

皮膚創傷治癒過程において $\alpha 9$ インテグリンとそのリガンドの相互作用の阻害は 成熟肉芽組織の形成を遅延させる

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

皮膚は損傷を受けると、一連の創傷治癒反応が生じる。この創傷治癒過程において、組織中の細胞とそれを取り巻く細胞外マトリックス (ECM) や成長因子との相互作用は密接に関与する。従来、ECM は細胞接着における足場としての役割の重要性が報告されてきたが、最近では数多くの分泌型 ECM の存在も明らかになってきている。これらは発生過程で重要であると考えられている一方で、成体での発現は創傷治癒や組織リモデリング過程に局限される。これらのタンパク質は「マトリセルラープロテイン」と総称されている。現在までに、創傷治癒過程におけるこれらの役割については遺伝子欠損マウスを使用して数多くの報告がなされているが、その機能は未だ不明な点も多い。マトリセルラープロテインであるオステオポンチン (OPN) やテネイシン-C (TN-C) の共通の受容体として $\alpha 9$ インテグリンが同定されている。そして、 $\alpha 9$ インテグリンもまた創傷治癒過程における役割が示唆されているが、 $\alpha 9$ インテグリン欠損マウスは出生後約 10 日で死亡してしまうため、その役割は現在までほとんど明らかにされていない。そこで、 $\alpha 9$ インテグリンの役割を検討するために、リガンドとの接着阻害能を持つ抗マウス $\alpha 9$ インテグリン抗体(55A2C)を使用して創傷治癒過程における $\alpha 9$ インテグリンの機能解析を行った。

【方法と結果】

C57BL/6 マウス背部に皮膚全層性欠損を作製し、傷の面積を測定したところ、創傷作製後 0~5 日、及び 7~10 日において、傷の面積の著しい低下が観察された。一方、創傷作製後 5~7 日においては傷の面積に顕著な変化は認められなかった。そこで、過去の報告をもとに今回作製したモデルの創傷治癒過程を創傷初期、創傷中期、創傷後期という 3 つの時期に分類し、各時期を創傷作製後 0~5 日、5~7 日、7~14 日と定義した。そして、これらの時期においてそれぞれ、傷の再上皮化、肉芽組織の形成、肉芽組織の収縮が起こると考えた。次に、創傷部位における $\alpha 9$ インテグリンとそのリガンドの発現の経時的変化を検討した。 $\alpha 9$ インテグリン遺伝子の発現は創傷後直ちに亢進し、創傷後 3~10 日にかけてその発現上昇は維持されていた。また、 $\alpha 9$ インテグリンのリガンドである OPN 及び TN-C 遺伝子も創傷部位で顕著な発現亢進を示した。そこで、全層性欠損を作製する 1 日前と創傷作製後 2 日目にマウス腹腔内に 55A2C を投与し、創傷治癒過程における $\alpha 9$ インテグリンの役割を検討した。

まず、傷の再上皮化に対する 55A2C 投与の影響を検討した。創傷組織切片のヘマトキシリン・エオシン染色像を用いて、再生表皮先端の幅と遊走表皮細胞の領域を測定することにより表皮細胞の遊走能及び増殖能を評価したが、対照群との有意な差は認められなかった。次に、肉芽組織の収縮に対する 55A2C 投与の影響を検討した。正常皮膚周縁部の距離の測定及び α -平滑筋アクチンに対する免疫組織染色を行い筋線維芽細胞の発現を観察したが、

対照群との有意な差は認められなかった。次に、免疫組織染色によりビメンチン陽性線維芽細胞の集積、CD31 陽性血管の形成、F4/80 陽性マクロファージが認められる領域を肉芽組織とし、またその中で、ビメンチン陽性線維芽細胞、CD31 陽性血管が密に集積している領域を成熟肉芽組織と定義し、それらの面積を測定した。その結果、55A2C 投与群において成熟肉芽組織面積が顕著に減少していることが観察された。さらに、55A2C 投与群において創傷後 7 日で成熟肉芽組織におけるビメンチン陽性線維芽細胞の密度も顕著に低下していることが観察された。しかし血管新生とマクロファージの浸潤に対する対照群との差は認められなかった。そこで、フローサイトメトリーを用いて、創傷部位から採取した線維芽細胞における $\alpha 9$ インテグリンの発現を確認したところ、線維芽細胞上での $\alpha 9$ インテグリンの発現が確認された。また、新生児マウス皮膚から単離した皮膚線維芽細胞を用いて、 $\alpha 9$ インテグリンのリガンドである TN-C に対する細胞接着試験及び細胞遊走試験を行った結果、皮膚線維芽細胞は TN-C と結合し、さらに、TN-C に対する遊走活性を示した。これらの線維芽細胞の機能は 55A2C の添加により特異的に抑制された。また、末梢血中に存在するフィブロサイトにおける $\alpha 9$ インテグリンの発現について検討を行ったが、発現は認めなかった。

【考察】

インテグリンと ECM との相互作用は、皮膚創傷治癒過程において重要な役割を担っていることが報告されているが、その中で $\alpha 9$ インテグリンの役割は不明である。そこで、55A2C を用いて、創傷治癒過程の 1) 傷の再上皮化、2) 成熟肉芽組織の形成、3) 肉芽組織の収縮、という 3 つの時期における $\alpha 9$ インテグリンの役割について検討を行ったところ、傷の再上皮化及び肉芽組織の収縮に対して 55A2C 投与の影響は認められなかった。従って、これらの過程は $\alpha 9$ インテグリン非依存的であるか、もしくは、その他のインテグリン等により $\alpha 9$ インテグリンの機能が補完されてしまったと考えられる。

一方、55A2C 投与により成熟肉芽組織面積の減少が認められ、さらに成熟肉芽組織内の線維芽細胞の密度が顕著に低下していることが観察された。また、創傷治癒過程において、 $\alpha 9$ インテグリンのみならず、そのリガンドである OPN や TN-C の発現も強く亢進することが確認された。さらに、*in vitro* において、皮膚線維芽細胞は $\alpha 9$ インテグリンを強く発現しており、TN-C に対する遊走活性は 55A2C で抑制されることを確認した。これは、 $\alpha 9$ インテグリンが線維芽細胞の運動に関与することを示唆するものである。以上の結果より、皮膚線維芽細胞上の $\alpha 9$ インテグリンは OPN や TN-C 等の ECM の受容体として遊走を促進する働きを持ち、これらの相互作用を 55A2C の投与により阻害することで創傷組織中への皮膚線維芽細胞の遊走が抑制され、それゆえ成熟肉芽組織の形成が遅延すると考えられた。さらに、皮膚線維芽細胞は OPN、TN-C の分泌能を有することが知られている。皮膚線維芽細胞上の $\alpha 9$ インテグリンは、これら自身の産生するマトリセルラープロテインに対してオートクライン、またはパラクライン的に遊走能を獲得すると考えられた。OPN や TN-C と $\alpha 9$ インテグリンの相互作用による成熟肉芽組織形成の機序について、更には、OPN、TN-C のどちらがより密接にその機序に関与するかについて、今後更なる詳細な検討が必要であると思われる。

【結論】

本研究により我々は以下のことを明らかにした。

1) 皮膚創傷部位において $\alpha 9$ インテグリンの発現が亢進していた。2) 皮膚線維芽細胞は $\alpha 9$ インテグリンを発現しており、その遊走活性は 55A2C によって抑制された。3) 皮膚全層性欠損モデルにおいて、傷の再上皮化、肉芽組織の収縮に対する 55A2C 投与の影響は認められなかった。4) 一方、55A2C 投与により成熟肉芽組織の形成が抑制された。これらの結果より、皮膚創傷治癒過程やその他の組織リモデリング過程において、 $\alpha 9$ インテグリンは線維芽細胞の遊走を調節することにより成熟肉芽組織の形成に重要な役割をもつことが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 清 水 宏

学 位 論 文 題 名

皮膚創傷治癒過程において

$\alpha 9$ インテグリンとそのリガンドの相互作用の阻害は

成熟肉芽組織の形成を遅延させる

皮膚は損傷を受けると、一連の創傷治癒反応が生じる。この創傷治癒過程において、組織中の細胞とそれを取り巻く細胞外マトリックス (ECM) や成長因子との相互作用が密接に関与する。最近では数多くの分泌型 ECM の存在も明らかになってきており、これらは創傷治癒過程において一過性に発現が亢進する。これらのタンパク質は「マトリセルラープロテイン」と総称され、創傷治癒過程におけるこれらの役割について遺伝子欠損マウスを使用して数多くの報告がなされているが、その機能は未だ不明な点も多い。マトリセルラープロテインであるオステオポンチン (OPN) やテネイシン-C (TN-C) の共通の受容体として $\alpha 9$ インテグリンが同定されている。 $\alpha 9$ インテグリンもまた創傷治癒過程における役割が示唆されているが、その役割は現在までほとんど明らかにされていない。そこで、 $\alpha 9$ インテグリンの役割を検討するために、リガンドとの接着阻害能を持つ抗マウス $\alpha 9$ インテグリン抗体(55A2C)を使用して創傷治癒過程における $\alpha 9$ インテグリンの機能解析を行った。

C57BL/6 マウス背部に皮膚全層性欠損を作製し、創傷部位における $\alpha 9$ インテグリンとそのリガンドの発現変化を検討したところ、 $\alpha 9$ インテグリン及びそのリガンドである OPN、TN-C 遺伝子の発現亢進が認められた。そこで、マウス腹腔内に 55A2C を投与し、創傷治癒過程における $\alpha 9$ インテグリンの役割を検討した。

まず、創傷組織切片のヘマトキシリン・エオシン染色像を用いて、再生表皮先端の幅と遊走表皮細胞の領域を測定することにより傷の再上皮化に対する 55A2C 投与の影響を検討したが、対照群との有意な差は認められなかった。次に、肉芽組織の収縮に対する 55A2C 投与の影響を検討した。肉芽組織の収縮は、正常皮膚周縁部の距離の測定及び α -平滑筋アクチンに対する免疫組織染色を行い筋線維芽細胞の発現を観察する事により判定したが、対照群との有意な差は認められなかった。次に、免疫組織染色により線維芽細胞や新生血管が高密度で存在する成熟肉芽組織の面積を測定したところ、55A2C 投与群において成熟肉芽組織面積が顕著に減少していることが観察された。さらに、55A2C 投与群において創傷後 7 日で成熟肉芽組織における線維芽細胞の密度も顕著に低下していることが観察された。また、新生児マウス皮膚から単離した皮膚線維芽細胞を用いて、 $\alpha 9$ インテグリンの

リガンドである TN-C に対する細胞遊走試験を行った結果、55A2C は皮膚線維芽細胞の TN-C に対する細胞遊走活性を特異的に抑制する効果を有していることが明らかとなった。最後に近年創傷治癒に関与することが報告されている末梢血中に存在するフィブロサイトについて $\alpha 9$ インテグリンの発現について検討を行ったが、発現は認めなかった。以上の結果より、皮膚創傷治癒過程において、 $\alpha 9$ インテグリンは線維芽細胞の遊走を調節することにより成熟肉芽組織の形成に重要な役割をもつことが示唆された。

公開発表に際し、副査の清水教授より、1) $\alpha 9$ インテグリンと介合する β 鎖、2) $\beta 1$ インテグリンと介合する $\alpha 9$ 以外のインテグリン、3) 55A2C の $\alpha 9$ インテグリン機能の抑制効果、4) $\alpha 9$ インテグリン欠損マウスを用いた創傷治癒実験に関する過去の報告事例の有無についての質問がなされた。次いで、副査の小野江教授から、1) $\alpha 9$ インテグリン欠損マウスの死亡原因、2) 55A2C 投与マウスにおける成熟肉芽組織の形成不全の創傷治癒に対する意義、3) 線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化機序についての質問がなされた。次いで、主査の上出教授から、1) $\alpha 9$ インテグリンコンディショナルノックアウトマウスと 55A2C 投与マウスにおける創傷治癒過程の差異、2) 創傷治癒における、抗 $\alpha 9$ インテグリン抗体の臨床応用の可能性についての質問がなされた。これらの質問に対して、申請者は過去に報告された $\alpha 9$ インテグリンや創傷治癒に関連する文献の引用、考察を交え、妥当な解答をなし得た。

この論文は、創傷治癒過程における $\alpha 9$ インテグリンの機能を見出したという点で高く評価され、今後、組織線維化等、線維芽細胞が関与する疾患に対する機序の解明が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。