

氏名（本籍）	水野晃治	（愛知県）
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	甲第135号	
学位授与年月日	平成21年3月16日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者	
学位論文の題名	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	

論文審査委員	主査	教授	瀬山義幸
	副査	教授	辻勉
	副査	教授	鈴木勉

論文内容の要旨

高齢者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、患者の QOL を悪化する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と考えられているが、褥瘡のモデル動物および臨床的なマーカーの不足などから褥瘡の基礎研究はあまり進んでいない。

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。すなわち、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 matrix metalloproteinases (MMPs) の活性も亢進し、血管新生を促進する。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。そこで、神経変性患者において褥瘡の発症率が高いことに着目し、マウスの坐骨神経を切除した後、自由歩行させることでマウス後肢踵部位に褥瘡様皮膚潰瘍を作製した。この褥瘡様皮膚潰瘍モデルを用いて、創傷治癒時に重要とされる細胞外マトリックスの代謝について検討した。

マウスの坐骨神経を切除し、自由歩行させることにより、経日的に褥瘡様皮膚潰瘍面積が拡大することが明らかとなった。また、褥瘡様皮膚潰瘍部位について HE 染色を行なったところ、骨直下に形成される潰瘍であること、表皮の肥厚、潰瘍部位内部の出血および多数の有核細胞の存在が確認され、褥瘡の臨床像に類似した皮膚潰瘍であると判断した。潰瘍部位周辺の一定部位を採取後、これをホモジネートしたサンプルを用いて、ゼラチンザイモグラフィによる MMP-2 および MMP-9 の活性を測定した。また、全 RNA を抽出し、collagen α_1 (I)、collagen α_1 (IV)、laminin-5 α_3 、MMP-2、MMP-3 および MMP-9 の各種 mRNA 発現を PCR 法で測定した。その結果、潰瘍部位では潰瘍形成初期から MMP-9 活性の上昇が認められた。HE 染色の結果からこの MMP-9 活性上昇は、炎症細胞の浸潤により引き起こされることが示唆された。これら所見は、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た。また、慢性潰瘍部位では、MMPs の発現亢進が認められるという報告や MMP と tissue inhibitor matrix metalloproteinase (TIMP) バランスの崩壊が認められるという報告があることから本モデルが慢性皮膚潰瘍モデルとして有用であることが示唆された。さらに、MMP-2、MMP-9 の活性上昇および collagen α_1 (IV) の mRNA 発現変動が顕著であったことから、基底膜成分のリモデリングが褥瘡様皮膚潰瘍の発症に関与していることが示唆された。また、collagen α_1 (I)、collagen α_1 (IV)、laminin-5 α_3 、MMP-2、MMP-3 および MMP-9 の mRNA 発現と潰瘍面積との相関関係を検討したところ、経日的な潰瘍面積の拡大と共に、collagen α_1 (I)、collagen α_1 (IV)、MMP-2、MMP-3 および MMP-9 の mRNA 発現は増加し、有意な相関関係 ($r=0.8$ 程度) が認められた。これらの結果から、collagen α_1 (I)、collagen α_1 (IV)、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と考えられた。しかしながら、mRNA 発現の検討には、組織採取が必須であり、臨床応用をすることは難しいことから、非侵襲的な褥瘡部位の評価マーカーが必要であることが考えられる。現在、褥瘡の臨床的な評価として DESIGN 分類が用いられているが、これは褥瘡の深さ、浸出液の有無、大きさ、感染の有無、肉芽の性状、壊死の有無、ポケットの有無を総合的に点数化して評価するため、褥瘡の多様性を正確に反映することは難しいという問題がある。

近年、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ることが報告された。細胞外マトリックス産生の調節因子の一つとして注目されている TGF- β は、large latent complex (LLC) と呼ばれる前駆体として貯蔵され、N 末端領域で 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 TGF- β を遊離するカスケードの一つとして、プラスミンによる LLC の酵素分解がある。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、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。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。また、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、その機序は明らかとなっていない。LTBP は、Ca 結合 Epithelial 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ている。そこで、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、褥瘡治癒時の TGF- β 活性化機序の解明および褥瘡治癒時に得られる LTBP-1 断片の臨床的応用について検討した。

動物細胞で発現した LTBP-1 を用いて fibrillin-1 結合部位とモノクローナル抗体のエピトープを同定した。正常真皮に貯蔵された TGF- β /LTBP-1 複合体は、プラスミンの消化によって fibrillin-1 分子全体の分解を伴わずにマイクロフィブリルから遊離された。その遊離した LTBP-1 断片は、TGF- β 結合ドメインと fibrillin-1 との結合部位を含んでいた。さらに褥瘡部位においても正常皮膚のプラスミン消化断片と同じ LTBP-1 断片が検出され、褥瘡部位からプラスミン活性も認められた。正常真皮においては fibrillin-1 と LTBP-1 の共存が

観察されるが、肉芽組織中では LTBP-1 の分布は減少し、線維性の形態パターンを失っていた。また、褥瘡部位から検出される LTBP-1 断片は、肉芽組織形成時では増加するが、上皮化の初期において減少した。

以上のことから、創傷治癒において、真皮に貯蔵された large latent complex (LLC) は、不活性型から活性型の TGF- β に変換される過程で、プラスミンをはじめとする酵素による限定分解を受け、遊離されることが示唆された。従って、LTBP-1 による TGF- β 活性化の制御は、創傷治癒において重要であると考えられ、褥瘡表面の 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可能性が考えられた。

本研究では、褥瘡様皮膚潰瘍モデルにおいて細胞外マトリックスの遺伝子発現が褥瘡マーカーとして有用である可能性を示し、また、褥瘡創部における LTBP-1 断片を利用することが、詳細な褥瘡診断応用につながることを示した。また、坐骨神経切除による褥瘡様皮膚潰瘍モデルにおいても、褥瘡患者と同様に LTBP-1 断片およびプラスミン活性が認められており、このモデルを利用することは、褥瘡の新規治療薬の開発および治療方針の確立に寄与するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

褥瘡を含む創傷治癒は、炎症、肉芽形成、組織再構築などの再生機構により行われる。すなわち、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。損傷を受けた細胞や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を始め炎症細胞が遊走し、異物を分解、貪食する。同時に matrix metalloproteinases (MMPs) は活性化され、このため、細胞外マトリックスの分解や血管新生が促進する。また、サイトカインや増殖因子による調節を受けた線維芽細胞は、細胞外マトリックスを合成し、新生血管の多い肉芽形成を促進する。細胞外マトリックスを足場に上皮細胞による上皮形成やコラーゲンの再構築がなされ創傷が治癒すると推測される。そこで、本論文では、皮膚潰瘍における細胞外マトリックス代謝を検討すると同時に細胞外マトリックスが創傷治癒のマーカーになりうるかを検討した。

マウスの坐骨神経を切除し、自由に歩行させることにより、後肢踵部位に褥瘡様皮膚潰瘍を作成した。この皮膚潰瘍では潰瘍面積が経日的に拡大し、表皮の肥厚、潰瘍部位内部の出血や多数の有核細胞の存在が確認され、褥瘡の臨床象に類似していた。潰瘍部位では潰瘍形成初期から MMP-9 活性の上昇が認められ、さらに皮膚潰瘍面積の拡大に伴い、collagen α 1(I)、collagen α 1(IV)、laminin-5 α 3、MMP-2、MMP-3 及び MMP-9 の各 mRNA 発現は増加し、潰瘍面積と mRNA 発現には有意な相関関係 ($\gamma = 0.8$ 程度) が認められた。これらの各 mRNA 発現は皮膚潰瘍の発症マーカーとして有用であると考えられるが、これには組織採取が必要であり、臨床的には非侵襲的な皮膚潰瘍評価マーカーが必要である。現在、褥瘡の臨床的な評価は潰瘍部位の深さ、浸出液の有無、大きさ、感染の有無、肉芽の性状、壊死の有無、ポケットの有無を総合的に点数化して評価する DESIGN 分類が用いられている。しかし、この分類では褥瘡の多様性を正確に反映しにくい問題点がある。一方、細胞外マトリックス産生の調節因子の TGF- β は large latent complex (LLC) と呼ばれる潜在型として貯蔵され、N 末端領域で Latency-associated peptide (LAP) と非共有結合し、LAP は latent TGF- β binding Protein (LTBP) とジスルフィド結合して LLC を形成している。この潜在型から活性型 TGF- β の変換にはプラスミンによる LLC の酵素的限定分解及び LAP の酵素分解が必要であると推測されている。また、LTBP は構造的に fibrillin と類似の特徴を有し、fibrillin スーパーファミリーと区分される。そこで、動物細胞で発現した LTBP-1 を用いて fibrillin-1 結合部位とモノクローナル抗体のエピトープを

同定した。その結果、正常真皮に貯蔵された TGF- β /LTBP-1 複合体はプラスミンにより fibrillin-1 の分解を伴わずマイクロフィブリルから遊離された。遊離した LTBP-1 断片には TGF- β 結合ドメインと fibrillin-1 との結合部位を含んでいた。さらに、褥瘡部位においても正常皮膚のプラスミン分解断片と同様な LTBP-1 断片とプラスミン活性も認められた。

一方、正常真皮では fibrillin-1 と LTBP-1 は共存しているが、褥瘡の肉芽組織中では LTBP-1 の分布は減少し、線維性の形態は失われ、その部位の LTBP-1 断片は増加していた。これらのことから、創傷治癒において真皮に貯蔵された LLC は不活性型から活性型の TGF- β に変換される過程で、プラスミンをはじめとする酵素により限定分解され、LTBP-1 断片と共に TGF- β が遊離されることが示された。また、褥瘡様皮膚潰瘍モデルの潰瘍部位周辺においても褥瘡患者と同様に LTBP-1 断片とプラスミン活性が認められた。以上から、本モデルを用い細胞外マトリックスの遺伝子発現や細胞外マトリックスの LTBP-1 の分解物を指標に解析することは新たな褥瘡治療薬の開発や治療方針の確立に寄与するものと考えられ、従って、本論文は博士（薬学）の学位論文に十分値するものと判定した。