

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860952

研究課題名(和文)細胞外マトリックス分子バーシカンと細胞遊走

研究課題名(英文)A role of extracellular matrix protein versican in cell migration

研究代表者

富田 元(TOMITA, Hajime)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：30457535

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)：皮膚創傷治癒過程の増殖期は、真皮間葉系細胞、血管内皮細胞が細胞外マトリックスとともに肉芽組織を形成する。プロテオグリカンであるバーシカンに焦点をあて、その生理的意義を解析した。

マウスの創傷皮膚におけるバーシカンは創傷後4～5日目で発現増加し、速やかに定常状態になることを見出した。バーシカンsiRNAを用いてノックダウンすると、SrpX2、Ccl6、Smoc2が著明に発現誘導されることをマイクロアレイにより見出した。これらは、細胞遊走、創傷治癒での機能を示唆されている分子である。本バーシカンはこれらの分子発現の抑制を介して、創傷における細胞遊走を調整していると考えた。

研究成果の概要(英文)：In wound healing, extracellular matrices support cell adhesion, cell proliferation, and differentiation in granulation tissue. We focused on a role of versican, a hyaluronan-binding, chondroitin sulfate proteoglycan.

The levels of versican mRNA were examined by RT-PCR during a process of wound healing in cutaneous wound in the mouse back skin. On the days 4 and 5, versican expression significantly increased relative to those of the days 1 and 3. Subsequently, mRNA level of versican rapidly decreased on the days 6 and 7. Versican seems to be tightly regulated in the wound healing process. siRNA of versican was transfected to mouse embryonic fibroblasts (MEF) lead to upregulation of Sushi repeat-containing protein, X-linked 2 (SrpX2), Ccl6, and Smoc2. These factors have been reported to involve in the inflammatory cell migration as well as angiogenesis. These observations suggest that versican possibly regulates the wound healing through SrpX2, Ccl6 and Smoc2.

研究分野：皮膚科学

キーワード：細胞外マトリックス 細胞遊走 創傷治癒

### 1. 研究開始当初の背景

難治性皮膚潰瘍は近年その患者数を増やしつつある。創傷治癒過程は、血液凝固期、炎症期、増殖期、再構築期とつづく。この増殖期において主役となるのは真皮間葉系細胞、血管内皮細胞である。創傷後に皮膚が元通りに再生するには、その欠損部分を充填する細胞外マトリックスは必須で、正常過程では増殖期に盛んに細胞外マトリックスを産生し、肉芽を形成する。

真皮細胞外マトリックスにはコラーゲン、弾性線維といった線維成分の他に基質と呼ばれるグリコサミノグリカン (GAG) が存在する。しかし GAG の役割に関しては、いまだ十分に解明されているとは言えない。そこで創傷治癒における GAG を持つプロテオグリカンであるバーシカンに着目し、研究を行うこととした。

### 2. 研究の目的

皮膚の GAG のなかでも創傷部位に一過性に強く発現し集積するバーシカンの役割を詳細に研究することは、創傷治癒の分子機構の解明につながると考える。本研究は増殖期の欠損・機能不全ともいえる難治性皮膚潰瘍の治療法開発に繋がると考える。具体的には、免疫組織化学法、SiRNA によるノックダウン、マイクロアレイなどを用いた解析を介して、バーシカンの存在により影響を受ける分子を同定することで、バーシカンの機能を解明することを目指す。

### 3. 研究の方法

(1) マウス創傷皮膚のバーシカン発現

(2) siRNA 導入によるバーシカンノックダウン

(3) マイクロアレイによる発現変化分子群の同定

(4) RT-PCR による Srp2、Cc16、Smoc2 の発現変化の検証

### 4. 研究成果

(1) マウス創傷皮膚のバーシカン発現

受傷後 1~3 日目ではバーシカン発現はないが、4~5 日目で発現増強した。その後 6~7 日目で発現は急速に消滅した。創傷治癒の過程でバーシカンが一過性に発現することが示された。

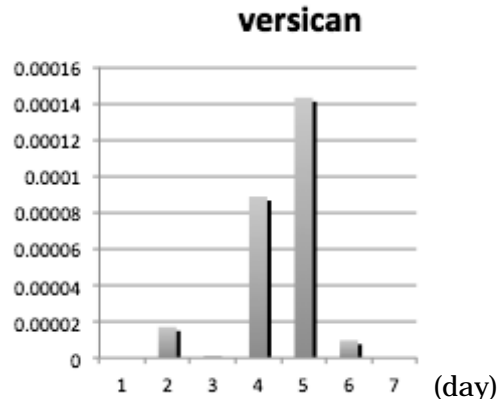


図 1. マウス創傷皮膚のバーシカン発現

(2) バーシカンの siRNA 導入によるノックダウン

MEF (mouse embryonic fibroblasts) 細胞にバーシカンの siRNA を導入してバーシカン産生の変化を RT-PCR にて確認した。導入 5 日目、7 日目ではネガティブコントロールと比較して、著明にバーシカンの産生は減少していた。

siRNA 導入 14 日目にはネガティブコントロールとほぼ変わらない結果となった。この結果から siRNA は、トランスフェクション後 1~10 日間は効果的にバーシカン mRNA を減少させることが判明した。

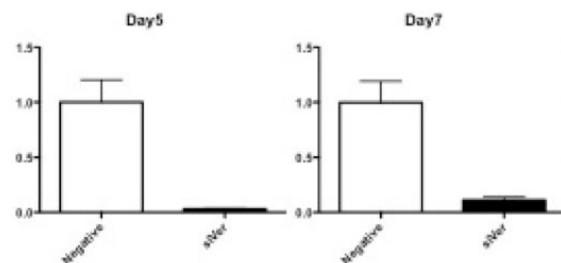


図 2 a. RT-PCR によるバーシカン発現の変化 (5 日目、7 日目)

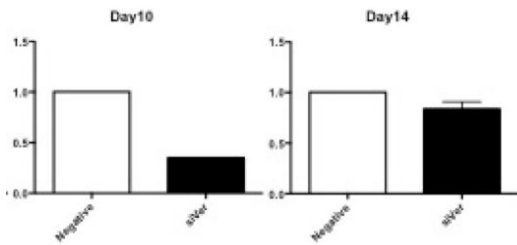


図 2 b . RT-PCRによるバーシカン発現の変化(10日目、14日目)

### (3) ドットプロットによるバーシカン発現抑制

バーシカンの siRNA 導入の後 7 日目の MEF 細胞の conditioned medium を用いてタンパク量を検討した。メディウム中のバーシカンの発現は著明に減少していた。

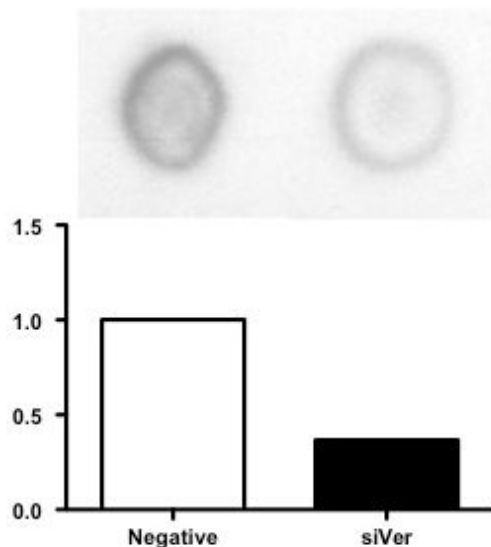


図 3 . ドットプロットによるバーシカン発現抑制

### (4) バーシカン減少により影響を受ける分子

MEF のバーシカンをノックダウンした時に、上昇する種々の分子をマイクロアレイにて同定した。その中から 3 つの分子に焦点を当て、RT-PCR にて検証した。バーシカンノックアウト 7 日目の MEF において、 Sushi repeat-containing protein, X-linked 2 (SrpX2) と CC Chemokine Ligand-6 (Ccl6)、 Secreted modular calcium-binding protein-2 (Smoc2) の発現が確かめられた。

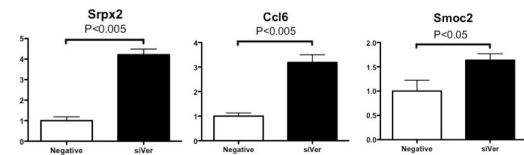


図 4 . バーシカンノックダウンによる SrpX2、Ccl6、Smoc2 の発現

### 考察

本研究において創傷後 2~3 日で上皮化することから、5 日目は創傷治癒における増殖期であり、その時期にのみバーシカンが発現していた。今回の MEF のバーシカンを抑制する実験では、創傷治癒過程において 4~5 日目の状態におけるバーシカンの機能を観察することができた可能性がある。またそれは 6~7 日目のバーシカンが消失する際に、反対の効果として検証できる可能性が示唆された。

MEF においてバーシカン発現をノックダウンすると興味深い分子が増加した。まず SrpX2 は細胞外マトリックス蛋白でセレクチンファミリーとともに働き、血管新生と血管内皮細胞の遊走を調節していることが報告されている。

次に Ccl6 はマクロファージや CD4 陽性リンパ球、好酸球の遊走因子である。また、Ccl6 はマクロファージの遊走を促すことで創傷治癒を促進するとされている。

Smoc2 は細胞外マトリックスの 1 つであり、腫瘍の新生や創傷時の組織の修復時に血管新生や角化細胞の遊走などを促進する。

創傷治癒ではバーシカンが存在しない間の 1~3 日目の時期に、SrpX2 増加により血管内皮細胞の遊走が起こり Ccl6 増加はマクロファージを創傷部位に呼び込み、Smoc2 増加は血管新生や角化細胞の遊走を刺激する可能性がある。そして、4~5 日目になるとバーシカンは増加していくため、上の 3 分子はいずれも減少し、上記の効果は減弱し、創傷における炎症細胞、血管内皮の遊走は抑制され、炎症を収拾していく方向に舵をきるとも考

えられる。受傷 6 日目以降ではパーシカンの発現は再度抑制されているが、この後は、新生血管・炎症細胞の消失が起こる時期になると考えられるため、再度 Srpα2 と Ccl6、Smoc2 が上昇するかは、実際の組織での検討が必要である。

培養細胞に RNAi 法でパーシカンを抑制すると、様々な分子の発現変化を起こしていることが判明した。その詳細なメカニズムは不明であり、今後のさらなる検討が必要であると考ええる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Tomita H, Koike Y, Asai M, Ogawa F, Abe K, Tanioka M, Utani A: Angiosarcoma of the scalp successfully treated with pazopanib. J Am Acad Dermatol, 査読有, 70: e19-21, 2014  
DOI: 10.1016/j.jaad.2013.08.055

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 富田 元、宇谷厚志：研究演題：当院における脱毛症患者の治療と予後に関する報告。日本皮膚科学会第 319 回長崎地方会 (2013/4/14, 長崎市・長崎大学医学部第一講義室)
2. 富田元、鎌塚大、小池雄太、浅井幸、小川文秀、西村直樹、谷岡未樹、宇谷厚志：分子標的薬が奏功した血管肉腫の 2 例。第 65 回日本皮膚科学会西部支部学術大会 (2013/11/9~11/10, 鹿児島市・かごしま県民交流センター)

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

富田 元 (TOMITA, Hajime)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・  
客員研究員  
研究者番号：30457535