

創傷治癒機構における小胞体ストレス応答の関与

和歌山県立医科大学薬理学講座

松崎 伸介

Recently, accumulating reports have suggested the importance of endoplasmic reticulum (ER) stress signaling in the differentiation of several tissues and cells, including myoblasts and osteoblasts. Secretory cells are easily subjected to ER stress during maturation of their secreted proteins. Skin fibroblasts produce and release several proteins, such as collagens, matrix metalloproteinases (MMPs), the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) and glycosaminoglycans (GAGs), and the production of these proteins is increased at wound sites. It is well known that differentiation of fibroblasts into myofibroblasts is one of the key factors for wound healing. In this study, we examined the effects of ER stress signaling on the differentiation of fibroblasts, which is required for wound healing, using constitutively ER stress-activated primary cultured fibroblasts. The cells expressed positive α -smooth muscle actin signals without TGF- β stimulation compared with control fibroblasts. Gel-contraction assays suggested that ER stress-treated primary fibroblasts caused stronger shrinkage of collagen gels than control cells. These results suggest that ER stress signaling could accelerate the differentiation of fibroblasts to myofibroblasts at injured sites. The present findings may provide important insights for developing therapies to improve wound healing.

1. 実験背景

小胞体ストレス（以下ERストレス）による細胞死機構についての多くの研究がなされ、変性疾患発症過程におけるERストレスの重要性は多数報告されている¹⁻⁷⁾。一方、より強い筋組織の形成を行う過程でERストレスによる筋芽細胞の選択が行われていること⁸⁾、骨芽細胞の分化においてERストレス応答経路が重要であること^{9, 10)}が報告された。このことは、ERストレスが細胞死を誘導するだけではなく、成体の恒常性維持に重要であることを示唆している。

膵臓などの内分泌器官においては大量の分泌タンパク質の合成過程において生理的ERストレス状態にあると考えられている。我々は創傷皮膚において多くの分泌タンパク質の合成が行われることから、膵臓などの内分泌器官同様生理的ERストレス状態にあると想定し、創傷治癒機構におけるERストレスの重要性に着目した。一方で、創傷治癒機構ではfibroblastからmyofibroblastへの分化が重要であることが知られている^{11, 12)}。そこで、創傷皮膚領域におけるERストレスの意義を検討する目的で、生理的ERストレスがfibroblast分化に及ぼす影響を検討することとした。

2. 実験概要

in vitro実験系において生理的ERストレスを再現する



Involvement of ER Stress in the wound healing of skin
Shinsuke Matsuzaki
Department of Pharmacology, Wakayama Medical University

目的で、ERストレスの1つであるtunicamycin（糖鎖修飾阻害剤）の反復投与を行った。最終的には、細胞死の促進はなしにERストレス応答が亢進している状態を示す条件を絞り込み、それら条件に合致する実験条件を今後の方針として採用した。

細胞分化への影響についてはFibroblastからmyofibroblastへの分化をもとに検討した。その分化の指標としては α -SMA発現レベルの変化（上昇）を用いた。また、機能的な分化であったか否かを検討するためゲルコントラクションアッセイを用い、分化したfibroblastsの有する収縮能力を評価した。

詳細な方法と結果については下記の「3. 実験方法」、「4. 実験結果」の項目に記載する。

3. 実験方法

3. 1. Fibroblastの準備と培養

2-4日齢のC57B6マウスの皮膚を切除し培養ディッシュに貼付け、10% fetal bovine serum (FBS) を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を添加し、酸素5%、二酸化炭素95%、37°Cの条件で培養した。その後、2度の播きかえを行い、各実験に用いる細胞培養用ディッシュにて培養。必要に応じて1 μ g/ml tunicamycin(an inhibitor of N-glycosylation in the ER)、又は溶媒であるdimethyl sulfoxide (DMSO) による刺激を1日5分間、3日連続で実施した。この連続刺激が修了した後、3度目の播きかえ作業を実施し、血清を含まないDMEMへと変更、24時間経過した後、10ng/ml TGF- β 1 (R&D Systems Inc.) を含む又は含まないDMEMへと変更した。これらの実験は、大阪大学動物実験規定に基づき作成・承認を得た計画書に則り実施した。

3. 2. 細胞死アッセイ

Primary fibroblastsは96-well platesに 1×10^4 / wellにて播かれ36時間血清入りDMEMで培養された後、DMSO又はTMによる負荷が行われた。負荷時間は下図の通りである。負荷が終了した後 phosphate buffered saline (PBS)にて2度洗い流し、DMEM (D1145, SIGMA)とWST-1試薬を混合した液にて3時間培養し、WST-1試薬の反応を吸光光度計にて測定した (λ 450 nm - λ 650 nm)。3回以上同等の実験を実施し、得られた結果を標準誤差付して表示した。

3. 3. Western blot analysis

各刺激・負荷を受けた細胞はPBS洗浄を2度行った後に回収され、protease inhibitor cocktail (Roche, Sydney, Australia) を含むRIPA bufferにて溶解された。同量のタンパク質サンプルを5-20% gradient SDS-PAGE, e-PAGE (ATTO CO., Tokyo, Japan) にて電気泳動した後、PVDF

membrane (Millipore, Bedford, MA)に転写、5% (w/v) skim milkによるブロッキング作業を行った後、GRP78/Bip又は β -actin抗体にて免疫反応を実施した。抗体としては、mouse anti-BiP/GRP78 antibody (BD Transduction Laboratories) / HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody (Cell Signaling Technology)、又はanti- β -Actin HRP-DirecT (MBL Co., Nagoya, Japan) を使用。発色には Luminata Classico Western HRP substrate (MERCK MILLIPORE)を用いた。結果を数値化するため得られたバンドをImage Jにて数値化した。独立した3回以上の施行結果を平均化し、標準偏差を付して示した。

3. 4. Collagen Gel Contraction Assay

各負荷を受けたfibroblastsに対してCollagen Gel Culturing Kit (Nitta Gelatin, Inc.) を用いたゲル収縮能の評価を行った。 2×10^5 cellsが0.5mlの培養用ゲル内に均一になるよう培養された。均一化された培養用ゲルは

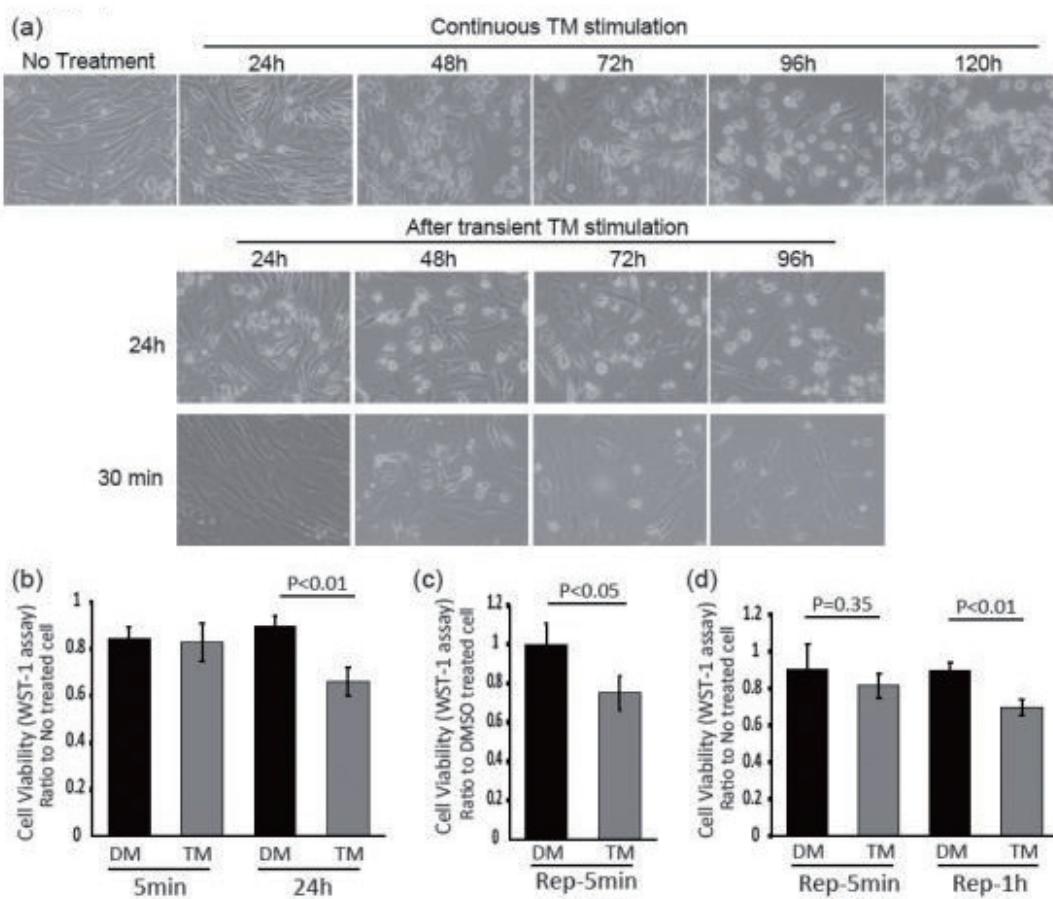


Fig. 1 Condition setting for physiological ER stressed fibroblast

(a) (upper panels) Primary cultured fibroblasts were treated with 1 μ g/ml TM. The cells were observed each time points. (middle and bottom panels) Primary cultured fibroblasts were transiently treated with 1 μ g/ml TM for 24 h or 30 min and the medium were changed to the culture medium. The cells were observed each time points after the medium change. (b-d) The effect of each ER stress methods on cell viability was measured by WST-1 assay. (b) 24h or 5 min of transient 2 μ g/ml TM stimulation, (c) 5 min of repeated 2 μ g/ml TM stimulation and (d) 1h or 5 min of repeated 1 μ g/ml TM stimulation were adopted for these assays. Same amount of DMSO were used as controls. The P value was compared with the control and calculated by Student's T test.

4-well culture plates にて固められ、固まった後はゲルとの接地面を剥離、その状態での血清を含まないDMEMにて培養された。必要に応じてTGF- β 1の添加も行っている。各タイムコースでのゲルの大きさはImage Jにて数値化した。独立した3回以上の施行結果を平均化し、標準偏差を付して示した。

3.5. Immunocytochemistry

各負荷を受けたfibroblastsに対して2度のPBS洗浄を行った後、4% paraformaldehydeによる固定を行った。その後、5% BSA and 0.1% triton-X処理を行い、一次抗体としてrabbit monoclonal antibody for α -SMA (Epitomics, Inc., CA, USA)又はrabbit polyclonal antibody for Bip (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)、二次抗体としてfluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-rabbit

IgG antibodyを用い反応させた後、共焦点顕微鏡 LSM-510 laser scanning microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)を用いて観察を行った。

4. 実験結果

近年、生理的小胞体 (ER) ストレスが細胞の分化に重要な働きをしていることが多数報告されるようになってきた。そこで、皮膚fibroblastの分化におけるERストレスについて検討することとした。生理的ERストレスを培養細胞レベルで再現する目的で、細胞死が誘導されずERストレス応答 (本研究ではGRP78 発現にて確認) が誘導される条件を検討することとした (図1・2)。先ず、1 μ g/ml tunicamycin (TM) 負荷を行い 24・48・72・96 時間後に観察した。その結果として 24 時間負荷では僅かな細胞死が確認された (図1a)。本結果をもとに、30分、24時間の

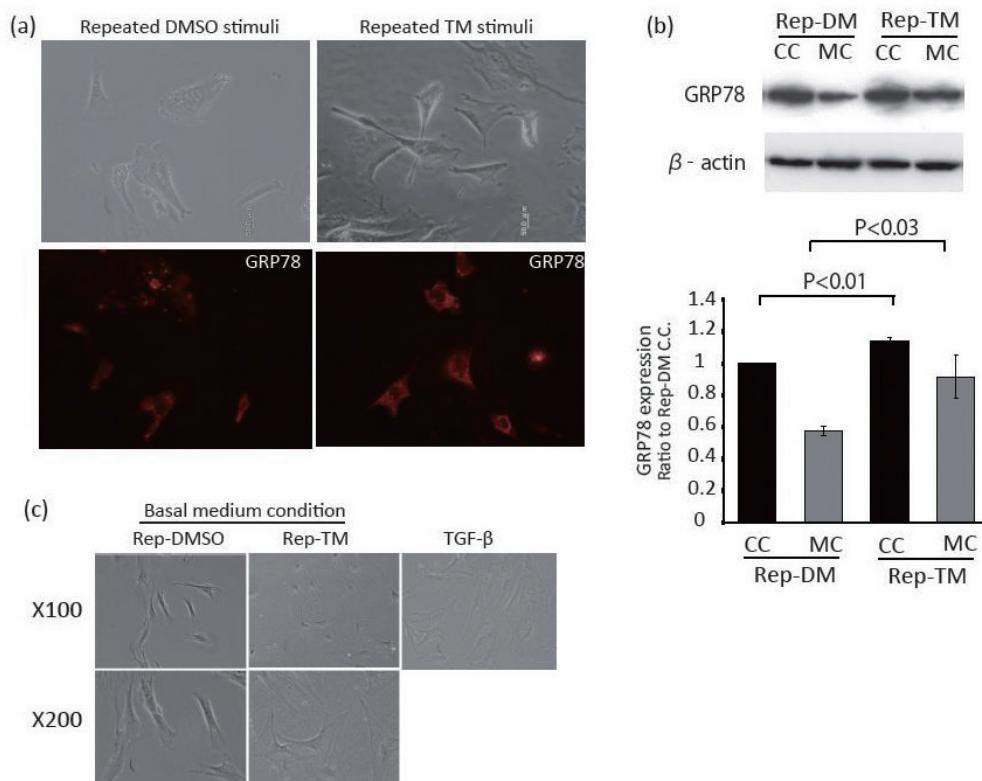


Fig. 2 Effects of repeated TM stimulation on fibroblasts' morphology and GRP78/BiP expression

Primary cultured fibroblasts were treated with 1 μ g/ml TM or DMSO for 5 minutes per day 3 days in series. After this repeated TM or DMSO stimulation, medium was changed to DMEM with 2% horse serum (Basal medium condition) and incubated for 12h to induce differentiation. Primary cultured fibroblasts were treated with 1 μ g/ml TM or DMSO for 5 minutes per day 3 days in series.

- (a) Just after this repeated TM or DMSO stimulation, the cells were observed (upper panels) and stained by anti-Bip antibody (bottom panels).
- (b) The cells treated with TM (Rep-TM) or DMSO (Rep-DM/Rep-DMSO) cultured in the culture condition medium (C.C.) or in the Basal medium condition for differentiation (M.C.) were collected and lysed. Western blot analysis was performed using an anti-Bip or anti- β -actin primary antibody (upper panels). Quantitative data were obtained by densitometry of the bands. Data are expressed as the mean \pm SEM for at least three independent experiments (shown as a ratio of the Rep-DM C.C.). The P value was compared with the control and calculated by Student's T test.
- (c) Left and middle panels show the cells treated with TM (Rep-TM) or DMSO (Rep-DMSO) cultured at Basal medium condition. Right panel shows the cells treated with TGF- β 1 after the incubation at the basal medium condition.

TM 単回負荷を行い、培養用メディアに戻して 24・48・72・96 時間後に細胞の観察を行ったところ、24 時間負荷細胞ではかなりの細胞死の促進が確認された(図 1a)。

一方で、30 分負荷細胞も軽度の細胞死誘導が確認された。そこで、5 分間単発 TM 負荷を実施したところ細胞死は確認されなかった(図 1b)。次に、24 時間毎 TM 5 分、30 分、1 時間負荷を 3 度繰り返した細胞に対して細胞死アッセイ(WST-1 アッセイ)を実施した。その結果、1 μ g/ml TM 負荷では連続的 5 分間負荷細胞では細胞死の誘導が確認されなかつたが、30 分、1 時間連続負荷細胞では細胞死の促進が確認された(図 1d 及び data not shown)。一方で、2 μ g/ml TM 負荷では連続的 5 分間負荷細胞が細胞死の促進を示した。この結果より、生理的 ER ストレスを培養細胞で模倣する方法として 1 μ g/ml TM 連続的 5 分間負荷(以下、TM 反復刺激)を用いることとした。

上記方法にて fibroblasts への負荷条件を決定した上で、ER ストレス応答への影響を観察したところ、免疫染色法においてもウェスタンプロット法においても GRP78 発現が促進していることが確認された(図 2a, b)。次に細胞形態を確認したところ、通常培養メディア下では TM 反復負荷細胞とコントロールとして用いた DMSO 反復負荷細胞の間に大きな差を認めなかつたが、分化誘導前に用いる血清なし DMEM (basal medium) に変更後 24 時間で TM 反復負荷細胞は扁平な形態を示すことを見出した(図 2c)。一方で、TGF- β 1 刺激が fibroblasts の分化を誘導することが知られていることから、fibroblasts に TGF- β 1 刺激を行い形態観察したところ、扁平な形態変化を示すことが予想された。そこで、fibroblasts が分化し myofibroblast に

変化しているか否かを確認するため、 α -SMA による免疫染色を行った。その結果、basal medium において TM 反復負荷細胞では DMSO 反復負荷細胞に比して α -SMA の発現が上昇していることが明らかとなった(図 3)。さらに、TGF- β 1 刺激後の各 fibroblasts においても TM 反復負荷細胞において α -SMA の発現上昇を認めた(図 3)。このことは、ER ストレス反復刺激が fibroblast の分化を促進していることを示唆している。

そこで、Collagen Gel Culturing Kit を用いたゲルコントラクションアッセイを実施し、TM 反復負荷による fibroblast の分化促進はゲル収縮力に影響するのか否かを検討することとした。TGF- β 1 刺激なしの場合、TM 反復負荷細胞では DMSO 反復負荷細胞に比して有為なゲル収縮能を示すことが明らかとなった。一方、TGF- β 1 刺激では両者ともに強いゲル収縮能を示したもの TM 反復負荷細胞ではより強い収縮傾向を示した(図 4)。本結果より、fibroblast は ER ストレス反復刺激により分化誘導され α -SMA 陽性細胞(myofibroblast) に変化し、ゲル収縮能を有するようになることを明らかとした。

5. 考 察

本研究結果は生理的 ER ストレスが皮膚由来 fibroblast の分化に重要な役割を果たす可能性を示している。創傷部領域では創傷治癒に必要となる多くの分泌因子の合成が促進しており、過剰な蛋白質合成状態にある。すなわち生理的 ER ストレス状態にあることが予想され、創傷部では ER ストレスを介した分化が誘導されていることが予想される。一方で、fibroblast の分化が促進状態にあり、強い収縮能を示す状態にあると考えられるケロイド領域におい

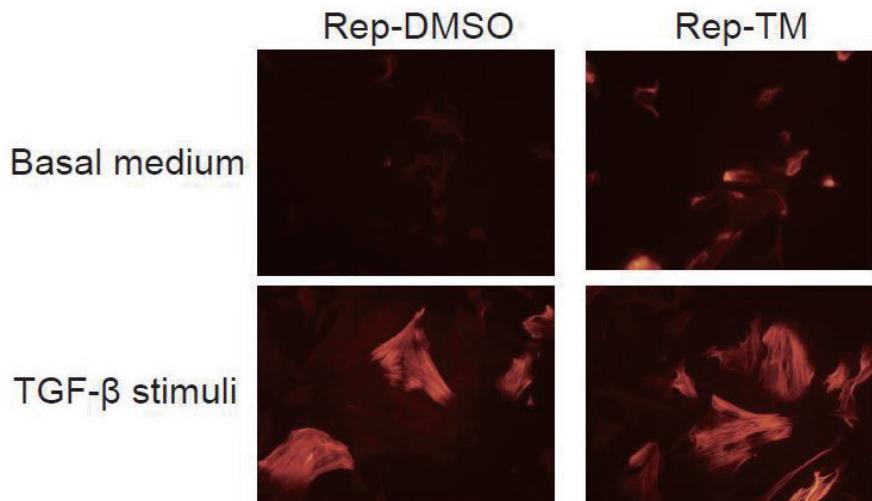


Fig. 3 The repeated TM treated fibroblasts showed α -SMA induction.

Rep-TM and Rep-DMSO cells were cultured at basal medium for 12 h (upper panels) and each cells were treated with TGF- β 1 after basal medium condition for 48 h. The cells were fixed and immunocytochemistry was performed with anti- α -SMA antibody.

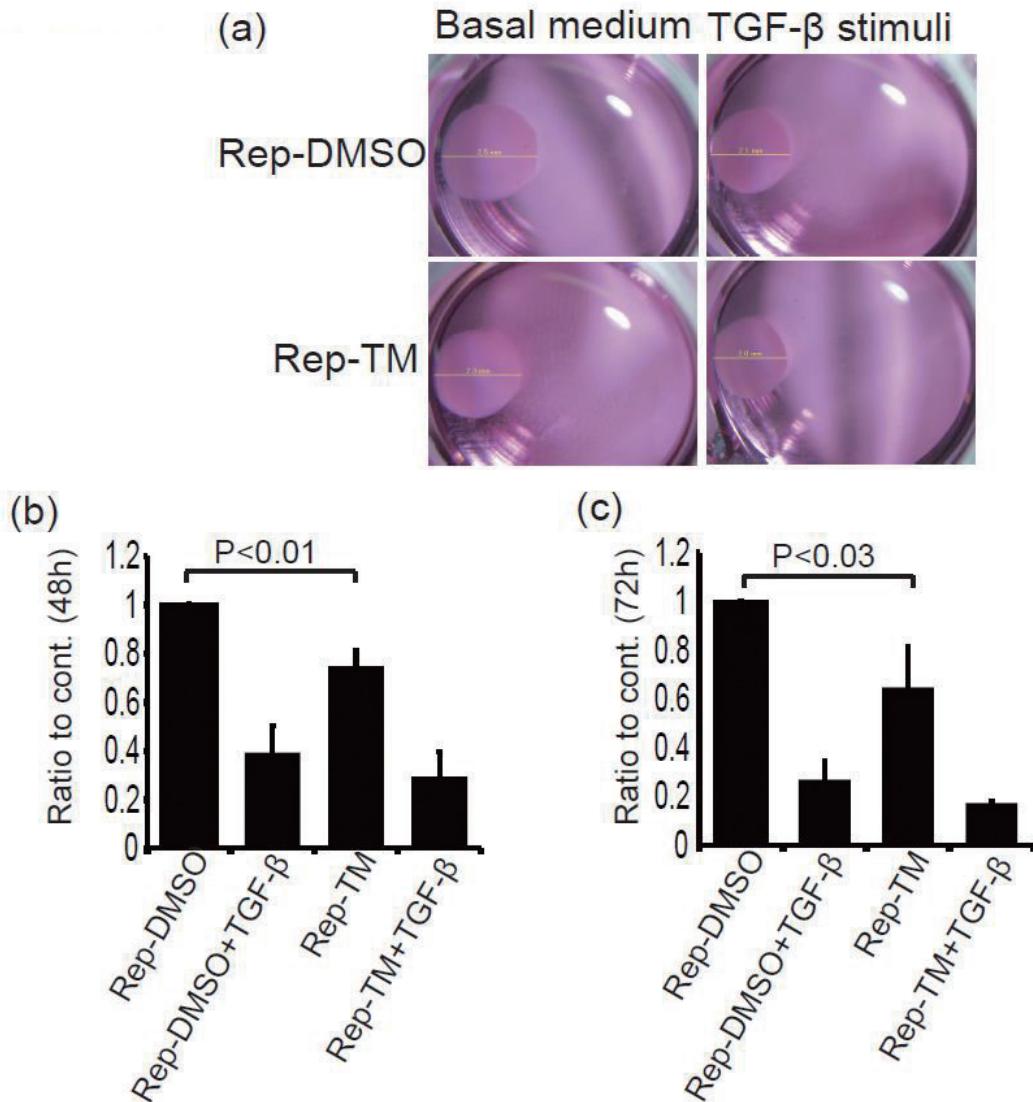


Fig. 4 The repeated TM treated fibroblasts showed accelerated collagen gel contraction.

Rep-TM and Rep-DMSO cells were embedded in collagen gels. After gel formation, the rims of the gels were detached and gels were overlaid with basal medium or TGF- β 1 containing medium. (a) these pictures show one of the experimental results of gel contraction. (b and c) Gel size of each conditions were measured at 48 and 72 h. Gel size containing Rep-DMSO cells treated with basal medium were used as control. Each bars show the ratio to control at 48 h (b) and 72 h (c). The P value was compared with the control and calculated by Student's T test.

てERストレス応答の亢進が報告されている¹³⁾。この報告は、皮膚fibroblastの分化にERストレスが関与していることを示しており、本研究結果を支持するものである。

追記

本報告内容は以下の雑誌に受理され掲載された。

- ・Matsuzaki S, Hiratsuka T, et. al., Physiological ER Stress Mediates the Differentiation of Fibroblasts. PLoS One. 10(4):e0123578. 2015.

(引用文献)

- 1) Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. Science 281: 1312–1316 pmid : 9721091

doi: 10.1126/science.281.5381.1312

- 2) Glücksmann A (1951) Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. Biol. Rev. 26: 59–86 pmid: 24540363 doi: 10.1111/j.1469-185x.1951.tb00774.x
- 3) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie A (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer. 26: 239–257 pmid: 4561027
- 4) Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, et al. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. Nature. 403 (6765) : 98–103. pmid: 10638761 doi: 10.1038/47513

- 5) Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, et al. (2004) Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol.* 165 (3) : 347–56. pmid: 15123740 doi: 10.1083/jcb.200310015
- 6) Katayama T, Imaizumi K, Sato N, Miyoshi K, Kudo T, Hitomi J, et al. (1999) Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* 1 (8) : 479–85. pmid: 10587643
- 7) Lindholm D, Wootz H, Korhonen L (2006) ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ.* 13 (3) : 385–92. pmid: 16397584 doi: 10.1038/sj.cdd.4401778
- 8) Nakanishi K, Dohmae N, Morishima N (2007) Endoplasmic reticulum stress increases myofiber formation in vitro. *FASEB J.* 21 (11) : 2994–3003. pmid: 17435177 doi: 10.1096/fj.06-6408com
- 9) Murakami T, Saito A, Hino S, Kondo S, Kanemoto S, Chihara K, et al (2009) Signalling mediated by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in bone formation. *Nat Cell Biol.* 11 (10) : 1205–11. doi: 10.1038/ncb1963. pmid: 19767743
- 10) Saito A, Ochiai K, Kondo S, Tsumagari K, Murakami T, Cavener DR, et al (2009) Endoplasmic Reticulum Stress Response Mediated by the PERK-eIF2arufa-ATF4 Pathway Is Involved in Osteoblast Differentiation Induced by BMP2. *J Biol Chem.* 286 (6) : 4809–4818. doi: 10.1074/jbc.m110.152900
- 11) Garner WL, Rittenberg T, Ehrlich HP, Karmiol S, Rodriguez JL, Smith DJ, et al (1995). Hypertrophic scar fibroblasts accelerate collagen gel contraction. *Wound Rep. Reg.* 3, 185–191. doi: 10.1046/j.1524-475x.1995.30210.x
- 12) Hinz B (2007) Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair. *Journal of Investigative Dermatology* 127, 526–537. pmid: 17299435 doi: 10.1038/sj.jid.5700613
- 13) Butler PD, Wang Z, Ly DP, Longaker MT, Koong AC, Yang GP (2011) Unfolded Protein Response Regulation in Keloid Cells. *J Surg Res.* 167 (1) : 151–157. doi: 10.1016/j.jss.2009.04.036. pmid: 1963134