

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791726

研究課題名（和文） klotho マウスを用いたヒト老化皮膚潰瘍モデルによる治癒遷延メカニズムの解明

研究課題名（英文） Study of the molecular mechanisms of delayed wound healing by using klotho mice, which have phenotypes similar to skin ulcer of aged humans.

研究代表者

山下 建 (YAMASHITA KEN)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：30312507

研究成果の概要（和文）：ヒト老化に類似した表現型を呈する α -klotho 欠損マウス（以下、klotho マウス）を用い、創傷治癒遷延の分子メカニズムについて研究を行った。klotho マウスの皮膚欠損モデルを用いて、創閉鎖期間、創部での組織像、mRNA 発現について検討した。野生型マウスと比較して、klotho マウスでは創傷治癒が遷延し、創部では肉芽組織の減少を認めた。RT-PCR を行ったところ、野生型マウスと比較し klotho マウスの創部では、mRNA 発現が IL-1 β 、IL-6、TNF- α で増強し、ラミニン 5 で減弱を示した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to analyze the molecular mechanisms of delayed wound healing with aging by using α -klotho-deficient (klotho) mice, which have phenotypes similar to those of aged humans. Wound healing time, histology and mRNA expression were investigated using a skin defect wound model of klotho mice. The klotho mice showed delayed wound healing and impaired granulation formation compared to those in wild-type (WT) mice. The reverse transcript polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis revealed enhancement of the mRNA expression of *interleukin (IL)-1 β* , *IL-6* and *tumor necrosis factor (TNF)- α* , and depression of laminin-5 in skin wound lesions of klotho mice compared to the levels in WT mice.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011 年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 2012 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,700,000 | 810,000 | 3,510,000 |

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：外科、老化、創傷治癒、皮膚潰瘍、klotho マウス

1. 研究開始当初の背景

皮膚は、全身の恒常性を維持する最大の臓器であり、老化による変化が現れやすい。萎縮、下垂、籐壁形成、毛根の減少などの老化現象のほかに、褥瘡・難治性潰瘍などの病的変化も起こる。臨床では特に外傷などを契

機に潰瘍化し、治癒まで長期を要することも少なくない。臨床においても治癒遷延のメカニズムを解明することは急務と考えられるが、いまだ十分な研究は進んでいない。

私は、ヒト老化の動物モデルとして α -klotho 欠損マウス（以下、klotho マウス）

に注目した。klotho マウスは、ヒトの老化症状に酷似した多彩な表現型を示すことが知られている。このマウスは5番染色体上の外来遺伝子の挿入変異により α -klotho 遺伝子の転写開始部を含む領域に欠失があり、 α -klotho 遺伝子の発現が著しく減少している機能欠損マウスである。常染色体劣性遺伝により、ホモ変異型では短命、皮膚の萎縮、肺気腫、動脈硬化、骨粗鬆症、不妊などのヒト老化の表現型に酷似した多彩な異常が認められる。平均寿命は野生型の1~2年に比し、60日ほどである。私はこのklothoマウスに着目し、老化皮膚潰瘍研究に有用であると考え、検討を試みた。

klotho マウスとC57BL/6野生型マウスを病理組織学的に比較検討したところ、野生型に比し毛根数の減少や、真皮層・脂肪層の薄様化、真皮コラーゲン量の減少などがみられ、ヒト老化皮膚に類似していた。そこで老化皮膚潰瘍モデルとしての有用性の検討のため、klotho マウスの背部皮膚を切除し、物理的に潰瘍を作成、治癒過程を観察する実験を行った。作成した老化皮膚潰瘍モデルでの創傷治癒過程を検討したところ、野生型が平均して創閉鎖まで19日を要したのに対し、klotho マウスでは平均35日にて創閉鎖を得た。病理組織学的検討においても、肉芽組織、炎症細胞数、コラーゲン量の減少を認め、老化皮膚潰瘍モデルとしてふさわしいものであった。

2. 研究の目的

加齢はそれだけで創傷治癒遅延の因子となるが、高齢者はそれ以外に基礎疾患を有していることが多く、局所的因子の改善や予防だけを行っても期待する効果が得られないことを経験する。そのため、一度、褥瘡などの皮膚潰瘍が発生すると治癒させるまで長期間かかってしまうことがある。

私は、ヒト老化の動物モデルとしてklothoマウスを用い、高齢者の創傷治癒遅延の原因究明を目的としている。klothoマウスは、皮膚の組織像がヒト老化変化に類似しているだけでなく、肺気腫、動脈硬化、骨粗鬆症、筋力低下などの高齢者の基礎疾患としてありうる合併症も有している。klotho マウス（もしくは α -klotho 遺伝子）と創傷治癒の関連性を究明することにより、このモデルを用いて解明した治癒遅延のメカニズムから、臨床へ直結した治療法を確立することが最終目標である。

klotho マウスの創傷治癒が遅延の原因としては、結合組織産生能の低下、免疫能の低下、炎症の遅延など、さまざまな要因が考えられる。それぞれについての検討が必要と考えているが、本調査においてはまず、遅延の大きな原因の一つと考えられる創収縮の減

退についての検討を行う。収縮には膠原線維、弾性線維、線維芽細胞など複数の要素が複合的に働いているため、各要素につき検討を行い、メカニズム解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 創閉鎖期間の再検討

klotho 欠損マウス、ヘテロマウス、野生型マウスの背部に、それぞれ直径6mmの皮膚欠損を作成し、創閉鎖期間、創部での組織像および α -klotho mRNA 発現を比較検討した。創閉鎖期間は、皮膚欠損作成時の面積を100%として、その後の創面積の収縮率を経時的に測定した。創部での組織像および α -klotho mRNA 発現は、klotho マウスおよび野生型マウスを用いて、正常皮膚、および、皮膚欠損作成後3、6、8、10、12日の創部を採取し検討した。

(2) klotho マウス皮膚自体の先天的および器質的異常の有無の検討

創傷治癒遅延の原因が皮膚自体の器質的問題でないことを確認するため、klotho マウスと野生型マウスの15mm角全層皮膚をそれぞれ交換して移植後、移植皮膚に皮膚欠損を作成し、血液などにより種々の因子が供給されることにより、創閉鎖期間に影響を受けるかどうかの検討を行った。皮膚移植を行った群は、klotho マウスの皮膚を野生型マウスに移植した群、野生型マウス同士で行った群の2種類で、皮膚移植2週間後に移植皮膚内に(1)と同様に直径6mmの皮膚欠損を作成し、創閉鎖期間を測定した。

(3) 分泌型 α -klotho 蛋白が及ぼす線維芽細胞の機能へ影響の解析

線維芽細胞の機能に分泌型 α -klotho蛋白やFGF23蛋白が与える影響について、klotho マウス、野生型マウスから採取・培養した線維芽細胞を用い、in vitroでの線維芽細胞の増殖能 (cell proliferation assay)、収縮力 (collagen gel contraction assay) を評価した。

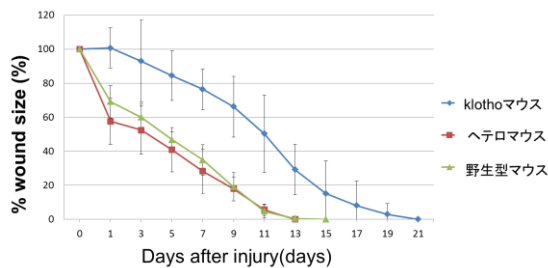
(4) 創部における細胞外基質、および、細胞成長各因子などの液性因子の網羅的解析

生後6週のklothoマウスおよび野生型マウスの創部における細胞外基質、および、細胞成長各因子などの液性因子の網羅的解析を行い、比較検討した。klothoマウスおよび野生型マウスを用いて、正常皮膚、および、皮膚欠損作成後3、6、8、10、12日の創部を採取後、mRNAを抽出し、創部における経時的mRNA発現RT-PCRにて網羅的解析を行った。検討したmRNA発現は、 α -klotho、FGF23、皮膚を構成する細胞外基質 (I、III、IV、VII型コラーゲン、ラミニン5)、創傷治癒に関

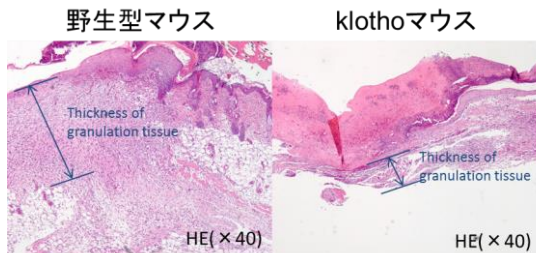
与する代表的なサイトカインおよび成長因子 (bFGF、TNF- α 、TGF- β 、IL-1 β 、IL-2、IL-6、EGF、VEGF、IGF-1、PDGF α 、adiponectin) である。

4. 研究成果

(1) 創閉鎖期間はヘテロマウスでは 13.0 \pm 0 日、野生型マウスでは 12.8 \pm 1.1 日であったが、klotho マウスでは 17.3 \pm 2.1 日を要し、明らかに創傷治癒が遅延していた (図 1)。病理組織学的検討においても、klotho マウスでは肉芽組織の減少を認めた (図 2)。次に、野生型マウスでは、皮膚欠損部において炎症反応の惹起などにより、 α -klotho の発現が誘導されていないか、RT-PCR にて mRNA レベルで確認をしたが、発現はしていなかった。

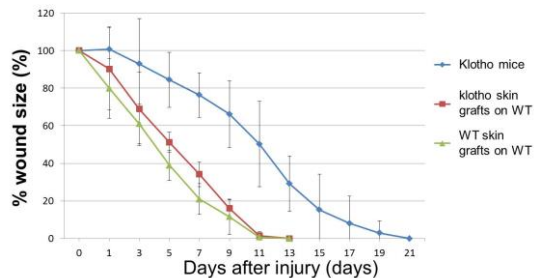


(図 1) 皮膚潰瘍の閉鎖期間



(図 2) 皮膚欠損部の病理像 (HE \times 40)

(2) klotho マウスの皮膚を野生型マウスに移植した群と野生型マウス同士で皮膚移植した群それぞれの平均創閉鎖期間は、10.6 \pm 1.0 日、11.3 \pm 0.5 日で、創閉鎖期間に有意差を認めず、皮膚移植をしていない klotho マウスに皮膚欠損を作成したものより、早期に治癒が得られた (図 3)。この結果より、klotho マウスの創傷治癒の原因は、皮膚自体の器質的問題ではなく、液性因子の関

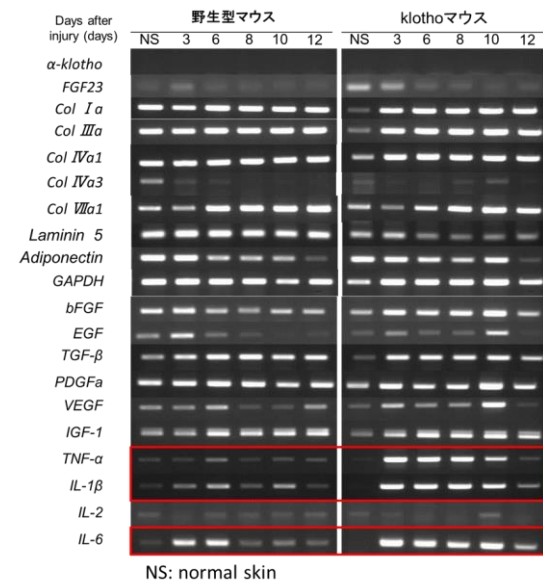


(図 3) 皮膚潰瘍の閉鎖期間

与が示唆された。

(3) 液性因子の中でも、klotho マウスで欠損している分泌型 α -klotho 蛋白を第一候補に考えた。真皮層の構成成分である線維芽細胞は、創傷治癒において最も重要な役割を果たす細胞の一つである。線維芽細胞の機能 (増殖能、収縮力) に分泌型 α -klotho 蛋白や FGF23 蛋白が与える影響について検討した。Cell proliferation assay と collagen gel contraction assay 共に分泌型 α -klotho 蛋白投与による差異を認めなかった。結果、分泌型 α -klotho 蛋白が直接線維芽細胞の機能に影響を与え、創傷治癒に関与していることは確認できなかった。

(4) 野生型マウスと比較し、klotho マウスでは IL-1 β 、IL-6、TNF- α の発現が増強し、ラミニン 5 の発現が低下していた (図 4)。発現が増強していた IL-1 β 、IL-6、TNF- α は炎症性サイトカインであり、難治性の慢性皮膚潰瘍ではこれらの炎症性サイトカインが高値を示すことが知られている。klotho マウスでは、創部での IL-1 β 、IL-6、TNF- α などの炎症性サイトカインが増強していることが創傷治癒を遅延している可能性がある。



(図 4) 創部における細胞外基質、および、細胞成長各因子などの液性因子の発現

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

山内誠、池田佳奈枝、山下建、四ッ柳高敏、

廣橋良彦、鳥越俊彦. α -klotho 欠損マウスの創傷治癒遷延に関する検討. 第 21 回日本形成外科学会基礎学術集会、2012 年 10 月 4・5 日、福島県.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 建 (YAMASHITA KEN)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：30312507

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：