

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17340

研究課題名（和文）転写因子SOX2による皮膚虚血再灌流障害（急性期褥瘡）における 制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the regulatory mechanism of cutaneous ischemia-reperfusion injury (acute bed sore) by the transcription factor SOX2

研究代表者

内山 明彦 (Akihiko, Uchiyama)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90760538

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では未だ有効な治療方法が確立されていない急性期褥瘡（皮膚虚血再灌流障害）における転写因子SOX2に着目した新たな治療の開発を目的とした。野生型マウスと皮膚表皮細胞特異的SOX2過剰発現マウスを用いた検討を行った。皮膚虚血再灌流障害の後にSOX2の発現が上昇すること、また皮膚表皮細胞にSOX2を高発現させることで皮膚虚血再灌流後に生じる潰瘍形成が有意に縮小することを発見した。その機序として酸化ストレスや血管傷害、炎症性サイトカイン、炎症細胞浸潤を抑制することを見出した。今後は本研究を発展させるため、SOX2のターゲットを見出して臨床応用の礎となる研究を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦では今後も高齢化が進み褥瘡の発症リスクは増加の一途を辿ると考えられる。本研究成果によって、これまで発症予防に確立した治療がなかった急性期褥瘡において潰瘍形成を防ぐ新たな治療を開発することが出来れば難治性の褥瘡を発症する患者数や医療費の減少が期待できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The objective was to evaluate the role of transcription factor SOX2 in cutaneous ischemia-reperfusion(I/R) injury and the possible protective effect of SOX2 induction in keratinocytes on pressure ulcer formation in cutaneous I/R injury. Cutaneous I/R injury experiment was performed using wild type mouse and epidermal-specific SOX2 overexpressing mouse. Immunostaining and qPCR analysis showed that SOX2 expression is transiently expressed in the epidermis after cutaneous I/R injury. The development of ulcer formation was significantly inhibited in epidermal specific SOX2-overexpressing mice. Immunostaining using skin tissue at I/R site revealed that the number of infiltrating inflammatory cells, apoptotic cells, vascular damage, hypoxic areas were significantly suppressed in SOX2-overexpressing mice. qPCR assay revealed mRNA levels of inflammatory cytokines expression tended to be reduced in SOX2-overexpressing mice.

研究分野：皮膚科

キーワード：転写因子 SOX2 皮膚虚血再灌流障害 急性期褥瘡 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

褥瘡は高齢化社会におけるリスクの高い疾患であり、急性期(紅斑・紫斑期)を経て慢性期(潰瘍形成期)に到る。これまでに皮膚科領域では褥瘡に対する治療として、既に発生してしまった創傷(潰瘍)に対する外用剤、被覆材の開発に重点が置かれていたが、難治や再発を繰り返す症例が多く、重篤な感染症により致命的な経過に至ることもあるため医療界ならびに社会的問題となっている。一方、潰瘍形成前の急性期褥瘡(紅斑・紫斑形成期)に対して、本邦および世界的な褥瘡治療ガイドラインでは除圧や注意深い経過観察の記載があるのみで、その後の潰瘍形成を防ぐ有効な治療は未だ確立されていない。そのため急性期褥瘡における病態解明および潰瘍形成を防ぐ治療などの開発が望まれている。

申請者はこれまでに皮膚虚血再灌流障害(急性期褥瘡)の病態において酸化ストレスや血管傷害が重要であり、それらを抑制することでその後の皮膚潰瘍形成を予防できることを見出した。また、申請者は皮膚表皮細胞に発現せず、口腔粘膜上皮に発現する転写因子 SOX2 が、皮膚の創傷と比較して口腔内の創傷を早期に治癒させる能力を有していることを明らかにした。さらに SOX2 を皮膚表皮細胞に発現させることで難治性皮膚潰瘍へ治療応用できる可能性についても明らかにした。しかし、転写因子 SOX2 における皮膚虚血再灌流障害(急性期褥瘡)および酸化ストレスの制御機構については未だ明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では皮膚虚血再灌流障害における転写因子 SOX2 の役割および皮膚表皮細胞に発現させた SOX2 が皮膚虚血再灌流障害における潰瘍形成、酸化ストレスや血管傷害、炎症性サイトカインや炎症細胞浸潤に与える影響およびその制御する機序を明らかにし、今後の臨床応用の基盤となる研究を行う

3. 研究の方法

マウスの背部の皮膚をつまみ上げ、2枚の円形の磁石を両方向から密着させる。その状態を12時間持続し虚血状態を形成する。その後磁石を外すことで血流を戻す(再灌流)することで皮膚虚血再灌流障害を生じさせるモデルマウスの実験系を用いた検討を行った。野生型マウスを用いて皮膚虚血再灌流後の皮膚組織における SOX2 の発現を経時的に免疫染色法と qPCR 法を用いて評価した。表皮細胞特異的に SOX2 の発現をタモキシフェン投与下で誘導できる K14CreERTM/LSLSOX2 (TG) マウスを用いて、コントロール群と SOX2 発現群で磁石を用いた皮膚虚血再灌流障害後に生じる潰瘍形成を比較した。虚血再灌流障害後の皮膚組織を採取して組織学的検討及び qPCR 法での mRNA レベルでの炎症性サイトカインの発現や酸化ストレスマーカーに関して検討を行った。酸化ストレスに関する評価のため酸化ストレス可視化マウス(OKD48-Luc)マウスと TG マウスを交配させ TG/OKD48-Luc マウスを作成し酸化ストレスに関する検討を行った。マウス表皮初代培養細胞の実験系を用いて SOX2 を発現させた際の酸化ストレスに対する酸化ストレス応答や炎症性サイトカインの産生について *in vitro* で検討を行った。

4. 研究成果

野生型マウスにおける検討の結果 mRNA レベルでの SOX2 の発現は虚血再灌流後4時間をピークに一時的に上昇し、その後72時間までに定常状態と同程度まで漸減した。免疫染色学的検討では定常状態では表皮細胞に SOX2 の発現はほとんど見られなかったが虚血再灌流後12時間の時点で SOX2 の発現が亢進した。

TG マウスを用いた検討の結果、SOX2 発現群において皮膚虚血再灌流後に生じる潰瘍形成が有意に抑制されることを見出した。さらに皮膚虚血再灌流後の潰瘍部を含む皮膚組織を用いて炎症細胞浸潤(免疫染色: MPO 陽性好中球数、CD68 陽性マクロファージ数) アポトーシス細胞数(TUNEL 染色)、血管傷害(CD31 染色)について検討を行ったところ、SOX2 発現群では炎症細胞浸潤や血管傷害、アポトーシス細胞が有意に抑制されることも明らかにした。TG/OKD48-Luc マウスを用いた検討では SOX2 発現群では Nrf2 シグナルが虚血再灌流後に有意に亢進していることを見出した。また、マウス初代表皮培養細胞を用いた検討では過酸化水素刺激により亢進する炎症性サイトカイン(iNOS, TNF-)や抗酸化ストレスマーカー(HO-1)の発現が SOX2 発現群で上昇する傾向が見られた。さらに TG/OKD48-Luc マウス由来初代表皮培養細胞を用いて酸化ストレス可視化の実験を行ったところ、皮膚組織を用いた検討と同様に過酸化水素刺激により亢進する Nrf2 シグナルが SOX2 を発現することによりさらに上昇することを見出した。さらにアポトーシス細胞についても TUNEL 染色を用いて検討を行ったところ *in vivo* での検討と同様に SOX2 発現表皮細胞では過酸化水素刺激により誘導させるアポトーシス細胞数がコントロール群と比較して有意に減少した。

これらの結果から表皮細胞に発現した SOX2 は虚血再灌流障害において抗酸化ストレス機能を

上昇させ、表皮や真皮内の組織障害を軽減している可能性が示唆された。今後は転写因子 SOX2 のターゲット遺伝子による皮膚虚血再灌流障害に対する治療応用を検討し、新たな治療薬の開発を目指した研究を継続する。

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