

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461673

研究課題名(和文)細胞外マトリックスに着目した創傷治癒研究

研究課題名(英文)Wound healing in focusing extracellular matrices

研究代表者

宇谷 厚志 (UTANI, Atsushi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：10292707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では創傷部位で特にコンドロイチン硫酸鎖を有するバーシカンに焦点を当てた。その創傷治癒過程での空間的・時間的発現を免疫組織学的に解析したところ、その一過性(受傷後3-7日)の発現を見出した。さらにVer-Creマウスを作成しVer-Cre;ROSA26R マウスでトレース実験を行ったところ、バーシカン産生細胞は5日前後で最も多くなり、免疫染色の結果と一致を見せた。これらの事実から創傷治癒過程において一過性に出現するマトリックスは構成成分としての機能以外の役割を担っており、細胞遊走などの関連の存在を示唆していると考えた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on a versican (VCAN), a proteoglycan that has chondroitin sulfates chains as glycosaminoglycans. We immunohistochemically found its transient expression in the wound during 3-7 days after wounding on the mouse skin. Furthermore, we made VCAN-promoter-Cre transgenic mouse and obtained VCAN-Cre;ROSA26R mice. Trace experiments with this mouse revealed X-gal staining-positive cells were appeared in the wound during 3 to 5 days after wounding. Based on these findings, transient presence of VCAN and its producing cells in the wound may have an essential role for cell migration other than a role as structural components.

研究分野：皮膚科学

キーワード：細胞外マトリックス 創傷治癒 バーシカン トレース トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

申請者は、ECM (extracellular matrix) の1つであるラミニンの合成ペプチドがGAGを有するシンデカン受容体を介して角化細胞の遊走を引きおこし、そのシグナルがインテグリン凝集を介した機構であることを示した。すなわちECMにより角化細胞の遊走が刺激され創傷治癒が促進される分子メカニズムを明らかにした (Arakiら, Mol Biol Cell, 2009)。

さらに正常創傷治癒からの逸脱とされるケロイドにおけるECMを解析し、I型コラーゲン沈着にはmiR196が関与すること (Kashiyamaら, JID, 2012)、またバーシカン過剰沈着 (Ikedaら, BBRC, 2009) を明らかにした。引き続き独自に作成したモデルマウスを用い、バーシカン沈着抑制によるケロイド治療の可能性を示した (Yagi ら, JID, 2012 in press)。

これらの研究の過程で、創傷治癒においてバーシカン発現を免疫染色にて検索したところ、マウス背部創傷でバーシカンが著しく発現が強まっていた。またその発現の時間的経過をみると一過性に5~7日後 (d5-d7) の創傷に強発現し創閉鎖と共に速やかに消失することを見出した。10日後ではこの部位のバーシカンはほぼ完全に消失し、毛包周辺と毛乳頭のみに限局していた。このように創傷に一致し、かつ一過性に発現する分子には、創傷治癒に重要な役割を担っている可能性があるかと想定した。

バーシカンの細胞遊走活性は、ほとんど解析されていなかった。しかし、コンドロイチン硫酸鎖を有する分子の過剰発現は脊髄損傷後の神経細胞遊走を抑制している事が報告されている (Bradbury ら, Nature 2002)。このため、バーシカンは従来考えられてきたような創傷を「充填する」ECM としての機能のみならず、「細胞遊走」にも関与している可能性もあると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、創傷時のバーシカンの発現様式とその機能の解析を行う。それと同時に、バーシカンの発現を詳細に検討するため、トランスジェニックマウスを用いて産生細胞をトレースし、その「出現から、消退」までを検討する。

本研究はECMの側から創傷治癒過程の分子メカニズムを明らかにするものであり、新たな視点からの創傷治癒促進薬開発へ繋がると思われる。

(1) マウス背部に創傷を作成し、バーシカン沈着を経時的に免疫染色で解析する。また、mRNA も経時的に回収し、マイクロアレイにてサイトカインも含めた網羅的な検討を行う。

(2) サイトカインのバーシカン発現への影響を培養細胞で検討する。

(3) バーシカン機能、とくに細胞遊走活性を、強制発現、siRNA を利用して検討する。

(4) バーシカン promoter にて、Cre を発現するトランスジェニックマウスと ROSA26R マウスと掛け合わせ、それを用いてバーシカン産生真皮間葉系細胞のトレースを行う。現段階では1系統ではあるが、バーシカンを発現した真皮間葉系細胞を同定することに成功している。

3. 研究の方法

(1) 創傷組織の経時的バーシカンの発現・沈着

創傷作成後経時的にサンプルを回収する。mRNA も回収し、ECM, サイトカインなどをマイクロアレイにより発現増強分子のスクリーニングを行う。

(2) バーシカンの細胞遊走への機能

バーシカンを強制発現、または siRNA にてノックダウンさせた細胞を用いて行う。

(3) サイトカインのバーシカン産生制御
マイクロアレイにより創傷に関連する

サイトカインのバーシカン発現への効果を解析。

(4) 創傷時出現するバーシカン産生間葉系細胞のトレース実験

Ver-Cre;ROSA26R マウス皮膚に創傷を作成し X-gal 染色にて解析する。

本研究課題は研究代表者（宇谷）に加え、鉦塚助教が研究分担者として研究を行うほか、2人の大学院生と技官3名の研究協力者で行った。

平成 25 年度

(1) マウス背部創傷実験

1日単位の間隔にてサンプル採取をおこない、バーシカンの免疫組織染色、mRNAの定量を RT-PCR にて行う。抗マウスバーシカン抗体は、その染色条件をすでに決定済みである。

(2) 細胞遊走測定

siRNA は、Stealth (Invitrogen) を用いて細胞遊走の測定を行った。

(3) 線維芽細胞自体の遊走

スクラッチアッセイとトランスウエルアッセイを用いて検討した。下層にバーシカン発現抑制もしくは増強細胞を培養する。上層に、炎症細胞、血管内皮細胞を加え、バーシカンの有無による遊走刺激活性を検定した。

平成 26, 27 年度

25年度で判明した事実の再現性の確認と共に以下を行った。

(1) バーシカン産生間葉系細胞のトレース実験

Ver-Cre マウスと *ROSA26R* マウスとを交配させ、*Ver-Cre;ROSA26R* マウス皮膚に創傷を作成する。経時的にサンプルを回収し、X-gal 染色にて、バーシカン産生細胞の増減、分布様式、残存比率などを解析した。また陽性細胞に対して免疫組織化学染色を行い、血管内皮、リンパ球、筋線維芽細胞との比較を行った。

4. 研究成果

(1) マウス背部創傷実験：1日単位の間隔にてサンプル採取をおこない、バーシカンの免疫組織染色、mRNAの定量を RT-PCR にて行った。バーシカンは一過性に5日をピークに出現することが判明した。

(2) 細胞遊走測定

siRNA は、Stealth (Invitrogen) をもちい正常線維芽細胞においてバーシカンの発現抑制をウエスタンブロットにて確認できた。本実験系をもちいて遊走能を測定する予定である。

(3) バーシカン産生間葉系細胞のトレース実験 *Ver-Cre* マウスと *ROSA26R* マウスとを交配させ、*Ver-Cre;ROSA26R* マウス皮膚に創傷を作成した。創傷作成後、経時的にサンプルを回収し、X-gal 染色にて、バーシカン産生細胞の増減、分布様式、残存比率などを解析した。また陽性細胞に対して免疫組織化学染色を行い、血管内皮 (CD31 染色)、筋線維芽細胞 (αSMA 染色) との比較をしたところ、これらの細胞とは一致しなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 30 件)

1. Ashida M, Koike Y, Kuwatsuka S, Ichinose K, Migita K, Sano S, Utani A: Psoriasis-like lesions in a patient with familial Mediterranean fever. *J Dermatol* (査読有) 43: 314-317, 2016.
10.1111/1346-8138.13068
2. Honda M., Tomimura S., de Vega S., Utani A.: Multiple dermatofibromas in a patient with Down syndrome. *J Dermatol* (査読有) 43: 346-348, 2016.
10.1111/1346-8138.13189
3. Hattori Y, Ikeuchi T, Kuroda Y, Matsugi K, Minami S, Higuchi T, Zaima M, Ishitoya S, Yamauchi C, Onishi H, Kawamura J, Kitoh K, Oshiro O, Yamamoto Y, Utani A, Hattori N: Postoperative gluteal skin damage associated with latent development of gluteal muscle damage. *J Dermatol* (査読有) 43: 547-552, 2016.
10.1111/1346-8138.13181
4. Murayama N, Koike Y, Ikehara S, Okubo Y,

- Tomimura S, Utani A: Is bevacizumab a culprit of intractable skin ulcers? *J Dermatol* (査読有) Epub ahead of print, 2016. 10.1111/1346-8138.13325
5. Mizokami F, Takahashi Y, Nemoto T, Nagai Y, Tanaka M, Utani A, Furuta K, Isogai Z: Wound fixation for pressure ulcers: a new therapeutic concept based on the physical properties of wounds. *J Tissue Viability* (査読有) 24: 35-40, 2015. 10.1016/j.jtv.2015.01.002
 6. Kuwatsuka S, Kuwatsuka Y, Tomimura S, Utani A: Proposal of the new name "eruptive papular collageno-elastopathy" to unify the two indistinguishable entities, eruptive collagenoma and papular elastorrhesis. *J Dermatol* (査読有) 42: 440-441, 2015. 10.1111/1346-8138.12807
 7. Okada K, Endo Y, Miyachi Y, Koike Y, Kuwatsuka Y, Utani A: Glycosaminoglycan and versican deposits in taxane-induced sclerosis. *Br J Dermatol*(査読有) 173: 1054-1058, 2015. 10.1111/bjd.13899
 8. Sato Y, Hara T, Okubo Y, Utani A: Axillary syringomas misdiagnosed as pseudo-xanthoma elasticum for years. *J Dermatol* (査読有) 42: 933-934, 2015. 10.1111/1346-8138.12984
 9. Asai M, Sago T, Utani A: Parry-Romberg syndrome associated with contralateral cerebral atrophy. *Eur J Dermatol*(査読有) 25: 624-625, 2015. 10.1684/ejd.2015.2651
 10. 宇谷厚志: 【最近のトピックス 2015 Clinical Dermatology 2015】最近話題の皮膚疾患 皮膚粗鬆症. *臨床皮膚科*(査読無) 69: 21-25, 2015.
 11. 佐藤之恵, 宇谷厚志: 【包括的な観点からみた高齢者の褥瘡・皮膚潰瘍】加齢による皮膚・皮下組織の変化 結合組織を中心に. *WOC Nursing* (査読無) 3: 7-12, 2015.
 12. Nakase I, Osaki K, Tanaka G, Utani A, Futaki S: Molecular interplays involved in the cellular uptake of octaarginine on cell surfaces and the importance of syndecan-4 cytoplasmic V domain for the activation of protein kinase Calpha. *Biochem Biophys Res Commun*(査読有) 446: 857-862, 2014. 10.1016/j.bbrc.2014.03.018
 13. Mine Y, Iwanaga A, Ikehara S, Koike Y, Takamura N, Utani A: Pseudo-xanthoma elasticum-like skin lesions with congenital erythropoietic porphyria. *Eur J Dermatol* (査読有) 24: 401-402, 2014. 10.1684/ejd.2014.2335
 14. Mizokami F, Furuta K, Matsumoto H, Utani A, Isogai Z: Sacral pressure ulcer successfully treated with traction, resulting in a reduction of wound deformity. *Int Wound J*(査読有) 11: 106-107, 2014. 10.1111/j.1742-481X.2012.01028.x
 15. Tanioka M, Utani A, Tamura H, Yoshimura N, Kashiwagi N, Kondo E, Konishi I, Miyachi Y: Calcification of the placenta in a woman with pseudo-xanthoma elasticum with a mutation of the ABCC6 gene. *J Dermatol* (査読有) 41: 189-191, 2014. 10.1111/1346-8138.12360
 16. 三長孝輔, 山下幸孝, 宇谷厚志, 谷口洋平, 幡丸景一, 中谷泰樹, 赤松拓司, 瀬田剛史, 浦井俊二, 上野山義人: 胃粘膜生検後に出血性ショックを来した弾性線維性仮性黄色腫の1例. *Gastroenterological Endoscopy 日本消化器内視鏡学会雑誌* (査読有) 56: 1756-1762, 2014. 10.11280/gee.56.1756
 17. 宇谷厚志: 新・皮膚科セミナーウム 皮膚から診断する全身疾患 真皮細胞外マトリックス病変から全身疾患を診断. *日本皮膚科学会雑誌*(査読無) 124: 909-915, 2014. 10.14924/dermatol.124.909
 18. 宇谷厚志: 弾性線維性仮性黄色腫の現況と展望. *日本臨牀* (査読無) 72: 2073-2077, 2014.
 19. 遠藤雄一郎, 白瀬智之, 戸田憲一, 宇谷厚志, 吉川義顕: 【小児の皮膚病・腫瘍・母斑】臨床例 頭部に生じた孤立性コラゲノーマ. *皮膚病診療* (査読無) 36: 1053-1056, 2014.
 20. Mizokami F, Furuta K, Utani A, Isogai Z: Definitions of the physical properties of pressure ulcers and characterisation of their regional variance. *Int Wound J*(査読有) 10: 606-611, 2013. 10.1111/j.1742-481X.2012.01030.x
 21. Hayashi S, Utani A, Iwanaga A, Yagi Y, Morisaki H, Morisaki T, Hamasaki Y, Hatamochi A: Co-existence of mutations in the FBN1 gene and the ABCC6 gene in a patient with Marfan syndrome associated with pseudo-xanthoma elasticum. *J Dermatol Sci*(査読有) 72: 325-327, 2013. 10.1016/j.jdermsci.2013.07.007
 22. Yagi Y, Muroga E, Naitoh M, Isogai Z, Matsui S, Ikehara S, Suzuki S, Miyachi Y, Utani A: An ex vivo model employing keloid-derived cell-seeded collagen sponges for therapy development. *J Invest Dermatol*(査読有) 133: 386-393, 2013. 10.1038/jid.2012.314

1. Kiyohara T, Okubo Y, Yamaguchi M, Yozaki M, Usui A, Muto M, Fujiwara S, Utani A: COL5A1 gene mutation in three cases of classic type Ehlers-Danlos syndrome. The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (2015/12/11~12/13, 岡山市・岡山コンベンションセンター)
2. Asai M, Kashiyama K, Kuwatsuka Y, Kiyohara T, Okubo Y, Utani A: Profile of upregulated molecules in keloids. The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (2015/12/11~12/13, 岡山市・岡山コンベンションセンター)
3. 宇谷厚志: ランチョンセミナー 創傷治癒と細胞外マトリックス. 第 45 回日本創傷治癒学会 (2015/11/30~12/1, 千代田区・JP タワーホール&カンファレンス)
4. 宇谷厚志: エーラス・ダンロス症候群と弾性線維性仮性黄色腫のみかた. 平成 27 年度日本皮膚科学会中部支部企画研修講習会 (2015/10/30, 神戸市・神戸国際会議場)
5. 宇谷厚志, 大久保佑美, 北岡隆, 前村浩二, 田村寛, 山本洋介: 弾性線維性仮性黄色腫診療ガイドラインの策定に向けて、第 II 報. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等政策研究事業(難治性疾患政策研究事業)稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究班 平成 27 年度第 2 回総会 (2015/10/28, 新宿区・慶応義塾大学病院)
6. 宇谷厚志: 新たに難病指定を受けた真皮細胞外マトリックスの疾患. Hot Topics in Dermatology (2015/10/23, 大阪市・ANA クラウンプラザホテル大阪)
7. 宇谷厚志, 浅井幸, 櫻山和也: シンポジウム【感覚器疾患の分子形態学的解析】ケロイド細胞とは何? 第 47 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会 (2015/9/18~9/19, 長崎大学医学部良順会館、ポンペ会館)
8. Okubo Y, Iwanaga A, Ikehara S, Masuyama R, Utani A: Accelerated calcification in fibroblasts derived from Pseudoxanthoma elasticum-like disorder, GGCX syndrome. 45th Annual ESDR Meeting (2015/9/9~9/12, Rotterdam, the Netherlands)
9. Utani A, O Sato Y, Koike Y: Elevation of Serum KL-6 level in psoriasis patients with biologics treatment. 23rd World Congress of Dermatology (2015/6/8 ~ 6/13, Vancouver, Canada)
10. 佐藤之恵, 齋塚大, 原肇秀, 宇谷厚志: 弾性線維性仮性黄色腫との鑑別を要した腋窩の丘疹の 2 例. 第 114 回日本皮膚科学会総会 (2015/5/29~5/31, 横浜市・パシフィコ横浜)
11. 宇谷厚志: 真皮マトリックスの遺伝性疾患. 第 265 回日本皮膚科学会岡山地方会 青山裕美教授就任記念 (2015/5/16, 岡山市・岡山コンベンションセンター)
12. 大久保佑美, 臼井文, 與崎マリ子, 吉見公佑, 小池雄太, 齋塚大, 宇谷厚志: 弾性線維性仮性黄色腫様症状を呈した GGCX 症候群. 第 47 回日本結合組織学会学術大会 (2015/5/15~5/16, 港区・コクヨホール)
13. 岩永聡, 與崎マリ子, 大久保佑美, 小池雄太, 齋塚大, 山本洋介, 荻朋男, 宇谷厚志: 弾性線維性仮性黄色腫患者における ABCC6 遺伝子変異の同定. 第 47 回日本結合組織学会学術大会 (2015/5/15~5/16, 港区・コクヨホール)
14. 齋塚大, 與崎マリ子, 齋塚さやか, 大久保佑美, 臼井文, 小池雄太, 宇谷厚志: トリコスタンチン A と Creb-binding protein がケロイド細胞に及ぼす遺伝子発現の検討. 第 47 回日本結合組織学会学術大会 (2015/5/15~5/16, 港区・コクヨホール)
15. Yoshimi K, Okubo Y, Ikehara S, Koike Y, Kuwatsuka Y, Utani A: A homozygous single T deletion found in the GGCX gene with PXE-like phenotypes. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (2014/12/12~12/14, 吹田市・ホテル阪急エキスポパーク)
16. 宇谷厚志: 弾性線維性仮性黄色腫重症度判定基準作成 2014. 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等克服研究事業)稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究班 平成 26 年度第 2 回総会 (2014/10/17, 新宿区・慶応義塾大学病院)
17. Koike Y, Yagi Y, Yozaki M, Okubo Y, Yoshimi K, Kuwatsuka Y, Utani A: Epithelial mesenchymal transition acceleration of keratinocytes at leading edge during wound healing process supplied with basic fibroblast growth factor. 44th Annual ESDR Meeting (2014/9/10~9/13, Copenhagen, Denmark)
18. 齋塚大, 吉見公佑, 宇谷厚志: ヒスタンジアセチラーゼ阻害剤がケロイド細胞に及ぼす遺伝子発現の検討. 第 46 回日本結合組織学会学術大会 第 61 回マトリックス研究会大会 合同学術集会 (2014/6/5~6/7, 名古屋市・ウインクあいち)
19. 小池雄太, 与崎マリ子, 吉見公佑, 宇谷厚志: 創傷治癒過程における、bFGF を用いた表皮ケラチノサイトの EMT 誘導. 第 46

回日本結合組織学会学術大会 第 61 回
マトリックス研究会大会 合同学術集会
(2014/6/5～6/7, 名古屋市・ウインクあい
ち)

20. 岡田佳与、遠藤雄一郎、藤澤章弘、谷岡未樹、椛島健治、宮地良樹、宇谷厚志: ドセタキセルによる皮膚硬化の病態: 真皮コラーゲンとヒアルロン酸の検討. 第 113 回日本皮膚科学会総会 (2014/5/30～6/1, 京都市・国立京都国際会館)
21. 八木洋輔、池原進、檜山和也、宇谷厚志: 辺縁正常皮膚をコントロールとしたケロイド病変特徴的な遺伝子発現の検討. 第 45 回日本結合組織学会学術大会・第 60 回マトリックス研究会大会 合同学術大会 (2013/6/28～6/29, 和歌山市・和歌山県立医科大学講堂、生涯教育・地域医療支援センター)

[図書] (計 7 件)

1. 宇谷厚志: 南山堂、南山堂医学大辞典 第 20 版, 2015, pp.1572-1573
2. 宇谷厚志: 日本皮膚科学会, 平成 27 年度日本皮膚科学会研修講習会テキスト - 中部支部企画研修講習会 (選択コース) -, 2015, pp.1-8.
3. 宇谷厚志: メディカルレビュー社, 苦手な外来皮膚疾患 100 の解決法. 2014, pp.132-133.
4. 宇谷厚志, 谷岡未樹, 荻朋男, 山本洋介, 田村寛, 佐々木隆子: 久留米大学皮膚科, 皮膚の遺伝関連性希少難治性疾患群の網羅的研究 平成 24 年度～25 年度 総合研究報告書. 2014, pp.118-124.
5. 宇谷厚志, 谷岡未樹, 荻朋男, 山本洋介, 田村寛, 佐々木隆子: 久留米大学皮膚科, 皮膚の遺伝関連性希少難治性疾患群の網羅的研究 平成 25 年度 総括研究報告書. 2014, pp.72-79

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇谷 厚志 (UTANI, Atsushi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・
教授

研究者番号: 10292707

(2) 研究分担者

鍛塚 大 (KUWATSUKA, Yutaka)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・
助教

研究者番号: 90437864