

# 転写因子 SOX2 による皮膚虚血再灌流障害 (急性期褥瘡) における制御機構の解明および新規治療法の開発

群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学

内山 明彦

Cutaneous ischemia-reperfusion (I/R) injury is engaged with the early pathogenesis of cutaneous pressure ulcers (PUs). Our previous work identified that the induction of genes that were consistently upregulated in the oral mucosa, especially transcription factor *SOX2*, accelerate wound healing in skin. The aim of this study was to investigate the effect of *SOX2* on the formation of PUs after cutaneous I/R injury and determine the molecular and cellular mechanisms. We found that induction of *SOX2* in the keratinocytes significantly suppress the formation of PUs. The induction of *SOX2* in the keratinocytes suppressed the numbers of infiltrating inflammatory cells (MPO<sup>+</sup> neutrophils, CD68<sup>+</sup> macrophages) in the skin area after I/R injury. In *SOX2* expressing mice, the number of CD31<sup>+</sup> endothelial cells was significantly increased, and hypoxic area was significantly decreased when compared with control mice. In *SOX2*/OKD-48 (Keap1-dependent oxidative stress detector, No 48-luciferase) mice, Nrf2 antioxidant response pathway was significantly enhanced with respect to control OKD-48 mice. *In vitro*, *SOX2* expressing keratinocytes significantly decreased the numbers of apoptotic cells under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulation. These results suggest that the induction of *SOX2* in the keratinocytes might protect against the development of PUs after cutaneous I/R injury by enhancement of anti-oxidative response, resulted in suppression of apoptosis, protection of vascular damages and inhibition of infiltration of inflammatory cells.

## 1. 緒言

褥瘡は自立体動が困難な高齢者や知覚神経や動機能障害を呈する様々な疾患に関連して発症する皮膚疾患である。超高齢化社会である本邦において、褥瘡発症のリスクは今後さらに高まることが予想される。褥瘡は急性期(紅斑・紫斑期)を経て慢性期(潰瘍形成期)に到る。潰瘍形成後は様々な外用治療が行われているが、難治や再発を繰り返す症例が多く、医療界ならびに社会的問題となっている。しかし、潰瘍形成前の急性期褥瘡(紅斑・紫斑期)において、その後の潰瘍形成を防ぐ有効な治療は未だ確立されていない。そのため、患者のQOLの向上や治療期間・医療費の削減のためにも、急性期褥瘡に対する新たな治療法の開発が期待されている。我々はこれまでに急性期褥瘡(皮膚虚血再灌流障害)の病態において酸化ストレスや血管障害が重要であり、それらを抑制することでその後の潰瘍形成を予防できることを見出した<sup>1)</sup>。

口腔粘膜では皮膚と比べて創傷が早期にかつ癒痕形成を残さずに治癒することが知られている。我々はこの知見をもとに口腔粘膜上皮と皮膚表皮細胞の遺伝子発現の違いによる創傷治癒制御機構の違いについて検討を行った。その結果、創傷治癒皮膚の表皮細胞には発現せず、高い創傷治

癒能を有する口腔粘膜表皮に発現する転写因子SOX2を同定した<sup>2)</sup>。また表皮細胞に発現させたSOX2は創傷部位における血管新生やヒアルロン酸の産生の亢進、EGFRシグナルを活性化させることで皮膚創傷治癒を促進させることも明らかにした<sup>3)</sup>。しかし、転写因子SOX2における皮膚虚血再灌流障害(急性期褥瘡)及び酸化ストレスの制御機構については未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、これまでに解明されていない転写因子SOX2による皮膚虚血再灌流障害に関する制御機構及び治療効果の有無を明らかにすることを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1. 皮膚虚血再灌流モデル

2枚の磁石(1180G)を用いて背部の皮膚を両方向から12時間圧迫(虚血)させた後に磁石を外した(再灌流)。連日虚血再灌流部位の写真撮影を行い潰瘍部の面積をImageJ softwareを用いて計測した。

### 2.2. マウス

タモキシフェン投与下に表皮細胞特異的にSOX2を発現するマウス(K14CreERTM/LSL-SOX2)<sup>4)</sup>(SOX2マウス)を用いてコントロール群(DMSO:100μL)とタモキシフェン群(DMSO:タモキシフェン1.5mg/100μL)を5日間連日で腹腔内投与し、1週間後から実験を行った(図1)。また酸化ストレス可視化マウス(OKD-48)<sup>5)</sup>とSOX2マウスを掛け合わせてSOX2/OKD-48マウスを作成し、皮膚虚血再灌流後における酸化ストレスに関して評価した。



The role of transcription factor SOX2 in the regulation of cutaneous I/R injury

Akihiko Uchiyama

Department of Dermatology, Gunma University Graduate School of Medicine

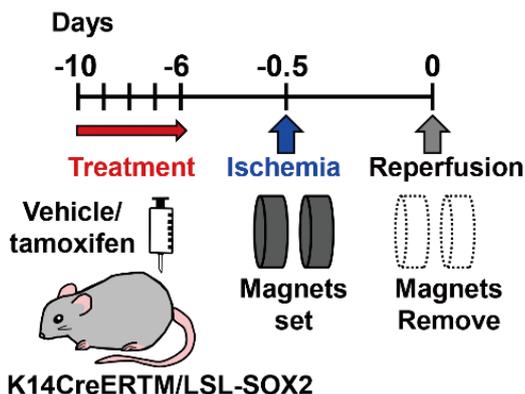


図1 SOX2マウスを用いた皮膚虚血再灌流モデル

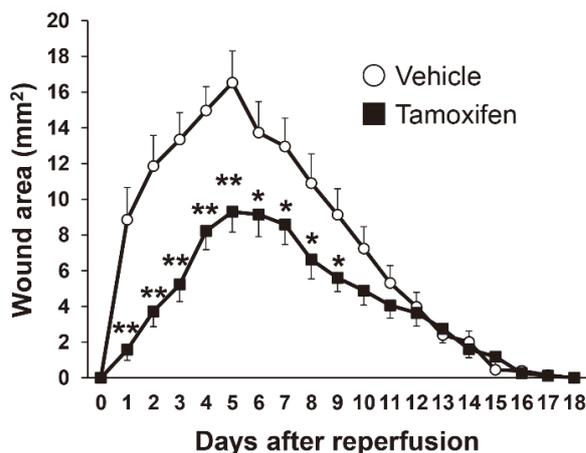


図2 虚血再灌流部位の潰瘍面積の比較

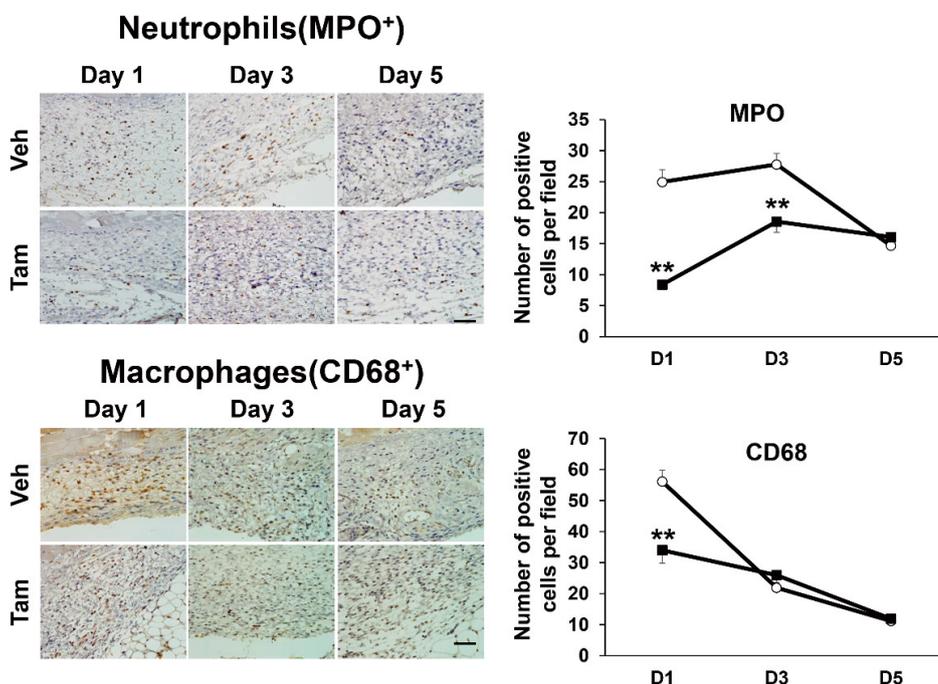


図3 炎症細胞浸潤の評価

### 2. 3. マウス初代表皮細胞培養

SOX2マウスの出生後0~2日目の表皮シートから初代表皮培養細胞を作成した<sup>6)</sup>。過酸化酸素0.5mM刺激下におけるアポトーシス細胞数についてTUNEL染色を用いて比較、検討した。

### 2. 4. 酸化ストレス可視化

SOX2/OKD-48マウスを用いて皮膚虚血再灌流後の皮膚組織を採取しシフェリン溶液(0.3mg/mL)で処理した後にIVIS (PerkinElmer)で輝度を測定した。

## 3. 結果

### 3. 1. 皮膚虚血再灌流後に生じる潰瘍形成の検討

SOX2マウスを用いて、表皮細胞に発現させたSOX2の

皮膚虚血再灌流障害により生じる潰瘍形成に対する影響を評価した。コントロール群と比較してタモキシフェン投与群では潰瘍形成が虚血再灌流後1日目から8日目まで有意に抑制された(図2)。

### 3. 2. 皮膚虚血再灌流後に生じる炎症細胞浸潤の検討

SOX2マウスを用いて、表皮細胞に発現させたSOX2の皮膚虚血再灌流障害により生じる炎症細胞浸潤について免疫染色にて検討を行った。タモキシフェン投与群において浸潤する好中球(MPO陽性)の数は1日目、3日目に、またマクロファージ(CD68陽性)の数は1日目においてコントロール群と比較して有意に低下した(図3)。

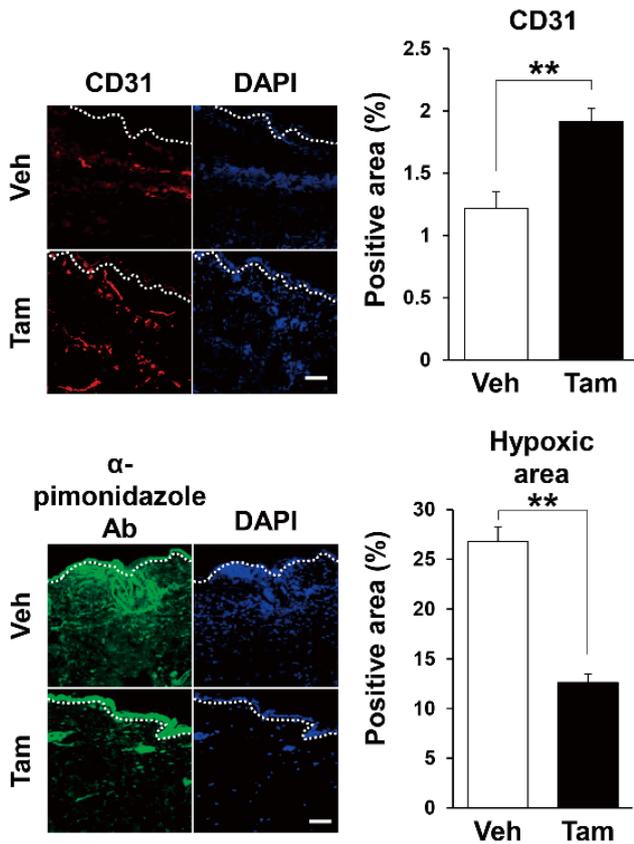


図4 血管量と低酸素領域の評価

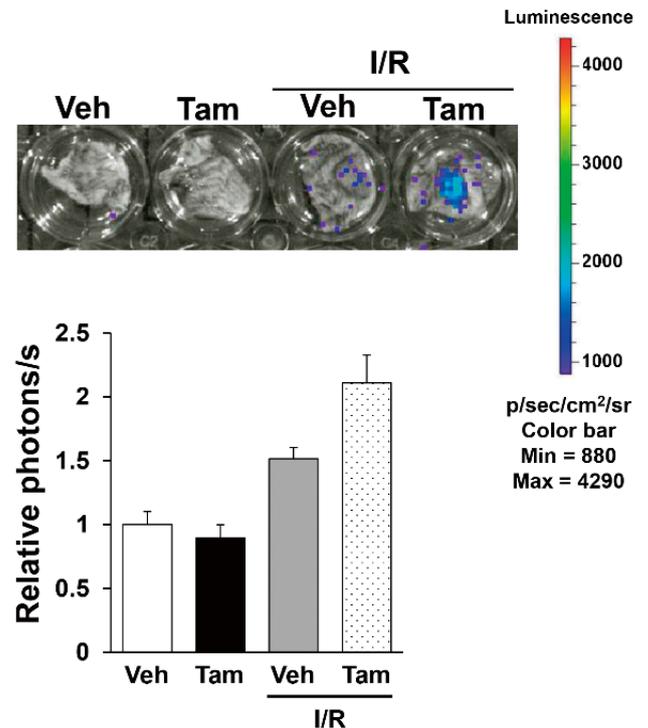


図5 酸化ストレス応答の検討

### 3. 3. 皮膚虚血再灌流後の低酸素領域、血管傷害の検討

次にSOX2マウスにおけるコントロール群、タモキシフェン投与群で皮膚虚血再灌流部での低酸素領域、血管傷害について免疫染色法で検討を行った。タモキシフェン投与群では血管内皮細胞(CD31陽性)の割合がコントロール群と比較して有意に増加していた。さらに低酸素領域( $\alpha$ -pimonidazole抗体陽性)についても同様に検討を行ったところ、タモキシフェン投与群ではコントロール群と比較して低酸素領域が有意に低下した(図4)。

### 3. 4. SOX2による酸化ストレス応答に対する検討

SOX2/OKD-48マウスを用いて皮膚虚血再灌流後における酸化ストレス防御機構(Nrf2-Keap1系)について検討を行った。タモキシフェン投与群ではコントロール群と比較して皮膚虚血再灌流後の皮膚部位においてNrf2-Keap1の活性化が上昇する傾向がみられた(図5)。さらにSOX2マウス由来初代表皮細胞培養の実験系において過酸化水素( $H_2O_2$ )により生じるアポトーシス細胞についてTUNEL染色によって検討を行った。タモキシフェン投与群ではコントロール群と比較して酸化ストレスにより生じるアポトーシス細胞数が有意に抑制した(図6)。

## 4. 考察

表皮細胞特異的SOX2発現マウスを用いた皮膚虚血再灌流障害(褥瘡モデル)の検討により、通常SOX2を発現しない皮膚表皮細胞にSOX2を発現させることで皮膚虚血再灌流後に生じる潰瘍形成が抑制されることが明らかとなった。SOX2が潰瘍形成を抑制する要因として、虚血再灌流障害後に生じる酸化ストレスに対するNrf2-Keap1系の活性化が関与している可能性が示唆された。その結果、表皮細胞のアポトーシスを抑制し、炎症性サイトカイン産生の低下などによる血管傷害の軽減、低酸素領域の低下及び炎症細胞浸潤の減少が生じた可能性が考えられた。今後は転写因子SOX2による皮膚虚血再灌流障害の制御機構において、SOX2がターゲットとする遺伝子の同定やSOX2による酸化ストレス応答に関する制御機構に関して詳細な検討を行う。SOX2と同等の効果が得られる薬剤の同定によって褥瘡発症予防につながる革新的な新規治療薬が期待できる。急性期褥瘡において、その後生じる潰瘍形成を抑制することができれば患者の疼痛の軽減や潰瘍治癒後の瘢痕形成を防ぐことができる。その結果医療費や人件費、労働量の軽減につながる事が予想され、高齢化社会への高い貢献が期待できる。

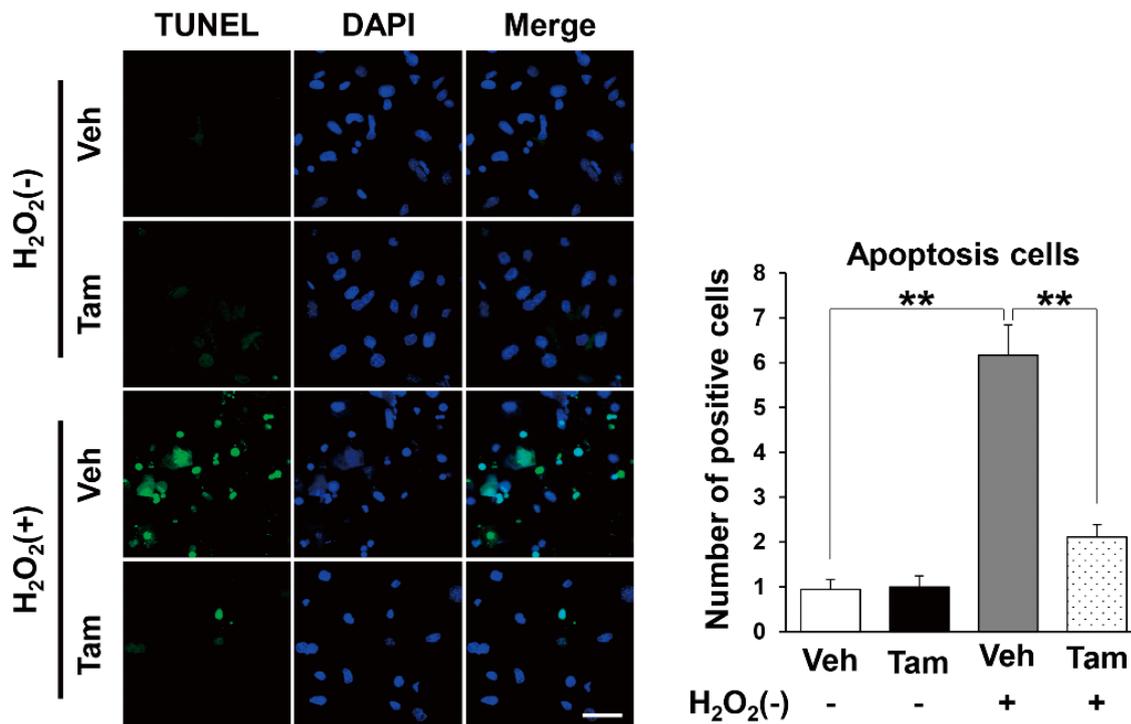


図6 酸化ストレスとアポトーシス細胞の検討

(引用文献)

- 1) Sekiguchi A *et al.* Botulinum toxin B suppresses the pressure ulcer formation in cutaneous ischemia-reperfusion injury mouse model: Possible regulation of oxidative and endoplasmic reticulum stress. *J Dermatol Sci.* **90**, 144–153 (2018).
- 2) Iglesias-Bartolome R. *et al.* Transcriptional signature primes human oral mucosa for rapid wound healing. *Sci Transl Med.* **10**, eaap8798 (2018).
- 3) Uchiyama A. *et al.* SOX2 epidermal overexpression promotes cutaneous wound healing via activation of

EGFR/MEK/ERK signaling mediated by EGFR ligands. *J Invest Dermatol.* **139**, 1809–1820 (2019).

- 4) Yun, L. *et al.* Evidence that SOX2 overexpression is oncogenic in the lung. *PLoS One.* **5**, e11022 (2010).
- 5) Oikawa D. *et al.* A transgenic mouse model for monitoring oxidative stress. *Sci Rep.* **2**, 229 (2012).
- 6) Lichti Ulrike. *et al.* Isolation and short-term culture of primary keratinocytes, hair follicle populations and dermal cells from newborn mice and keratinocytes from adult mice for in vitro analysis and for grafting to immunodeficient mice. *Nat Protoc.* **3**, 799–810 (2008).