

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791323

研究課題名（和文） アディポサイトカイン、ミオカインの糖尿病性創傷治癒遅延への影響

研究課題名（英文） Effects of Adipokine and Myokine on impaired wound healing in diabetes

研究代表者

河合 建一郎（KAWAI KENICHIRO）

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：80423177

研究成果の概要：

糖尿病の合併症の一つとして、足底潰瘍に代表される創傷治癒遅延があげられる。一方、糖尿状態になると脂肪や筋肉から分泌される adipokine や myokine といった内分泌因子の血中濃度が増減することが知られている。本研究により adipokine の一つである adiponectin が、皮膚創傷治癒で重要な役割を果たしている keratinocyte の増殖や分化に影響を与えていることを解明した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,700,000	0	2,700,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	210,000	3,610,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：糖尿病、外科

## 1. 研究開始当初の背景

他の先進国と同様、糖尿病患者は我が国でも増加傾向にあり、糖尿病そのものに加えその合併症に対する基礎研究や治療法の確立が待たれている。中でも糖尿病に起因する創傷治癒遅延は壊疽や感染症等に発展しやすく患者の QOL のみならず医療費の観点からも対策が急務である。

一方、脂肪や筋肉が内分泌組織として働くことが近年明らかになってきており、分泌される因子はそれぞれ adipokine や myokine と総称される。これらの因子は糖尿病では血中濃度が増減することが知られ、糖尿病の様々な病態に関わることが判明してきてい

る。

## 2. 研究の目的

(1) ①Adipokine、Myokine が fibroblast や keratinocyte などの創傷治癒に関わる細胞に対してどのような影響を与えているのを in vitro にて明らかにする。

②KKAy マウスなどのモデル動物を用いて in vivo にても Adipokine, Myokine の影響を明らかにする。

(2) FGF や VEGF などの創傷治癒に関わるサイトカインが、脂肪細胞や筋肉細胞に対し、Adipokine や Myokine の分泌にどのように影響を与えているかについても明らかにす

る。

### 3. 研究の方法

Adipokine として adiponectin, Myokine として Musclin を用いた。これは報告されているすべての Adipokine, Myokine に対して実験を行うことは予算、時間的に無理があること、これまでの実験で Adiponectin, Musclin の扱いに慣れていたためである。

- (1) ① Recombinant 蛋白の Adiponectin, Musclin を初代培養皮膚 fibroblast および keratinocyte の Cell Line である HaCaT 細胞へ添加し、Real Time PCR にて、Involucrin, Keratin, bFGF, IL, MMP, VEGF, TGF  $\beta$ , Integrin といった細胞分化や増殖に関わる遺伝子について調査した。また、同様に recombinant 蛋白添加後、細胞 Lysate を回収し、Western Blot 法にて AMPK や MAPK のリン酸化といったシグナル伝達経路についても調査した。また BrdU を用いて細胞増殖に与える影響や TUNEL assay を用いて細胞の apoptosis に与える影響についても調査した。
- ② 動物実験として肥満糖尿病モデルである KKAY マウスを用いた実験を行った。3ヶ月間高脂肪高カロリー食を食べさせた群と普通食を食べさせた群にわけ、背部に創を作成後、創傷治癒の状態や Adiponectin の集積を免疫組織染色にて確認した。さらに recombinant 蛋白の局所投与にて創治癒がどのように影響されるかを調査した。
- (2) 創傷治癒に際して強く発現される因子の VEGF や bFGF, TGF  $\beta$  の Recombinant 蛋白を脂肪細胞の Cell line である 3T3L-1 や筋肉細胞の Cell line である C2C12 に添加し、Adiponectin と Musclin の遺伝子発現にどのような影響を与えるかを Real time PCR を用いて調査した。

### 4. 研究成果

(1) ① Pilot study にて Recombinant Musclin は fibroblast, HaCaT 細胞いずれに対しても、調査したすべての遺伝子およびシグナル伝達経路に対して有意な影響を与えていなかったため、以後 Adiponectin についての調査に傾注した。

初め fibroblast, HaCaT 細胞に Recombinant adiponectin を、濃度を変えて添加し、Real time PCR 法にて Involucrin, Keratin, bFGF, IL, MMP, VEGF, TGF  $\beta$ , Integrin といった細胞分化や増殖に関わる遺伝子についてその発現変化を網羅的に調査した。その結果、Fibroblast においては今回調査したすべての遺伝子については変化が確認されなかったが、HaCaT 細胞に対しては、Involucrin, TGF  $\beta$  1, 2, 3 に対し、濃度依存性に遺伝子発現変

化が見られた (図 1, 2)。

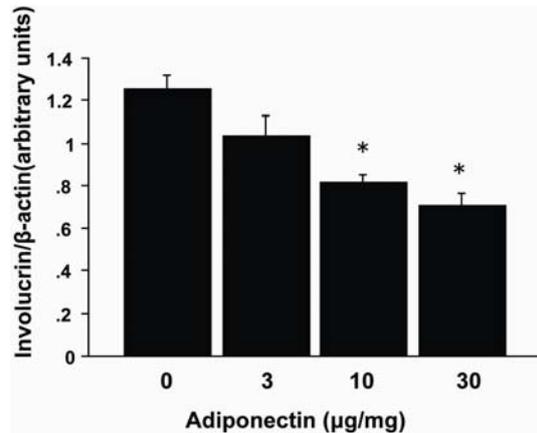
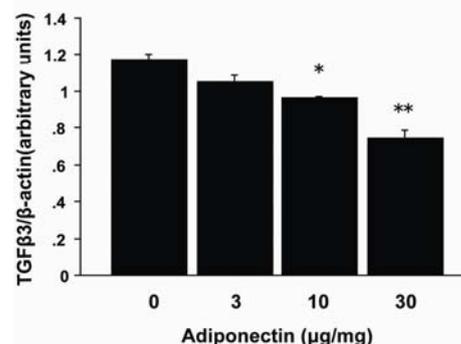
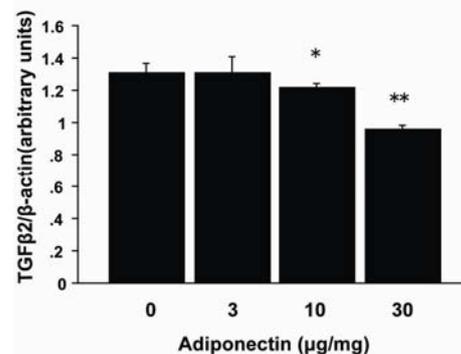
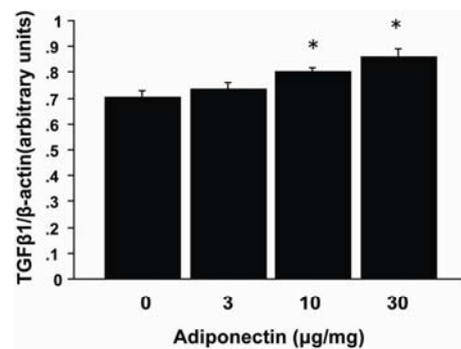


図 1. HaCaT 細胞に対する Adiponectin の Involucrin 遺伝子発現変化への影響

図 2. HaCaT 細胞に対する Adiponectin の TGF  $\beta$



1, 2, 3 遺伝子発現変化への影響

次に、Adiponectin 添加によるシグナル伝達経路への影響であるが、fibroblast におい

ては AMPK, MAPK ともに変化が確認できなかった。一方 HaCaT 細胞に対しては、AMPK のリン酸化に影響を与えている結果が一度出たもののその後再現性がとれなかった。今後更なる検討を要する。

Adiponectin の HaCaT 細胞に対する細胞増殖に与える影響を調査するため BrdU uptake を検討した。その結果、Adiponectin は濃度依存的に細胞増殖を抑制していることが判明した (図 3)。

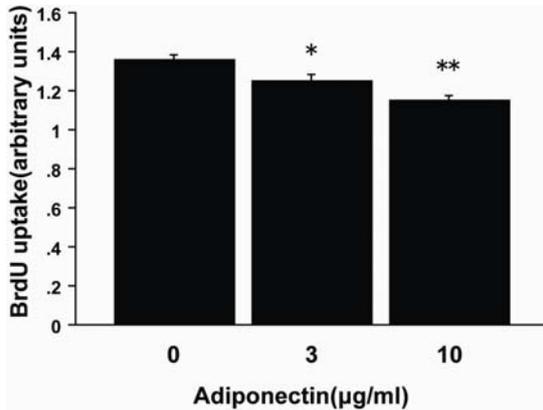


図 3. HaCaT 細胞に対する Adiponectin の BrdU uptake への影響

更に Adiponectin の HaCaT 細胞に対する apoptosis に与える影響を調査するため TUNEL assay を行った。その結果、Adiponectin は濃度依存性に apoptosis を亢進していた (図 4)。

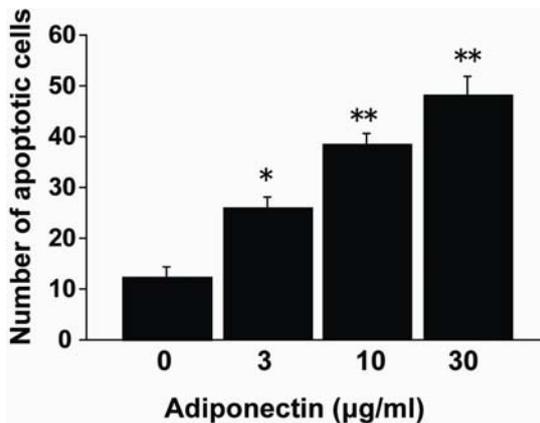


図 4. HaCaT 細胞に対する Adiponectin の apoptosis への影響

②KKAy マウスを高脂肪高カロリー食摂取群と普通食摂取群に分け、3ヶ月後の血中アディポネクチン濃度を測ったところ、前群において有意に血中アディポネクチン濃度が減少しており、また創治癒にも遷延が見られた。そこで adiponectin の創部への集積に2群に差があるか確認しようと試みたが、明らかな

差は見られなかった。ただしこれは抗体の性能や条件検討によっては今後差が確認できるかもしれない、さらなる検討が必要である。また、Recombinant adiponectin の創部への局所投与実験では、adiponectin 投与側において創治癒が促進される傾向があったものの有意差はみられなかった。

(2) VEGF, bFGF, TGF  $\beta$  いずれの Recombinant 蛋白添加でも 3T3L-1 において Adiponectin, また C2C12 において Musclin の遺伝子変化に差は見られなかった。

糖尿病では足底の潰瘍において上皮化が進まない一方、周辺に分厚い胼胝を生じたり、逆に胼胝が原因となって足底潰瘍を生じることがある。これらは keratinocyte の異常増殖・分化や Apoptosis の過程が正常に行われないことから生じると考えられる。

糖尿病では Adiponectin の血中濃度が低下することは以前より知られている。本研究により、Adiponectin は keratinocyte に対し、分化抑制 (involucrin の発現を抑制)、増殖抑制 (TGF  $\beta$  1 の発現亢進、3 の発現抑制) に働く可能性が示された。一方 Adiponectin は Keratinocyte に対し、apoptosis の亢進という一見すると矛盾するよう見えるデータも示された。これは、肝臓や脂肪のように分化して成熟した細胞が働く組織と異なり、表皮組織は基底層から成熟していき最終的に角化 (=apoptosis) してはがれ落ちていくといったように色々な段階の細胞があるため、どの段階の keratinocyte に働きかけるかによって表現形が異なるため、Adiponectin は表皮の定常性を保つために重要な役割を担っている可能性が示唆される。

本研究により糖尿病における低 Adiponectin 血症が、足底の胼胝を惹起させたり、潰瘍の上皮化を妨げている可能性が示唆された。糖尿病における潰瘍に対する軟膏などによる Adiponectin 局所投与といった新たな治療法も期待される。

## 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)

(著者名) Kawai K, Kageyama A, Tsumano T, Nishimoto S, Fukuda K, Yokoyama S, Oguma T, Fujita K, Yoshimoto S, Yanai A, Kakibuchi M. (論文標題) Effects of adiponectin on growth and differentiation of human keratinocytes--implication of impaired wound healing in diabetes. (雑誌名) Biochemical and Biophysical Research Communications (査読の有無) 有り (巻) 374 (発行年) 2008 (最初と最後の

〔学会発表〕(計 1 件)

(発表者名) 蔭山晶子、河合建一郎、妻野知子、西本聡、福田健児、横山茂和、小熊孝、藤田和敏、吉本咲哉、柳井亜矢子、垣淵正男 (発表標題) アディポネクチンの Keratinocyte への影響 (学会等名) 第 17 回日本形成外科学会基礎学術集会 (発表年月日) 2008 年 10 月 2 日 (発表場所) 東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河合 建一郎 (KAWAI KENICHIRO)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号：80423177

### (2) 研究協力者

蔭山 晶子 (KAGEYAMA AKIKO)  
兵庫医科大学・医学部・病院助手  
研究者番号：00454760  
妻野 知子 (TSUMANO TOMOKO)  
兵庫医科大学・医学部・病院助手  
研究者番号：90449877