

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17363

研究課題名（和文）抗酸化酵素PRDX4遺伝子改変マウスモデルを用いた、創傷治癒改善メカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysis of wound healing improvement mechanism using antioxidant enzyme PRDX4 genetically modified mouse model

研究代表者

山口 礼門（YAMAGUCHI, Reimon）

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：50836533

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：酸化ストレスの過剰な蓄積は、高齢者の創傷治癒遅延の一因である。これまでに我々は抗酸化酵素PRDX4が持つ抗炎症作用および抗アポトーシス作用に着目し、メタボリックシンドロームを中心とした病態形成の一機序を解明してきた。今回我々は独自に作製したヒトPRDX4のトランスジェニックおよびノックアウトマウスを用い、PRDX4が特に酸化ストレス負荷の高い高齢マウスの創傷治癒遅延を改善することを示した。本酵素が高齢者の難治性皮膚潰瘍の治療に応用されることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、我が国は超高齢化社会を迎え、高齢者の褥瘡が急増している。加齢に伴い創傷治癒の遅延が起きることは古くから良く知られており、この原因には、老化に伴う皮膚線維芽細胞の機能低下が潜在する。また高齢者は糖尿病や動脈硬化などの基礎疾患を有することが多く、微小循環障害などにより創傷部に酸化ストレスが蓄積しやすいために、さらに組織修復が阻害されるものと推測される。本研究では、抗酸化酵素ペルオキシレドキシン4（PRDX4）が高齢マウスの創傷治癒遅延を劇的に改善することを示し、その一機序を解明した。本研究は高齢者の難治性皮膚潰瘍に対する新規治療法の開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Excessive accumulation of oxidative stress contributes to delayed wound healing in the elderly. We have so far focused on the anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of the antioxidant enzyme PRDX4, and have elucidated one of the mechanisms of the pathogenesis of metabolic syndrome. Here, using our original human PRDX4 transgenic and knockout mice, we demonstrated that PRDX4 ameliorated delayed wound healing, especially in aged mice with high oxidative stress. It is expected that this enzyme will be applied to the treatment of intractable skin ulcers in the elderly.

研究分野：創傷治癒

キーワード：Peroxioredoxin4 創傷治癒 酸化ストレス 線維芽細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ペルオキシレドキシシン(PROX)は生体内に広く発現する新規抗酸化酵素群であり、H₂O₂ を H₂O に還元することで過剰な酸化ストレスから生体を保護している。PROX1~6 の 6 種類が存在し、その内の PROX4 は唯一の分泌型として細胞内外に発現し、酸化ストレスによる組織障害を防いでいる。過剰な酸化ストレスによる組織障害は、糖尿病や動脈硬化などの生活習慣病や癌をはじめとする様々なヒト疾患の病因の根底にあると考えられている。我々はこれまでに独自に開発したヒト PROX4 (hPROX4) 遺伝子改変マウスを用いて、本酵素が生活習慣病(動脈硬化や糖尿病、非アルコール性脂肪肝炎など)の発症と進行を抑制し、また種々の癌細胞における増殖や遊走、アポトーシスに重要な役割を果たすことを明らかにしてきた(Zheng et al, Oxid Med Cell Longev 2020, (関連のある発表論文を参照), Guo et al, Antioxid Redox Signal 2019, Zhang et al, Int J Mol Sci 2018, Guo X et al, Antioxid Redox Signal 2012, Yamada et al, Pathol Int 2018)。創傷治癒に於いて、適度な酸化ストレスはケミカルメディエーターや感染防御因子として働くが、過度な酸化ストレスは修復細胞の機能を低下させ治癒を妨げる。特に加齢に伴う内因性 ROS の産生による酸化ストレスの劇的な増加は創傷治癒遅延の一因となる。PROX4 は皮膚にも豊富に存在することが知られており、抗酸化ネットワークの一翼を担っていると推測されている。PROX4 は創傷部で up-regulate されることが報告されており、本酵素の特に創傷治癒に対する重要な役割が示唆されてきたが、その作用と詳細なメカニズムは不明のままであった。

2. 研究の目的

皮膚はその臓器特性上、常に様々な刺激に曝されており、過酸化水素やフリーラジカル、有機ヒドロペルオキシドなどの活性酸素種(ROS)が蓄積しやすい。特に高齢者の皮膚は、糖尿病や高血圧などの基礎疾患による微小循環障害のため、内因性 ROS の産生により更なる酸化ストレスに暴露され得る。これは創傷治癒において、内因性幹細胞や各種成長因子を破壊し組織修復を妨げ、加齢に伴う創傷治癒遅延の要因の一つとなる。近年、世界的な高齢化により、褥瘡を始めとする高齢者の難治性皮膚潰瘍が問題となっている。これらは感染症などの重大な合併症や、患者の死亡リスクに繋がるため、疾患メカニズムの解明と有効な治療手段の開発が求められている。本研究では若年マウス(4週齢)、成熟マウス(12週齢)、高齢マウス(52週齢)の3世代の創傷治癒動物モデルを用いて、PROX4 が加齢による創傷治癒遅延を改善する分子メカニズムの解析を行い、PROX4 を含む抗酸化酵素の治療応用を模索する。

3. 研究の方法

まずは再現性のある創傷治癒モデルマウスの確立(1)が必要であった。次に組織学的評価(2)および蛋白解析(3)を行い、創傷治癒改善の分子機構を解明、そしてマウス皮膚由来の初代皮膚線維芽細胞を用いて酸化ストレスと細胞機能との関連を調査した(4)。

(1) 創傷治癒マウスモデルの作製

C57BL/6 背景の、オスの野生型(WT)および Tg、KO を用いた。加齢と酸化ストレスの関連を調べるため、全てのグループで若年マウス(4週齢)、成熟マウス(12週齢)、高齢マウス(52週齢)の3世代を用意した。背部皮膚に直径 6mm の全層性皮膚潰瘍を施し、創傷治癒過程を記録した。創傷作成後 7 日目に創傷皮膚を採取し、組織学的評価と蛋白解析に使用した。

(2) 組織学的評価

創傷皮膚を採取・ホルマリン固定後に、組織学的評価を行った。まず hPROX4 特異抗体を用いた免疫組織染色を行い、創傷部で PROX4 の発現を確認した。また酸化ストレスマーカー(8-OHdG など)を用いて、酸化ストレスの蓄積を評価した。その他、肉芽組織内の線維芽細胞や血管内皮細胞の密度などの、創傷治癒に関わる因子の発現を比較した。

(3) 蛋白解析

創傷皮膚から、蛋白および mRNA を抽出する。Western blot および real-time PCR により、PROX4 発現や細胞増殖・遊走マーカー、コラーゲン発現、アポトーシス関連蛋白など、創傷治癒に関連する蛋白の発現を比較した。現時点では創傷治癒に関連の深い Wnt や ERK signaling pathway の解析を想定した。

(4) 初代皮膚線維芽細胞を用いた in vitro の実験

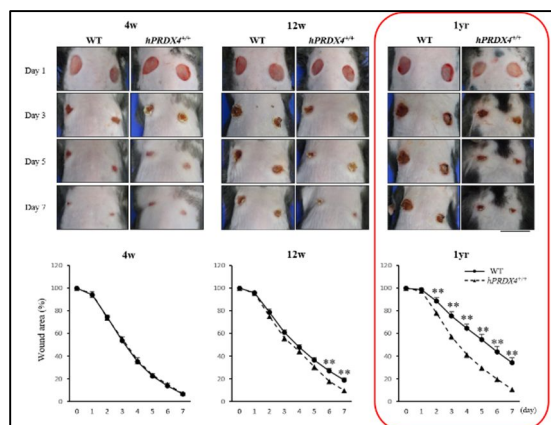
各群のマウス背部皮膚から初代皮膚線維芽細胞を培養し、殖能・遊走能や細胞老化、コラーゲ

ン発現など、線維芽細胞の機能を評価した。また過酸化水素による酸化ストレス条件下での、これらの線維芽細胞機能も評価した。また ELISA 法により、培養液中の増殖因子の評価も行った。

4. 研究成果

過去の報告では、PRDX4 の発現は創傷作成後 5~8 日目に up-regulate されることが分かっていたが (Kumin et al. J Cell Biol 2007) 創傷治癒に及ぼす詳細な影響は不明のままであった。そこで我々は、独自に開発した hPRDX4 遺伝子改変マウスを用いて、PRDX4 と創傷治癒との関連についての研究に着手した。以下にこれまでの研究成果 (Yamaguchi et al, J Invest Dermatol 2021 から抜粋) を示す。本研究では野生型 (WT) および hPRDX4 トランスジェニック (Tg) それぞれ若年 (4 週齢)、成熟 (12 週齢)、高齢 (1 年齢) の 3 世代の背部にトレパンによる 6mm の全層性皮膚潰瘍を作製し、7 日後にサクリフェイスし各種解析を行った。

PRDX4 は高齢マウスの創傷治癒遅延を改善する若年マウスでは群間に有意差は見られなかったが、成熟マウスでは Tg の創傷治癒が有意に促進した。更に驚くべきことに、高齢マウスでは Tg の創傷治癒が劇的に改善した (図 1)。対照的に hPRDX4 ノックアウトマウス (KO) では、創傷治癒が極端に遅延し、創傷治癒作成後数日以内に全個体の約 30%が死亡した。



PRDX4 は高齢マウスの過剰な酸化ストレスと炎症反応を抑制する WT は加齢に伴い肉芽組織内の酸化ストレス蓄積の増加が観察されたが、Tg では有意に抑制された (図 2)。また高齢 Tg は高齢 WT と比較して肉芽組織内の好酸球浸潤が有意に少なく、炎症性サイトカイン蛋白の発現が抑制されていた (図 3)。

図 2.

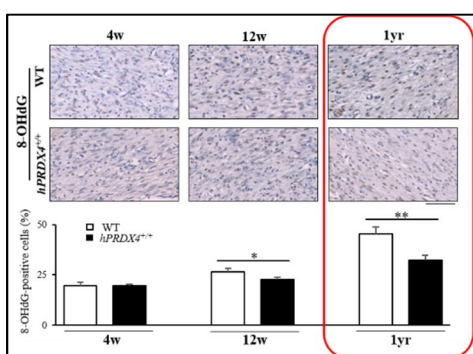
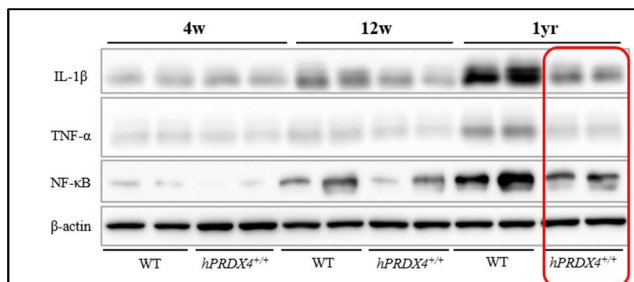


図 3.



PRDX4 は高齢マウスの肉芽組織形成を促進する WT は加齢に伴い創傷肉芽組織内の細胞密度が減少し浮腫性の不良肉芽の存在が目立ったが、Tg は高齢であっても細胞豊富な充実良好な肉芽組織が多く観察された (図 4, 5)。また高齢 Tg の肉芽組織内における、CyclinD1 および Vimentin の発現は高齢 WT よりも高く、高齢 Tg における肉芽組織形成の活性化が示唆された。(図 6)。さらに高齢 Tg では高齢 WT と比べ、全身性および肉芽組織における Fibroblast growth factor 2 (FGF2) と ERK signaling pathway に含まれる複数の因子の発現が増強することを明らかにしており (添付論文 Fig4 参照)、現在、更なる分子機構の解明に努めている。

図 4 .

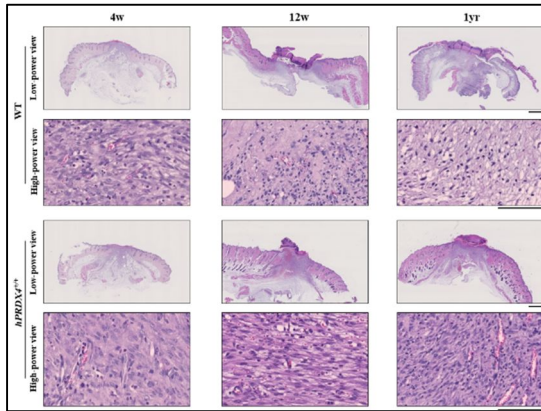


図 5 .

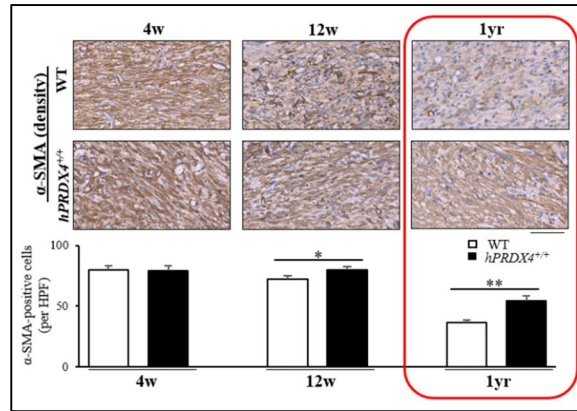
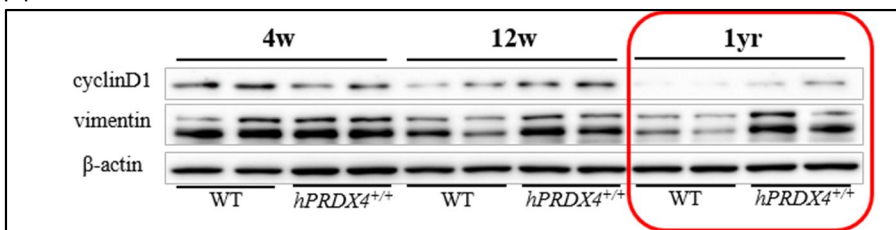


図 6 .



in vitro に於いても、PRDX4 は酸化ストレスを減弱し線維芽細胞の増殖と遊走を促進する WT および Tg、それぞれ若年(4 週齢)、成熟(12 週齢)、高齢(1 年齢)の背部皮膚由来の線維芽細胞 (FB) を用いて in vitro の実験を行った。FB の lysates に於ける酸化ストレスの蓄積は、特に高齢 Tg 由来のものに有意に抑制されていた。増殖能 (WST-8 assay) は高齢 Tg 由来の FB が高齢 WT 由来のものに比べて有意に高く、遊走能 (Transwell assay) は全年齢層に於いて Tg に有意に高かった (添付論文 Fig5 参照)。更に Tg 由来の FB は酸化ストレスによる濃度依存性の細胞障害に抵抗性を示した (図 7, 8)。

図 7 .

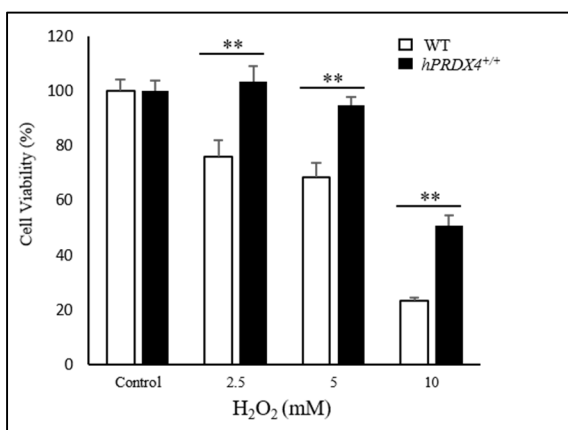
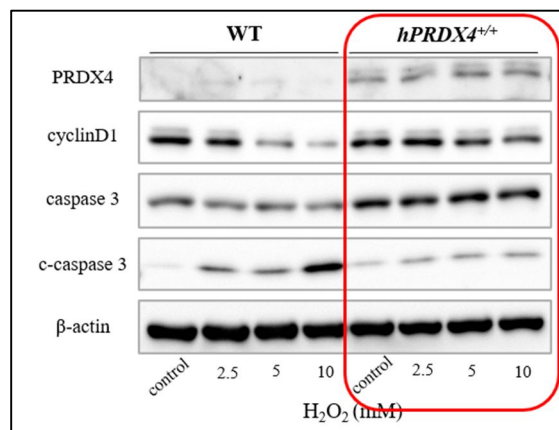
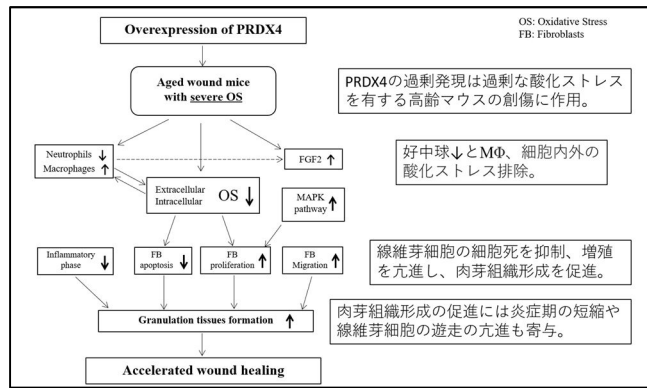


図 8 .



【研究結果のまとめ】



PRDX4 は酸化ストレス負荷の高い高齢マウスに主に作用する。好中球の減少や細胞内外の酸化ストレスを減弱させ、EGF2 の発現を促進する。引き続き、線維芽細胞の増殖を促進し、アポトーシスを抑制することで肉芽組織の形成を促進する。これには MAPK 経路の活性化が寄与しており、また線維芽細胞の遊走能の促進や創傷治癒過程における炎症期の短縮も関与していることが示唆された。

本研究より、PRDX4 は創傷治癒過程で必要不可欠な抗酸化酵素であり、過剰な酸化ストレスと炎症を減弱させ線維芽細胞を保護し、その機能（増殖能・遊走能）を促進することにより、酸化ストレス負荷の大きい特に高齢マウスの創傷治癒を改善することが示された。一方で酸化ストレス負荷の小さな若年マウスの創傷には影響を及ぼさなかったことから、PRDX4 は創傷治療薬として安全に使用できる可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 9件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ono Hiroto, Yamaguchi Reimon, Arai Minako, Togi Sumihito, Ura Hiroki, Niida Yo, Shimizu Akira	4. 巻 -
2. 論文標題 <scp>Schimmelpenning Feuerstein Mims</scp> syndrome induced by <i>HRAS</i><scp>Gly12Ser</scp> somatic mosaic mutation: Case report and literature review	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.16822	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Shimizu Akira, Yamaguchi Reimon, Kuriyama Yuko	4. 巻 50
2. 論文標題 Recent advances in cutaneous HPV infection	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 290 ~ 298
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.16697	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hirakawa Mutsuki, Ishikura Yuki, Futatsuya Taketoshi, Yamaguchi Reimon, Shimizu Akira	4. 巻 2022
2. 論文標題 Polypoid Basal Cell Carcinoma on the Nose Tip	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Case Reports in Dermatological Medicine	6. 最初と最後の頁 1 ~ 5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2022/4087202	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ono Hiroto, Yamaguchi Reimon, Shimizu Akira	4. 巻 35
2. 論文標題 Urticarial vasculitis after <scp>COVID</scp> 19 vaccination: A case report and literature review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dermatologic Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dth.15613	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Han Jia, Guo Xin, Koyama Tomoyuki, Kawai Daichi, Zhang Jing, Yamaguchi Reimon, Zhou Xiaolei, Motoo Yoshiharu, Satoh Takumi, Yamada Sohsuke	4. 巻 13
2. 論文標題 Zonarol Protected Liver from Methionine- and Choline-Deficient Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Mouse Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 3455 ~ 3455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu13103455	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamaguchi Reimon, Guo Xin, Zheng Jianbo, Zhang Jing, Han Jia, Shioya Akihiro, Uramoto Hidetaka, Mochizuki Takashi, Yamada Sohsuke	4. 巻 141
2. 論文標題 PRDX4 Improved Aging-Related Delayed Wound Healing in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 2720 ~ 2729
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2021.04.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi Reimon, Anzawa Kazushi, Taga Fumiaki, Ishikura Yuki, Yamada Sohsuke, Makino Satoshi, Mochizuki Takashi	4. 巻 48
2. 論文標題 Case of disseminated cryptococcosis with phlegmon like lesions on an upper limb of a renal transplant recipient	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 E488-E489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.16038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhao Shilei, Guo Xin, Mizutani Ken-ichi, Yamaguchi Reimon, Yamada Sohsuke, Gu Chundong, Uramoto Hidetaka	4. 巻 18
2. 論文標題 Overexpression of Teashirt Homolog 2 suppresses cell proliferation and predicts the favorable survival of Lung Adenocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 1980 ~ 1989
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/ijms.52109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Han Jia、Guo Xin、Meng Xiang-Jin、Zhang Jing、Yamaguchi Reimon、Motoo Yoshiharu、Yamada Sohsuke	4. 巻 26
2. 論文標題 Acupuncture improved lipid metabolism by regulating intestinal absorption in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 World Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 5118 ~ 5129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3748/wjg.v26.i34.5118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Zheng Jianbo、Guo Xin、Nakamura Yuka、Zhou Xiaolei、Yamaguchi Reimon、Zhang Jing、Ishigaki Yasuhito、Uramoto Hidetaka、Yamada Sohsuke	4. 巻 2020
2. 論文標題 Overexpression of PRDX4 Modulates Tumor Microenvironment and Promotes Urethane-Induced Lung Tumorigenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oxidative Medicine and Cellular Longevity	6. 最初と最後の頁 1 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/8262730	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Jianbo Zheng、Xin Guo、Akihiro Shioya、Takako Yoshioka、Kimikazu Matsumoto、Tsubasa Hiraki、Hironori Kusano、Takeru Oyama、Nozomu Kurose、Reimon Yamaguchi、Hidetaka Uramoto、Satoshi Ieiri、Hideaki Okajima、Miyuki Kohno、Sohsuke Yamada	4. 巻 12
2. 論文標題 Peroxioredoxin 4 promotes embryonal hepatoblastoma cell migration but induces fetal cell differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Translational Research	6. 最初と最後の頁 2726 ~ 2737
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Reimon Yamaguchi、Xin Guo、Jianbo Zheng、Jing Zhang、Jia Han、Akihiro Shioya、Hidetaka Uramoto、Akira Shimizu、Sohsuke Yamada
2. 発表標題 Peroxioredoxin 4 improved aging-related delayed wound healing in mice.
3. 学会等名 The 111th Annual Meeting of the Japanese Society of Pathology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Reimon Yamaguchi, Xin Guo, Jia Han, Jianbo Zheng, Akihiro Shioya, Jing Zhang, Hidetaka Uramoto, Takashi Mochizuki, Sohsuke Yamada
2. 発表標題 Overexpression of PRDX4 improved age-related delayed wound healing in mice.
3. 学会等名 The 110th Annual Meeting of the Japanese Society of Pathology,
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Reimon Yamaguchi, Xin Guo, Jianbo Zheng, Jing Zhang, Jia Han, Akihiro Shioya, Hidetaka Uramoto, Takashi Mochizuki, Akira Shimizu, Sohsuke Yamada
2. 発表標題 Peroxiredoxin 4 improved aging-related delayed wound healing in mice.
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research (selected for POSTER WALK) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Reimon Yamaguchi, Xin Guo, Jianbo Zheng, Jing Zhang, Jia Han, Akihiro Shioya, Hidetaka Uramoto, Takashi Mochizuki, Akira Shimizu, Sohsuke Yamada
2. 発表標題 Antioxidant protein Peroxiredoxin 4 uniquely improved aging-related delayed wound healing in mice.
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamaguchi Reimon, Guo Xin, Zheng Jianbo, Shioya Akihiro, Han Jia, Zhang Jing, Ono Hiroto, Uramoto Hidetaka, Mochizuki Takashi, Yamada Sohsuke
2. 発表標題 Peroxiredoxin 4 uniquely prevents age-related delayed wound healing in mice
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Reimon Yamaguchi, Xin Guo, Ken-ichi Mizutani, Motona Kumagai, Akihiro Shioya, Nozomu Kurose, Jianbo Zheng, Takashi Mochizuki, Sohsuke Yamada
2. 発表標題 Antioxidant protein Peroxiredoxin 4 uniquely prevents age-related delayed wound healing
3. 学会等名 109th Annual Meeting of the Japanese Society for Pathology
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Xin Guo, Shilei Zhao, Kenichi Mizutani, Jing Zhang, Reimon Yamaguchi, Chundong Gu, Hidetaka Uramoto, Sohsuke Yamada
2. 発表標題 Overexpression of Teashirt Homolog 2 Suppress Cell Proliferation in Lung adenocarcinoma
3. 学会等名 109th Annual Meeting of the Japanese Society for Pathology
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------