

機関番号：24701
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791775
 研究課題名（和文） TGF ベータ/Smad シグナルを標的とした皮膚の癒痕化の薬物治療法の開発
 研究課題名（英文） Development of treatment for skin wound which controlled TGF beta /Smad signal.
 研究代表者
 木田 真紀 (KIDA MAKI)
 和歌山県立医科大学 医学部・助教
 研究者番号：00326381

研究成果の概要（和文）：皮膚の創傷治癒過程において、オステオポンチンが欠如している状態では、肉芽形成、マクロファージの浸潤、細胞外マトリックスの発現が抑制されていた。また *in vitro* では、TGF ベータに起因するリン酸化 Smad2 の発現も同様に抑制されていた。オステオポンチンが欠如状態では、TGF ベータ/ Smad シグナルが抑制されており、その結果、細胞外マトリックスの発現が抑制されていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Lacking OPN suppressed granulation tissue formation, the expression of macrophage and extracellular matrix. Moreover, the expression of phosphor Smad2 was reduced *in vitro*. Loss of osteopontin(OPN), TGF beta / Smad signal was controlled during skin wound healing. As a result, it was suggested that the expression of extracellular matrix was controlled in a condition of lacking OPN.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：オステオポンチン, TGF β , 皮膚創傷治癒, 線維化

1. 研究開始当初の背景

救急集中治療領域において皮膚の損傷は防御機能の破綻し感染リスクが高くなるだけでなく、治癒後の癒痕化が問題となる。癒痕収縮により拘縮をきたせば、患者の ADL は低下する。皮膚の創傷治癒過程における各種サイトカイン等の各種メカニズムについてのいくつか報告はあるが、皮膚の癒痕化のメカ

ニズムの詳細は未だ完全に解明されていない。

2. 研究の目的

今回申請する研究では OPN ノックアウト (KO) マウスを用いたマウス胎児線維芽細胞 (MEF) の細胞培養実験にて細胞外マトリックス、サイトカインの発現の有無とシグナル

伝達レベルでの上皮 - 間葉系移行の機序解明について検討する。さらに KO マウスを用いた皮膚の全層欠損モデルを作成し、細胞培養モデルの結果をもとに皮膚の創傷治癒過程における上皮 - 間葉系移行制御因子を明らかにする。それらを利用してシグナル伝達のレベルでの上皮 - 間葉系移行の抑制による皮膚の癒痕収縮に対する治療方法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養実験

野生株 (C57BL/6) マウス (WT) と KO マウスの MEF を用い、TGF β 1 を添加した群と TGF β 1 無添加群を作成し、48 時間培養した後に mRNA を抽出した。細胞外マトリックス、各種サイトカインおよび Smad の発現を抽出した mRNA で Real-time RT-PCR、Western blot にて調べた。

(2) In vivo 実験

トレパンとはさみを使用し、OPN KO マウスと WT マウスの背中中の皮膚を径 5mm に全層切除し、皮膚全層欠損モデルを作成する。肉眼的、組織学、免疫組織化学的検討を行った。

また、創部を径 5mm に切除し、治癒部分の mRNA を抽出し、mRNA を抽出した。細胞培養実験と同様に Real-time RT-PCR および Western blot にて、mRNA の発現を検討した。

4. 研究成果

(1) 細胞培養実験

TGF β 1 添加後の MBF のリン酸化 Smad2、 α SMA、フィブロネクチンの発現は、WT で多かったが、KO MBF では TGF β 1 添加の有無に関係なく、ほとんど発現していなかった (図 1a、b、c)。

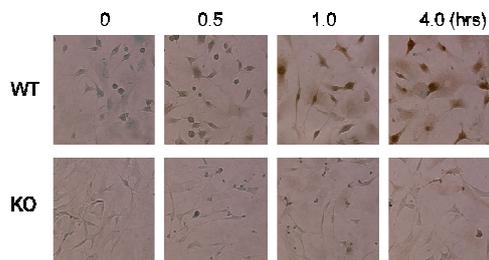


図 1a TGF β 1 添加後の MBF のリン酸化 Smad2 の発現

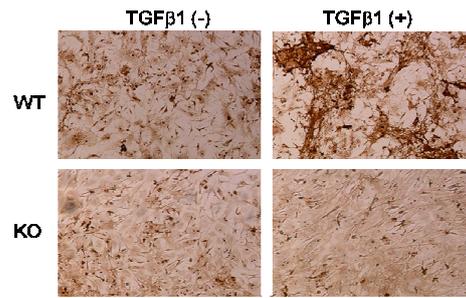


図 1b TGF β 1 添加後の MBF の α SMA の発現

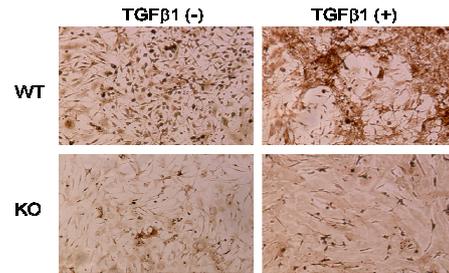


図 1c TGF β 1 添加後の MBF のフィブロネクチンの発現

(2) In vivo 実験

肉眼的観察では、WT に比べ、KO の創部閉鎖は遅延した (図 2a、b)。



図 2a 皮膚創部の閉鎖 (肉眼的変化)

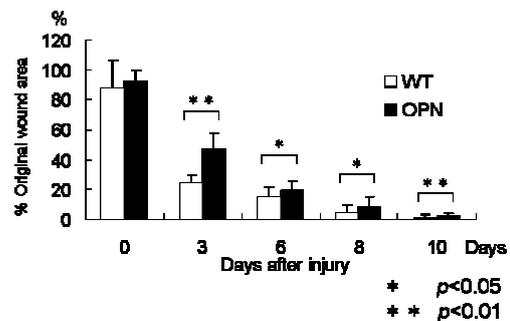


図 2b 皮膚創部面積の経時変化

組織学的変化では、肉芽の厚さはKOで薄く、肉芽が発達していなかった(図3a、b、c、d)。

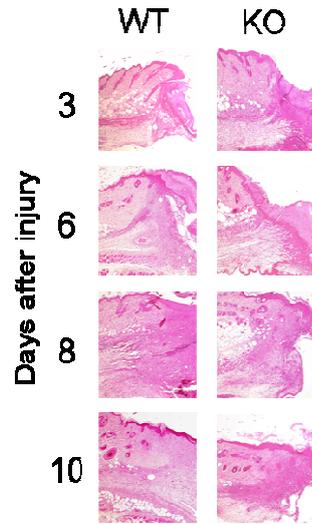


図3a 創部辺縁の組織学的変化

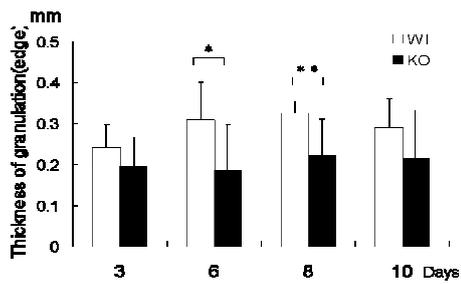


図3b 肉芽の厚さ(創部辺縁)

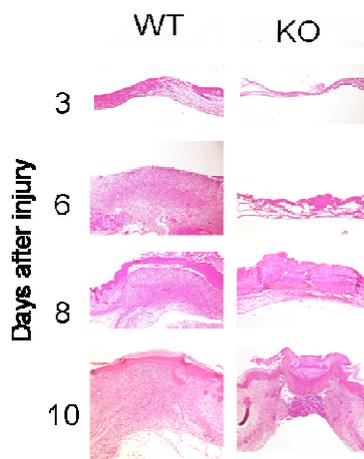


図3c 創部中心部の組織学的変化

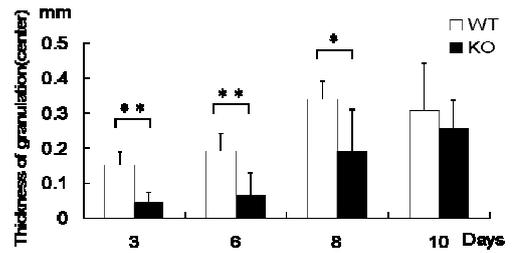


図3d 肉芽の厚さ(創部中心部)

免疫組織化学的变化では、KOの方がWTより α SMAの発現、マクロファージの浸潤は抑制されていた(図4a、b)。

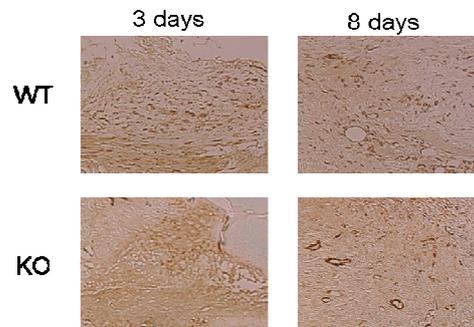


図4a 免疫組織化学的变化(α SMA)

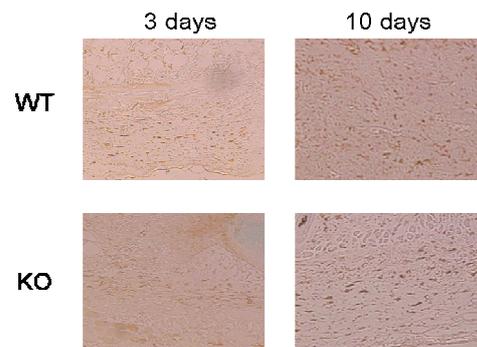


図4b 免疫組織化学的变化(マクロファージ)

TGF β 1、コラーゲンIa α のmRNAの発現はKOで抑制されていた(図5a、b)。

研究者番号：

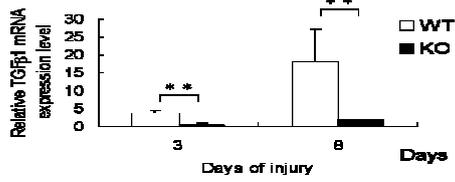


図 5a mRNA の発現 (TGF β 1)

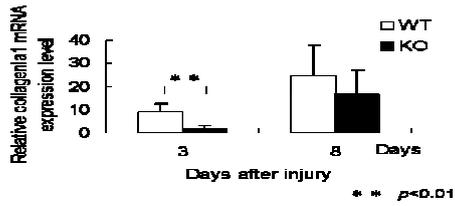


図 5b mRNA の発現 (コラーゲン Ia α)

以上より、皮膚の創傷治癒において、オステオポンチンが欠如している状態では、肉芽組織の形成と再上皮化が遅延しており、その原因として、TGF βに関連した線維化が抑制されていることが示唆された。

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)

[学会発表] (計 1 件)

1. 木田真紀, オステオポンチンの欠如は皮膚の創傷治癒を遅延する. 第 42 回日本結合組織学会学術大会, 第 57 回マトリックス研究会大会合同学術集会, 2010.8.19 秋田

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木田 真紀 (KIDA MAKI)
和歌山県立医科大学 医学部 助教
研究者番号：00326381

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()