

機関番号：32645

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591355

研究課題名 (和文) 創傷治癒過程における Toll 様受容体シグナルの役割

研究課題名 (英文) The role of Toll-like receptor signaling in wound healing

研究代表者

坪井 良治 (TSUBOI RYOJI)

東京医科大学・医学部・主任教授

研究者番号：70221421

研究成果の概要 (和文)：

自然免疫では樹状細胞上に存在する Toll 様受容体(Toll-like receptor, TLR)が重要な役割を担っているが、創傷治癒における役割は解析されていない。そこで TLR シグナル遺伝子欠損マウスの創傷治癒過程を検討した。Myd88 欠損マウスでは有意な所見が得られなかったが、NF- $\kappa$ B を増強する PDLIM2 欠損マウスでは創収縮が亢進して創閉鎖が促進した。分離された線維芽細胞を包埋したコラーゲンゲル収縮も亢進し、TLR シグナルが創傷治癒に関与していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Although Toll-like Receptor (TLR) plays an important role in innate immunity, its role in wound healing has yet to be analyzed. In the present study, the healing process of dermal wounds in TLR knock-out mice was examined. No significant findings were observed in Myd88 KO mice. Meanwhile, PDLIM2 KO mice, which showed exaggerated NF- $\kappa$ B activity, demonstrated earlier wound closure due to enhanced wound contraction. Contraction of the collagen gel seeded with fibroblasts from KO mice was also enhanced, suggesting the involvement of TLR signaling in wound healing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード: 創傷治癒, Toll 様受容体, TLRシグナル, 遺伝子欠損マウス, 創傷治癒遅延モデル, コラーゲンゲル収縮, ピルフェニドン, FGF-7 ファミリー

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚の創傷治癒過程では種々の現象が経時的に観察される。その中で炎症後期に皮膚欠損局所に集まるマクロファージと、それに引き続く表皮角化細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞の反応性が最も創傷治癒に重要であ

る。マクロファージ機能の低下は創傷治癒遅延に直結する。皮膚の修復過程の病態解析は、新しい皮膚潰瘍治療薬や被覆材の開発だけでなく、再生医療やアンチエイジングの研究にとっても重要である。

さて、病原性微生物の感染に対する宿主防

御機構として自然免疫は大きな役割を果たしているが、なかでも樹状細胞上に存在する Toll 様受容体(Toll-like receptor, TLR)は病原性微生物共通の分子パターンを認識している。これまでの研究により、それぞれ特異的な TLR が同定され、細胞内シグナルについても MyD88、TRIF などのアダプター分子と NF- $\kappa$ B、IRF-3 を介するサイトカイン反応が報告された。細菌やウイルスなどに対する免疫応答性については大筋が明らかにされたといえる。しかし、皮膚疾患における意味づけについては乾癬、ざ瘡、疣贅などを除き十分ではなく、組織修復における血管新生を除き、創傷治癒過程に及ぼす影響については解析されていない。創傷治癒過程ではマクロファージが大きな役割を果たしており、従来から低濃度の細菌死菌や多糖体が肉芽形成を促進させることが知られており、TLR シグナルの遮断により創傷治癒過程が遅延することが示唆される。

私はこれまで、遺伝的糖尿病マウス(db/db)が糖尿病状態とマクロファージ機能の低下により創傷治癒が遅延すること、線維芽細胞成長因子 (bFGF) がこれを回復させることを報告し、フィブラストの開発に貢献した。その後も各種細胞成長因子の治癒促進作用の解析や感染皮膚潰瘍の作製など、創傷治癒に関する基礎的研究に携わってきた。また、研究分担者の齋藤は、形質細胞様樹状細胞における TLR7, 9 刺激による TypeI INF の産生には Ikka が必須であることを報告した (Nature 440,949,2006)。また、TLR シグナルに関する種々の遺伝子欠損マウスは理化学研究所免疫・アレルギー総合科学研センターより供給が可能である。

以上の情報から、樹状細胞やマクロファージに発現する TLR やそのシグナルが、創傷治癒や皮膚の修復過程に重要な役割を果たしている可能性が考えられ、TLR シグナルに関する遺伝子欠損マウスと、それに由来する培養細胞を使用することにより、この仮説を証明できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

マクロファージに発現する TLR やそのシグナルが、創傷治癒過程で重要な役割を果たしているかどうかを、種々の TLR シグナル遺伝子欠損マウスを用いて明らかにする。TRIF を介するため、野生型マウス、MyD88 欠損マウス、TRIF 欠損マウス、さらに MyD88/TRIF 重欠損マウスを用いて創傷治癒実験を行うことにより、全ての TLR シグナルが遮断された状態も検討することができる。

①これらのマウスの背部皮膚に 6 mmパンチで全層皮膚欠損創を作製し、経時的に皮膚組織を採取する。HE 染色標本や凍結標本に

より組織学的に治癒過程を比較検討する。またマイクロアレイや real-time PCR 法などにより、組織中に発現している関連分子の mRNA 発現を比較する。

②さらに細かくシグナルの特異性を追求するため、これら以外の TLR シグナル遺伝子欠損マウスを用いて創傷治癒実験を実施する。

③これらのマウスの皮膚欠損創に細菌死菌や LPS などを濃度別に添加して創傷治癒が促進するか検討する。

④野生型マウスや TLR シグナル遺伝子欠損マウスに、MyD88 および TRIF をウイルスベクター pUNO で過剰発現させ、①で示した創傷治癒実験方法により創傷治癒が促進ないし抑制されるかを検討する。

⑤TLR シグナル遺伝子欠損マウスから表皮角化細胞と線維芽細胞を分離培養し、遊走能、コラーゲン収縮能、インテグリン・コラーゲン発現量などの創傷治癒パラメーターに変化があるか、またウイルスベクター pUNO で MyD88 および TRIF を過剰発現させた時、これらの機能が回復するかどうかを検討する。

## 3. 研究の方法

野生型マウス、MyD88 欠損マウス、TRIF 欠損マウス、さらに MyD88/TRIF 重欠損マウスは理化学研究所免疫・アレルギー総合科学研センターの改正恒康チームリーダー (現大阪大学) などの協力を得る。

(1) 野生型マウス、MyD88 欠損マウス、TRIF 欠損マウス、MyD88/TRIF 重欠損マウスの背部皮膚に 6 mmパンチで全層皮膚欠損創を作製し、経時的に皮膚組織を採取する。

①HE 染色標本を作製して、再上皮化、肉芽組織面積、血管新生、コラーゲン量などを定量的に画像解析する。

②凍結標本より薄切標本を作製し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて MyD88、TRIF、TRAF6、IRF-3 などの TLR シグナルと、VEGF、FGF、PDGF、TGF- $\beta$ 、インテグリン、PA、MMP など創傷治癒に関連した分子の発現を特異抗体を用いて染色する。

③マイクロアレイ実施後に特定の分子について real-time PCR 法を実施して、組織中に発現している上記分子の mRNA 発現量を比較する。

(2) 創傷治癒に差異の認められたマウスの皮膚欠損創に細菌死菌や LPS などを濃度別に添加して創傷治癒が促進するか検討する。

(3) 野生型マウスや TLR シグナル遺伝子欠損マウスに、MyD88 および TRIF をウイルスベクター pUNO で過剰発現させ、①で示した創傷治癒実験による創傷治癒が変化するかを検討する。

(4) TLR シグナル遺伝子欠損マウスの背部皮

膚から表皮角化細胞と線維芽細胞を分離培養する

①表皮角化細胞の遊走能を測定する、②線維芽細胞を可溶化 type I コラーゲンと混合してゲル化させ、このゲル収縮を経時的に測定する、③インテグリン、フィブロネクチン、プロコラーゲンの mRNA 発現量の変化を定量的 PCR で測定する。

(5) ウイルスベクター pUNO で MyD88 および TRIF を表皮角化細胞と線維芽細胞に過剰発現させた時、(4)の機能が変化するかどうかを検討する。

#### 4. 研究成果

(1) TLR シグナル遺伝子欠損マウスのうち、まず TLR の重要なアダプター分子である Myd88 欠損マウスに着目した。しかし、Myd88 欠損マウス背部皮膚を用いた創傷治癒実験では創傷治癒に関する有意な変化は見いだせなかった (negative data)。

(2)しかし、その検討の過程で  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  を調節する遺伝子である PDLIM2 が創収縮に重要であることを見出した。

TLR を介した細胞内シグナルの一部は細胞質に存在する  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  に到達して炎症を誘発する。PDLIM2 は  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  のユビキチン化に関連した遺伝子であり、 $\text{NF-}\kappa\text{B}$  を分解に導くことにより炎症を終焉させる重要な役割を果たし、PDLIM2 欠損マウスでは炎症性サイトカインの異常産生が起こることが知られている。

①まず、PDLIM2 遺伝子欠損マウスを用いた全層皮膚欠損モデルにおいて、野生型マウスと比較して創収縮が亢進して創面積が縮小することを確認した。病理組織学的な検討では、再上皮化や肉芽形成には差異が認められなかった。

②次に、PDLIM2 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの線維芽細胞を採取してコラーゲンゲルを作製し、創収縮実験を行った。その結果、PDLIM2 遺伝子欠損マウス由来線維芽細胞では  $\text{TGF}\beta$  や FCS 刺激で、より強いゲル収縮を認めた。これらの実験は終了しているが、外部機関との共同研究の一部であるため図表を使つての記述はできない。論文の投稿準備中である。

(3)さらに TRIF 欠損マウスと MyD88/TRIF 重複欠損マウスについて実験を予定したが、繁殖の関係で動物の供給が十分でなく、実験結果を得ることができなかった。

(4)TLR の実験とは別に、正常マウス背部皮内にブレオマイシン (BLM)  $50\mu\text{g}/\text{日}$  を 1 ヶ月間反復注射することにより皮膚硬化を誘導し、創傷治癒遅延モデルを作製した。このモデルを用いて、その成因の解明と治癒促進薬の探索を試みた。

①このモデルの背部皮膚硬化部位に直径 6mm の全層皮膚欠損創を作製し、正常マウス皮膚欠損創と創閉鎖を比較した。その結果、皮膚硬化マウスでは創閉鎖が有意に遅延した。組織学的には、正常マウスでは血管新生が著明であり、皮膚硬化マウスでは筋線維芽細胞の増加と線維化が著明であった。これらのモデルから組織を採取して total RNA を抽出し、 $\text{TGF}\beta 1$ 、Coll A1、 $\alpha\text{SMA}$ 、VEGF の mRNA 発現を比較したところ、皮膚硬化マウス皮膚では有意に Coll A1 の発現が低下していた。

②皮膚硬化マウスを用いた創傷治癒遅延モデルに bFGF を投与して創傷治癒改善効果を検討した。bFGF ( $1.0\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) を創作製後に単回投与して被覆すると、対照群に比較して統計学的有意差はないものの、創閉鎖が促進された。(下記論文②として一部発表済み。現在英文論文作成中)

(5) ヒトケロイド由来の線維芽細胞を分離培養し、 $\text{TGF}\beta$ 、CTGF、 $\alpha\text{SMA}$  の mRNA の発現を測定するとともに、細胞をコラーゲンゲル内に包埋してゲル収縮実験を行った。この系に線維化を抑制する作用が知られているピルフェニドン (pirfenidone) を添加して皮膚硬化抑制作用を検討した。

①ケロイド由来の線維芽細胞では  $\text{TGF}\beta$ 、CTGF、 $\alpha\text{SMA}$  の mRNA 発現が亢進していた。また、強いゲル収縮能を示し、 $\text{TGF}\beta$  刺激で収縮力が増加した。

②ピルフェニドンはコラーゲンゲル収縮を抑制した。また、ピルフェニドン前処置により  $\text{TGF}\beta 1$  依存性のゲル収縮や線維芽細胞の  $\alpha\text{SMA}$  遺伝子発現は抑制された。(現在英文論文作成中)

(6)さらに 3 番目の実験として、創傷治癒過程における fibroblast growth factor (FGF) -7 ファミリー蛋白、特に FGF-22 の局在について検討した。

①ヘアレスマウス (hr/hr) 背部の全層皮膚欠損創の FGF-22 局在を組織学的に検討したところ、FGF-22 は創縁部の再上皮化表皮上層に限局していた。この分布は p-p38 の局在と類似していた。これらの結果から FGF-22 が再生上皮の分化や遊走表皮の制御に関与している可能性が示唆された。(下記論文①として一部発表済み。現在英文論文作成中)

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 件)

- ① 倉繁祐太, 織田裕子, 今村亨, 坪井良治: 創傷治癒過程における fibroblast growth factor (FGF)-7 ファミリー蛋白の局在. 東京医科大学雑誌 査読有 67: 176-183, 2009.
- ② 前田龍郎, 山本俊幸, 坪井良治: プレオマイシン反復注射による皮膚硬化創傷治癒遅延マウスにおける bFGF の創傷治癒促進効果の解析. 皮膚の科学 査読無 8: 46-51, 2009.

[学会発表] (計 件)

- ① 倉繁祐太, 前田龍郎, 坪井良治: 創傷治癒過程における fibroblast growth factor (FGF)-7 ファミリー蛋白の局在. 第2回 皮膚創傷治癒研究会. 2010年11月26日 東京
- ② 坪井良治: 創傷治癒促進外用薬をいかに使い分けるか? 第12回 日本褥瘡学会学術集会, 2010年8月21日 千葉 (幕張)
- ③ 前田龍郎, 坪井良治: bFGF と pirfenidone のケロイド抑制効果の比較検討. 第1回皮膚創傷治癒研究会. 2009年11月27日 東京
- ④ 倉繁祐太, 織田裕子, 今村亨, 坪井良治: 創傷治癒過程における fibroblast growth factor (FGF)-7 ファミリー蛋白の局在. 第11回日本褥瘡学会学術集会. 2009年9月4日 大阪
- ⑤ 前田龍郎, 吉野育子, 山本俊幸, 今村亨, 坪井良治: プレオマイシン皮内注射による創傷治癒遅延モデルマウスの作製. 第341回日本皮膚科学会東北六県合同地方学術大会. 2008年2月2日 仙台

[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

坪井 良治 (TSUBOI RYOJI)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 70221421

(2) 研究分担者

齋藤 万寿吉 (SAITO MASUKICHI)  
東京医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 30366124

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: