

# 論文の内容の要旨

論文題目「細胞の浸潤・増殖・遊走を制御する新規低分子化合物による

創傷治癒促進機序の検討」

学位申請者 山岡 華児

キーワード： 創傷治癒、TGF- $\beta$ /Smad3シグナル、pirin、表皮角化細胞、真皮線維芽細胞

人口の高齢化に伴う難治性皮膚潰瘍患者の増加は、医療の現場において大きな問題になっている。創傷治癒は皮膚真皮の肉芽形成と表皮の再上皮化によってもたらされるが、両者のバランスを協調させて創傷治癒に導くような、難治性潰瘍に対する理想的薬剤はいまだに存在しない。Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) は皮膚線維芽細胞のコラーゲン産生を亢進させるいっぽうで、皮膚角化細胞の増殖や遊走に対しては抑制的にはたらくことが知られており、その細胞内シグナル伝達物質であるSmad3を欠失させたマウスでは、炎症細胞浸潤の抑制と欠損皮膚の再上皮化促進により早期の創傷治癒が得られることが報告された。共同研究者の稲垣らはTGF- $\beta$ /Smad3シグナルによるヒト I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子(*COL1A2*)の転写調節機構を解明する中で、転写因子YB-1がSmad3に拮抗することでTGF- $\beta$ の作用を抑制することを見出した。さらに、新規低分子化合物HSc025がYB-1の核内移行を促進してTGF- $\beta$ /Smad3シグナルの伝達を阻害すること、また最近ではHSc025の投与が実験的臓器線維症の進展を抑制することを明らかにしたが、同化合物の創傷治癒に対する効果の有無は不明であった。

そこで本研究では、TGF- $\beta$ /Smad3シグナルの創傷治癒に対する影響を肉芽形成と再上皮化の両面から検証するとともに、そのシグナルに拮抗するHSc025の創傷治癒促進機序を検討することで、難治性潰瘍に対する新たな治療法を開発することを目的とした。はじめに、*in vivo*のマウス創傷治癒モデルでは、HSc025を投与したマウスで肉眼的ならびに組織学的に早期の創閉鎖が得られたが、I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子(*Col1a2*)プロモーターの活性化やコラーゲンの沈着に有意な差異は見られなかった。浸潤した炎症細胞の免疫染色では、好中球やリンパ球数には両群間で差はなかったが、F4/80染色陽性のマクロファージがHSc025投与群で有意に減少していた。次いで

*in vitro*の検討では、HSc025はTGF- $\beta$ の作用に拮抗して培養表皮角化細胞の増殖と遊走を亢進させたが、真皮線維芽細胞においてはTGF- $\beta$ の有無にかかわらず、その遊走を促進した。線維芽細胞の遊走に対する効果を*in vivo*でも確認するため、*Colla2*エンハンサー・プロモーターに *Enhanced green fluorescent protein (EGFP)* 遺伝子を連結したレポーターマウスの創部に人工真皮を埋め込んだ。その結果、HSc025群の創部ではEGFP発現線維芽細胞の浸潤が有意に促進していた。培養線維芽細胞のcDNAマイクロアレイ解析を行ったところ、HSc025の添加により *pirin* 遺伝子の発現増強が確認された。さらに、*pirin* siRNAを用いた検討では、*pirin*発現をノックダウンした状態ではHSc025の遊走亢進作用は消失した。最後に、抗体アレイにより血管新生関連因子のスクリーニングを行ったところ、真皮線維芽細胞ではHSc025の添加により vascular endothelial growth factor (VEGF) が、表皮角化細胞ではplatelet-derived growth factor (PDGF)-AAとplacental growth factor (PIGF)の産生増加が認められた。

以上の結果より、HSc025は炎症細胞浸潤や表皮角化細胞の増殖・遊走に対してはTGF- $\beta$ に拮抗するとともに、*pirin*の発現誘導を介して真皮線維芽細胞の遊走をTGF- $\beta$ 非依存的に亢進させるなどの多彩な作用により、創傷治癒を促進することが明らかになった。これらの知見は、難治性の皮膚潰瘍に対する新たな治療薬を開発する上で、有用の情報をもたらすと考えられた。