

平成 2 6 年 6 月 1 0 日現在

機関番号：1 2 1 0 2

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：2 3 5 9 2 6 4 1

研究課題名（和文）創傷治癒過程における酸化ストレス応答タンパク質Trim16の分子機能

研究課題名（英文）Molecular function of Trim16 in wound healing

研究代表者

足立 孝二（Adachi, Koji）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：7 0 5 7 2 5 6 9

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,900,000 円、（間接経費） 1,170,000 円

研究成果の概要（和文）：Trim16はこれまでに、上皮組織に強い発現が認められる非分泌性のタンパク質であり、ケラチノサイト成長因子などのシグナル伝達に関与することが報告されている。しかし、詳細な分子機能は不明である。本研究は、皮膚の障害とくに紫外線照射による影響とTrim16との関係を解析した。Trim16をノックダウンした細胞、さらにTrim16-KOマウスともにUVBによるサンバーン形成が野生型と比べ顕著に起きることを見出した。これにはTrim16の欠失による抗アポトーシスタンパク質の低下が関与しており、Trim16がアポトーシス経路に対する調節機能を持っていることが示された。

研究成果の概要（英文）：Though Trim16 is known to be expressed in epidermal tissue, and involved in KGF signaling, the precise molecular function is unknown. In this study, we analyzed the role of Trim16 in sunburn formation by UVB irradiation on skin. We found that deficiency in Trim16 leads to high sensitivity to UVB by using Trim16 knock down cells and knockout mouse. Our data suggested decrease in the anti-apoptotic protein level is related to this phenomenon, Trim16 has a role in regulation of apoptosis pathway.

研究分野：創傷治癒学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：創傷治癒学 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

創傷治癒 wound healing は、生体に生じた損傷が実質細胞の再生と細胞外マトリクスの産生を介し修復される過程である。その調節には IL-1、IL-6 をはじめとして TGF- β などのサイトカインが深く関与し、急性期反応、滲出期の炎症細胞の遊走、血小板による止血作用や生理活性物質の分泌を経てから、修復期、増殖期の血管新生、線維芽細胞増殖、肉芽組織形成となり、癒痕期でコラーゲンが架橋されるという転帰をたどる。従来、それらの治癒機転についての各段階での検討を行っていたが、創傷治癒の開始点である受傷時のストレスから始まり、治癒過程における免疫応答のストレスなどの治癒過程における一連の創部環境のストレスの変化という視点から考えることは少なかった。さらに、臨床上日常的に見られる糖尿病患者の術後創傷治癒の遅延に対し、糖尿病性細小血管症による微小循環障害がその原因の一つと言われているが、その詳細は明らかではない。申請者らはこれまで、同年齢の同様な症例、同様な皮膚の傷害を受けているにもかかわらず、その治癒の過程が異なり、臨床の場での創傷治癒に影響を与える因子を分子生物学的手法で明らかにできないかと考えていたが、臨床のアウトプットと、従来の静的な分子自体の関係で見える方法では、ギャップを埋めることができず、苦慮していた。そこで今回、ストレス応答遺伝子という新しい概念から創傷治癒を捉えることを考え、この Trim16 (EBBP) 遺伝子の欠損マウスに着目して本研究の着想に至った。近年、生体のストレス防御系については、Nrf2-Keap1 システムが発見され注目を浴びている。Nrf2-Keap1 システムは外界からの新電子試薬をはじめとする種々のストレスに対して、Keap1 制御による転写因子 Nrf2 の核移行と、核内での Nrf2 の転写調節によって下流にある各種の防御系遺伝子を発現させて、外界からのストレスに対して生体が防御をおこなうという一連の分子メカニズムのモデルである。Nrf2 の抑制因子である Keap1 は細胞質で Nrf2 と結合し、Nrf2 をユビキチン-プロテアソーム系で常時早いターンオーバーで分解しているが、外界からのストレスで Keap1 の結合が解離し、転写因子の Nrf2 が核内移行し各種ストレス応答遺伝子のプロモーターに結合することによってストレス防御系の遺伝子を発現するというシステムである。

2. 研究の目的

本研究で着目する遺伝子 Trim16 (EBBP) は、Nrf2-Keap1 に制御されている遺伝子であり、申請者らは、Nrf2-Keap1 システムの研究過程で、血流やメスによる切開などにより生じる物理的外力に伴い発現変動する遺伝子をマイクロアレイにより網羅的に探求したところ、Trim16 (EBBP) の発現が Nrf2-Keap1 依存的に変動することを発見した。

Trim16 (EBBP) はこれまでに、上皮組織に強い発現が認められ、細胞質内に通常局在している非分泌性のタンパク質であり、ケラチノサイト成長因子やエストラジオール、レチノイン酸などのシグナル伝達に関与することが報告されている。しかし、これらの報告には Trim16 (EBBP) の持つ機能として一貫性がなく、共通の理解には至っていない。

以上を踏まえて、本研究では、皮膚創傷治癒過程における Trim16 (EBBP) の影響、役割を分子レベルで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) in vitro

ヒトケラチノ細胞 (HaCaT) 細胞に siRNA 処理により Trim16 をノックダウンする培養系を構築し、紫外線照射後の死細胞率、アポトーシスシグナル関連タンパク質の発現を調べた。

(2) in vivo

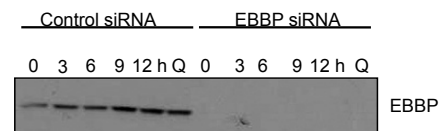
Trim16 ノックアウトマウスを作製し、背部を除毛後 UVB を照射し、継時的なサンバーン形成を観察した。また、皮膚組織の病理学的な解析を加えた。

4. 研究成果

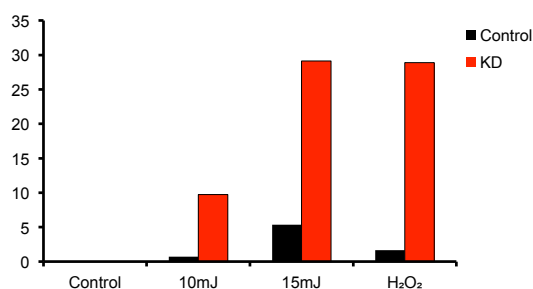
(1) in vivo

下図に示す通り、効率よく Trim16 をノックダウンする培養系が構築できた。

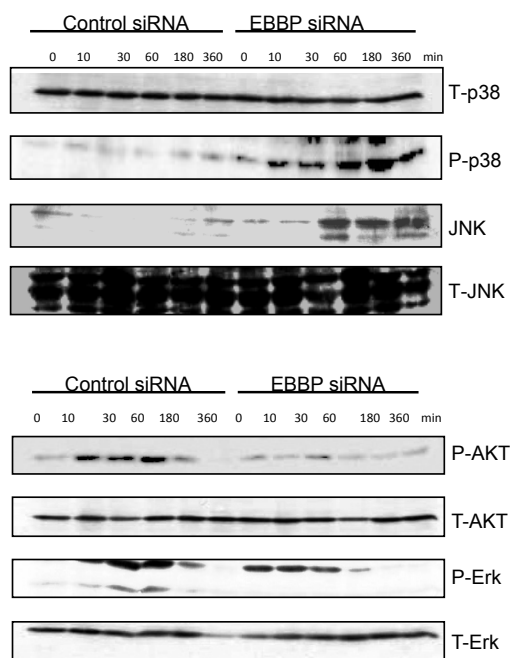
UVB 10 mJ/cm²
照射後 0-12 h



以下に示す通り、ノックダウン細胞は紫外線による細胞死が著しく亢進していた。さらに過酸化水素に対しても著明な細胞死が見られた。

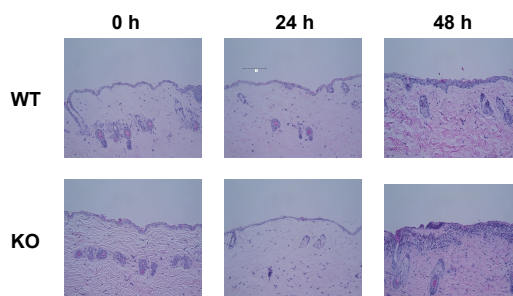


このとき、アポトーシス関連タンパク質の発現を調べたところ、下図のように、Trim16 ノックダウン細胞でアポトーシス誘導タンパク質の活性化亢進、抗アポトーシスタンパク質量の低下がみられ、シグナル伝達のレベルでアポトーシス誘導が亢進していることが明らかになった。



(2) in vivo

野生型、Trim16-KO マウスの皮膚に UVB を照射し、その後に起きるサンバーンの形成を継続的に観察した。その結果、次図に示す通り、KO マウスの皮膚では、著明なアポトーシス細胞の増加、および炎症性細胞の浸潤を認め、UVB による障害が増悪することが明らかとなった。またこのとき、アポトーシス関連タンパク質については、in vitro で見られたものと同様に、シグナル伝達タンパク質の有意な増減が見られた。



以上の結果から、Trim16 はアポトーシスシグナルの調節因子であり、その欠損により、紫外線照射による障害が増悪されることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文]

なし

[学会発表] (計 21 件)

1. Eiji Warabi, Kentaro Akiyama, Junichi Shoda and Tetsuro Ishii. Obesity in p62-KO mice is prevented by estradiol. The Environmental Response, 2014. 2. 28, Sendai
2. 蕨 栄治、石井哲郎、正田純一. p62/Sqstm1 欠損は中枢におけるレプチン抵抗性により過食を引き起こす. 第 8 回臨床ストレス応答学会 2013. 11. 15、松本
3. 蕨 栄治、秋山健太郎、正田純一. p62:Nrf2 遺伝子二重欠損マウスは過食により NASH を自然発症する. JDDW 2013. 10. 9、東京
4. 秋山健太郎、岡田浩介、正田純一、蕨 栄治. p62:Nrf2 遺伝子二重欠損マウスは脂肪性肝炎を自然発症する. 第 68 回日本生化学会 2013. 9. 11、横浜
5. Tetsuro Ishii, Eiji Warabi, Richard C.M. Siow and Giovanni E. Mann. Interaction of Sequestosome1/p62 with voltage-activated potassium channels in arterial smooth muscle cells in injury-induced arterial remodeling. IUPS2013, 2013. 6. 21, Birmingham, UK
6. 蕨 栄治、柳川徹、正田純一.

- p62/Sequestosome1 欠損によるメタボリックシンドローム発症機序の解析. 第 66 回日本酸化ストレス学会 2013.6.13、名古屋
7. 秋山健太郎、正田純一、蕨 栄治. 過食肥満により脂肪性肝炎を自然発症する p62:Nrf2 遺伝子二重欠失マウスの腸管病変とその病態的意義. 第 21 回肝病態生理研究会 2013.6.5、東京
 8. 秋山健太郎、正田純一、蕨 栄治. 過食肥満により脂肪性肝炎を自然発症する p62:Nrf2 遺伝子二重欠失マウスの腸管病変とその病態的意義. 第 49 回日本肝臓学会 2013.6.6、東京
 9. 池田瑛、蕨 栄治、正田純一. 脂肪性肝炎を自然発症する過食肥満マウスの腸管病変と病態的意義. 第 99 回日本消化器病学会総会 2013.3.21、鹿児島
 10. 蕨 栄治、岡田浩介、正田純一. Nrf2 : p62 遺伝子二重欠損マウスは脂肪性肝炎を自然発症し、肝腫瘍を発生する JDDW 2012.10.10、神戸
 11. 蕨 栄治、岡田浩介、徳重克年、橋本悦子、正田純一. Nrf2/p62 遺伝子二重欠損マウスは脂肪性肝炎を自然発症し、肝腫瘍を発生する. 第 20 回肝病態生理研究会 2012.6.6、金沢
 12. 蕨 栄治、岡田浩介、徳重克年、橋本悦子、正田純一. Nrf2/p62 遺伝子二重欠損マウスは脂肪性肝炎を自然発症し、肝腫瘍を発生する. 第 48 回日本肝臓学会総会 2012.6.7、金沢
 13. Eiji Warabi, Airi Ueda, Tetsuro Ishii. Estradiol prevents obesity formation in Sqstm1/p62-KO mice. 16th SFRRI Biennial Meeting, 2012.9.6, London, UK
 14. Sechang Oh, Eiji Warabi, Masayuki Yamamoto, Kiyoji Tanaka, Junichi Shoda. Nrf2 activation remarkably improves exercise endurance capacity in mice. 16th SFRRI Biennial Meeting, London, 2012.9.6, London, UK
 15. Eiji Warabi. Non-dipper-like hypertension in sequestosome1 deficient mice, Molecular Mechanisms of Stress Response in Disease, 2012.4.6, Tsukuba
 16. Satoshi Sakai, Eiji Warabi, Satoru Katayanagi, Toru Yanagawa, Tetsuro Ishii. Deficiency of sequestosome1 accelerates neointimal hyperplasia and carotid artery remodeling, Molecular Mechanisms of Stress Response in Disease, 2012.4.6, Tsukuba
 17. Kosuke Okada, Eiji Warabi, Ken Itoh, Tetsuro Ishii, Masayuki Yamamoto, Junichi Shoda. Nrf2 plays protective roles against nutritional steatohepatitis. Molecular Mechanisms of Stress Response in Disease, 2012.4.6, Tsukuba
 18. Norihiko Kikuchi, Yukio Ishii, Toru Yanagawa, Eiji Warabi, Tetsuro Ishii. The role of peroxiredoxin I in the development of bleomycin-induced acute lung injury and pulmonary fibrosis. Molecular Mechanisms of Stress Response in Disease, 2012.4.6, Tsukuba
 19. Eiji Warabi. Deficiency of Sequestosome1 causes hyperphagia due to leptin-resistance in the brain. Symposium on Behavioral Molecular Neuroscience, 2012.3.19, Tokyo
 20. Eiji Warabi, Satoshi Sakai, Eiko Suzuki, Takashi Tomoo, Toru Yanagawa, Giovanni E. Mann, Tetsuro Ishii. Non-dipper-like hypertension in sequestosome1/p62/A170 deficient mice in early phase of obesity. Physiology2011, 2011.6.11, Oxford, UK

21. 岡田浩介、杉本浩一、正田純一、堀江正樹、蕨 栄治、石井哲郎、後藤直宏、山本雅之. 動脈硬化＋高脂肪食誘発脂肪性肝炎における転写因子 Nrf2 の役割. 臓学学会総会 2011. 10. 20、福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 孝二 (ADACHI, Koji)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：70572569

(2) 研究分担者

蕨 栄治 (WARABI, Eiji)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：70396612

柳川 徹 (YANAGAWA, Toru)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：10312852

(3) 連携研究者

なし