



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	プロテアソーム機能低下が褥瘡の病態形成に与える影響 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	村田, 恵理
Description	配架番号 : 2632
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14520号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81546
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Eri_Murata_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏 名 村田 恵理

学 位 論 文 題 名

プロテアソーム機能低下が褥瘡の病態形成に与える影響

(Decreased proteasomal function increases oxidative stress in the early stage of pressure ulcer)

【背景と目的】褥瘡とは、皮膚が圧迫や剪断応力を受け、虚血、循環障害により組織壊死をもたらす疾患である。近年、病態形成における虚血再灌流障害 (ischemia-reperfusion injury; IRI) が注目されており、再灌流により発生する活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) に起因する酸化ストレスが炎症と組織傷害の中心的な役割を担うと考えられている。

プロテアソームは細胞内タンパク質分解酵素複合体であり、細胞周期やシグナル伝達等、細胞の生命活動に重要な役割を担い、酸化ストレス応答もそのひとつである。プロテアソームの機能は加齢により低下し、様々な疾患と密接に関連するが、プロテアソーム機能と褥瘡の関連は今のところ明らかにされていない。本研究では、高齢者における褥瘡形成を念頭においたモデルとして、老化の表現型を示すプロテアソーム機能低下マウスを用いて皮膚 IRI モデルを作製し、組織傷害や酸化ストレスの変化、酸化ストレス応答関連分子の発現変化を解析した。IRI における細胞障害を検討する目的で、マウス皮膚線維芽細胞を用い、プロテアソーム阻害剤負荷や低酸素・再酸素 (Hypoxia/Reoxygenation; H/R) 環境における細胞ストレス、酸化ストレス応答関連分子の発現変化を検討した。また、フリーラジカル消去剤である Edaravone (EDA) の IRI モデル、細胞の H/R に与える効果について検討した。

【材料と方法】プロテアソーム機能低下マウスとして酵素活性の低い $\beta 5t$ サブユニットを全身発現するトランスジェニックマウス ($\beta 5t$ transgenic mouse; Tg) を用いた。酸化ストレス可視化レポーターマウス (Keap1-dependent Oxidative stress Detector, No-48; OKD)、酸化ストレス応答経路の活性化したマウス Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap-1) 欠損マウス (Keap-1^{-/+})、およびこれらのマウスと Tg を交配した OKD/Tg、Keap-1^{-/+}/Tg を作製した。実験には 8-12 週齢のマウスを使用し、コントロールには野生型 (wild type; WT) C57B6 マウスを用いた。

皮膚 IRI モデルは既報に則り、マウス背部の皮膚にマグネットを装着し(虚血)、12 時間後にマグネットを外す(再灌流)ことで作製し、マグネットを外した IRI 直後(0h)及び 24 時間後(24h)の変化について、肉眼的、組織学的評価を行った。また、IRI 部皮膚組織から抽出した total RNA を用い、炎症性サイトカイン、細胞接着分子、酸化ストレス応答関連分子の発現を定量的 RT-PCR 法にて検討した。酸化ストレスの検討には、皮膚 IRI 後のルシフェリン発光量を IVIS® Spectrum CT にて測定した。

マウス皮膚線維芽細胞 (fibroblast; FC) はマウス皮膚組織からコラーゲン処理により分離・培養した。プロテアソーム阻害剤 (MG132) 含有培地で培養した後、低酸素培養キットを使用し H/R 処理を行い、再酸素化 0h、12 時間(12h)、24h における酸化ストレス、ROS 産生、定量的 RT-PCR 法による酸化ストレス応答関連分子の発現解析を行った。

EDA は IRI、H/R 処置の 30 分前に添加し、IRI の組織傷害や酸化ストレスの変化、細胞 H/R

処理における酸化ストレス、酸化ストレス応答関連分子の発現解析を行った。

【結果】プロテアソーム機能低下を示す Tg では、WT に比較して皮膚 IRI における組織傷害が増悪した。IRI の病態形成に影響を与える炎症性サイトカインや接着分子の発現を検討した結果では、WT と Tg の間に有意差を認めなかった。Tg では IRI による酸化ストレスの亢進を認めたが、酸化ストレス応答に働く Nrf2 経路を活性化させた Keap-1-^{-/+}/Tg において IRI による組織障害は十分に改善されなかった。

FC を用いた検討では、プロテアソーム阻害剤の負荷は H/R 環境における細胞ストレスを増強し、ROS 産生を増加させた。酸化ストレス応答関連分子の発現は H/R 0h-12h にかけて増強したものの、24h では Nrf2 の活性化に引き続いて起こる抗酸化酵素群の発現を認めなかった。

また、フリーラジカル消去剤である EDA は Tg の皮膚 IRI を改善し、酸化ストレスを抑制した。EDA は FC に発生する酸化ストレスを抑制したが、酸化ストレス応答転写因子および抗酸化酵素群の発現に変化は見られなかった。

【考察】老化は褥瘡の重大な危険因子であるものの、褥瘡の病因として老化に焦点を当てた研究は殆どみられない。本研究では、加齢の表現型を示すマウスモデルを用いて、プロテアソーム機能低下が IRI の初期段階における皮膚損傷を悪化させることを示した。更に、細胞培養系を用いた検討により、プロテアソームの機能障害は H/R による酸化ストレスを増大させ、ROS 産生が増加する一方、Nrf2 経路の活性化による抗酸化応答が適切に機能しない可能性を示した。また、プロテアソーム機能低下により生じた酸化ストレスはフリーラジカルスカベンジャーである EDA により効果的に抑制された。これらの結果は、プロテアソーム機能が低下した高齢者の褥瘡の初期段階において、EDA 投与が保護効果をもたらす可能性があることを示唆している。

プロテアソーム機能低下モデルにおける皮膚 IRI の悪化の要因には、(1)ROS の増加、(2)Nrf2 経路の活性化による抗酸化反応が十分に機能していない、という 2 つの可能性が考えられる。ROS の増加に関しては、プロテアソーム機能障害がミトコンドリアに損傷を与えることにより、ROS を増加させることが報告されている。Nrf2 経路の活性化による抗酸化反応が十分に機能しない点については、現在のところ、プロテアソーム機能障害が Nrf2 下流の抗酸化遺伝子のシグナル伝達に直接影響を与えるという報告はない。その一方で、Nrf2 活性化経路が加齢により衰退することが報告されている。プロテアソームはシグナル伝達やタンパク質恒常性の維持に重要な役割を果たしており、Nrf2 のシグナル伝達系への影響について解析を進めることで、酸化ストレスと老化・老化関連疾患の病態形成の分子メカニズムの解明が前進することが期待される。

プロテアソーム活性の加齢に伴う減少は、多数の臓器で報告されている。高齢者や老化した皮膚から分離された FC ではプロテアソーム活性が低いことが報告されており、皮膚 FC は IRI による酸化ストレスに対し感受性が高いことが推定される。加齢により発症リスクの高まる老化関連疾患の研究においては、加齢による生理的变化を反映するモデルを用いた病態解析を進めることが重要と考えられる。今後の展望として、加齢によるレドックスバランスの悪循環を改善する予防薬や治療薬の開発が望まれる。

【結論】本研究により、プロテアソームの機能低下は酸化ストレスの亢進による皮膚 IRI を増悪させることを明らかにした。プロテアソーム機能は加齢により低下することが報告されており、高齢者における褥瘡の病態発症に影響する可能性が考えられる。