮膚の遺伝子発現量変化のマイクロアレイ解析

ラットの大腿部に衝撃波照射後の遺伝子変化をマイクロアレイにて解析した。FosB が照射後 0.5 時間では著明に上昇し (66.3 倍) (Table2)、4 時間後には変動 (>2 倍以上あるいは <0.5 倍以下) は認められなかった。IPA による upregulator 解析では、照射後 0.5 時間で PMA により誘導される遺伝子セットと有意な相関が認められた (Z score=3.554, P=6.49 x10<sup>-12</sup>) が 4 時間後の相関は有意では無かった (Z score=1.331, P=5.28 x10<sup>-14</sup>)。また、0.5 時

間後では angiogenic chemokine である CXCL2 が著明な上昇を来していた (42.0 倍)

Table 2

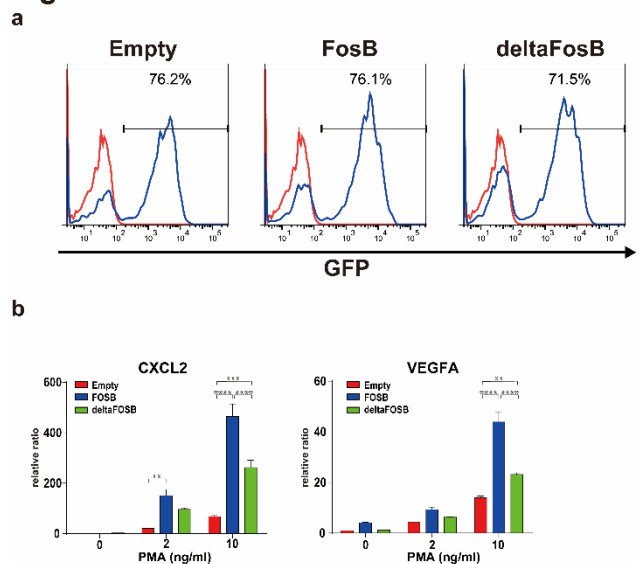
Upregulated genes 0.5 hours after treatment with SW in rat skin (Top 10)

Gene Symbol	Entrez Gene Name	Fold Change
Krtap31-1	keratin associated protein 31-1	67.8
FOSB	FosB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	66.3
CXCL2	C-X-C motif chemokine ligand 2	42.0
PNLIPRP1	pancreatic lipase related protein 1	25.7
Gm35427	predicted gene, 35427	24.2
KRTAP20-2	keratin associated protein 20-2	23.1
FOS	Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	18.6
Olf1124	olfactory receptor 1124	18.3
Lao1	L-amino acid oxidase 1	17.3
KRTAP4-9	keratin associated protein 4-9	16.6

(3) FosB、delta FosB を強制発現した皮膚微小血管内皮細胞での PMA 刺激による遺伝子発現量変化

FosB、delta FosB の強制発現により遺伝子変化の検証を行った。コントロール、FosB、delta FosB の遺伝子導入効率はそれぞれ近い細胞を用いて比較した (Figure-1)。FosB、delta FosB 共に遺伝子を強制発現させたのみでは CXCL2、VEGFA の有意な上昇は認められなかったが、PMA 共刺激下では、CXCL2、VEGFA 共に有意な上昇を認めた。VEGFA に比し、CXCL2 は著明な上昇率を示した (Figure-1)。

Figure-1



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
---------	---------