

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861692

研究課題名(和文) クロトー遺伝子が皮下脂肪織および皮膚創傷治癒に及ぼす影響について

研究課題名(英文) Effect of Klotho gene on subcutaneous fat tissue and skin wound healing

研究代表者

山内 誠 (YAMAUCHI, Makoto)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：90438060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：野生型マウスとklothoマウスではアディポネクチン遺伝子に発現に有意差を認めなかった。LPS誘導性TNF- $\alpha$ 産生は分泌型-klotho蛋白存在下では抑制されず、FGF23存在下に有意に増強した。FGF23は-klotho蛋白の存在の有無にかかわらずTNF- $\alpha$ 産生を促進するよう機能している可能性がある。klothoマウスでは、TNF- $\alpha$ の過剰産生が創傷治癒遅延に関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Expression of Adiponectin mRNA was not significantly different between wild type and klotho deficient mice. LPS-induced TNF- $\alpha$  production was not suppressed in the presence of Secreted -klotho protein but was significantly increased in the presence of FGF23. Thus, FGF23 may have a function to promote TNF- $\alpha$  production independently of -klotho protein. In klotho deficient mice, excess production of TNF- $\alpha$  in wounds might cause delay in wound healing.

研究分野：形成外科

キーワード：老化 病理学 免疫学

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚は、全身の恒常性を維持する最大の臓器であり、老化による変化が現れやすい。萎縮、下垂、皺壁形成、毛根の減少などの老化現象のほかに、褥瘡・難治性潰瘍などの病的変化も起こる。臨床では特に外傷などを契機に潰瘍化し、治癒まで長期を要することも少なくない。その機序の解明は重要であるにも関わらず、治癒遷延のメカニズムを解明するに至っていない。

ヒト老化の動物モデルとして  $\alpha$ -klotho 欠損マウス (以下、klotho マウス) に注目し、研究を行っている。klotho マウスは、ヒトの老化症状に酷似した多彩な表現型を示すことが知られている。このマウスは 5 番染色体上の外来遺伝子の挿入変異により  $\alpha$ -klotho 遺伝子の転写開始部を含む領域に欠失があり、 $\alpha$ -klotho 遺伝子の発現が著しく減少している機能欠損マウスである。常染色体劣性遺伝により、ホモ変異型では短命、皮膚の萎縮、肺気腫、動脈硬化、骨粗鬆症、不妊などのヒト老化の表現型に酷似した多彩な異常が認められる。また、皮膚には発現していないにも関わらず、klotho マウスは野生型に比し毛根数の減少や、真皮層・脂肪層の薄様化、真皮コラーゲン量の減少などがみられる。特に皮下脂肪織の薄様化は著しく、最も目立つ変化の一つである。ヒト老化皮膚も同様の変化を認め、これが褥瘡などの発生率にも関与している。しかし、この原因は分かっておらず、創傷治癒の研究をしている施設も他に存在しない。それは、klotho マウスは開発当初より麻酔や手術などの外的ストレスに非常に脆弱とされており、これまでの諸家の報告では操作直後に大半が死亡するために実験困難と結論付けられていたことも理由の一つと思われる。(倉林正彦: コスメトロジー研究報告; 第 11 号, 2003.) 我々は生存率改善のために種々の工夫を行い、死亡率を 10% 以下とし、皮膚潰瘍モデルとしての使用を可能にした。(3<sup>rd</sup>

Annual Academic Surgical Congress 2008 にて発表)

この klotho マウスの背部に皮膚潰瘍を作成し創傷治癒過程を検討したところ、野生型と比較して klotho マウスでは、明らかに創閉鎖までの期間が遷延し、肉芽組織、炎症細胞数、コラーゲン量の減少を認めた。 $\alpha$ -klotho 蛋白には膜型と分泌型があり、分泌型  $\alpha$ -klotho 蛋白は、分泌型ホルモンとして作用し、マウスでも  $\alpha$ -klotho 遺伝子が発現していない臓器に作用して変化を起こすと考えられているが、まだまだ、不明な点も多い。野生型での皮膚潰瘍部において、炎症反応の惹起などにより、 $\alpha$ -klotho の発現が誘導されていないか、RT-PCR にて mRNA レベルで確認をしたが、発現はしていなかった。このことから、分泌型  $\alpha$ -klotho 蛋白をはじめとする液性因子の関与が予想された。

klotho マウスの皮膚潰瘍を作成し、潰瘍周囲に分泌型  $\alpha$ -klotho 蛋白を皮下投与しても創傷治癒期間に変化は認めず、また、創収縮などに最も重要な真皮層の構成成分である線維芽細胞に  $\alpha$ -klotho recombinant protein や FGF23 recombinant protein の存在下に培養をしても線維芽細胞の機能に影響を与えていなかった。この *in vivo*、*in vitro* の結果より、単純に、直接、分泌型  $\alpha$ -klotho 蛋白が線維芽細胞に作用しているのではなく、サイトカイン分泌に関与している可能性が示唆された。

前述の通り、klotho マウスの脂肪組織は著明な変化を認めており、脂肪組織は生体のおかれた環境に応じてさまざまな液性因子を分泌している。これらの液性因子はアディポカインと総称されるが、そのひとつにアディポネクチンがある。アディポネクチンは、肥満や痩せている状態では分泌が減少するため、klotho マウスでも分泌が低下していることが予想される。また、アディポネクチンは keratinocyte の増殖や分化に影響を及ぼしているという報告もあり、分泌低下は創傷治癒

遷延の原因となりうる。また、分泌型 klotho 蛋白は、幹細胞増殖に必要な Wnt シグナルの活性化を抑制とされている (Liu H et al. Science. 317:803-806, 2007.) klotho マウスでは持続的な Wnt シグナルの活性化により幹細胞が枯渇し、創傷治癒が遷延する可能性が示唆されており、さらに脂肪組織中に存在する脂肪由来幹細胞 (adiposederived stem cell, ASC) も枯渇し、薄様化を来している可能性もある。以上のように、脂肪組織に由来するアディポネクチンや ASC を測定することにより、皮下脂肪織の薄様化の原因だけではなく、創傷治癒遷延の原因も同時に検討する予定である。

## 2. 研究の目的

従来、皮膚に対する物理的な実験が困難とされていた klotho マウスを用いて、“老化皮膚潰瘍の治癒遷延メカニズムの解明”の研究を行っており、今回は皮下脂肪織の著明な薄様化に注目し、その原因究明と創傷治癒に及ぼす影響について研究を行う。現在、創収縮などに最も重要な真皮層の構成成分である線維芽細胞の研究も並行して行っており、最終的には難治性皮膚潰瘍における治癒遷延のメカニズムを解明し、将来的には褥瘡・難治性潰瘍など臨床幅広く見られる疾患の治療法を開発することを目的としている。

## 3. 研究の方法

(1) klotho マウスおよび野生型マウスの正常皮膚、創部におけるアディポネクチン発現

生後 6 週の klotho マウスおよび野生型マウスの正常皮膚、創部におけるアディポネクチン発現について比較検討した。klotho マウスおよび野生型マウスを用いて、正常皮膚、および、皮膚欠損作成後 3、6、8、10、12 日の創部を採取後、mRNA を抽出し、創部におけるアディポネクチン遺伝子の経時的 mRNA 発現を RT-PCR にて解析を行った。

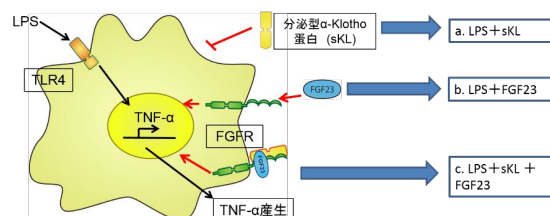
(2) klotho マウスおよび野生型マウスの血清中の分泌型  $\alpha$ -klotho 蛋白、FGF23 の測定

klotho マウスでは、分泌型  $\alpha$ -klotho 蛋白が欠損しており、膜型  $\alpha$ -klotho 蛋白が欠損しているため、血中 FGF23 濃度が上昇されている。実際に研究に用いているマウスが報告通りか、生後 6 週の klotho マウスおよび野生型マウスを用いて血清中の分泌型  $\alpha$ -klotho 蛋白と FGF23 の濃度を ELISA にて測定した。

(3) 脾細胞の LPS 誘導性 TNF- $\alpha$  産生に対する分泌型  $\alpha$ -klotho 蛋白や FGF23 が与える影響

$\alpha$ -klotho が、外傷などの外来刺激により分泌される TNF- $\alpha$  を抑制している可能性を確認するため、分泌型  $\alpha$ -klotho 蛋白や FGF23 が脾細胞の LPS 誘導性 TNF- $\alpha$  産生に与える影響を評価した。

klotho マウスでは、分泌型  $\alpha$ -klotho 蛋白が欠損しており、膜型  $\alpha$ -klotho 蛋白も欠損しているため、血中 FGF23 濃度が上昇している。klotho マウスにおいて、TNF- $\alpha$  が増強されている原因として下記の 3 種類の可能性が考えられた。

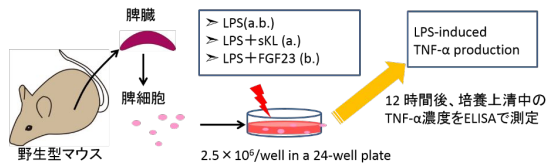


a. 分泌型  $\alpha$ -klotho 蛋白により TNF- $\alpha$  の分泌が抑制されていない可能性

b. 過剰な FGF23 が TNF- $\alpha$  産生を促進している可能性

c. FGF23 が、TNF- $\alpha$  の分泌を促進するには、膜型と同様に分泌型  $\alpha$ -klotho 蛋白が co-receptor として機能する必要がある可能性

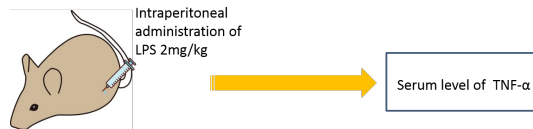
そのために野生型マウスの脾臓から、マクロファージや好中球を含む脾細胞を分離し、その脾細胞に LPS、分泌型  $\alpha$ -klotho 蛋白、FGF23 を投与し、12 時間後に培養上清中の TNF- $\alpha$  濃度を ELISA にて測定した。



他の研究にて、a.および b.の 2 項目につき検討を行っており、LPS 誘導性 TNF- $\alpha$  産生は、分泌型  $\alpha$ -klotho 蛋白により抑制されず、 $\alpha$ -klotho 蛋白非存在下での FGF23 投与により有意に増強した。今回、c.の項目につき検討を行う。

(4) klotho マウスおよび野生型マウスへの LPS 腹腔内投与が血清 TNF- $\alpha$  濃度および創傷治癒に与える影響の検討

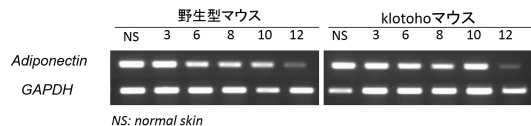
生後 6 週の klotho マウスおよび野生型マウスの腹腔内に LPS 2mg/kg を投与し、2 時間後の血清中の TNF- $\alpha$  濃度を ELISA にて測定した。



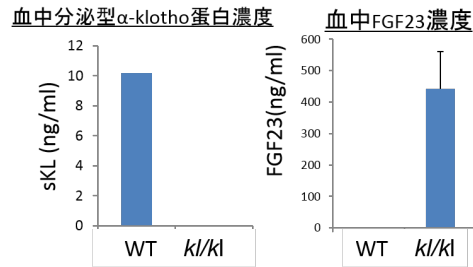
また、同様に腹腔内に LPS 投与し、背部に背部にそれぞれ直径 6mm の皮膚欠損を作成し、創閉鎖期間、創部での組織像および  $\alpha$ -klotho mRNA 発現を比較検討した。創閉鎖期間は、皮膚欠損作成時の面積を 100%として、その後の創面積の収縮率を経時的に測定した。

#### 4. 研究成果

(1) アディポネクチン遺伝子の発現は klotho マウスと野生型マウスでの有意差を認めなかった。

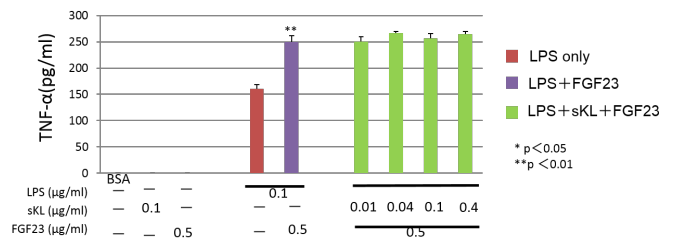


(2) klotho マウスでは、分泌型  $\alpha$ -klotho 蛋白は測定できず、血中 FGF23 濃度は、野生型マウスの 2500 倍に増加していた。



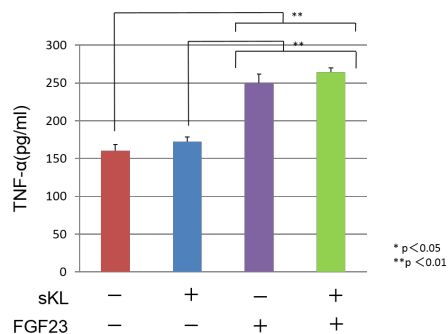
(3) 脾細胞の LPS 誘導性 TNF- $\alpha$  産生に対する分泌型  $\alpha$ -klotho 蛋白や FGF23 が与える影響の評価

c. FGF23 が、TNF -  $\alpha$  の分泌を促進するには、分泌型  $\alpha$ -klotho 蛋白が co-receptor として機能するか検討するため、FGF23 の投与量を一定にし、分泌型  $\alpha$ -Klotho 蛋白の投与濃度を変更したが、FGF23 単独投与の結果と分泌型  $\alpha$ -klotho 蛋白添加による結果は有意差を認めなかった。



a. ~ c. の 3 つのデータをまとめると、分泌型  $\alpha$ -klotho 蛋白単独投与では TNF- $\alpha$  産生は抑制されず、FGF23 単独投与により TNF- $\alpha$  産生は有意に増強した。これは、分泌型  $\alpha$ -klotho 蛋白の有無により影響を受けなかった。

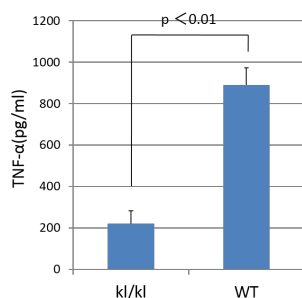
つまり、FGF23 は、 $\alpha$ -klotho 蛋白 非依存性に、脾細胞の LPS 誘導性 TNF- $\alpha$  産生を有意に増強していることが分かった。



一般的に、FGF23 のシグナル伝達には膜型

$\alpha$ -klotho 蛋白が必須とされているが、本研究により FGF23 が  $\alpha$ -klotho 蛋白非依存性に機能する分子機構があることが示唆された。FGF23 が TNF- $\alpha$  産生を促進し、創部での過剰な TNF- $\alpha$  産生が起こっている可能性が考えられた。

(4) LPS 腹腔内投与による血清 TNF- $\alpha$  濃度は野生型マウスの方が有意に klotho マウスより高値であった。



また、創傷治癒期間は、LPS 腹腔内投与の有無により有意差を認めなかった。

## 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〕(計 1 件)

1. Yamauchi M, Hirohashi Y, Torigoe T, Matsumoto Y, Yamashita K, Kayama M, Sato N, Yotsuyanagi T.

Wound healing delays in  $\alpha$ -Klotho-deficient mice that have skin appearance similar to that in aged humans - Study of delayed wound healing mechanism.

Biochem Biophys Res Commun. 13;473(4):845-52, 2016

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山内 誠 (YAMAUCHI, Makoto)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：9043806

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：