

創傷治癒における細胞外マトリックスの一つである バーシカンの関与、RNAiによる検討

長崎大学病院皮膚科アレルギー科

富田 元

Traumatic injury leaves disfiguring scar and pigmentation, which provide significant reduction of QOL. Adequate skin wound healing leads to beautiful scar. Therefore, there is a need for a better treatment approach. Skin wound healing is a complex biological event as a result of the interplay of epidermis and dermis. Formed good dermis wound bed performs an essential function for epidermal cell migration and re-epithelization. Although, extracellular matrix existing dermis has relations with cell adhesion, cell migration, cell differentiation, and cell proliferation, little is known about a role of extracellular matrix in wound healing. To clarify a role of extracellular matrix in wound healing, we investigated mouse fibroblast cell using suppression of versican, which is a hyaluronan-binding, extracellular chondroitin sulfate proteoglycan.

The levels of versican expression were measured over time after mouse cutaneous wounding. On day 4 and 5, mRNA level of versican were significantly increased in day 4 and 5 relative to day 1 to 3. By contrast, mRNA level of versican were significantly decreased in day 6 and 7. Therefore, versican may regulate the wound healing process.

The mRNA expression of *Srpx2*, *Ccl6*, and *Smoc2* was increased in versican suppressed mouse embryonic fibroblast. Previous reports showed that these factors regulated the inflammatory cell infiltration and angiogenesis. These results suggest that versican may regulate the wound healing through *Srpx2*, *Ccl6* and *Smoc2*.

Blockade of versican changed the various factors in mouse embryonic fibroblast. These effects of versican blockade may occur in this wound study on day 1 to 3, 6, and 7. Taken together, it is possible that versican regulate the wound healing by the *Srpx2*, *Ccl6* and *Smoc2* at some stated periods.

1. 緒言

外傷などで損傷された皮膚は難治な場合に醜い瘢痕や色素沈着を残し、著しくQOLを低下させる。そのため、瘢痕や色素沈着が少なく美しく治るような適切な治療が常に求められている。皮膚潰瘍の治療には真皮側、表皮側の両方の再生が必要であり、良好な真皮側のウンドベッド（創床）形成が表皮細胞の遊走、再上皮化の前提条件である。この真皮側のウンドベッド形成には新生血管や線維芽細胞の増殖が必須の条件となっている。今回、それらの細胞間に存在する皮膚細胞外マトリックスに焦点をあてた。皮膚細胞外マトリックスは、細胞の接着、分化、増殖などに深く関わっていることが知られているが、創傷治癒における個々の成分の役割は未だ解明されていない点が多い。本研究はこれまで注目されてこなかったグリコサミノグリカン（コンドロイチン硫酸）を糖鎖に持つバーシカンの創傷治癒における役割をさぐる。

創傷治癒の過程は大きく分けて4つの過程から成ると考えられている。最初の過程は血液凝固期であり、創ができると血小板・フィブリンが凝集し、まず創部を塞ぐ。次の

で炎症期となり、好中球、マクロファージ、リンパ球などが創部に浸潤してくる。これら炎症細胞は侵入病原体を除去するのみならず、サイトカインや細胞成長因子を放出することによって、表皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞を活性化させ、次に続く増殖期を誘導する。増殖期では、表皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞などが増殖し、その結果再上皮化、肉芽組織の形成が起こる。その後、いったん生じた瘢痕組織などを正常の組織構築に置き換える再構築期という、比較的長く続く過程が生じる。

今回、バーシカンが創傷治癒の過程において経時的な発現の変化をとることが示され、創傷治癒過程のそれぞれの時期によって異なった役割を果たしている可能性があることが示唆された。線維芽細胞におけるバーシカンの発現を調節することで、創傷治癒におけるバーシカンの詳細な役割を検討することを本研究の目的とした。

2. 実験

2.1 マウスの創傷皮膚におけるバーシカンの発現

マウスの背部皮膚にメスを用いて長径2cmの全層性の皮膚潰瘍を作成し、テガダーム®にて創を被覆した。創傷の2mmマージンで創部の皮膚を採取し、全RNAを単離した。RNAをcDNAに逆転写し、バーシカンの転写産物をGlyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)のPCR産物と比較することで相対発現量を算出した。以上のRT-PCR法をもちいて創作生後の1日目から7日目までのマウス創傷部皮膚におけるバーシカンの発現を検討した。



Study the extracellular matrix, especially versican involvement of wound healing by use of RNAi

Hajime Tomita

Department of Dermatology, and Allergology, Nagasaki University Hospital

2.2 RT-PCRを用いたマウス胚線維芽細胞(MEF)のsmall interfering RNA (siRNA) 導入によるバーシカン産生抑制の確認

胎生10日のマウスより皮膚線維芽細胞を摘出し、MEFを培養する。Lipofectamin™ RNAiMAX® を用いてMEFにバーシカンのsiRNAを導入した。その5日後、7日後、10日後、14日後のMEFから全RNAを抽出し、RT-PCRを用いてバーシカンの発現を検討した。コントロールとしてネガティブsiRNAを同様の方法で導入したMEFを用いた。また、siRNA導入の3日目、5日目にそれぞれメディウムの変更を行った。

2.3 ドットブロットを用いたMEFのsiRNA導入によるバーシカン産生抑制の確認

siRNA導入7日目のメディウムを用い、バーシカンがタンパクレベルにおいても抑制されているかを確認した。採取したメディウム4μlをメンブレンに滴下し、バーシカンの抗IgG抗体及び蛍光抗体を用いてバーシカンの発現を確認した。コントロールとしてはネガティブsiRNAを導入したMEFのメディウムを用いた。また、siRNA導入の3日目、5日目にそれぞれメディウムの変更を行った。

2.4 DNAマイクロアレイ

MEFにバーシカンのsiRNAを導入して7日後のMEFサンプルとネガティブsiRNAを導入したMEFサンプルそれぞれのDNAを抽出し、マイクロアレイを用いてDNAの

変化を網羅的に観察した。

2.5 バーシカンの抑制によって変化した分子の検討

マイクロアレイにて変化を起こしていた分子に対して実際にMEFで変化がおきているかをRT-PCRを用いて確認した。サンプルとしてはバーシカンのsiRNAを導入したMEFを用い、導入後7日目のサンプルを用いた。コントロールとしてはネガティブsiRNAを導入したMEFのメディウムを用いた。また、siRNA導入の3日目、5日目にそれぞれメディウムの変更を行った。

3. 結 果

3.1 経時的に変化するマウス創傷皮膚のバーシカンの発現 (図1)

創作成の1-3日目ではバーシカンの発現は認められなかった。しかしながら創作成4-5日目でバーシカンは過剰に発現した。しかしながら、創作成6-7日目ではバーシカンの発現は4-5日目と比較して著明に抑えられた。創傷治癒の過程の一部でバーシカンが著明に発現し、その後に抑制されていることが示された。

3.2 siRNA導入によるバーシカン産生の経時的变化 (図2)

MEFにバーシカンのsiRNAを導入することによってMEFのバーシカン産生の変化を確認した。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

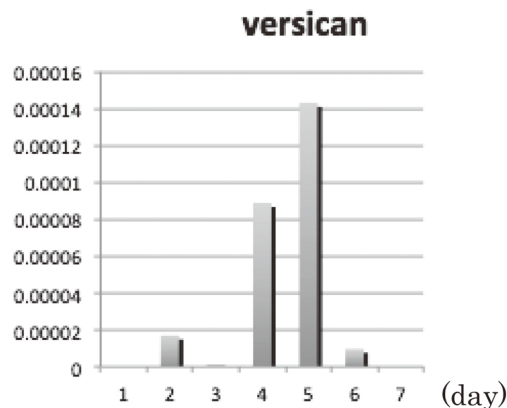


図1 経時的に変化するマウス創傷皮膚のバーシカンの発現

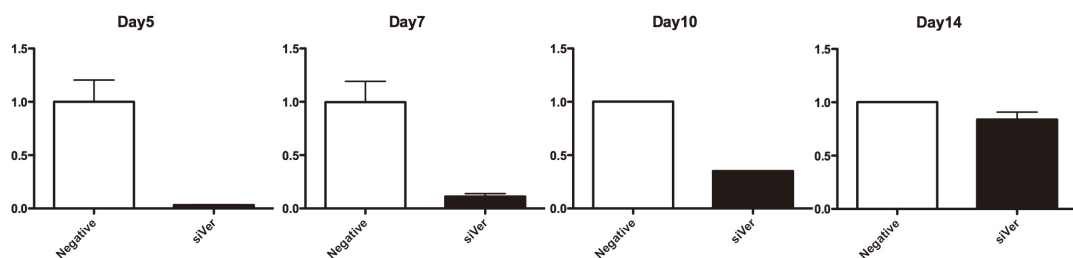


図2 リアルタイム RT-PCR によるバーシカン発現の変化

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。

3.3 タンパクレベルにおけるバーシカン発現の確認 (図3)

MEFにバーシカンのsiRNA 導入の後7日目において、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。タンパクレベルでも siRNA 導入によってバーシカンの産生が抑制されていることが確認された。

3.4 バーシカンが抑制されることで変化した細胞外マトリックスやサイトカイン (図4)

マイクロアレイを用いてMEFのバーシカンを抑制した際に、上昇した3つの因子を実際にRT-PCRを用いて評価した。バーシカンのsiRNAを導入した7日目のMEFにおいて、コントロールと比較してSushi repeat-containing protein, X-linked 2 (SrpX2) と CC Chemokine Ligand-6 (Ccl6)、Secreted modular calcium-binding protein-2 (Smoc2) の発現がネガティブコントロールと比較して有意に上昇していた。

4. 考 察

マウス皮膚創傷治癒の過程において、バーシカンが一過性に発現し、その後に抑制されていることから、創傷治癒

に何らかの役割を担っている可能性が高いと考える。本研究では創傷作成後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から再構築期であり、その時期にバーシカンが発現していることが示唆される。またその後バーシカンの発現が低下していることから、今回のMEFのバーシカン抑制実験では、本研究の創傷治癒過程において6-7日目の状態を観察することができた可能性がある。

MEFのバーシカン抑制するとSrpX2が上昇した。SrpX2は細胞外マトリックス蛋白の一つであり、セレクトインファミリーとともに働くことによって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¹⁾。バーシカンの抑制によりSrpX2が上昇することで、血管新生の促進、血管内皮細胞の遊走を介して創傷治癒を調節しているのかもしれない。

同様の実験でMEFのバーシカン抑制した際にCcl6が上昇した。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事が知られている。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ことが報告されている²⁾。実際の創傷治癒ではどの時期に働いているのかは不明であるが、バーシカンが抑制された状態ではCcl6を介して創傷治癒を促進していることが予想された。

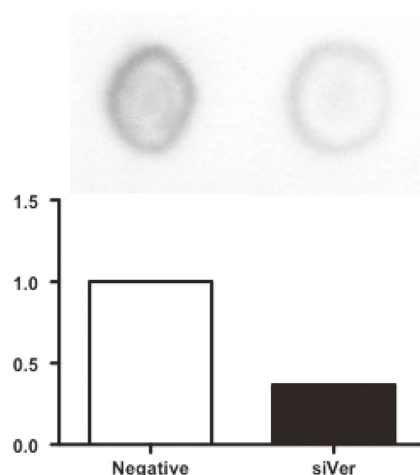


図3 ドットプロットによるバーシカン発現の確認

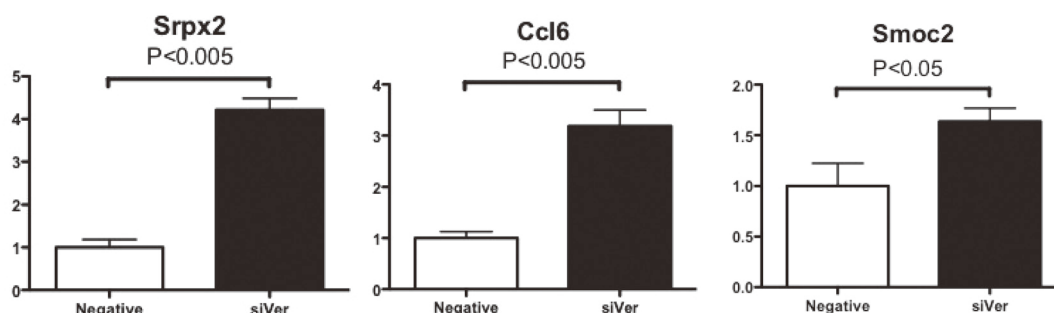


図4 MEFのバーシカン抑制した際のSrpX2、Ccl6、Smoc2の発現

同様に、MEFのバーシカンを抑制した際にSmoc2が上昇した。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に関与している事が知られている。具体的にはSmoc2は血管新生やケラチノサイトの遊走などを促進することが報告されている^{3,4)}。バーシカンが抑制されるとSmoc2の経路も介して創傷治癒を促進することが予想された。

バーシカンを抑制することでこれら3つの因子が上昇した。それぞれが創傷治癒を調節することが報告されており、これらの因子を介してバーシカンは創傷治癒を調節している可能性がある。よってin vivoでバーシカンを抑制することが出来た場合は創傷治癒に何らかの変化が起こることが予想された。

本研究では正常の創傷治癒においてバーシカンが発現する時期は4-5日目と限られていたことがわかった。バーシカンの抑制実験が実際に本研究の創傷治癒における1-3日目、6-7日目を反映しているかどうかは確かめておらず、in vivoでの定量が今後必要であると考えた。

創傷治癒過程において一過性に発現するバーシカンには創傷治癒を調節する役割があることが予想された。受傷1-3日目ではバーシカンが抑制されており、Srp2やCcl6、Smoc2などが発現し、炎症細胞の浸潤や血管新生を促進して、肉芽の形成を促進している可能性がある。さらに言えば、これまでの報告で肉芽組織には過剰にバーシカンが発現していることが知られており⁵⁾、受傷4-5日目では形成された肉芽を反映してバーシカンが上昇していると思われる。受傷6日目以降ではバーシカンの発現は再度抑制されており、再度Srp2とCcl6、Smoc2が上昇している事が予想される。よって受傷6日目以降は肉芽組織が減少する再構築期である可能性が高い。

MEFに対してRNAi法を用いることでバーシカンを抑制すると非常に様々な変化を起こしていることが示唆された。MEFから発現するバーシカンを抑制することでMEFの周囲の環境が変化し、Srp2やSmoc2などの細胞外マトリックス、Ccl6などのサイトカインに影響を及ぼしていた。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。マイクロアレイ法にて変化した因子はSrp2とCcl6、Smoc2以外にも多数変化したものが認められ、他の分子においても検討を行い、バーシ

カンの細胞に働きかける役割をさらに検討する必要があると考えた。

5. 総 括

創傷治癒は様々な過程を経ているため非常に複雑であり、バーシカンが経時的に発現、抑制されていることは非常に興味深い。特に肉芽形成を反映する増殖期に過剰発現し、その後に抑制されていることは意味があると考えられた。今後は実際に血管新生、炎症細胞遊走、線維芽細胞や表皮細胞の遊走に与える変化をin vitroにて検討していくこととなる。さらに、マウスを用いたin vivoの創傷治癒過程においてバーシカンをRNAi法にて抑制した際の創傷治癒過程の変化を検討し、さらにSrp2やCcl6、Smoc2の発現の変化を検討する必要があると考える。これらの結果からバーシカンが創傷治癒に与える影響を検討していく。また、マイクロアレイ法にて変化があったサイトカインや細胞外マトリックスに関してもin vitro、in vivoそれぞれにて発現の検討を行い、バーシカンの線維芽細胞、マウスの皮膚に与える影響を詳細に検討していく必要がある。

(引用文献)

- 1) Miljkovic-Licina M, Hammel P, Garrido-Urbani S *et al.* Sushi repeat protein X-linked 2, a novel mediator of angiogenesis. *FASEB J* 2009; 23: 4105-16.
- 2) Kaesler S, Regenbogen J, Durka S *et al.* The healing skin wound: a novel site of action of the chemokine C10. *Cytokine* 2002; 17: 157-63.
- 3) Maier S, Paulsson M, Hartmann U. The widely expressed extracellular matrix protein SMOC-2 promotes keratinocyte attachment and migration. *Experimental cell research* 2008; 314: 2477-87.
- 4) Rocnik EF, Liu P, Sato K *et al.* The novel SPARC family member SMOC-2 potentiates angiogenic growth factor activity. *The Journal of biological chemistry* 2006; 281: 22855-64.
- 5) Hakkinen L, Westermarck J, Kahari VM *et al.* Human granulation-tissue fibroblasts show enhanced proteoglycan gene expression and altered response to TGF-beta 1. *J Dent Res* 1996; 75: 1767-78.