

Title	マウス皮膚の発生と創傷治癒におけるProgranulinとその関連分子の役割
Sub Title	The effect of Progranulin in skin wound healing.
Author	藤井, 貴子(Fujii, Takako)
Publisher	
Publication year	2015
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2014.)
JaLC DOI	
Abstract	主に神経の慢性炎症に関連することで知られるProgranulinについて, 本研究では皮膚の創傷治癒, 特に創部へ集積する好中球やマクロファージなどの炎症細胞とProgranulinとの関連について検討した。マウスの背部皮膚創傷治癒モデルを用いた研究により, 主にマクロファージと血管内皮細胞においてProgranulinが発現すること, また好中球エラスターゼ欠損マウスの創部においてはProgranulinがより豊富に存在し抗炎症作用を有することが示唆された。 Progranulin is known to have anti-inflammatory effect in central nervous system. The objective of this study was to investigate the effect of Progranulin in skin wound healing. Histological analysis using mouse skin wound healing model revealed that Progranulin was expressed mainly in macrophages and endothelial cells in wound granulation tissue. The expression level of Progranulin in neutrophil elastase-null mice was higher than control. They tended to heal with less inflammation, suggesting that Progranulin acted as an anti-inflammatory agents in skin wound healing.
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2013～2014 課題番号：25861706 研究分野：形成外科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25861706seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

平成 2 7 年 6 月 2 日現在

機関番号： 3 2 6 1 2

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2013 ~ 2014

課題番号： 2 5 8 6 1 7 0 6

研究課題名（和文）マウス皮膚の発生と創傷治癒におけるProgranulinとその関連分子の役割

研究課題名（英文）The effect of Progranulin in skin wound healing.

研究代表者

藤井 貴子（Fujii, Takako）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号： 2 0 5 7 3 3 6 4

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：主に神経の慢性炎症に関連することで知られるProgranulinについて、本研究では皮膚の創傷治癒、特に創部へ集積する好中球やマクロファージなどの炎症細胞とProgranulinとの関連について検討した。マウスの背部皮膚創傷治癒モデルを用いた研究により、主にマクロファージと血管内皮細胞においてProgranulinが発現すること、また好中球エラスターゼ欠損マウスの創部においてはProgranulinがより豊富に存在し抗炎症作用を有することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Progranulin is known to have anti-inflammatory effect in central nervous system. The objective of this study was to investigate the effect of Progranulin in skin wound healing. Histological analysis using mouse skin wound healing model revealed that Progranulin was expressed mainly in macrophages and endothelial cells in wound granulation tissue. The expression level of Progranulin in neutrophil elastase-null mice was higher than control. They tended to heal with less inflammation, suggesting that Progranulin acted as an anti-inflammatory agents in skin wound healing.

研究分野： 形成外科学

キーワード： 創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

Progranulin は主に神経の慢性炎症に関連し、fronto-temporal dementia (FTD) の原因遺伝子として知られているが、近年、皮膚の創傷治癒においても一定の役割を果たしていることが報告されている。

Progranulin は Proepithelin、PC-cell derived factor、acrogranin などとも呼ばれ、1990 年代に新たな autocrine factor として報告されたものである。7 種類の Granulin が数珠状に連結した構造を呈しており、そのリンカー部位が好中球エラスターゼ、および同じく好中球由来セリンプロテアーゼである Proteinase 3 によって切断されることにより、個々の Granulins が生成されることが報告された (Zhu, et al. Cell 2002、Kessenbrock, et al. J Clin Invest 2008)。

Progranulin とその分解産物である Granulin は、組織において相対する作用を発揮すると考えられている。Progranulin が好中球やマクロファージの活性化を抑制して IL-8 など炎症惹起性サイトカインの産生を低下させるのに対して、Granulin は増加させる。Progranulin が直接 TNF α 受容体と結合することによって TNF α シグナルを阻害するが、分解産物である Granulin は受容体結合能が失われている (Tang, et al. Science 2011)。更には、Progranulin がケラチノサイトの増殖を促進するのに対して、Granulin は抑制する。つまり、Progranulin は炎症の鎮静化、上皮の増殖促進によって組織の再建・再生を促進する因子として働くのに対して、Granulin は炎症を惹起することによって病原体や異物を排除し生体保護のために働くが、一方で健常組織の破壊をきたすと考えられる。創傷治癒過程において、Progranulin は主に炎症細胞や線維芽細胞、血管内皮細胞から分泌されると考えられている (He, et al. Nat Med 2003)。そして、そのスイッチとしての役割を好中球由来セリンプロテアーゼが担っていると考えられる。

2. 研究の目的

ヒトを含めた哺乳類の皮膚が損傷を受けると、その後癒痕を残して修復される。皮膚の癒痕は拘縮による機能障害の原因となり、また整容的問題を生じるが、現在のところ有効な治療法は存在しない。皮膚癒痕の治療のために多くの社会的資源が投入されており、有効な治療方法の開発が望まれている。

我々は以前から皮膚の創傷治癒と炎症反応との関連について研究を行ってきた。特に好中球エラスターゼに注目し、その活性を阻害することにより癒痕形成が軽減されるとの仮説を立て検証を行ってきた。本研究は、皮膚の創傷治癒において Progranulin がどのような役割を果たしているかについて検討することを目的に開始された。

3. 研究の方法

(1) 成獣マウスを用いた皮膚欠損創モデルによる検討

成獣マウスの背部皮膚に全層欠損創を作成するモデルを用いて創傷治癒過程の解析を行う。

創傷治癒面積の比較

8 週齢の好中球エラスターゼ欠損 (*Ela2^{-/-}*) マウスおよび対照群の野生型 (*Ela2^{+/+}*) マウスを用いて、背部皮膚を剃毛後、正中に直径 10mm、深筋膜上までの全層皮膚欠損創を作成する。通常は 2 週間程度で創が閉鎖するが、それまでの期間、創傷面積の変化を観察し、両群において比較検討する。

組織学的検討

創傷作成後 1 日目、2 日目、4 日目、7 日目、14 日目の創部組織を回収・固定する。H-E 染色および Masson-Trichrome 染色を行い、創部組織全体の構築、炎症細胞浸潤の程度、癒痕形成の程度について比較検討を行う。

(2) 新生仔マウスを用いた皮膚切開創モデルによる検討

生後 1 日目の新生仔マウスの背部皮膚に、マイクロ用ハサミを用いて長さ 3mm の皮膚全層切開創を作成する。

出生後のマウス皮膚においては、成獣と同様の治癒過程が進行することが知られている。つまり、好中球を含めた活発な炎症細胞の集積を伴い、組織の再構築を経て癒痕を残して創が修復される。

新生仔を用いることの利点としては、組織が柔軟であり、組織学的な解析や遺伝子の抽出などの操作を行うにあたり比較的容易であることが挙げられる。また、成獣と比較して体動が少なく、二次的な創の損傷が少ない点も利点と言える。

免疫染色

好中球エラスターゼ欠損マウスおよび野生型マウスの新生仔背部に創傷を作成後、1 日目、2 日目、4 日目、7 日目の創部組織を回収し、4%PFA で一晩固定後、30%スクロースに 24 時間浸漬する。封入後に凍結し、cryostat で厚さ 8 μ m の凍結切片を作製する。Progranulin、TNF α 、血管 (CD31)、リンパ管 (LYVE1) を含めた 1 次抗体を使用して免疫染色を行う。共焦点顕微鏡で観察し、Progranulin 発現の程度、血管やリンパ管新生の程度について評価を行う。

Western Blot による Progranulin の定量解析

好中球エラスターゼ欠損マウスにおいて Progranulin のタンパク質発現量がどのように変化しているかについて、創傷作成後 1 日

目、2日目、4日目、7日目の組織からタンパク質を抽出し定量し、野生型 littermate と比較する。

4. 研究成果

(1) 成獣マウスを用いた皮膚欠損創モデルによる検討

好中球エラスターゼ欠損マウスは通常（メンデル遺伝）の比率で出生し、体重や寿命に変化は認めなかった。妊娠も可能であった。

創傷治癒面積の比較

成獣の好中球エラスターゼ欠損マウスおよび野生型マウスの背部皮膚に全層欠損創を作成し、経時的に創傷面積の比較を行った。

図1に示す通り、好中球エラスターゼ欠損マウスにおいて早期に創傷面積が縮小する傾向があったが、いずれにおいても創傷作成後12日程度で上皮化が完了した。

肉眼的に、好中球エラスターゼ欠損マウスの創部は野生型と比較して赤色調が強く、また痂皮が薄い傾向を認めた（図1）。

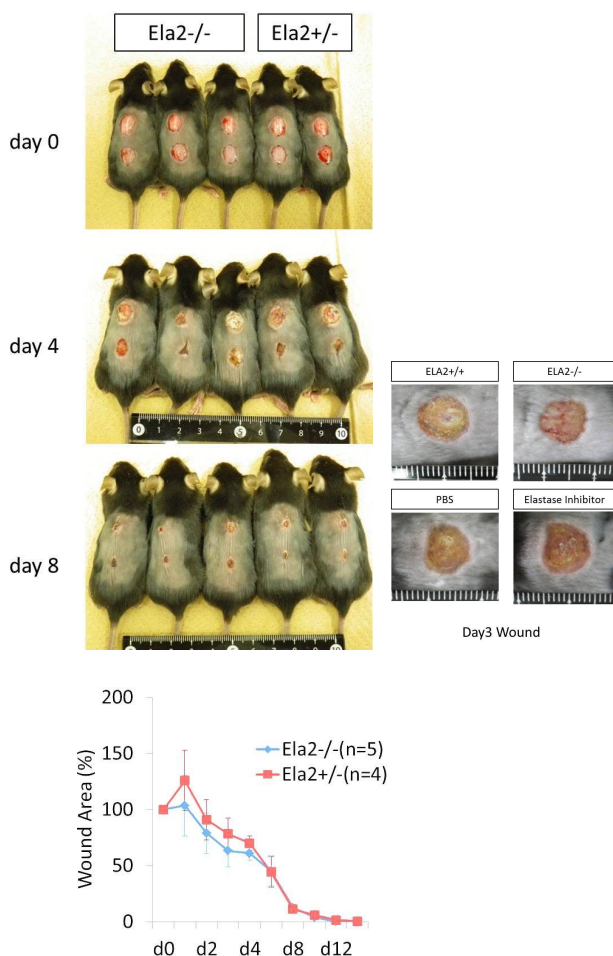


図1. 成獣マウスにおける創傷面積の比較

好中球エラスターゼ欠損マウスにおいては創面積が早期に縮小する傾向を認めた。また、肉眼的に創が赤色調を呈し、痂皮が薄かった。

組織学的検討

成獣マウスの創部組織を経時的に回収し、H-E染色、Masson-Trichrome染色、免疫染色を行って比較検討した。

各種標本において癒痕面積、癒痕の幅について検討したが、図2に示す通り、好中球エラスターゼ欠損マウスと野生型マウスとの間で有意な差異は認められなかった。

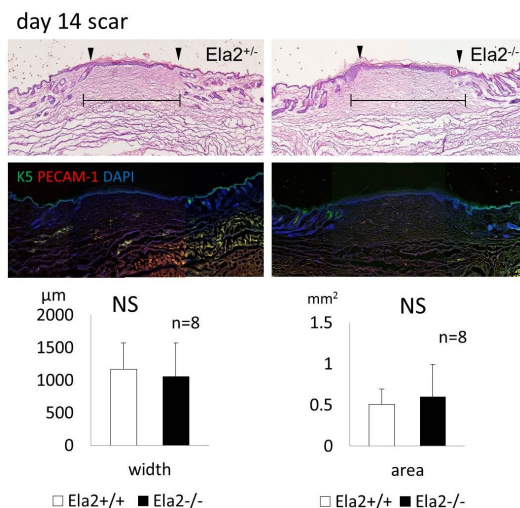


図2. 創傷作成後14日目の癒痕組織の比較

好中球エラスターゼ欠損マウスおよび野生型の対照マウスにおいて癒痕組織の量を比較したが有意な差は認められなかった。

(2) 新生仔マウスを用いた皮膚切開創モデルによる検討

新生仔マウスの背部皮膚に全層切開創を作成し、同様に創傷治癒過程について検討を行った。

図3に示す通り、好中球エラスターゼ欠損マウスの創部においては7日目以降の癒痕による引きつれ（拘縮）が少なく、また形成された癒痕組織は少量であった。

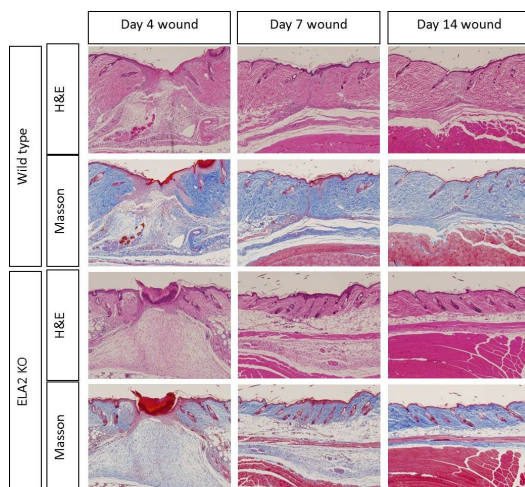


図3. 新生仔マウスにおける癒痕組織の検討

成獣マウスを用いて皮膚「欠損」創モデルで比較した場合には有意な差異が観察されなかったが、新生仔マウスを用いて皮膚「切開」創モデルで比較した場合には差異が観察された。

このことから、大きな組織欠損を伴わないような組織損傷の場合には、好中球エラスターゼ欠損マウスにおいて瘢痕が形成されにくい傾向があることが示唆された。

また、新生仔と成獣における治癒様式の相違が関与している可能性があるため今後の検討が必要と考えられた。

免疫染色

新生仔創傷モデルを用いて免疫染色を行った。創傷作成後1日目、2日目、4日目、7日目の組織を回収して Progranulin、血管、リンパ管、炎症性サイトカインについて染色を行い検討した。

Progranulinについては、図4に示す通り、創傷作成後4日目の時点で好中球エラスターゼ欠損マウスにおいて有意に発現が強いことが分かった。

この Progranulin (PRGN) 陽性を示す細胞は、他の免疫染色の結果と照合し、主に F4/80 陽性のマクロファージ、および CD31 陽性の血管内皮細胞であることが分かった。

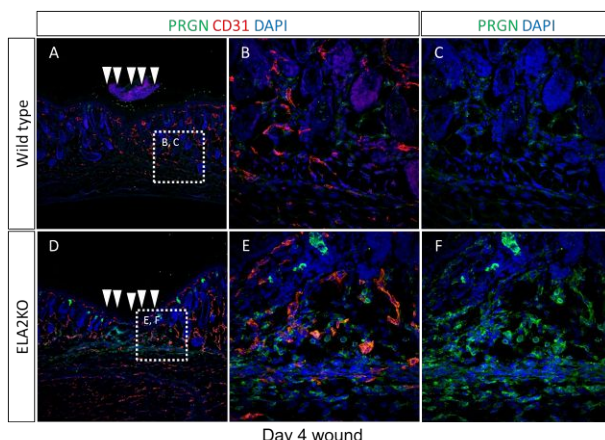


図4．創部組織における Progranulin の発現
創傷作成後4日目の好中球エラスターゼ欠損マウスの創部組織において Progranulin の発現が亢進している。

Progranulin は好中球エラスターゼをはじめとするセリンプロテアーゼにより Granulin に分解されることが示唆されている。エラスターゼ欠損マウスにおいてはこの分解が抑制されることにより、野生型と比較して Progranulin が豊富に保たれ、創部における paracrine の増殖因子として機能している可能性が考えられた。

血管およびリンパ管新生の程度には有意な差を認めず、また TNF α など炎症性サイトカインについては免疫染色による検出と定量に限界があり、ELISA 法などを用いた定量を今後追加する必要があると考えられた。

また、今回 Progranulin の免疫染色を行った際に、好中球エラスターゼ欠損マウスおよび野生型マウスいずれにおいても、毛包膨大部において Progranulin 強陽性を示す細胞集団が存在することがたびたび観察された(図5)。

健康部皮膚においてこのように局所的な Progranulin の発現があることはこれまで報告されておらず、その意義について今後検討する余地があると考えられた。

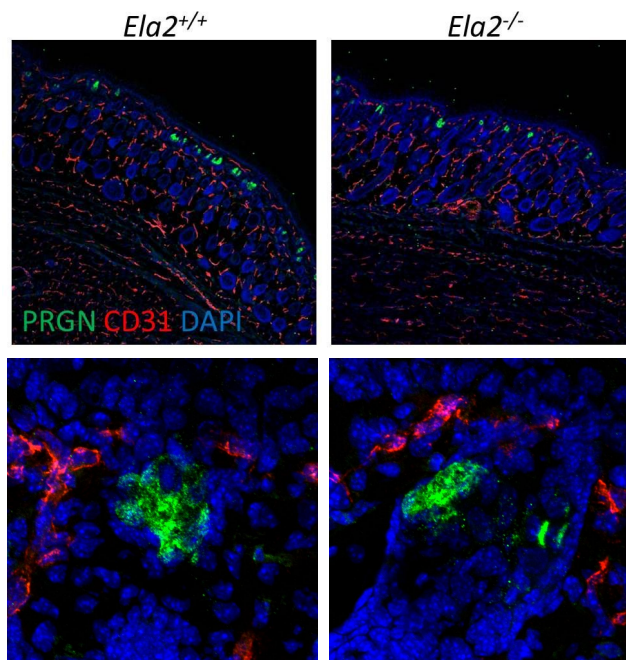


図5．毛包における Progranulin の発現

Western Blot による Progranulin の定量解析

Western Blot による Progranulin タンパク質の定量解析に取り組んだものの、抗体の特異性の問題、実験手法の技術的な問題などから、本実験期間内に有意な結果を得ることができなかった。抗体の選定や実験の条件を変更することにより今後対応する予定である。

本研究から、創部組織において、主にマクロファージと血管内皮細胞において Progranulin の発現が認められることが分かった。また、この発現は好中球エラスターゼ欠損マウスで亢進していたことから、*in vivo* においても Progranulin は好中球由来セリンプロテアーゼによって分解される可能性が高いことが示された。

一方、成獣を用いた創傷治癒の結果からは好中球エラスターゼが欠損することによる結果への影響は比較的少なかった。Progranulin は好中球エラスターゼのみでなく、他の好中球由来セリンプロテアーゼ(主に Proteinase 3)によっても分解されることが示唆されているため、これらによる redundant な作用が結果に影響していると考えられた。

今後はこれらの欠損マウスにおいても検

討を加えることで新たな知見が得られると思われた。

<引用文献>

Zhu et al. Cell 111: 867-878, 2002.
Kessenbrock et al. J Clin Invest 118: 2438-2447, 2008.
Tang et al. Science 332: 478-484, 2011.
He et al. Nat med 9: 225-229, 2003.

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 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤井 貴子 (FUJII Takako)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 20573364

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし