

皮膚潰瘍における細胞外マトリックスの
臨床診断への応用

Application to clinical diagnosis of extracellular matrix
in pressure ulcerations

水野 晃治

Koji Mizuno

目 次

論文リスト	p. 1
略語リスト	p. 2
第一章 緒論	p. 3
第二章 試薬リスト	p. 5
第三章 褥瘡様皮膚潰瘍モデルを用いたバイオマーカーの探索	p. 8
第四章 褥瘡を例とした細胞外マトリックスによる TGF- β の活性制御機構	p. 24
第五章 総括および結論	p. 47
謝辞	p. 48
参考文献	p. 49

論文リスト

本論文は、学術雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

1. Koji Mizuno, Hiroshi Wachi, Fumiaki Sato, Satoshi Onoue, Yoshimitsu Sakamoto, Takashi Kobayashi, and Yoshiyuki Seyama, Characteristic expression of connective tissue components and matrix metalloproteinases (MMPs) during the development of pressure ulcerations, *Inflammation and Regeneration*, **28**, 47-52 (2008).
2. Koji Mizuno, Hiroshi Wachi, Zenzo Isogai, Masahiko Yoneda, Satoshi Fujii, Ken Watanabe, Yoshiyuki Seyama, Proteolytic release of Latent TGF- β binding protein-1 (LTBP-1) fragment in Wound healling, *Journal of Health Science*, accepted (2009).

論文 1.を第三章に、論文 2.を第四章に使用した。

略語リスト

本論文では、以下の略語を用いた。

DMEM :	Dulbecco's modified Eagle's medium ダルベッコ変法イーグル培地
EGF:	Epidermal growth factor、上皮成長因子
GAPDH :	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素
MMP:	Matrix metalloproteinase、マトリックスメタロプロテイナーゼ
PBS :	Phosphate buffered saline、リン酸緩衝生理食塩水
TBS :	Tris buffered saline、トリス緩衝生理食塩水
TIMP:	Tissue inhibitor matrix metalloprotease、 マトリックスメタロプロテイナーゼ阻害因子
TGF- β :	Transforming growth factor- β 、トランスフォーミング増殖因子ベータ
TNF- α :	Tumor necrosis factor- α 、腫瘍壊死因子アルファ

第一章 緒論

高齢化社会への移行にともない、高齢者の長期入院患者における褥瘡の発症は、医療費の増加や細菌感染の危険性などによる患者の QOL の悪化という点で重要な問題となっている。褥瘡は、骨突出部位に好発し、ベッドと接触することによる圧力、摩擦などの外的因子および加齢、低栄養、麻痺などの内的因子により発症する。また、褥瘡は、様々な要因が絡み合って発症するものであり、褥瘡と一言で表しても様々な創傷の状態があるために、その診断および治療が困難である。現在、褥瘡の治療は DESIGN 分類によって褥瘡の病態を評価し、それに基づき治療を行なっているが、必ずしも DESIGN 分類による評価が創傷の状態を反映しているとは限らないため、熟練した皮膚科医の診断による治療方針の決定が必須である。そのため、熟練した臨床医以外でも褥瘡の診断および治療方針を決定できるような新たな診断マーカーが必要である。しかしながら、褥瘡モデル動物の検討があまりなされていないことや、臨床での褥瘡の生化学的解析があまり行なわれていないため、褥瘡の基礎研究は進んでいない。

皮膚を含む様々な臓器、器官、組織は、個々の組織特有の細胞と間質から構成されている。間質は細胞外マトリックスと呼ばれる巨大分子（コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、エラスチン、プロテオグリカン、ヒアルロン酸など）の集合体である不溶性線維（膠原線維、弾性繊維）や膜（基底膜）として存在している。これら細胞外マトリックスは、臓器、器官、組織の形態を保持するだけでなく、細胞との情報伝達により細胞の増殖や分化を調節する機能も有する。褥瘡を含む創傷治癒は、炎症、肉芽形成、組織再構築といった再生機構により行なわれる^{1,2}。受傷により、皮膚、血管が破壊されると、損傷部位に血小板が凝集しフィブリン塊を形成する。これは、細胞接着、細胞遊走の足場となる。また、損傷を受けた細胞、血小板などからサイトカインが放出され、好中球やマクロファージといった炎症細胞が遊走し、異物の分解および貪食、さらに増殖因子の放出を行なう。炎症によってマトリックスメタロプロテ

イナーゼ (MMPs) の活性が亢進し、血管新生を促進する³。サイトカインや増殖因子によって調節を受けた線維芽細胞は、フィブロネクチンなどの細胞外マトリックスを合成し、新生血管と細胞外マトリックスの豊富な肉芽を形成する。肉芽形成後、この細胞外マトリックスを足場とした上皮細胞の遊走による上皮形成、フィブロネクチンからコラーゲンへの組織内再構築を経て治癒に至ると考えられている。これら細胞遊走、血管新生、肉芽形成にはサイトカインの刺激による細胞外マトリックスの合成と分解が必要であり、細胞外マトリックスの分解と合成のバランス崩壊は、慢性創傷の要因となる⁴⁻⁶。近年、細胞の接着や遊走、および臓器、器官、組織の形態保持に関与する細胞外マトリックスが、TGF- β 等のサイトカインを貯蔵していることが報告された⁷⁻⁹。この貯蔵されたサイトカインは、創傷等の刺激により遊離し、細胞に働きかけ、組織修復を促進していると考えられている。このように、細胞外マトリックスは、結合組織成分としてのみならず、サイトカイン制御の役割も有しており、創傷治癒における細胞応答および組織再生に重要な役割を果たしている。

そこで、本研究では、褥瘡様皮膚潰瘍モデルを用いて細胞外マトリックスを対象として褥瘡創部の新たな病態マーカーの探索およびヒト褥瘡創傷面からの褥瘡治療マーカーの探索を行なうことを目的とした。

第二章 試薬リスト

本研究には、以下の試薬を使用した。

培養細胞

HEK293c18

American Type Culture Collection (ATCC)

培養関連試薬

Dulbecco's modified Eagle's medium (high glucose)	Invitrogen
Trypsin-EDTA/PBS	Invitrogen
Fetal calf serum	Invitrogen
L-Glutamine	Invitrogen
Penicillin/streptomycin	Invitrogen
Non-essential amino acid	Invitrogen

測定試薬類

Micro BCA protein assay kit	Pierce
-----------------------------	--------

RNA 解析関連試薬

Guanidine thiocyanate	Fluka
Sodium-N-lauroylsarcosine	Sigma
Phenol:Chloroform:Isoamylalcohol	Sigma
M-MLV Reverse transcriptase	Invitrogen

Ribonuclease inhibitor	Invitrogen
Oligo dT primer	Invitrogen
GoTaq® Green Master Mix	Promega
Agarose	Invitrogen

Polymerase chain reaction において、primer として用いた oligonucleotide は、SIGMA GENOSYS より得た。

タンパク解析関連試薬

All Blue prestained standards	Bio-Rad
Anti-LTBP antibody (mAb388)	R&D
Anti-LTBP antibody (mAb75G)	gift from Dr. Isogai
Anti-Fibrillin-1 antibody (mAb69)	gift from Dr. Isogai
Anti-Fibrillin-1 antibody (mAb78)	gift from Dr. Isogai
Anti-Fibrillin-1 antibody (pAb9543)	gift from Dr. Isogai
Anti-Fibronectin antibody (mAb875A51)	Poole, UK
Anti-plasmin/plasminogen antibody (mAb2596)	R&D
Western Lighting Reagent Plus	Perkin Elmer

その他の一般試薬については、和光純薬工業（株）及び Sigma の特級またはそれに準ずるものを使用した。

第三章 褥瘡様皮膚潰瘍モデルを用いたバイオマーカーの探索

第一節 緒言

近年、高齢化社会への移行に伴い、高齢者の長期入院患者における褥瘡の発症が増加している。褥瘡は、自発的体位変換の困難な患者においてベッドと強く接する局所において好発する虚血性の組織壊死、炎症を伴う難治性の皮膚潰瘍であり¹⁾、また、糖尿病や脊髄損傷など様々な基礎疾患によって発症することも知られている。わが国では、4.2～9.5%の長期入院患者において褥瘡が発症している。また、褥瘡等の潰瘍は、医療費の増加や細菌感染の危険性などによる患者のQOLの悪化という点で重要な問題となっている。しかしながら、褥瘡の発症とバイオマーカーとの関連は未だ明らかとなっていない。

創傷治癒は、受傷後直ちに開始され、炎症、肉芽形成、上皮形成、マトリックス再構築を経て治癒にいたる。一般に受傷すると組織損傷により血管が破壊され、損傷部位が血液で満たされ、血小板の凝集によりフィブリンおよびフィブロネクチンの豊富なフィブリン塊を形成する。血小板は、成長因子や接着タンパクを分泌し、フィブリン塊を足場とした創部への炎症細胞の遊走を促進する。炎症では、好中球による異物の分解および単球からマクロファージへの分化による異物の貪食により創部が洗浄される。マクロファージは、肉芽形成および上皮形成を活性化する成長因子やサイトカインを分泌する。線維芽細胞は、創部に遊走し、フィブリン塊下にフィブロネクチン、コラーゲンの豊富な肉芽組織を形成する働きをする。また、近年、肉芽組織においてMMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-14の発現が増加するという報告がなされている⁴⁾。上皮化において、上皮細胞は再び皮膚を保護するために創部へ遊走する。近年、再上皮化時において、MMP-1、MMP-3、MMP-9、MMP-10が上皮細胞から検出されるという報告がある⁴⁾。Momotaらは、ラミニン5の $\alpha 3$ LG4モジュールがMMP-9の増加に伴い上皮細胞の遊走を促進することを示している¹⁰⁾。受傷後の血管新生は、上皮

および血管基底膜の破綻によって引き起こされ、このとき、細胞外マトリックスに結合した fibroblast growth factor (FGF) 等の血管新生因子が遊離される¹¹。また、Hanらは TNF- α および TGF- β が、線維芽細胞および上皮細胞からの基底膜や細胞外マトリックス構成成分を分解する MMP-9 の発現増加によって血管新生に寄与することを示した¹²。血管内皮細胞が創傷部位に血管を作るにつれて、線維芽細胞は筋線維芽細胞へ分化し、創傷部位の収縮を促す。存在していた細胞はアポトーシスを受け、長い年月をかけてゆっくりと組織が再構築され、コラーゲンの豊富な癒痕組織となる。このように細胞外マトリックスと MMP は創傷治癒に重要な働きをすることが知られている。しかしながら、褥瘡の発症とこれらのバイオマーカーとの関連は未だ明らかとなっておらず、現在、褥瘡の評価には肉眼的所見のみを使用している。また、褥瘡の治療薬も少ない。

そこで本研究では、坐骨神経を切除することによって作製した褥瘡様皮膚潰瘍マウスモデルを使用して、褥瘡発症時の創部拡大に伴う細胞外マトリックス構成成分および MMP の mRNA 発現の変動を検討し新規バイオマーカーの探索を行った。

第二節 試薬及び方法

褥瘡様皮膚潰瘍マウスモデルの作製

本研究は、星薬科大学動物実験指針に基づいて行われた。Turinsky の方法に従い、7週齢雄性 ICR 系マウスをペントバルビタール (40 mg/kg, i.p.) で麻酔し、背部および大腿部を剃毛した。両側の太股子から坐骨結節の範囲内で背面を矢状面に切開し、両側の坐骨神経を切除した¹³。その後、床敷きを敷かないケージにマウスを個別に飼育し、マウスの踵部位に褥瘡様皮膚潰瘍を発症させた。潰瘍面積はパラフィルムに写し取り、重量を測定し、潰瘍面積の指標とした。また、潰瘍部位はデジタルカメラで撮影し記録した。

HE 染色による潰瘍部位の観察

坐骨神経切除前のマウスおよび褥瘡様皮膚潰瘍発症マウスの足を切除し、10%中性ホルマリンで固定し、パラフィンブロックを作製した。これを厚さ 5 μ m に切り、切片を作製した。キシレンおよびエタノールを用いて脱パラフィンの後、HE 染色を行った。

ゼラチンザイモグラフィ

坐骨神経切除前 (0 日目)、坐骨神経切除後 1 日目、3 日目、5 日目、7 日目においてそれぞれ潰瘍部位を切除し、組織を採取した。採取した組織を液体窒素で瞬間凍結し、クライオプレスで破碎し、抽出バッファー (0.15 M 塩化ナトリウム, 0.15 mM 塩化亜鉛, 2mM 塩化カルシウム含有 0.01 M カコジル酸バッファー, pH5.2) 中で 4°C で 24 時間抽出を行なった。その後、4°C、2,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を採取した。この上清を BCA protein assay kit を用いてタンパク質濃度を測定した。この溶液をアセトン沈殿し、沈殿物を SDS-PAGE サンプルバッファー (1% SDS, 5% グリセロール, 0.01% ブロモフェノールブルー, 100 mM ジチオスレイトール含有 0.01M トリス塩酸バッファー, pH 7.4) に溶解した。0.2%ゼラチン含有 7.5%アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行ない、2.5% トライトン-X100 で 1 時間洗浄後、酵素反応溶液 (5mM 塩化カルシウム, 1 μ M 塩化亜鉛含有 50mM トリス塩酸バッファー, pH 7.5) で 37°C、20 時間インキュベートしてゲル内で酵素反応を行なった。このゲルを CBB 染色し、脱色して MMP-2 および MMP-9 のゼラチナーゼ活性を確認した。

全 RNA の採取及び RT-PCR

坐骨神経切除前（0 日目）、坐骨神経切除後 1 日目、3 日目、5 日目、7 日目において潰瘍部位を切除し、組織を採取した。潰瘍部位から採取した組織からの全 RNA 採取は、酸性グアニジンチオシアネート・フェノール・クロロホルム法に準じて、以下のように行った。組織を液体窒素で瞬間凍結し、クライオプレスを用いて破砕した。破砕した組織を D 液（4 M グアニジンチオシアネート、25 mM クエン酸ナトリウム、0.1 M 2-メルカプトエタノール溶液）を加え溶解した。その後、酸性フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（125:24:1）を加え、混合した後、4°C、20 分間放置した。その後、4°C、10,000 rpm、20 分間遠心分離することにより RNA と DNA を分離した。遠心分離後の上層を別のチューブに分取し、等量のイソプロパノールを加え、混合後、-20°C、1 時間放置した。同条件の遠心分離により沈殿させた RNA を再び D 液に溶解し、イソプロパノール沈殿を繰り返し行った。沈殿した RNA を 80% エタノールで洗浄後、核酸分解酵素を含まない精製水に溶解、凍結乾燥を行い、使用時まで -80°C に保存した。組織より抽出した RNA を鋳型として RT-PCR を行い、collagen α_1 (I), collagen α_1 (IV), laminin-5 α_3 , MMP-2, MMP-3, MMP-9 および内標準物質であるグリセルアルデヒド三リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) のそれぞれの相補鎖 DNA (cDNA) を増幅した。全 RNA 1 μ L (1 μ g/ μ L) と Oligo dT primer 1 μ L に MilliQ 水 8.5 μ L を加え、72°C で 10 分間変性した後、4°C で 10 分間放置した。その後、RT 反応バッファー（10×濃度マグネシウム含有 PCR バッファー）6 μ L, 10 mM で置きしヌクレオチド三リン酸（dNTP）2 μ L, RNA 分解酵素阻害剤 0.5 μ L, M-MLV 逆転写酵素 1 μ L を加え、42°C で 1 時間逆転写反応を行った。その後、70°C で 5 分間インキュベートし cDNA を作製した。合成した cDNA のうち 1 μ L を鋳型とし、PCR 法にて各遺伝子の増幅を行った。センスプライマー (Sense primer) 10 pmol, アンチセンスプライマー (anti-sense primer) 10 pmol, 10 mM dNTP 0.5 μ L, Taq ポリメラーゼ 1.25 μ L, 10×PCR バッファー 2.5 μ L, MilliQ 水 18.75 μ L を順次加え、94°C で 2 分間インキュベートをした後 PCR 反応を行った。熱変性を 94°C で 30 秒間、アニーリング反応を 60°C

で 30 秒間、伸長反応を 72°C で 1 分間行い、これを 1 サイクルとして 30 サイクル繰り返した。その後、70°C で 5 分間インキュベートし、4°C に冷却した。PCR 反応の後、各サンプルをエチジウムブロマイド (2 µg/mL) 含有 2%アガロースゲル電気泳動を行い、紫外線照射下、目的バンドを可視化した。なお、遺伝子及びプライマーは Table 1 に示したものを使用した。各バンドは Kodak 1D 3.5 により数値化し、相関解析に用いた。

Table 1. Primer sequences

primers		primer sequences	amplified position
collagen α_1 (I)	Sense	5'-GGGCAAGACAGTCATCGAATA-3'	4332-4538
	Antisense	5'-TTTGGGTTGTTTCGTCTGTTTC-3'	
collagen α_1 (IV)	Sense	5'-AGCTGCTTTTGTGGAAGTCAT-3'	5698-5947
	Antisense	5'-CTGGTGTTCACATTCAGTGG-3'	
laminin-5 α_3	Sense	5'-GCAAGTCAATCTGGAGAGCAC-3'	4792-5092
	Antisense	5'-ATGAGTTCACACAGGGAGTG-3'	
MMP-2	Sense	5'-TTTATGGCTTTCAGCACTCTCA-3'	2584-2807
	Antisense	5'-TGGAGTGGAAGAACTGAAAAGGT-3'	
MMP-3	Sense	5'-CCTGCAACCGTGAAGAAGA-3'	1190-1505
	Antisense	5'-CAGGATGCCTTCCTTGGAT-3'	
MMP-9	Sense	5'-TGAATCAGCTGGCTTTTGTG-3'	2532-2773
	Antisense	5'-GTGGATAGCTCGGTGGTGTT-3'	
GAPDH	Sense	5'-CCATGGAGAAGGCCGGGGCCCA-3'	351-582
	Antisense	5'-ATGGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'	

第三節 結果

坐骨神経切除によるマウス踵部位への褥瘡様皮膚潰瘍の形成

褥瘡様皮膚潰瘍の形成状態を評価するために、坐骨神経切除後のマウス踵部位の潰瘍面積を測定した。潰瘍面積をグラフに示したように坐骨神経切除後3日目では約5 mm²、7日目では約10 mm²と経日的に褥瘡様皮膚潰瘍の面積は増加した (Figure 1)。さらに、坐骨神経切除前および切除後の潰瘍部位の組織を切片化し、HE染色を行った (Figure 2)。坐骨神経切除後3日目において、下肢に浮腫を伴い、踵部位の上皮が欠損し、小さな範囲の真皮の壊死が認められた。また、皮下組織に若干の炎症細胞の浸潤が認められた (データ未掲載)。坐骨神経切除後7日目において、上皮の欠損が大きくなり、皮下組織に伸展した線維芽細胞が多数認められた。また皮下組織には炎症細胞の浸潤が認められた (Figure 2B)。これらの結果から、坐骨神経切除により、マウスの踵部位において褥瘡様皮膚潰瘍の形成が可能であることが示された。

褥瘡様皮膚潰瘍部位における MMP-2 および MMP-9 の発現

褥瘡様皮膚潰瘍の形成時における MMP-2 および MMP-9 の生理的役割を検討するため、褥瘡様皮膚潰瘍部位抽出物中の MMP-2 と MMP-9 のゼラチナーゼ活性をゼラチンザイモグラフィで調べた。pro MMP-2 (66 kDa)、active MMP-2 (64 kDa) および pro MMP-9 (105 kDa) の発現は、坐骨神経切除後1日目から経日的に増加した (Figure 3)。

褥瘡様皮膚潰瘍部位における collagen α_1 (I)、collagen α_1 (IV)、laminin-5 α_3 、MMP-2、MMP-3、MMP-9 および GAPDH の mRNA 発現

創傷治癒では、肉芽形成、血管新生および上皮形成がバランスよく行われることが必要とされる。特に、肉芽形成には線維芽細胞による細胞外マトリックスの産生が必須である。本研究では、褥瘡様皮膚潰瘍部位における細胞外マトリックスとして (collagen α_1 (I)、collagen α_1 (IV) および laminin-5 α_3) およびその調節酵素である MMP (MMP-2、MMP-3 および MMP-9) の mRNA 発現について RT-PCR 法を用いて検討した。坐骨神経切除後の褥瘡様皮膚潰瘍部位における各 mRNA 発現は、経日的に増加した。特に、collagen α_1 (I)、MMP-2 および MMP-3 の各 mRNA 発現は劇的に増加した (Figure 4)。

褥瘡様皮膚潰瘍の形成と細胞外マトリックスと MMP の mRNA 発現の相関関係

褥瘡様皮膚潰瘍の形成と細胞外マトリックスおよび MMP の mRNA 発現の相関を検討するため、アガロースゲル電気泳動後の各バンドを Kodak 1D 3.5 により数値化し、褥瘡様皮膚潰瘍の面積と mRNA 発現の相関関係を解析した。褥瘡様皮膚潰瘍の面積と laminin-5 α_3 以外の細胞外マトリックス構成成分および MMP の mRNA 発現には有意な正の相関関係が認められた (Figure 5)。これは、褥瘡形成時の生化学的マーカーとして細胞外マトリックスおよび MMP の発現が有用であることを示唆している。

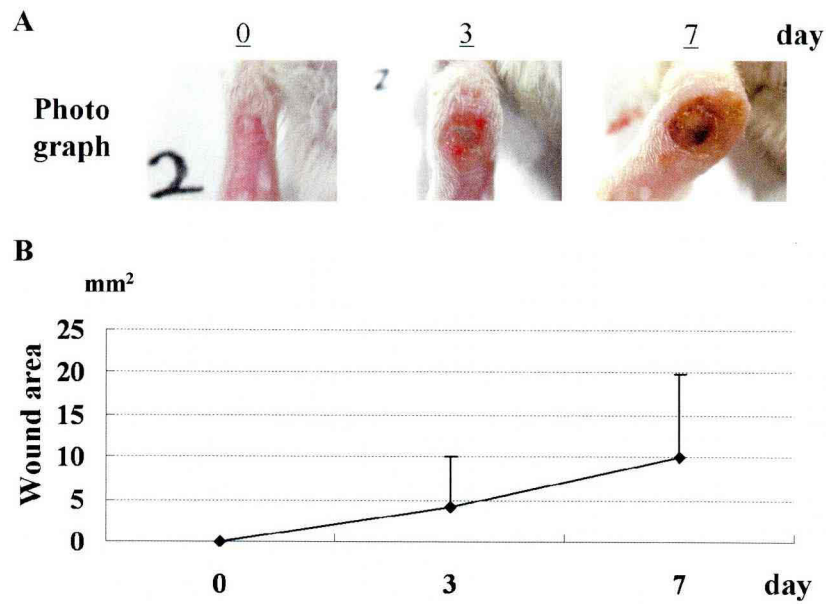


Figure 1 坐骨神経切除によるマウス踵部位への褥瘡様皮膚潰瘍形成

坐骨神経切除後、個々のマウスをチップの敷かない別々のケージで飼育した。坐骨神経切除後、褥瘡様皮膚潰瘍は、経日的に形成された。A: 坐骨神経切除前を 0 日目とした褥瘡様皮膚潰瘍形成に関する肉眼的所見写真像。B: 坐骨神経切除後の経日的な褥瘡様皮膚潰瘍形成過程をグラフ化した。

means \pm S.D., n = 5 (B)。

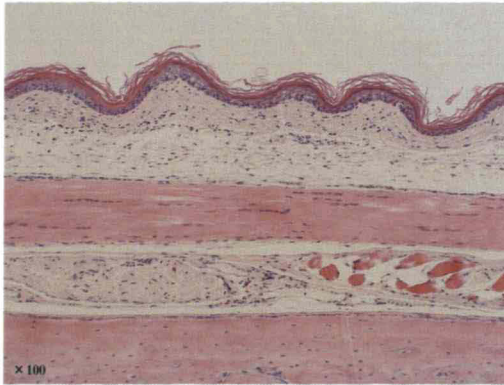
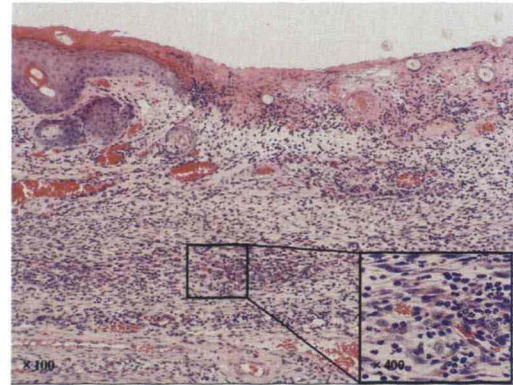
A**B**

Figure 2 HE 染色を用いた褥瘡様皮膚潰瘍部位の病理組織学的観察

マウスから坐骨神経切除前の踵部位および褥瘡様皮膚潰瘍部位を採取し、パラフィン切片化して HE 染色を行った。A: 坐骨神経切除前の踵部位、B: 坐骨神経切除後 7 日目の踵部位。褥瘡様皮膚潰瘍部位では、上皮の欠損、皮下組織に伸展した線維芽細胞および炎症細胞の浸潤が認められた Magnification×100。挿入画像には、好中球と線維芽細胞の存在が確認できた Magnification×400。

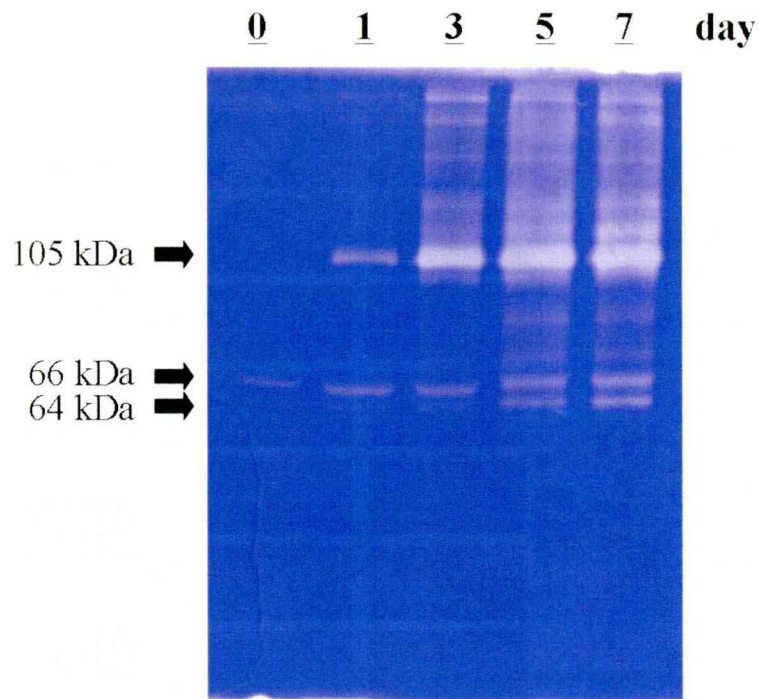


Figure 3 ザイモグラフィーによる褥瘡様皮膚潰瘍形成過程におけるゼラチナーゼ活性 (MMP-2 および MMP-9) の検出

坐骨神経切除後、経日的にマウス踵部位からサンプルを採取した。このサンプルを0.2%ゼラチン含有7.5%SDS-PAGEにより分離し、37℃でインキュベーションすることにより酵素反応を行った。MMP-2とMMP-9のゼラチナーゼ活性は経日的に増加した。

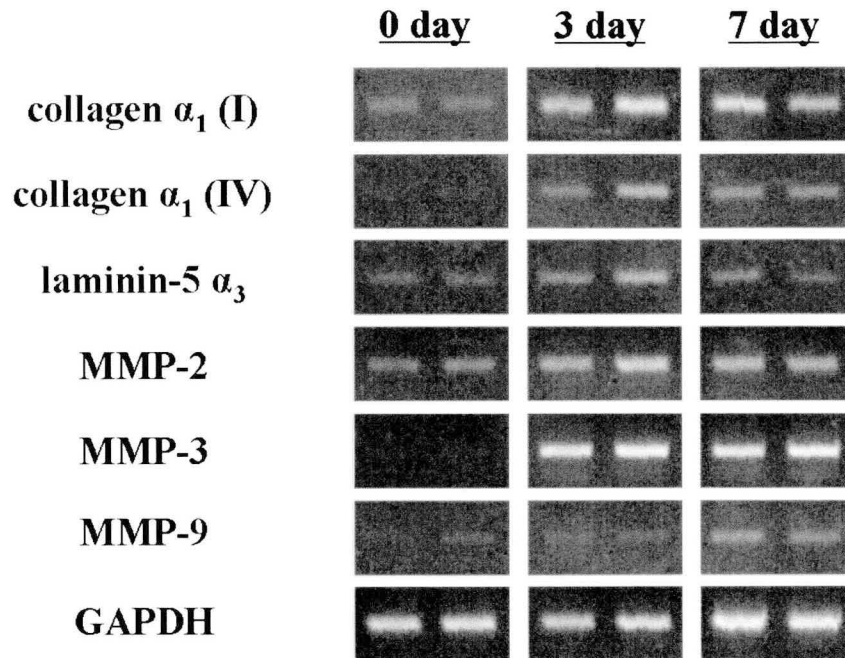


Figure 4 褥瘡様皮膚潰瘍部位における collagen α_1 (I)、collagen α_1 (IV)、laminin-5 α_3 、MMP-2、MMP-3、MMP-9 および GAPDH の経日的 mRNA 発現

全 RNA は、坐骨神経切除後、経日的に踵部位から phenol/chloroform により抽出し精製した。褥瘡様皮膚潰瘍形成過程における collagen α_1 (I)、collagen α_1 (IV)、laminin-5 α_3 、MMP-2、MMP-3、MMP-9 および GAPDH の mRNA 発現を RT-PCR 法を用いて検討した。同日の2つのサンプルは異なるマウスから採取した。

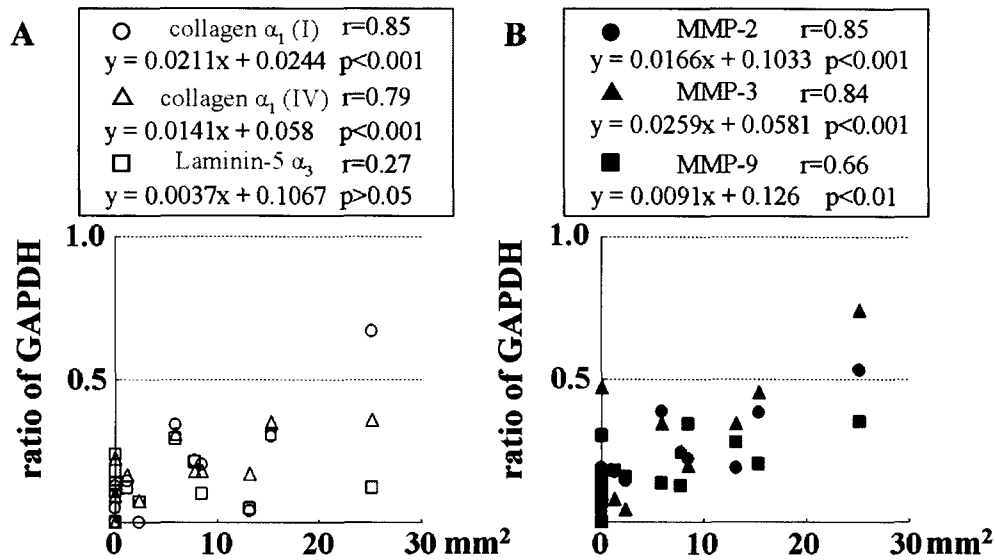


Figure 5 褥瘡様皮膚潰瘍面積と collagen α_1 (I)、collagen α_1 (IV)、laminin-5 α_3 、MMP-2、MMP-3 および MMP-9 の mRNA 発現との相関関係

全 RNA は、坐骨神経切除後、マウス踵における褥瘡様皮膚潰瘍部位より経日的にフェノールクロロホルムにより抽出および精製した。褥瘡様皮膚潰瘍形成過程の collagen α_1 (I)、collagen α_1 (IV)、laminin-5 α_3 、MMP-2、MMP-3、MMP-9 および GAPDH の mRNA を RT-PCR 法で増幅し、各サンプルをアガロース電気泳動後、Kodak 1D 3.5 にてバンド解析を行なった。GAPDH を内標準としてその比を数値化し、褥瘡様皮膚潰瘍面積との相関関係を解析した (n=17)。

第四節 考察

本研究において、坐骨神経を切除することにより、マウス踵部位に、褥瘡様皮膚潰瘍モデルを作製し、この褥瘡様皮膚潰瘍部位に多数の有核細胞を HE 染色で確認した。これらの細胞は、褥瘡様皮膚潰瘍部位に浸潤した炎症細胞であることが考えられる。この所見は、Peirce らの虚血圧迫モデルや Manley らの神経切除モデルと類似している^{14,15}。また、本研究では、褥瘡臨床像として認められるような、表皮の肥厚、炎症細胞の浸潤、創部への血管新生が認められた。さらに、坐骨神経切除後、経日的に潰瘍が発症し、同時に I 型コラーゲン (collagen α_1 (I))、IV 型コラーゲン (collagen α_1 (IV))、ラミニン 5 (laminin-5 α_3)、MMP-2、MMP-3 および MMP-9 の mRNA 発現は増加した。これらの結果は、このモデルの褥瘡様皮膚潰瘍の程度を創部の面積を測定することによって評価できることを示している。しかしながら、トロポエラスチン、フィブリリン、フィブロネクチンの各 mRNA 発現は増加しなかった (データ未掲載)。

創傷は、炎症、上皮再形成、血管新生、リモデリングといった複雑な過程を経て治癒に至る^{2,16}。一方、結合組織成分の IV 型コラーゲンとラミニン 5 を含む基底膜は、上皮細胞下にあり上皮の組織形態を保持する役割を果たしている¹⁷。また、ラミニン 5 は、IV 型コラーゲンに結合しており、細胞接着、細胞分化、細胞増殖、基底膜の構造保持に重要な役割を果たしている。最近の研究では、上皮細胞の遊走や増殖にはラミニン 5 が重要な役割を担っていることが明らかとなっている^{10,18}。しかしながら本研究における褥瘡様皮膚潰瘍モデルマウスでは、ラミニン 5 よりも IV 型コラーゲンの mRNA 発現が増加していた。これは、褥瘡様皮膚潰瘍の形成には IV 型コラーゲンのリモデリングが関与している可能性を示している。

基底膜構成成分の分解調節は、上皮化や血管新生のための細胞遊走や細胞増殖に必要であると考えられている。また、創傷治癒における上皮再形成時には、MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9、MMP-10 が増加するという報告もある^{4,19}。近年、MMP は創傷治癒に重要な役割を担うが、過剰な MMP 活性は慢性潰瘍を引き起こすという報告

がある⁴⁻⁶。本研究において褥瘡様皮膚潰瘍の発症に伴い、MMP-2 および MMP-9 活性の上昇を認めた。これらの結果は、褥瘡様皮膚潰瘍発症に伴う炎症により MMP 活性が上昇したことを示唆している。本研究ではサイトカインの発現を検討してはいないが、本研究の結果は、MMP の発現を促進する様々なサイトカインが MMP の発現を過剰にした可能性を示唆している。

本研究では、collagen α_1 (I)、collagen α_1 (IV)、laminin-5 α_3 、MMP-2、MMP-3 および MMP-9 の各 mRNA 発現が褥瘡様皮膚潰瘍の発症マーカーとして有用であることを示した。しかしながら、mRNA 発現を調べるには組織採取が必要であり、臨床応用は難しい。従って、臨床応用のためには非侵襲的な褥瘡マーカーが必要であると考えられる。

第四章 褥瘡を例とした細胞外マトリックスによる TGF- β の活性制御機構

第一節 緒言

創傷治癒は、多様な生物反応を伴う組織修復反応である。貯蔵されている増殖因子の適度な活性化は創傷治癒に必要な反応のひとつである。近年、増殖因子が細胞外マトリックスの代謝に関連しており、また、増殖因子が組織固有の方法で細胞外マトリックスに貯蔵され、必要時に活性化されていると考えられている⁷。

TGF- β は、マトリックス産生の調節因子の一つであり、近年、TGF- β の細胞外制御の重要性が注目されている^{8,9}。TGF- β は、large latent complex (LLC)と呼ばれる前駆体として貯蔵されている。TGF- β は、N末端で latency-associated peptide (LAP)と非共有結合し、さらに、LAP は、latent TGF- β binding protein (LTBP)とジスルフィド結合することで LLC を形成している。LLC からの TGF- β の遊離には LLC の酵素分解が必要であるとされている。この LLC の酵素分解は、TGF- β 活性化の第一段階として考えられている^{20,21}。サイトカインの遊離の第二段階として LAP の酵素分解が挙げられる。プラスミンは、TGF- β 活性化酵素であり²²、様々な細胞においてこの作用があると考えられている²³。このように、TGF- β の貯蔵および活性化は、様々な制御機構によって制御されている。

LTBP-1 は、血小板から単離され^{24,25}、その後、線維芽細胞によって産生されることが示された²⁶。LTBP-1, 2, 3, 4 はクローニングされ、LTBP は、Ca 結合 Epidermal Growth Factor 様ドメイン (cb-EGF-like domain) や 8 システインドメインを有する fibrillin と同様の特徴を持つことから fibrillin スーパーファミリーとして区分された^{21,27}。さらに、LTBP-1 は TGF- β と結合し、細胞外マトリックスにおける構造的な役割を担っている可能性もある^{28,29}。

創傷治癒においてプラスミンカスケードは重要なステップの一つである³⁰。プラスミンは LTBP-1 のような細胞外マトリックスを分解する^{26,31,32}。また、マウスにおける

プラスミンカスケードの活性化不全は、創傷治癒の遅延を引き起こす^{33,34}。TGF- β は、プラスミン依存的に潜在型から活性型へ変換され組織修復に重要な役割をすることが報告されているが^{23,35}、その機序は明らかとなっていない。真皮結合組織における TGF- β 活性制御機構を明らかにするためには、真皮における LTBP-1 の組織化、および相互作用の解明が重要であると考えられる。LTBP-1 と TGF- β の分布は、真皮弾性繊維におけるフィブリリンマイクロフィブリルの分布と同様の分布を示す^{36,37}。電子顕微鏡下の観察では、LTBP-1 は、真皮において 10-12 nm のフィブリリンマイクロフィブリル上に局在しており、LTBP-1 の C 末端部位は fibrillin-1 の N 末端部位と結合することが示されている²⁹。これらの報告は、フィブリリンマイクロフィブリルが LTBP-1 との結合を介して TGF- β 活性化を制御していることを示唆している⁸。実際に、マルファン症候群モデルマウスでは、fibrillin-1 変異のために TGF- β シグナル伝達制御不全を引き起こしていることが報告されている^{38,39}。これらは、また、細胞外マトリックスによる TGF- β の空間的、時間的制御が創傷治癒にも必要である可能性を示唆している。

本研究では、真皮マイクロフィブリルから LTBP-1 の酵素による遊離および fibrillin-1 と LTBP-1 の相互作用に着目した。Fibrillin-1 と結合する LTBP-1 のさらに詳細な部位を検討したところ、プラスミン処理によって、真皮マイクロフィブリルから遊離する LTBP-1 断片は、LAP および fibrillin-1 結合部位を含んでいることが明らかとなった。さらに、褥瘡創部表面において、プラスミン処理によって得られる LTBP-1 断片と同様の断片を検出し、同時にプラスミン活性も認められた。このことから、プラスミンによる細胞外マトリックスから遊離する LTBP-1 の断片化は、創傷治癒に重要な要因であると考えられる。

第二節 試薬及び方法

培養細胞

本実験に使用した細胞はヒト腎臓由来細胞(HEK293 細胞)である。細胞は、10% fetal calf serum (FCS) を含む、Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) に penicillin/streptomycin を添加した培地で 37°C、5 %CO₂ の条件で培養した。

使用抗体

本実験で使用した一次抗体を以下に示した。

- Anti-LTBP antibody (mAb388)
- Anti-LTBP antibody (mAb75G)
- Anti-Fibrillin-1 antibody (mAb69)
- Anti-Fibrillin-1 antibody (mAb78)
- Anti-Fibrillin-1 antibody (pAb9543)
- Anti-Fibronectin antibody (mAb875A51)
- Anti-plasmin/plasminogen antibody (mAb2596)

リコンビナント LTBP-1 断片の作製

Figure 1 で示したように LTBP-1 の short form (LTBP-1S) に存在する C 末端領域ペプチド (Arg1181 - Val1334) に相当する rL1P、および LTBP-1 の中間領域ペプチド (Asp834 - Phe1139) である rL1G を作製するために pCEPSP-rL1K²⁹ および pCEPSP-rL1M をそれぞれクローンとして RT-PCR 法を用い遺伝子を増幅した。使用したプライマーは、センスプライマーの 5'末端に *NheI* 制限酵素サイトをアンチセンスプライマーの 3'末端には 6 ヒスチジン残基、ストップコドン、さらに *XhoI* 制限酵素サイトを付加した。以下にその配列を記す。

rL1P センスプライマー；

5'-AGCTGCTAGCACGACCGGCTGAGTCAAACGAAC-3'

rL1P アンチセンスプライマー；

5'-GACTCTCGAGTCAATGATGATGATGATGATGCACACAGGTCATCTTGGCCGTATC
-3'

rL1G センスプライマー

5'-GACTGCTAGCAGATATCAATGAATGCTTGGAG-3'

rL1G アンチセンスプライマー

5'-CTCTCGAGTCAATGATGATGATGATGATGAAAGCACTGCAGTTTCACAGG-3'

NheI および *XhoI* 制限酵素処理により得られた rL1P、rL1G 遺伝子断片を BM40/SPARC シグナルペプチドを含む pCEP/γ2III4 に導入した。得られたベクターを HEK293 細胞にリポフェクションすることにより rL1P および rL1G 安定発現細胞株を作製した。これらの細胞から得た無血清培養上清中のリコンビナントタンパク質を DEAE 陰イオン交換セファロースカラムクロマトグラフィーおよび HisTrap キレートカラムを用い精製した⁴⁰。作製したリコンビナント rL1P および rL1G、さらに磯貝博士から譲り受けたリコンビナント rL1K および rL1M を SDS-PAGE 後、クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色および mAb388 および mAb75G を用いた Immunoblot により抗体エピトープマッピングを行った。

LTBP-1 の fibrillin-1 への結合部位の同定

LTBP-1 と fibrillin-1 との結合部位を同定するため ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) を行った。96 穴プレートに精製した LTBP-1 ペプチド (rL1M, rL1K, rL1P) を 50nM となるように炭酸バッファー (pH 9.2) に溶解し、100 μ L ずつプレートに添加し、4°C で一晩コートした。コートしたウェルを 5 %スキムミルクを用いて室温で 1 時間ブロッキングした。すでに LTBP-1 と結合することが知られている fibrillin-1 の N 末端のペプチドである rF23 (磯貝博士提供) を 2 mM 塩化カルシウムおよび 2%スキムミルク含有 TBS (pH 8.0) に溶解して各ウェルに添加し、3 時間室温でインキュベートした。TBS (pH 8.0) で各ウェルを洗浄した後、rF23 を認識する mAb2502 を 2%スキムミルク含有 TBS (pH 8.0) で 500 倍に希釈し、室温で 1 時間インキュベートした。再び、TBS で各ウェルを洗浄し、HRP 標識二次抗体を処理し、室温で 1 時間インキュベートした。3, 3'-5, 5'-テトラメチルベンジジン (Roche, Mannheim, Germany)を用いて発色させ、1M H₂SO₄ で反応を停止し、各ウェルの対照波長 600nm、測定波長 450 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

プラスミンによるマイクロフィブリルからの LTBP-1 断片の遊離

褥瘡患者から正常に近い部位の皮膚を採取し、この試験に使用した。このプロトコールは国立長寿医療センター倫理委員会の承認を得て、また、ヘルシンキ宣言に沿って行われた。プラスミン (0 mU/mL, 100 mU/mL, 500 mU/mL) の異なった濃度となるように、2 mM 塩化カルシウム を含有した 50mM の TBS (pH 7.4) に混合した。あらかじめ採取した皮膚を各濃度のプラスミン溶液中で 37°C、3 時間インキュベートしてタンパク質を抽出した。この溶液を 12,000 rpm で遠心分離して上清を採取した。得られた上清を 1.3 %酢酸カリウム含有 95 %エタノールで沈殿させ、SDS-PAGE サンプルバッファーに溶解した。これを 7.5 %アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE で分離し、mAb388 (1:1,000) および mAb75G (1:1,000) を用いてウェスタンブロットを行った。

ヒト褥瘡創傷面浸出液における LTBP-1 断片の検出

褥瘡創面の表面タンパク質を調べるため、以下の方法でサンプル採取およびタンパク質抽出を行った。褥瘡患者の褥瘡創傷面を静かに綿棒で擦り、褥瘡表面サンプルとし、使用するまで-20 °Cで保存した。このプロトコールは国立長寿医療センター倫理委員会の承認を得て、また、すべてのサンプルはインフォームドコンセントをとって採取した。綿棒サンプルにシグマプロテアーゼインヒビターカクテル含有6Mグアニジン塩酸-トリス緩衝液 (pH 7.4) 500 μ Lを加え、4°Cで48時間インキュベートすることでタンパク質を溶出した。得られた溶液を1.3 %酢酸カリウム含有95 %エタノールで沈殿させ、SDS-PAGEサンプルバッファーに溶解した。これを7.5 %アクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEで分離し、mAb388 (1:1,000)、mAb2499 (1:1,000) およびmAb78 (1:1,000)の各抗体を用いてウェスタンブロットを行った。LTBP-1を認識するmAb388 およびフィブロネクチン (fibronectin) を認識するmAb875A51によって得られた、様々な褥瘡創傷面のサンプルのバンドをImageJ 1.40gを用いて解析した。統計解析には、Student's t-testを用いた。

褥瘡創傷面でのプラスミン活性の検出

褥瘡創傷面のプラスミン活性を明らかとするためカゼインザイモグラフィーを行った。褥瘡創傷面から得たタンパク質溶液およびコントロールとしてヒト血漿プラスミン(Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN)を 0.2 %カゼイン(Wako Pure Chemical industries, Ltd., Tokyo, Japan)含有 10 %アクリルアミドゲルを用いて分離した。電気泳動後、ゲルを 2.5 %トライトンX-100 溶液で 1 時間インキュベートし、酵素反応溶液 (50mM トリス緩衝液 pH 7.5) 中で 37°C 一晩インキュベートして酵素反応を行った。創面から抽出したタンパク質を 10%アクリルアミドゲルで分離し、mAb 2596 (1:1,000) を用いてウェスタンブロットを行った。

ヒト褥瘡創面における **fibrillin-1** および **LTBP-1** の局在

Hasegawa らの方法をもとに免疫染色を行った⁴¹。褥瘡患者のポケット部位から得た組織をパラフィン置換し、ブロック化した。このブロックを 5 μ m の厚さに切片化して、二重染色に用いた。得られた切片をメタノールとアセトンで処理し、一次抗体として LTBP-1 は mAb388 (1:50)、fibrillin-1 は pAb9543 (1:50) を処理した。二次抗体としてフルオレセインイソチオシアネート結合抗マウスイムノグロブリン (1:25; Vector Laboratories, Burlingame, CA)、ローダミン結合抗ウサギイムノグロブリン (1:25; Rockland, Gilbertsville, PA).をそれぞれ用い、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 510) にて観察した。

第三節 結果

抗体とリコンビナント LTBP-1 ペプチドの特性

本研究において、作製した LTBP-1S のリコンビナントを使用して、モノクローナル抗体である mAb 75G と mAb 388 のエピトープの決定を試みた。mAb75G のエピトープを決めるために、リコンビナント rL1G を作製した。精製した標品の N 末端配列を調べることにより rL1G であることを確認した (Figure 1)。mAb 75G は、rL1G を認識しないが、rL1M を認識した (Figure 2)。このように、mAb 75G のエピトープは、カルシウム結合 Epidermal growth factor 様ドメイン (cb-EGF-like domain) を含む Figure 1 において破線矢印の部位であることが示された。LTBP-1 の C 末端部位 8 システインドメインおよび cb-EGF-like domain を含むリコンビナント rL1P を作製した。精製した標品の N 末端配列を調べることにより rL1P であることを確認した。Figure 1 で示された rL1P を含む LTBP-1 ペプチドはモノクローナル抗体のエピトープマッピングに使用した (Figure 2)。ヒト線維芽細胞から分泌される LTBP-1 に反応する mAb388 は、LTBP-1 ペプチドである rL1C を認識するが、rL1M および rL1N を認識しなかった (データ未掲載)。さらに mAb388 は rL1K および rL1P を認識することから、この抗体は、LTBP-1 の 3 つ目の 8 システイン部位、および、C 末端 cb-EGF-like domain を認識すると考えられる (Figure 1 および Figure 2)。

LTBP-1 中の Fibrillin-1 結合部位の特定

LTBP-1 の部分ペプチドである rL1K は fibrillin-1 の N 末端ペプチドである rF23 と結合することが以前報告されている²⁹。本研究では、LTBP-1S のポリペプチドである rL1P, rL1K および rL1M と fibrillin-1 (rF23) との結合能の有無を solid phase binding assay 法を用いて検討した。その結果、rL1P は、rL1K に比べて弱いですが、rF23 と結合することが明らかとなった (Figure 3)。また、rL1M には結合活性が認められなかった。

プラスミンによる皮膚真皮からの LTBP-1 断片の遊離

過去の報告において真皮マイクロフィブリル上に LTBP-1 が局在することが明らかとなっているので²⁹、創傷治癒時に産生される生体内プロテアーゼであるプラスミンが真皮結合組織から LTBP-1 を遊離するかどうかを検討した。ウェスタンブロット法を用いて、プラスミン処理により濃度依存的に真皮から LTBP-1 断片が遊離することを示した (Figure 4)。しかしながら、真皮にプラスミン処理を行なっても fibrillin-1 の C 末端を認識する mAb 69 および N 末端を認識する mAb 78 を用いたウェスタンブロット法では、fibrillin-1 断片の遊離を検出することはできなかった。これらの結果は、プラスミンによる真皮からの LTBP-1 の遊離にはフィブリリン線維の分解は必要ではないことを示している。また、プラスミンによって遊離される 140 kDa ほどの LTBP-1 断片は mAb 388 および mAb 75G の両方で認識された (Figure 5)。これは、fibrillin-1 との結合部位を含むと同時に、TGF- β (LAP) 結合部位を含むことを示している。さらに、プラスミン処理をしたサンプルにおいても 200 kDa 付近に薄いバンドが検出された (Figure 5)。このバンドは、ヒト正常皮膚のグアニジン抽出物や、ヒト線維芽細胞の培養上清において得られるバンドと同様のサイズであることから、LTBP-1 の全長であると推測される。しかしながら、グアニジン抽出物において、プラスミン処理によって認められた 140 kDa のバンドが認められなかったことは (Figure 5, lanes 1 and 3)、この 140 kDa の LTBP-1 断片が、抽出過程において非特異的に得られるものではないことを示している。このプラスミンによって得られる LTBP-1 断片のサイズは、過去の細胞を使用した報告と一致している^{28,31,42}。

褥瘡創傷面から得られる LTBP-1 断片とプラスミンにより遊離される LTBP-1 断片との類似性

組織からの TGF- β /LTBP-1 複合体の遊離は創傷治癒に重要であると考えられるので、本研究では、褥瘡創傷面から綿棒で採取したサンプルから LTBP-1 断片の検出を試みた。その結果、mAb 388 を使用したウェスタンブロットにより Figure 6 で認められるように LTBP-1 断片を確認した。褥瘡創傷面から得た LTBP-1 断片は、皮膚からプラスミンによって得た LTBP-1 断片と同様の分子量であった (Figure 6)。プラスミン処理のサンプルと同様に mAb 388 によって認識されるバンドは、mAb 75G によっても認識されるが (データ未掲載)、mAb 246 (anti-LAP) では認識されなかった (データ未掲載)。このことから、褥瘡創傷面から得られた LTBP-1 断片は、mAb 246 が認識するエピトープが失われていることが考えられた。一方、フィブロネクチン (fibronectin) を認識する mAb875A51 を用いたウェスタンブロットでは、分解産物は、薄いバンドが検出されるだけであった。これは、LTBP-1 断片が、フィブロネクチンの分解を伴わずに遊離したものであることを示唆している (Figure 6)。

褥瘡創傷面のプラスミン活性

続いて、カゼインザイモグラフィーを用いて褥瘡創傷面のプラスミン活性を確認した。褥瘡創傷面を綿棒で擦ることにより得られたサンプルのカゼイン分解能は、陽性対照として用いたヒト血漿プラスミンと同様の分子量 80 kDa に認められた (Figure 7a)。MAb2596 を用いたウェスタンブロットでは、ザイモグラフィーによって認められた分解能と同様の分子量 (約 80 kDa) にバンドが検出された (Figure 7b)。これらは、褥瘡創傷面にプラスミン活性があることを示している。また、同じサンプルから得られる LTBP-1 断片は mAb 388 によって認識された (Figure 7c)。

褥瘡創傷部位における肉芽組織中の LTBP-1 の分布

褥瘡創傷面から LTBP-1 断片が得られたので、次に正常真皮および肉芽組織での LTBP-1 の局在について検討した。正常真皮においては、LTBP-1 の分布は fibrillin-1 の分布と類似しており、fibrillin-1 と共局在していた (Figure 8)。一方、肉芽組織においては、LTBP-1 はほとんど fibrillin-1 と共局在せず、さらに、線維パターンを示していなかった。しかし、肉芽組織においても、Fibrillin-1 は部分的に線維パターンを保っていた (Figure 8)。

成長中の肉芽組織および上皮化中の褥瘡創傷部位における LTBP-1 断片の相違

臨床知見と LTBP-1 断片の相関関係を調べるために、様々な褥瘡創傷面から得られるサンプルを解析した。LTBP-1 を認識する mAb 388 およびフィブロネクチン (fibronectin) を認識する mAb 875A51 を用いたウェスタンブロットでは逆の相関が得られた (Figure 9)。統計解析によると、LTBP-1 断片は、成長している肉芽組織を持つ褥瘡創傷面において、上皮化している褥瘡創傷面よりも有意に多く遊離していた。逆に、Figure 8 のような浮腫を伴わない褥瘡創傷面において、LTBP-1 断片は認められなかった。

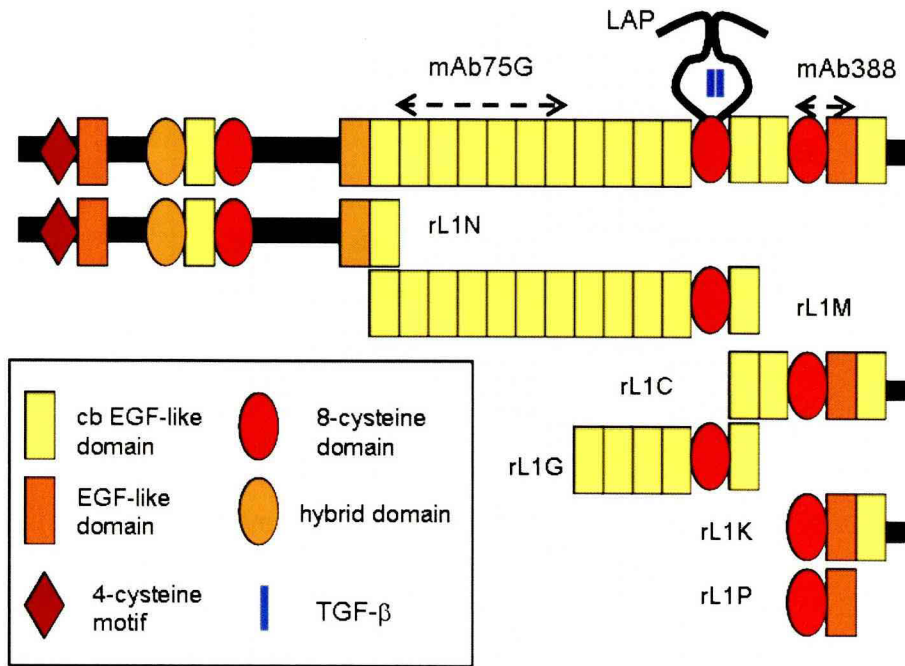


Figure 1 LTBP-1S (LTBP-1 short form) とリコンビナント LTBP-1 ポリペプチドの略図

LTBP-1S (short form) のドメイン構造の略図を示した。リコンビナント LTBP-1 断片は、C 末端部位にヘキサヒスチジンタグ (His tag) を付加し、N 末端部位には BM-40 シグナルペプチドを付加した。BM-40 シグナルペプチドと His tag は簡略化のため図には省略した。以前報告された LTBP-1 ペプチドも記載した。mAb 75G と mAb 388 のエピトープは破線矢印で示した。

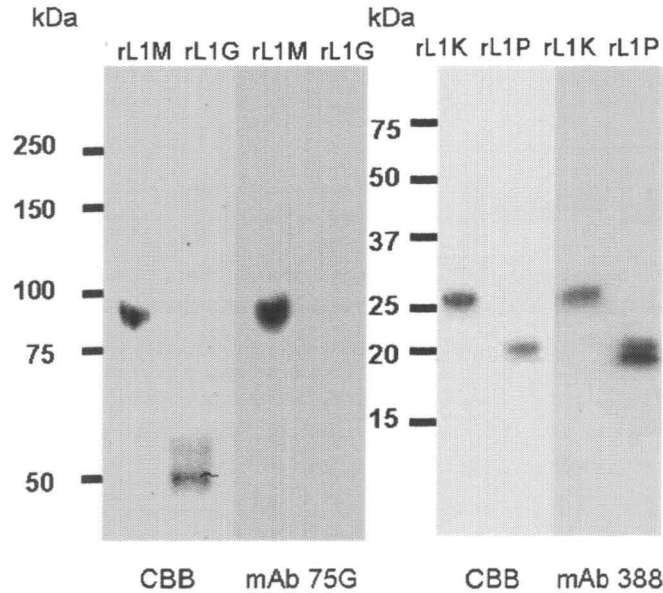


Figure 2 リコンビナント LTBP-1 ポリペプチドの発現と mAb 75G および mAb 388 のエピトープの決定

rL1M, rL1G, rL1K および rL1P は、DEAE 陰イオン交換セファロースカラムおよび HisTrap キレートカラムによって精製した。精製したリコンビナントタンパク質は、SDS-PAGE によって分離し、CBB 染色を行った。ウェスタンブロットでは、mAb 75G は rL1G を認識しないが、rL1M を認識することから、mAb 75G のエピトープは、Figure 1 の破線矢印で示された cb-EGF-like domain の中にあることが示された。また、mAb 388 は、rL1K および rL1P の両方を認識することから、mAb 388 のエピトープは、Figure 1 の破線矢印の部分であることが示された。

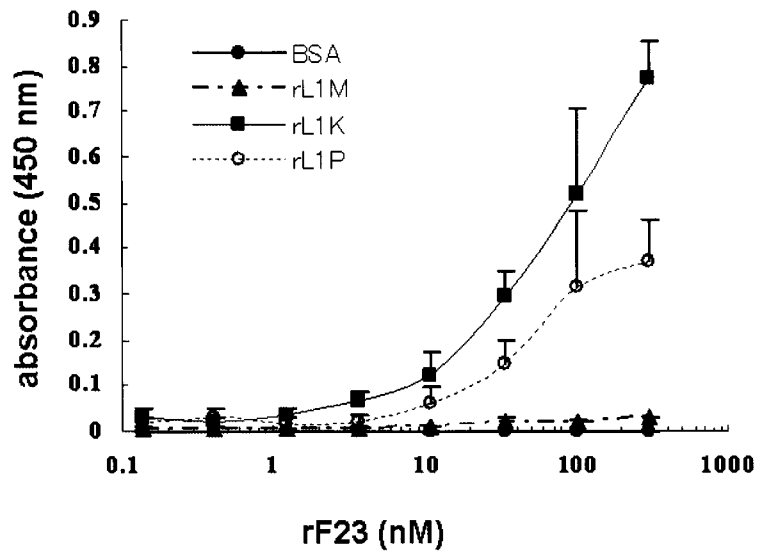


Figure 3 rL1P と rF23 との結合

Solid phase binding assay により、rL1P とリコンビナント fibrillin-1 (rF23) の結合を検討した。過去の報告により LTBP-1C 末端部位のリコンビナントタンパク質である rL1K が rF23 と結合することが示されている²⁹。結合した fibrillin-1 のリガンドは、mAb 2502 によって検出した。ネガティブコントロールとして BSA および LTBP-1 の中間部位のリコンビナントである rL1M を使用した。rF23 は、rL1K および rL1P に結合した。

Means \pm S.E., n=3。

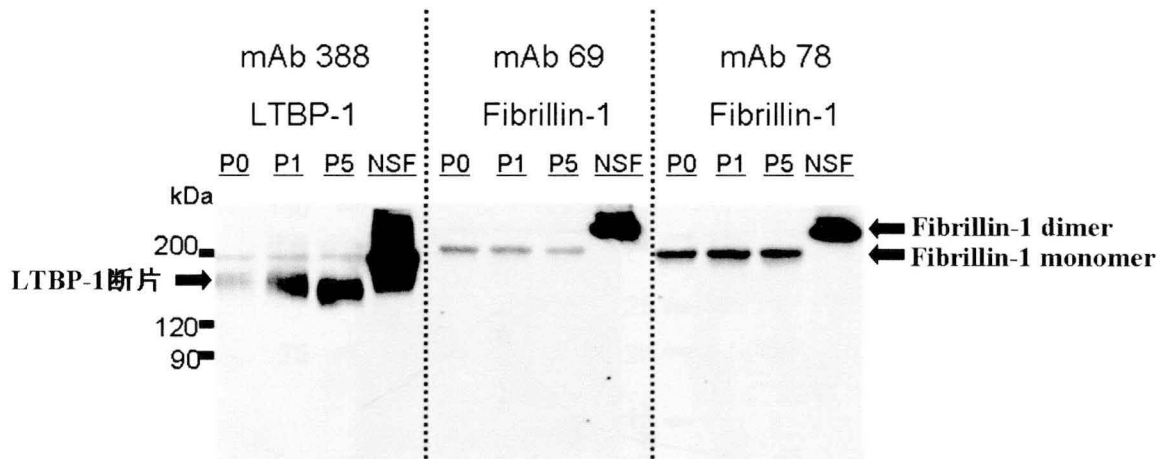


Figure 4 濃度依存的なプラスミン処理による真皮からの LTBP-1 断片の遊離

ヒト正常真皮にプラスミン（0 mU/mL: P0, 100 mU/mL: P1, 500 mU/mL: P5）を処理した。上清を採取し、7.5% SDS-PAGE を行い、LTBP-1 C 末端部位を認識する mAb 388、fibrillin-1 の C 末端部位を認識する mAb 69 および fibrillin-1 の N 末端部位を認識する mAb 78 を用いてウェスタンブロットによって解析した。mAb 388 によって認められる LTBP-1 断片は、プラスミンの濃度依存的に増加するのに対し、fibrillin-1 の断片はプラスミンによって遊離しなかった。NSF: NHDF 培養上清。

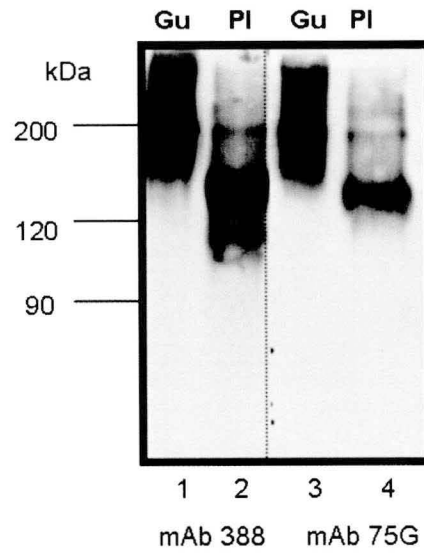


Figure 5 プラスミンによって遊離される LTBP-1 断片の特性

真皮を 6M グアニジン抽出物 (Gu) と真皮をプラスミン処理後に抽出したもの (PI) を SDS-PAGE によって分離した。Gu、PI 共に mAb 388 および mAb 75G によって認識された。

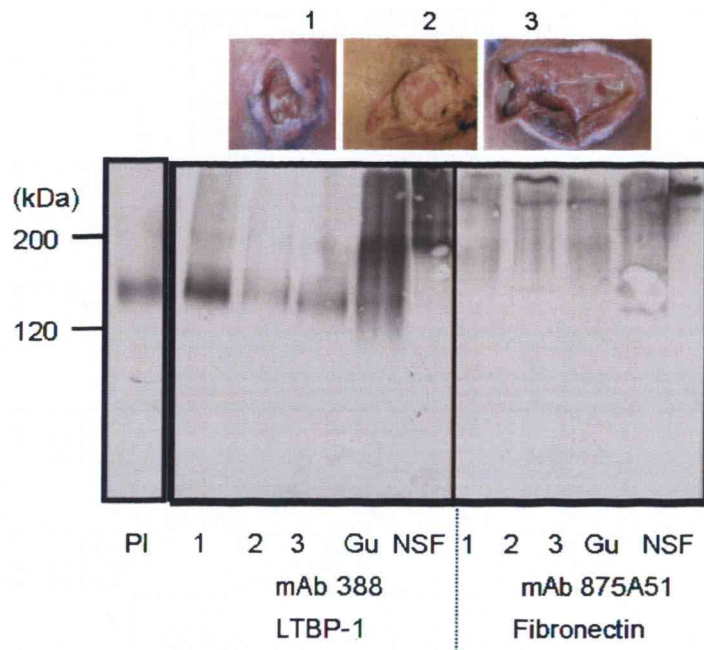


Figure 6 褥瘡創傷面から得られる LTBP-1 断片

mAb 388 を用いたウェスタンブロットの所見から、褥瘡創傷面から得られた LTBP-1 断片はヒト正常真皮からプラスミン処理により得られた LTBP-1 断片と同様の分子量であった。NHDF 細胞の培養上清から得られた fibronectin をコントロールとして比較すると、褥瘡創傷面からの fibronectin のバンドは大きなサイズでありインタクトのものであることが考えられる。褥瘡創傷面の臨床的な特徴は Figure の上部 (1、2、3) に示した。これらの褥瘡は、肉芽組織を含んでいる。

創部の写真番号と lane 番号は一致している。PI: 真皮プラスミン処理、Gu: 真皮 6M グアニジン抽出物、NSF: NHDF 培養上清。

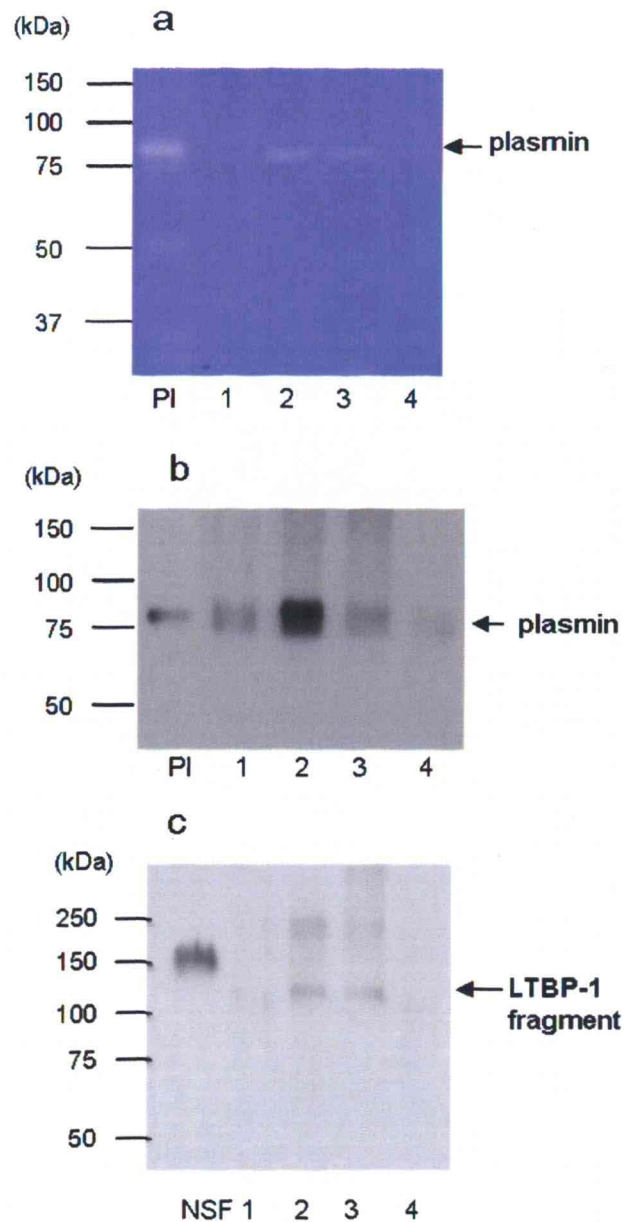


Figure 7 カゼインザイモグラフィーとウェスタンブロットによる褥瘡創傷面からのプラスミン活性

褥瘡創傷面から得たサンプルをカゼインザイモグラフィーによって解析したところ約 80 kDa にプラスミン活性が認められた (a)。抗プラスミン (anti-plasmin) 抗体を用いたウェスタンブロットでも同様に約 80 kDa にバンドが認められた (b)。カゼインザイモグラフィーとウェスタンブロットのポジティブコントロールとしてヒト血漿プラスミン (PI) を使用した。対応するサンプルを用いて mAb 388 によって LTBP-1 断片を検出した (c)。NSF: NHDF 細胞培養上清。

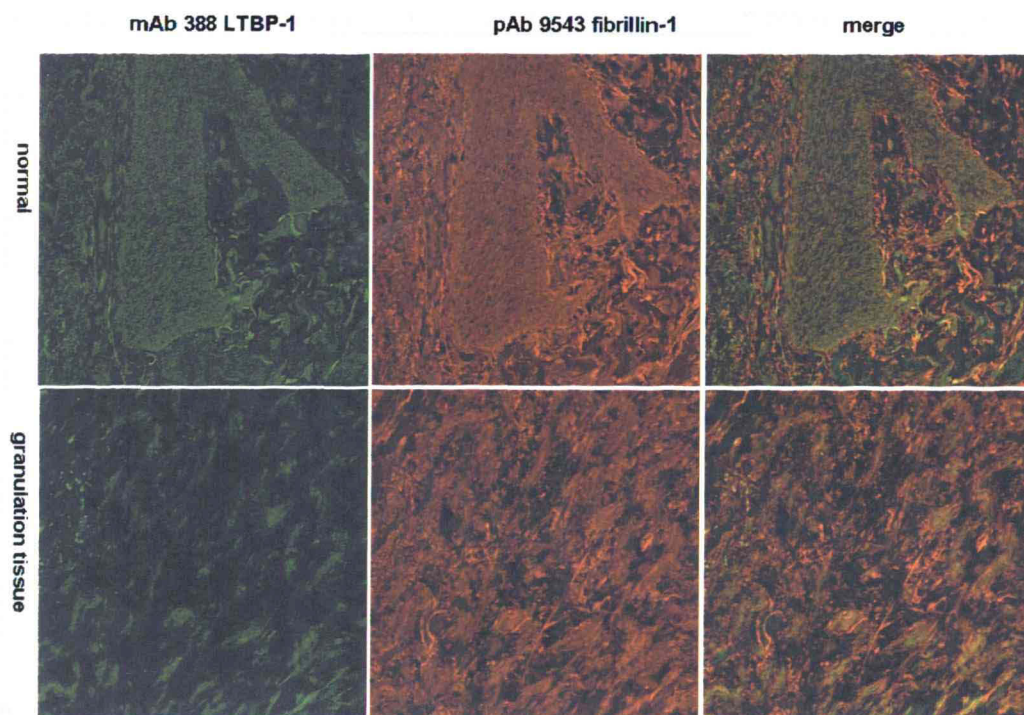


Figure 8 ヒト正常真皮および肉芽組織における LTBP-1 の局在

褥瘡のポケット部位を用いて蛍光免疫染色を行った。正常真皮 (Figure 上部) において、LTBP-1 は fibrillin-1 と共局在していた。しかしながら、肉芽組織を含む褥瘡創傷部位 (Figure 下部) において、LTBP-1 はほとんど局在しておらず、線維パターンを消失していた。Bar=100 μ m。

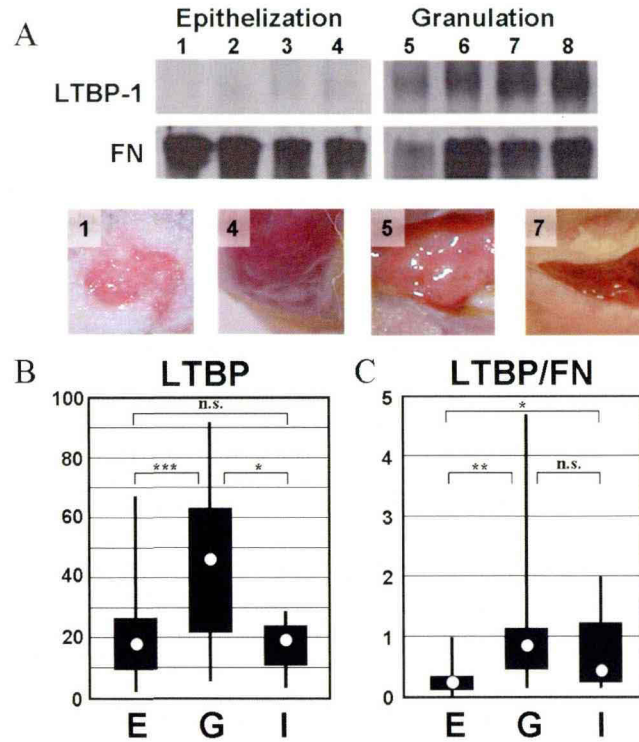


Figure 9 成長中の肉芽組織を有する褥瘡創傷面において **LTBP-1** 断片は特異的に検出される

褥瘡創傷面における LTBP-1 断片 (LTBP) と fibronectin (FN) の特性を Figure 6 において示した。代表的な上皮化している褥瘡創傷面 (Epithelization, 1-4) からのサンプルと成長中の肉芽組織 (Granulation, 5-8) を有する褥瘡創傷面から得たサンプルのウェスタンブロットの結果を A に示した。ブロットのサンプル番号と褥瘡創傷部位の写真の番号は一致している。LTBP-1 のバンド解析を行ない (B)、褥瘡創傷面における fibronectin と LTBP-1 断片の発現の比を boxplot にて示した (C)。Box の上部と下部の限界値はそれぞれ 75%と 25%を示している。また、それぞれの中間値は白丸で示した。Box から延びる垂線は、それぞれの群の最大値と最小値を示している。

E, epithelizing wounds (上皮化初期創) (n=19); G, growing granulation tissues (肉芽形成初期創) (n=36); I, various impaired wounds (治癒不全創) (n=7). Significant differences among classes means are indicated; *, $P < 0.01$; **, $P < 0.005$; ***, $P < 0.0005$; n.s., not significant.

第四節 考察

TGF- β は、fibrillin-1 と LTBP-1 によって複合体を形成し、真皮結合組織中に潜在型として貯蔵されている^{29,37}。最近の研究では、LTBP-1 に結合し、真皮中に潜在型として貯蔵された TGF- β が創傷治癒時に遊離し、利用されることも解明されつつある。本研究では、リコンビナント LTBP-1 ポリペプチド(rL1P および rL1G)を用いて、fibrillin-1 結合サイトおよび LTBP-1 の抗体 (mAb 75G および mAb388) のエピトープを解析した。その結果、LTBP-1 の 3 番目のシステインドメインを有する rL1P が fibrillin-1 に結合することが明らかとなった。この結果は線維芽細胞により産生された細胞外マトリックスを使用した過去の研究と一致した⁴³。また、rL1P は mAb 388 エピトープを含み、mAb 388 により認識され、さらに fibrillin-1 に結合した。これは、作製したリコンビナントの rL1P が安定した構造を保っていることを示唆している。一方、mAb 75G によって認識されるエピトープは、cb-EGF-like domain に存在することも明らかとなった。

次に、本研究では、ヒト正常真皮をプラスミン処理することによって約 140kDa の LTBP-1 断片が遊離し、その断片が mAb 75G および mAb 388 のエピトープを含んでいることを示した。このことは、線維芽細胞をプラスミンで処理すると、120~160 kDa の LTBP-1 断片が検出される報告とも一致した^{26,28,31,32,42}。本研究において、プラスミン処理によって真皮から得られる LTBP-1 断片の分子量は、細胞培養研究の過去の報告と一致した。さらに、mAb 75G および mAb 388 を使用したウェスタンブロットにより、プラスミンによって真皮から遊離する LTBP-1 断片は、TGF- β /LAP 結合部位および fibrillin-1 の結合部位の近傍を含んでいることを明らかにした。また、プラスミンによる真皮からの LTBP-1 断片の遊離は、fibrillin-1 の分解を伴わないことも示した。これらの結果は、プラスミンによる真皮からの LTBP-1 断片の遊離にマイクロフィブリルの分解を必要としないことを示唆している。

マルファン症候群モデルマウスでは、fibrillin-1 を変異させることで LTBP-1 と

fibrillin-1 との相互作用が破綻し、その結果 TGF- β の活性化制御が失われる²⁹。また、マルファン症候群での肺および動脈の表現型の変化は、TGF- β 活性制御の破綻によると説明されている^{38,39}。本研究の結果は、これらの過去の報告と一致する。本研究の結果より、プラスミンによる TGF- β の活性化には fibrillin-1 ではなく、LTBP-1 の分解を必要とすることから (Figure 4)、TGF- β 活性化過程における fibrillin-1 の分解は、マルファン症候群で認められるような、異常な TGF- β の活性化や TGF- β シグナルの制御不能を引き起こす可能性があるかと推測される。

本研究の結果は、small latent TGF- β complex (SLC) として結合しているべき、特異的な LTBP-1 断片が、創傷治癒過程において組織から遊離するという最初の報告である。従って、特異的な LTBP-1 断片およびプラスミン活性が、褥瘡創傷面からの抽出物に認められたことは、細胞外マトリックスからの LTBP-1 の遊離が創傷治癒において生理学的に重要なプロセスであることを示唆している。一方、プラスミノゲン欠損マウスでは、創傷治癒の遅延が認められる^{33,34,44}。また、コラーゲンゲル内での線維芽細胞の培養において、プラスミンは TGF- β 活性化および創部の収縮を増強することが報告されている^{23,45}。このように、プラスミンによる真皮からの LTBP-1 断片の遊離を介した TGF- β 活性化は、創傷治癒過程に重要な因子と考えられる。

褥瘡創傷部位において、蛍光免疫染色では、LTBP-1 は非常に弱いシグナルであり、線維の形態をとっていなかったが、正常真皮において、LTBP-1 と fibrillin-1 とは明らかな共局在を示し、複合体の形成が示唆された。さらに、創傷治癒において、肉芽組織形成には TGF- β による細胞外マトリックスの産生が必須である。また、線維芽細胞は、TGF- β により筋線維芽細胞へと形質転換することによって創傷部収縮能を保ち、上皮細胞の遊走が阻害されることが知られている。LTBP-1 断片が、肉芽組織形成時に増加し、上皮化初期の組織において減少したことは、創傷治癒過程に適した反応であると考えられる。

以上のことから、本研究では、創傷治癒において、真皮に貯蔵された large latent complex (LLC) は、プラスミンをはじめとする酵素による TGF- β の活性化の過程で

遊離することが示唆された。また、LTBP による真皮中の細胞外マトリックスによる TGF- β 活性化の制御は、創傷治癒において生理的に重要であると考えられる。さらに、褥瘡創傷面の LTBP-1 断片の解析は、褥瘡治癒の有用なマーカーとなりうることが示唆された。

第五章 総括および結論

本研究において以下のことが明らかになった。

1. 坐骨神経切除により褥瘡様皮膚潰瘍マウスモデルを作製することができ、このモデルを用いた mRNA 解析により、細胞外マトリックス構成成分が褥瘡様皮膚潰瘍のバイオマーカーとして使用できる可能性が示唆された。
2. 真皮に貯蔵された TGF- β の活性機構の一部を明らかとし、また、ヒト褥瘡創傷面の表面タンパク解析により、褥瘡創傷面から得られる LTBP-1 断片が、褥瘡治療のマーカーになることが示唆された。

褥瘡の基礎研究は、モデル動物が少ないことから現在まであまり行なわれていないが、本研究において、坐骨神経を切除し、自由歩行させることにより、新たに褥瘡様皮膚潰瘍マウスモデルを作製することが可能となった。本研究において示していないが、本研究室では、ヒト褥瘡創傷面から認められる LTBP-1 断片およびプラスミン活性を、坐骨神経切除によるマウス褥瘡様皮膚潰瘍モデルの潰瘍創傷面においても検出しており、ヒトの褥瘡と褥瘡様皮膚潰瘍マウスモデルの類似性も確認している（データ未掲載）。また、褥瘡様皮膚潰瘍マウスモデルにおける mRNA 発現解析およびヒトの褥瘡創傷面からの表面タンパク解析により、細胞外マトリックスが褥瘡発症および治癒の指標となることが示唆された。

現在、褥瘡治療の際には、DESIGN 分類による肉眼的な診断および治療法の決定を行なっているが、ヒト褥瘡創傷面の表面タンパク発現解析を行なうことで、より効果的な治療法の選択が簡易になると考えられる。また、坐骨神経切除による褥瘡様皮膚潰瘍モデルを使用することは、褥瘡発症および治癒における生体反応の解明、褥瘡予防および治療のための新たな薬物スクリーニングに寄与するものと考えられる。

謝辞

本研究に際し、終始御指導と御鞭撻を賜りました星薬科大学臨床化学教室 瀬山義幸教授に謹んで心より感謝致します。

本論文の作製に際し、御校閲を賜りました星薬科大学薬品毒性学教室 鈴木勉教授、及び、微生物学教室 辻勉教授に謹んで心より感謝致します。

本研究に際し、終始懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました星薬科大学臨床化学教室 輪千浩史准教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究に際し、御助言並びに御協力いただきました、愛知県立看護大学栄養代謝学教室 米田雅彦教授、国立長寿医療センター先端薬物療法科医長 磯貝善蔵先生に深く感謝致します。

本研究に際し、御協力いただきました、栗原慶太薬学修士、藤沢茜薬学士、小林恭子薬学修士、飯島彩未薬学士、比嘉久美子薬学士、前島孝治薬学士、古川梓卒論生並びに星薬科大学臨床化学教室諸氏に深く感謝致します。

参考文献

- (1) Midwood, K. S.; Williams, L. V.; Schwarzbauer, J. E. *Int J Biochem Cell Biol* **2004**, *36*, 1031-7.
- (2) Singer, A. J.; Clark, R. A. *N Engl J Med* **1999**, *341*, 738-46.
- (3) Rundhaug, J. E. *J Cell Mol Med* **2005**, *9*, 267-85.
- (4) Saarialho-Kere, U. K. *Arch Dermatol Res* **1998**, *290 Suppl*, S47-54.
- (5) Ladwig, G. P.; Robson, M. C.; Liu, R.; Kuhn, M. A.; Muir, D. F.; Schultz, G. S. *Wound Repair Regen* **2002**, *10*, 26-37.
- (6) Kalebic, T.; Garbisa, S.; Glaser, B.; Liotta, L. A. *Science* **1983**, *221*, 281-3.
- (7) Ramirez, F.; Rifkin, D. B. *Matrix Biol* **2003**, *22*, 101-7.
- (8) Kaartinen, V.; Warburton, D. *Nat Genet* **2003**, *33*, 331-2.
- (9) ten Dijke, P.; Arthur, H. M. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, *8*, 857-69.
- (10) Momota, Y.; Suzuki, N.; Kasuya, Y.; Kobayashi, T.; Mizoguchi, M.; Yokoyama, F.; Nomizu, M.; Shinkai, H.; Iwasaki, T.; Utani, A. *J Recept Signal Transduct Res* **2005**, *25*, 1-17.
- (11) Gerwins, P.; Skoldenberg, E.; Claesson-Welsh, L. *Crit Rev Oncol Hematol* **2000**, *34*, 185-94.
- (12) Han, Y. P.; Tuan, T. L.; Hughes, M.; Wu, H.; Garner, W. L. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 22341-50.
- (13) Turinsky, J. *Am J Physiol* **1986**, *251*, R165-73.
- (14) Peirce, S. M.; Skalak, T. C.; Rieger, J. M.; Macdonald, T. L.; Linden, J. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2001**, *281*, H67-74.
- (15) Manley, M. T.; Darby, T. *Arch Phys Med Rehabil* **1980**, *61*, 171-7.
- (16) Martin, P. *Science* **1997**, *276*, 75-81.
- (17) Masunaga, T. *Connect Tissue Res* **2006**, *47*, 55-66.

- (18) Decline, F.; Rousselle, P. *J Cell Sci* **2001**, *114*, 811-23.
- (19) Rogers, A. A.; Burnett, S.; Moore, J. C.; Shakespeare, P. G.; Chen, W. Y. *Wound Repair Regen* **1995**, *3*, 273-83.
- (20) Annes, J. P.; Munger, J. S.; Rifkin, D. B. *J Cell Sci* **2003**, *116*, 217-24.
- (21) Rifkin, D. B. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 7409-12.
- (22) Odekon, L. E.; Blasi, F.; Rifkin, D. B. *J Cell Physiol* **1994**, *158*, 398-407.
- (23) Sato, Y.; Rifkin, D. B. *J Cell Biol* **1989**, *109*, 309-15.
- (24) Miyazono, K.; Hellman, U.; Wernstedt, C.; Heldin, C. H. *J Biol Chem* **1988**, *263*, 6407-15.
- (25) Kanzaki, T.; Olofsson, A.; Moren, A.; Wernstedt, C.; Hellman, U.; Miyazono, K.; Claesson-Welsh, L.; Heldin, C. H. *Cell* **1990**, *61*, 1051-61.
- (26) Taipale, J.; Koli, K.; Keski-Oja, J. *J Biol Chem* **1992**, *267*, 25378-84.
- (27) Handford, P. A.; Downing, A. K.; Reinhardt, D. P.; Sakai, L. Y. *Matrix Biol* **2000**, *19*, 457-70.
- (28) Dallas, S. L.; Miyazono, K.; Skerry, T. M.; Mundy, G. R.; Bonewald, L. F. *J Cell Biol* **1995**, *131*, 539-49.
- (29) Isogai, Z.; Ono, R. N.; Ushiro, S.; Keene, D. R.; Chen, Y.; Mazzieri, R.; Charbonneau, N. L.; Reinhardt, D. P.; Rifkin, D. B.; Sakai, L. Y. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 2750-7.
- (30) Li, W. Y.; Chong, S. S.; Huang, E. Y.; Tuan, T. L. *Wound Repair Regen* **2003**, *11*, 239-47.
- (31) Taipale, J.; Miyazono, K.; Heldin, C. H.; Keski-Oja, J. *J Cell Biol* **1994**, *124*, 171-81.
- (32) Dallas, S. L.; Rosser, J. L.; Mundy, G. R.; Bonewald, L. F. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 21352-60.
- (33) Lund, L. R.; Romer, J.; Bugge, T. H.; Nielsen, B. S.; Frandsen, T. L.; Degen, J. L.; Stephens, R. W.; Dano, K. *Embo J* **1999**, *18*, 4645-56.
- (34) Lund, L. R.; Green, K. A.; Stoop, A. A.; Ploug, M.; Almholt, K.; Lilla, J.; Nielsen, B.

- S.; Christensen, I. J.; Craik, C. S.; Werb, Z.; Dano, K.; Romer, J. *Embo J* **2006**, *25*, 2686-97.
- (35) Sato, Y.; Tsuboi, R.; Lyons, R.; Moses, H.; Rifkin, D. B. *J Cell Biol* **1990**, *111*, 757-63.
- (36) Karonen, T.; Jeskanen, L.; Keski-Oja, J. *Br J Dermatol* **1997**, *137*, 51-8.
- (37) Raghunath, M.; Unsold, C.; Kubitscheck, U.; Bruckner-Tuderman, L.; Peters, R.; Meuli, M. *J Invest Dermatol* **1998**, *111*, 559-64.
- (38) Neptune, E. R.; Frischmeyer, P. A.; Arking, D. E.; Myers, L.; Bunton, T. E.; Gayraud, B.; Ramirez, F.; Sakai, L. Y.; Dietz, H. C. *Nat Genet* **2003**, *33*, 407-11.
- (39) Habashi, J. P.; Judge, D. P.; Holm, T. M.; Cohn, R. D.; Loeys, B. L.; Cooper, T. K.; Myers, L.; Klein, E. C.; Liu, G.; Calvi, C.; Podowski, M.; Neptune, E. R.; Halushka, M. K.; Bedja, D.; Gabrielson, K.; Rifkin, D. B.; Carta, L.; Ramirez, F.; Huso, D. L.; Dietz, H. C. *Science* **2006**, *312*, 117-21.
- (40) Reinhardt, D. P.; Keene, D. R.; Corson, G. M.; Poschl, E.; Bachinger, H. P.; Gambee, J. E.; Sakai, L. Y. *J Mol Biol* **1996**, *258*, 104-16.
- (41) Hasegawa, K.; Yoneda, M.; Kuwabara, H.; Miyaishi, O.; Itano, N.; Ohno, A.; Zako, M.; Isogai, Z. *J Invest Dermatol* **2007**, *127*, 1657-63.
- (42) Taipale, J.; Lohi, J.; Saarinen, J.; Kovanen, P. T.; Keski-Oja, J. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 4689-96.
- (43) Unsold, C.; Hyytiainen, M.; Bruckner-Tuderman, L.; Keski-Oja, J. *J Cell Sci* **2001**, *114*, 187-197.
- (44) Romer, J.; Bugge, T. H.; Pyke, C.; Lund, L. R.; Flick, M. J.; Degen, J. L.; Dano, K. *Nat Med* **1996**, *2*, 287-92.
- (45) Pins, G. D.; Collins-Pavao, M. E.; Van De Water, L.; Yarmush, M. L.; Morgan, J. R. *J Invest Dermatol* **2000**, *114*, 647-53.