



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14520
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96788
Type	doctoral thesis
File Information	Eri_Murata.pdf



学 位 論 文

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)

2021 年 3 月

北海道大学

村田恵理

学 位 論 文

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)

2021 年 3 月

北海道大学

村田恵理

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁

第一章 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た皮膚虚血再灌流障害モデルでの検討

緒言	8 頁
方法	9 頁
結果	12 頁
考察	16 頁

第二章 マウス皮膚線維芽細胞を用いた低酸素/再酸素化モデルでの検討

緒言	17 頁
方法	18 頁
結果	20 頁
考察	24 頁

第三章 フリーラジカル消去剤 Edaravone が皮膚虚血再灌流障害及び細胞の低酸素/再酸素化に与える効果

緒言	26 頁
方法	28 頁
結果	30 頁
考察	35 頁

総括および結論	36 頁
---------	------

謝辞	38 頁
----	------

利益相反	39 頁
------	------

引用文献	40 頁
------	------

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 村田恵理 1) 吉田拓磨 1) 山本彩晶 2) 牧田啓史 1) 石津明洋 3)
外丸詩野 1) 笠原正典 1)

1)北海道大学大学院 医学研究院 分子病理学教室 2)北海道大学 医学部看護学科
3)北海道大学大学院 保健科学研究所

「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」

第 108 回病理学会総会 2019 年 5 月 9 日～5 月 11 日・東京国際フォーラム

2. 村田恵理 1) 吉田拓磨 1) 山本彩晶 1) 牧田啓史 1) 石津明洋 2)
外丸詩野 1) 笠原正典 1)

1)北海道大学大学院 医学研究院 分子病理学教室 2)北海道大学大学院 保健科学
研究所

「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」

第 109 回病理学会総会 2020 年 7 月 1 日～7 月 31 日・オンライン総会（WEB 開催）

要旨

【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（Tg）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 における細胞傷害を検討する目的で、マウス皮膚線維芽細胞（FC）を用い、プロテアソーム阻害剤の負荷や低酸素/再酸素化（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】

第一章では、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）、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、実験に用いた。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）C57BL/6 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 部の皮膚組織から抽出した total RNA を用いて、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 後のルシフェリンの発光量を IVIS® Spectrum CT にて測定した。

第二章では、マウス皮膚線維芽細胞（fibroblast; FC）をマウス皮膚組織からコラゲナーゼ処理により分離・培養し実験に用いた。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、12h、24h における酸化ストレスの変化、ROS の産生、細胞死の誘導、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。

第三章では、EDA を皮膚 IRI、細胞 H/R 処置の 30 分前に投与し、IRI の組織傷害や酸化ストレスの変化、H/R 処置における酸化ストレスの変化、ROS の産生、細胞死の誘導、酸化ストレス応答関連分子の発現解析を行った。

【結果】

第一章において Tg では、WT と比較し皮膚 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 では皮膚 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 において皮膚 IRI による組織傷害は十分に改善されなかった。

第二章において、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 における細胞ストレスを増強し、ROS の産生と細胞死の誘導を増大させた。酸化ストレス応答関連分子の発現は H/R 処置後 0h から 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。

第三章において、EDA は Tg の皮膚 IRI を改善し、酸化ストレスを抑制した。EDA はプロテアソーム阻害下の H/R 処置により FC に発生する酸化ストレスと ROS の産生及び細胞死を抑制したが、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は影響が見られなかった。

【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、第一章において、Tg を用いてプロテアソーム機能の低下は皮膚 IRI の初期段階における皮膚創傷を悪化させることを示した。第二章では、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 産生と細胞死の誘導を増大する一方、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。更に第三章では、プロテアソーム機能低下により生じた酸化ストレスは

EDA により効果的に抑制されることを示した。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 の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。

Tg 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関しては、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により、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、加齢による生理的変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り皮膚 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。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

Actb	Beta-actin
ARE	antioxidant response element
cDNA	complementary DNA
EPUAP	European pressure ulcer advisory panel
EDA	Edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one, MCI-186)
FC	fibroblast
GPx1	glutathione peroxidase 1
HO-1	heme oxygenase-1
H/R	Hypoxia/Reoxygenation
ICAM1	intercellular adhesion molecule-1
IL-1 β	interleukin-1 beta
IL-6	interleukin-6
IP	intraperitoneal administration
IRI	Ischemia reperfusion injury
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
NPUAP	national pressure ulcer advisory panel
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase (quinone) 1
Nrf2	nuclear factor erythroid 2 [NF-E2]-related factor 2
NT	no treatment
OKD	Keap1-dependent Oxidative stress Detector, No-48 mouse
PBS	Phosphate-buffered saline
qPCR	quantitative PCR
ROS	reactive oxygen species
RT	reverse transcription
SOD1	superoxide dismutase 1
SPF	specific pathogen-free
Tg	β 5t Transgenic mouse
TNF α	tumor necrosis factor-alpha
VCAM1	vascular cell adhesion molecule-1
WT	wild type mouse

緒言

【背景】

褥瘡とは皮膚の長時間の圧迫により生じ、皮膚が圧迫や剪断応力を受け、虚血、循環障害、栄養不良などにより組織壊死をもたらす疾患である。褥瘡は従来、圧迫に伴う慢性虚血が褥瘡形成に重要であると考えられてきたが、近年、虚血後の再灌流障害の影響が注目されている。虚血再灌流障害（ischemia-reperfusion injury; IRI）では、虚血状態の組織への血液の再灌流により活性酸素種（reactive oxygen species; ROS）やフリーラジカル等が発生し、炎症性サイトカインが増加し、好中球やマクロファージの浸潤により炎症が増悪し組織傷害の悪化をもたらすと考えられている(Wu et al., 2018)。過剰に産生された ROS は細胞に酸化ストレスを引き起こす(Birben et al., 2012)。IRI では再灌流により生じる ROS に起因する酸化ストレスがその中心的な役割を担うとされている(Wu et al., 2018)。

褥瘡は急性期病棟から長期療養施設、在宅医療の現場まで広く認められる疾患であり(日本褥瘡学会実態調査委員会, 2018)、超高齢化が進む日本において、患者予後はもちろん医療経済に与える影響の観点からも褥瘡は重要な社会問題である。近年、褥瘡の早期変化に着目した検討が行われ、褥瘡に至る症例では、急性期の皮膚発赤の時点で皮膚深部の組織損傷 Deep Tissue Injury (DTI) が生じていることが報告されている(Saito et al., 2008)。DTI を含む褥瘡早期の病態明メカニズムを解明していくことは、高齢者の健康寿命の延長、糖尿病、心不全、慢性肺疾患などの慢性疾患に罹患した褥瘡のハイリスクグループの感染症や合併症の予防を考える上で非常に重要である(上出, 2009)。しかしながら、褥瘡は高齢者に多い病態であるにも関わらず、褥瘡の研究において、老化による生理学的変化に着目した研究は殆ど見られない。

本研究では、老齢個体における褥瘡の急性期変化を検討する目的で、加齢により機能低下を示すプロテアソームに着目し、IRI モデルによる実験を行なった。第一章において、老化の表現型を示すプロテアソーム機能低下マウス (Tg) を用いて皮膚 IRI モデルを作製し、褥瘡形成におけるプロテアソーム機能の影響、酸化ストレスの変化、IRI に関連した組織傷害分子の検討を行った。第二章では、IRI における細胞傷害を検討する目的で、マウス皮膚線維芽細胞 (fibroblast cell; FC) 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、第三章では、フリーラジカル消去剤である Edaravone (EDA) の皮膚 IRI モデル、FC の H/R に与える効果について検討した。

【目的】

1. 高齢者における褥瘡形成を念頭においたモデルとして、Tg を用いて皮膚 IRI モデルを作製し、褥瘡形成におけるプロテアソーム機能の影響、酸化ストレスの変化、IRI に関連した組織傷害分子の発現変化を検討する。
2. IRI における細胞傷害を検討する目的で FC を用い、プロテアソーム阻害剤の負荷や H/R 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する。
3. EDA が、皮膚 IRI モデルと FC の H/R に与える効果を検討する。

第一章

老化の表現型を示すプロテアソーム機能低下マウス を用いた皮膚虚血再灌流障害モデルでの検討

1.1 緒言

1.1.1 背景

プロテアソームはユビキチン化タンパク質の分解を行うタンパク質分解酵素複合体であり、細胞内の生命活動に重要な役割を担っている(Coux, Tanaka and Goldberg, 1996)。プロテアソームはユビキチン化タンパク質に加え、酸化変性タンパク質を分解し、生体の酸化ストレス応答に働いている(Poppek and Grune, 2006)。プロテアソーム機能は加齢により低下し、加齢によるプロテアソーム機能の低下はストレス応答の脆弱化につながり、神経変性疾患をはじめとする様々な老化関連疾患の病態形成に関連する (Löw, 2011)。

当研究室では先行研究において、酵素活性の低いプロテアソームサブユニットである $\beta 5t$ を全身に強制発現させることで、プロテアソームの機能低下を示すモデルマウスの開発に成功している。本マウスでは短寿命、背骨の彎曲等の老化の表現型を示す(Tomaru et al., 2012)。また、本マウスに高脂肪食やタバコ煙等の環境因子を負荷すると、脂肪代謝異常や肺気腫等のヒトの老化関連疾患に類似した病態を示すことから、本モデルは環境因子に誘導される老化関連疾患の病態を解析できるモデルとして有用であると考えられている (Tomaru et al., 2012; Yamada et al., 2015)。

第一章では、高齢者における褥瘡形成を念頭においたモデルとして、Tg を用いて皮膚 IRI モデルを作製し、褥瘡形成におけるプロテアソーム機能の影響、酸化ストレスの変化、IRIに関連した組織傷害分子について検討を行った。

1.1.2 目的

Tg を用いて皮膚 IRI モデルを作製し、褥瘡形成におけるプロテアソーム機能の影響、酸化ストレスの変化、IRIに関連した組織傷害分子の発現変化を検討する。

1.2 方法

1.2.1 使用動物

プロテアソーム機能低下マウスとして、キモトリプシン様活性が低い $\beta 5t$ サブユニットを全身に強制発現させたトランスジェニックマウス ($\beta 5t$ transgenic mouse; Tg) を用いた (Tomaru et al., 2012)。酸化ストレスの検討には、酸化ストレスを可視化できるレポーターマウス (Keap1-dependent Oxidative stress Detector, No-48; OKD) (Oikawa et al., 2012) (トランスジェニック社、福岡、日本)、OKD と Tg を交配したマウス (OKD/Tg) を用いた。Keap-1 ヘテロ-ノックアウトマウス (keap-1^{-/+}) は文部科学省のバイオリソースプロジェクトを通じ、理研から供与を受けた。Keap1 ホモ-ノックアウトマウスは、新生児期で致死となるため (Wakabayashi et al., 2003)、keap-1^{-/+} と Tg を交配したマウス (keap-1^{-/+}/Tg) を用いた。野生型 C57BL/6 マウス (wild type; WT) をコントロールに用いた。実験には 8-12 週齢のマウスを用いた。マウスは北海道大学医歯学総合研究棟実験生物部門 SPF (specific pathogen-free) 環境下で飼育された。実験は北海道大学動物実験に関する規程、北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定に従い実施した。

1.2.2 皮膚 IRI モデル

定法により、マウスの背部を剃毛し、3 種混合麻酔下に背部を 70%エタノールで消毒し、皮膚に直径 12mm、厚さ 5mm、平均重量 2.8g、磁束密度 1176G のマグネット (マグファイン社 宮城 日本) を装着し (虚血)、マグネット装着の 12 時間後にマグネットを外す (再灌流) ことで皮膚 IRI モデルを作製した (Stadler et al., 2004)。皮膚サンプルはマグネット装着部位に辺縁部 2mm を加えた直径 14mm の範囲を採取し、肉眼的評価、組織学的評価及び関連遺伝子の発現解析に用いた。

1.2.3 IRI における皮膚創傷の肉眼的評価

褥瘡に関する評価には国際的な褥瘡の深達度分類として、米国褥瘡諮問委員会 (national pressure ulcer advisory panel; NPUAP) やヨーロッパ褥瘡諮問委員会 (European pressure ulcer advisory panel; EPUAP) のグレード分類はあるが、日本では日本褥瘡学会が開発したアセスメントツール「DESIGN-R®」が認知されている。NPUAP や EPUAP は深達度に着目した評価であり、DESIGN-R® は深達度に相当する Depth (深さ) に加え、Exudate (滲出液)、Size (大きさ)、Inflammation/Infection (炎症/感染)、Granulation (肉芽組織)、Necrotic tissue (壊

死組織)が評価項目に含まれる。

IRI の初期は皮膚潰瘍形成の予備段階にあり、圧迫された皮膚はしばしば発赤、滲出液、表皮のびらんを示す。本研究では DESIGN-R®を参考にし、肉眼的評価が容易な発赤、滲出液、表皮びらんの 3 点について、IRI による創傷を評価した。score 0 を正常、score 1 を軽度、score 2 を中程度から重度と定義し、各スコアの合計を算出した。各マウスとも IRI により左右 2 か所に形成される IRI 領域の創傷の平均を score 値として検討した。

1.2.4 IRI における皮膚創傷の組織学的評価

組織標本はホルマリン固定した皮膚組織から作製し、ヘマトキシリン・エオジン (Hematoxylin Eosin) 染色 (H&E) を行った。表皮びらん、浸潤性炎症細胞の領域、および真皮間質の変性などの組織学的変化に従い、0: 変化なし、1: 軽度、2: 中等度、3: 高度、4: 広範囲の炎症を伴う顕著な皮膚損傷の 5 段階で評価した。各マウスとも IRI により左右 2 か所に形成される IRI 領域の平均を score 値として検討した。

1.2.5 IRI における酸化ストレスの検討

OKD、Tg と OKD を交配した OKD/Tg を用いて、皮膚 IRI 後、VivoGlo™ Luciferin, In Vivo Grade (Promega Southampton, UK) 0.15mg/g をイメージング実験の 15 分前に腹腔内投与し、IVIS® Spectrum CT (Perkin Elmer Waltham, MA) を用いて露光時間 2 分におけるルシフェリンの発光量を測定し、酸化ストレスの検討を行った。ルシフェリンの発光量は ImageJ software version 1.53e (National Institutes of Health, Bethesda, MD) を用いて定量化した。マグネットを装着した部位の辺縁部 2mm を加えた直径 14mm の円内の輝度の平均値を算出し、各マウスとも IRI により左右 2 か所に形成される IRI 領域の平均を計測値として検討した。

1.2.6 IRI における組織傷害関連分子の発現変化の検討

IRI 組織傷害関連分子として、炎症性サイトカイン、細胞接着分子をターゲットとし mRNA の発現を検討した。皮膚 IRI 組織より、FastGene™ RNA Premium Kit (日本ジェネティクス、東京、日本) を用いて total RNA を抽出し、DNase I 処理を行った。抽出した RNA 1μg から GoTaq® 2-Step RT-qPCR System (Promega) を用い、6.25 ng の cDNA を使用して定量的 PCR (qPCR) をサーマルサイクラーダイス (タカラバイオ本社、滋賀、日本) を用いて施行した。RT-PCR 反応は 25℃ 5 分間、42℃ 1 時間、70℃ 15 分間をそれぞれ 1 サイクル行った。qPCR は合成

した cDNA を 40 倍希釈したものを template として用い、template 5 μ l + buffer 20 μ l の total 25 μ l の反応系で測定を実施した。qPCR の反応プログラム、プライマーは表 1.2 に示す通りである。相対発現量は beta-actin (Actb) を内部コントロールとし、 $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて算出した。

1.2.7 統計学的検討

対応のない 2 群の比較では Student's t 検定を、3 群以上の多重比較では一元配置分散分析 (ANOVA) を行った。得られたデータは平均 $\pm$ 標準偏差で示し、0.05 未満の P 値を有意とした。

表 1. qPCR プログラム

ステップ	サイクル	温度 $^{\circ}$ C	時間 (秒)
Hot Start Polymerase activation	1	95	120
Denaturation	40	95	30
Annealing	40	58.8	30
Extension	40	72	30
Dissociation	1	60-95	

表 2. qPCR プライマー配列

標的遺伝子		塩基配列
TNF- α	forward	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
	reverse	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA
IL-1 β	forward	CTCCATGAGCTTTGTACAAGG
	reverse	TGCTGATGTACCAGTTGGGG
IL-6	forward	GACAACCACGGCCTTCCCTACTTC
	reverse	TCATTTCCACGATTTCCCAGAGA
E-selectin	forward	ATGAAGCCAGTGCATACTGTC
	reverse	CGGTGAATGTTTCAGATTGGAGT
ICAM1	forward	GACCCCAAGGAGATCACATTCACG
	reverse	CCTGGCCTCGGAGACATTAGA
VCAM1	forward	TCTGGGAAGCTGGAACGAAG
	reverse	CAAACACTTGACCGTGACCG
Actb	forward	CAGCCTTCCTTCTTGGGTAT
	reverse	ACTGTGTTGGCATAGAGGTC

1.3 結果

1.3.1 プロテアソーム機能低下が皮膚 IRI に及ぼす影響

皮膚 IRI の初期段階におけるプロテアソーム機能の関与を検討することを目的として、WT および Tg における IRI の直後 (0h) 及び 24 時間後 (24h) の皮膚創傷を肉眼的に評価した。肉眼的評価では、発赤、滲出液、表皮びらんを評価した後、その総合 score を算出した。0h では顕著な皮膚創傷は見られないが、WT、Tg 共に 0h と比較し 24h で皮膚創傷が増悪する傾向にあり、Tg は 24h において強い発赤や表皮びらを認め、WT と比較し有意に高い創傷 score を示した (図 1A)。皮膚 IRI の組織学的評価では、IRI 後の時間経過とともに score が上昇した。WT と Tg 双方において 0h と比較し 24h の score が有意に上昇し、Tg は 0h と 24h の双方において WT よりも高い score を示した (図 1B)。以上より、WT と Tg は 0h と比較し 24h に組織傷害が悪化すること、Tg では、WT と比較し 24h の組織傷害が悪化することが明らかとなった。

炎症性細胞、特に好中球とマクロファージの浸潤、及びそれに続く TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 などのサイトカインの産生が皮膚圧迫性潰瘍の発生に関与していることが報告されている (Saito et al., 2008)。また、細胞接着分子の発現増加は炎症促進性に働く (Seal and Gewertz, 2005)。皮膚 IRI 組織における炎症性サイトカインと細胞接着分子の発現を検討したところ、図 1C に示すように、TNF- α と IL-1 β の発現は、IRI 後の時間経過とともに増加した。IL-6、E-selectin、及び ICAM-1 は 0h で増加したが、24h では IRI 未処理の対照群と同じレベルに減少した。VCAM1 に関しては有意な変化を認めなかった (データ未提示)。いずれにおいても WT と Tg の間に差を認めず、プロテアソームの機能低下は炎症性サイトカインや炎症細胞の浸潤に対して直接的な影響を及ぼさないと考えられた。

1.3.2 プロテアソーム機能低下が皮膚 IRI における酸化ストレスに及ぼす影響

IRI には炎症に加え、ROS によって媒介される酸化ストレスも関与することが報告されている(Kasuya et al., 2014)。皮膚 IRI における酸化ストレスの関与を検討するために、酸化ストレス可視化レポーターマウスである OKD と Tg を交配した OKD/Tg を用い、皮膚 IRI による酸化ストレスを IVIS® Spectrum CT によりルシフェリンの発光量として測定した。OKD は酸化ストレス応答に働く Nrf2 による転写誘導を可視化できるレポーターマウスであり、酸化ストレス時は Nrf2 による転写誘導が起こり Nrf2-Luciferase-tag が発現し、ルシフェリン発光としてストレス応答を検出する。ルシフェリンの発光強度は酸化ストレスの程度に依存し、ストレスの定量化が可能である(Oikawa et al., 2012)。検討の結果、0h では、OKD と OKD/Tg に差は認められないが、24h の OKD/Tg の発光量は OKD と比較し有意に増強し（図 2A）、プロテアソーム機能の低下した OKD/Tg は、OKD と比較し酸化ストレスが強く発生していることが示唆された。

酸化ストレス応答に働く Nrf2 経路の活性化が IRI を改善することが報告されている(Takagi et al., 2014; Inoue et al., 2020)。他施設の報告では、Keap-1 の欠失した Keap-1^{-/-}マウスでは Nrf2 が核内に持続的に蓄積されるため、Nrf2 の標的遺伝子である酸化ストレス応答系は継続的に活性化され、IRI の改善につながると考えられている (Wakabayashi et al., 2003)。Tg において酸化ストレスの増加を認めたため、Keap-1^{-/-}と Tg を交配した Keap-1^{-/-}/Tg を作製し、皮膚 IRI の変化について検討した。Keap-1^{-/-}/Tg では、24h の皮膚創傷および組織学的 score は Tg と比較し若干改善されたが、有意な差は認めなかった（図 2B, C）。以上より、プロテアソーム機能低下は皮膚 IRI における過剰な酸化ストレスを誘発し、増加した酸化ストレスは Nrf2 経路の活性化では十分に改善されないと考えられた。

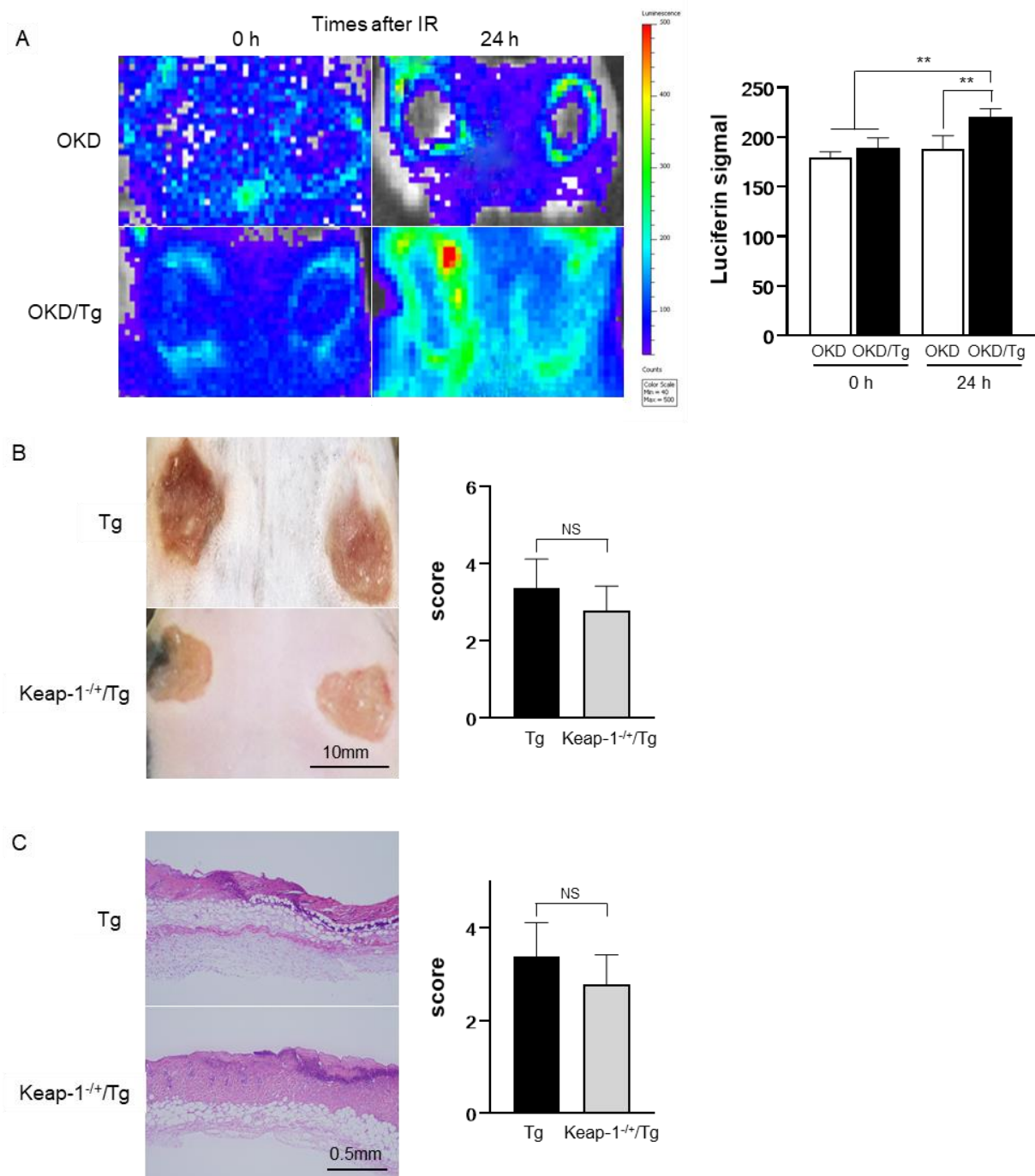


図 2. プロテアソーム機能低下と皮膚 IRI における酸化ストレス

(A) OKD および OKD/Tg の IVIS イメージングシステムによる代表的画像とルシフェリンの発光量、Tg と keap-1^{-/+}/Tg における IRI 領域の (B) 皮膚創傷の代表的撮像画像と肉眼的評価、(C) 組織の代表的撮像画像と組織学的評価。値は平均±標準偏差で表した。各群 n=4-6、**P < 0.01; NS : not significant.

1.4 考察

加齢によりプロテアソーム活性は低下することが報告されており (Chondrogianni and Gonos, 2005)、第一章では、高齢者における褥瘡形成を念頭においたモデルとして、Tg を用いて皮膚 IRI モデルによる実験を行った。Tg では皮膚 IRI による皮膚創傷が増悪し、プロテアソーム機能低下が褥瘡形成の病態を修飾している可能性が考えられた。

IRI 組織傷害関連分子の遺伝子発現変化を検討した結果では、IRI 時の炎症性サイトカインや接着分子の発現誘導に関して、WT と Tg の間に差を認めなかった。すなわち Tg における IRI の組織傷害の増悪は、炎症反応自体の過剰によるものではないと推定される。一方、Tg では皮膚 IRI により酸化ストレスの増大を認めた。酸化ストレスに対し、細胞内には数種類のストレス応答システムが存在し、代表的な機構の 1 つが Keap1-Nrf2 経路である。プロテアソームは Keap1-Nrf2 経路と連動して酸化ストレス応答に働く一方、酸化変性タンパク質の分解を行っており、プロテアソームの機能低下が IRI による酸化ストレスに対する脆弱性に繋がると考えられる。加齢によりプロテアソーム機能が低下した状態では、生理的な Nrf2 経路の活性化等の酸化ストレス応答では制御できないレドックスバランスの乱れが生じている可能性が推定される。

keap1^{-/-}/Tg を用いた検討では、Nrf2 経路の活性化は Tg の皮膚 IRI を十分に改善しなかった。他施設による検討では、Nrf2 経路の活性化が皮膚 IRI を改善することが報告されている (Takagi et al., 2014; Inoue et al., 2020)。加齢に伴う褥瘡の病態メカニズムの解析には、老化モデルを併用した研究を進めることで、有用な予防法や治療法につながる知見の蓄積が期待される。

第二章

マウス皮膚線維芽細胞を用いた 低酸素/再酸素化モデルでの検討

2.1 緒言

2.1.1 背景

皮膚 IRI においては、皮膚を構成する様々な細胞が影響を受けると考えられる。FC は真皮の主要な構成細胞として皮膚構造の維持に極めて重要である(石浦ら他., 2010)。一方、加齢に伴うプロテアソーム活性の低下は皮膚を含む多くの臓器や細胞で報告されている(Chondrogianni and Gonos, 2005; Dahlmann, 2007)。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下していることが報告されており(Hwang et al., 2007; Koziel et al., 2011)、FC におけるプロテアソーム機能の低下は皮膚 IRI に影響を及ぼしている可能性が推定される。

第一章において、老化の表現型を示すプロテアソーム機能低下マウスで皮膚 IRI により組織傷害が悪化すること、酸化ストレスが増加していることが明らかとなった。第二章では、FC を用いて H/R モデルを作製し、第一章の皮膚 IRI で観察された病態を *in vitro* の実験で検討した。

2.1.2 目的

IRI における細胞傷害を検討する目的で、FC を用いて、プロテアソーム阻害剤の負荷や H/R 環境における細胞ストレス、細胞死、酸化ストレス応答関連分子の発現変化を検討する。

2.2 方法

2.2.1 細胞分離と細胞培養

FC は、コラゲナーゼ処理により、WT および OKD の皮膚組織から分離した。FC は 10% ウシ胎児血清、100U/mL ペニシリン、100U/mL ストレプトマイシンを添加した DMEM で、5%CO₂ 及び 95%O₂ 下、37℃ で培養し、8~10 継代の細胞を実験に用いた。OKD の FC を発光シグナルによる酸化ストレスの検出に使用し、WT の FC は他の実験に使用した。FC をプロテアソーム阻害剤 (MG132) 含有培地 (0.1、0.5、1.0、及び 2.5 µM) で 24 時間培養し、MG132 を添加した。MG132 は、EMD Millipore Corp. (Billerica MA, USA) から購入した。

H/R 処理は、FC を細胞低酸素培養キット (BIONIX®, 杉山源株式会社、東京、日本) を使用し、加湿インキュベーター (95%air、5%CO₂、37℃) で 12 時間低酸素状態 (0.1%O₂) にした後、再酸素化した。H/R 実験には無血清培地を使用した。PBS を MG132 の未処理群の対照群として使用した。

2.2.2 FC における H/R 誘発性の酸化ストレスと ROS の検出

OKD の FC を用いて、Steady-Glo Luminescent Assay (Promega) を使用し酸化ストレスを検出した。WT の FC を用いて、ROS-Glo アッセイ (Promega, Southampton, UK) を使用し ROS を検出した。FC を H₂O₂ 検出溶液とインキュベートし、基質の発光をルミノメーターで測定した。各ウェルの生細胞数は、ルシフェラーゼ反応を用いた ATP 測定法 (CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay; Promega) で測定した。データを生細胞数で補正し、ATP 発光に対する基質発光の比率として表した。各測定は 3 回行った。

2.2.3 抗酸化酵素遺伝子群の発現変化の検討

抗酸化酵素遺伝子群をターゲットとし mRNA の発現を検討した。MG132 処理及び H/R 環境下で培養した FC から、FastGene™ RNA Premium Kit (日本ジェネティクス、東京、日本) を用いて total RNA を抽出し DNase I 処理を行った。抽出した RNA 1µg から GoTaq® 2-Step RT-qPCR System (Promega) を用い、6.25 ng の cDNA を使用して定量的 PCR (qPCR) をサーマルサイクラーダイス (タカラバイオ本社、滋賀、日本) を用いて施行した。RT-PCR 反応は 25℃ 5 分間、42℃ 1 時間、70℃ 15 分間をそれぞれ 1 サイクル行った。qPCR は合成した cDNA を 40 倍希釈したものを template として用い、template 5µl + buffer 20µl の total 25µl 反応系で測定を実施した。qPCR の反応プログラム、プライマーは表 3 に示す通り

である。相対発現量は Actb を内部コントロールとし、 $\Delta \Delta Ct$ 法を用いて算出した。

2.2.4 統計学的検討

対応のない 2 群の比較では Student's t 検定を、3 群以上の多重比較では一元配置分散分析 (ANOVA) を行った。得られたデータは平均±標準偏差で示し、0.05 未満の P 値を有意とした。

表 3. qPCR プライマー配列

標的遺伝子		塩基配列
Nrf2	forward	GACGGGACTATTGAAGGCTGTGA
	reverse	TCGGCTGGGACTCGTGTTCA
NQO1	forward	GGCGAGAAGAGCCCTGATTG
	reverse	GTTCATAGCATAGAGGTCAGATTCCG
HO-1	forward	TCAGAAGGGTCAGGTGTCCAGA
	reverse	GCATAGACTGGGTTCTGCTTGTT
GPx-1	forward	AGGAGAATGGCAAGAATGAAGAG
	reverse	TCCGCAGGAAGGTAAAGAGC
catalase	forward	GCCAGCGACCAGATGAAGCA
	reverse	GGAATCCGCTCTCTGTCAAAGTGT
SOD1	forward	TGGAGACCTGGGCAATGTGACT
	reverse	TCCACCTTTGCCCAAGTCATCT
Actb	forward	CAGCCTTCCTTCTTGGGTAT
	reverse	ACTGTGTTGGCATAGAGGTC

2.3 結果

2.3.1 MG132 負荷と H/R による酸化ストレス

FC を用いてプロテアソーム活性の低下と皮膚 IRI の増悪との関連性を検討した。はじめに、低酸素状態における MG132 負荷による酸化ストレスの誘導を検討した。図 3A に示すように、酸化ストレスは低酸素状態において MG132 の濃度依存性に増加した。酸化ストレスは、未処理の対照群と比較し 1.0 及び 2.5 μ M で有意に増大した。この結果を基に以降の実験における MG132 の濃度を 1.0 μ M とした。

次に H/R 下での FC の培養を行なった。H/R には低酸素 (0.1% O₂) で 12 時間培養した後、FC を加湿インキュベーター (95% air、37°C、5% CO₂) で 12 時間または 24 時間培養した。プロテアソーム 阻害には、H/R の 24 時間前に 1.0 μ M MG132 含有培地で培養した。酸化ストレスを検討した結果では、MG132 負荷により H/R 後の時間経過とともにシグナルが増加し、24h で MG132 未処置の FC と比較し MG132 を負荷した FC で有意に増大した (図 3B)。以上の結果は、H/R とプロテアソームの阻害が協調的に FC に酸化ストレスを誘発することを示唆する。

更に H/R 条件下で FC に MG132 を負荷し、ROS (H₂O₂) の誘導を解析した。ROS は、再酸素化直後 (0h) と 12h では検出されなかったが、24h で増加した (図 3C)。ROS は MG132 未処置の FC と比較し、MG132 を負荷した FC で有意に増大した。

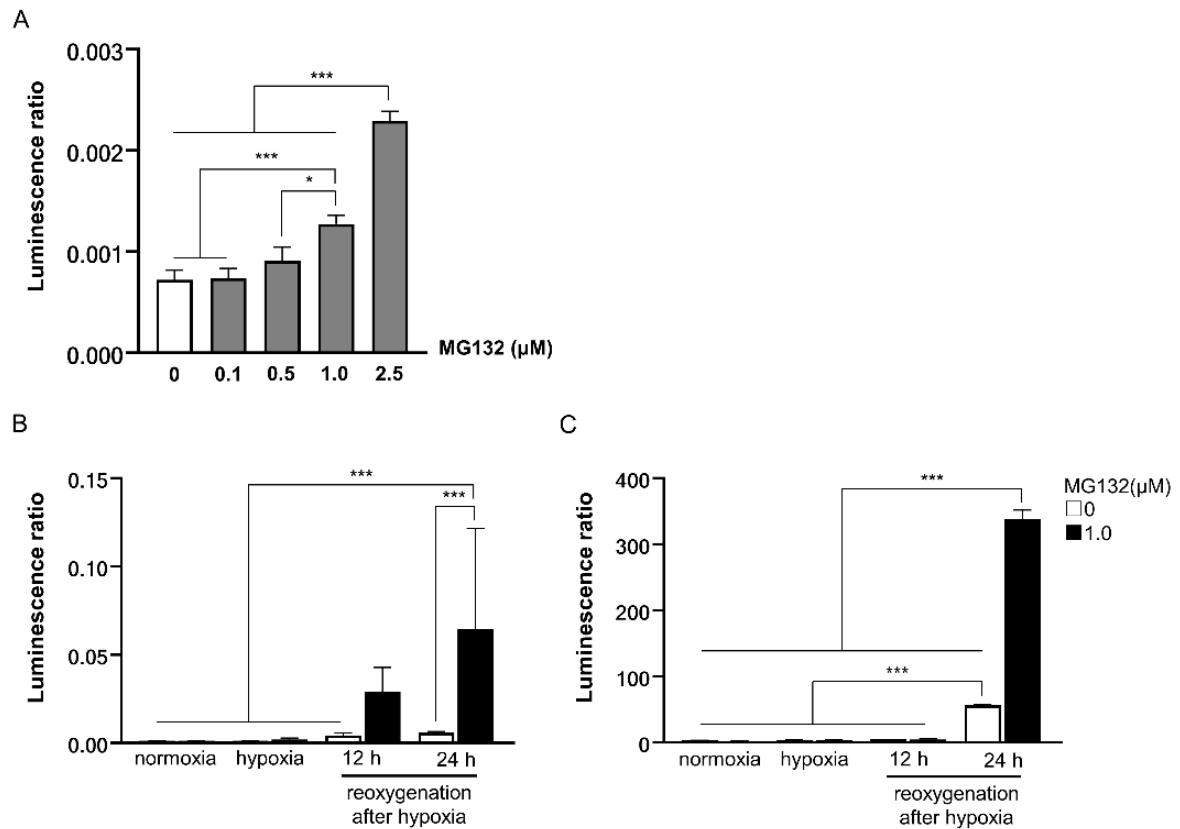


図 3. MG132 負荷と H/R による酸化ストレス

(A) MG132 負荷と低酸素による酸化ストレス、(B, C) MG132 負荷と H/R による酸化ストレス、ROS 産生。FC を低酸素状態 (0.1% O_2) で 12 時間培養後、再酸素化し 12 時間または 24 時間培養した。MG132 1.0 μ M を H/R の 24 時間前に負荷した。OKD (A, B)、WT (C) より分離した FC を用いて実験を行った。値は生細胞数で補正した。各測定は 3 回行い、値は平均 $\pm$ 標準偏差で表した。* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ 。

2.3.2 MG132 負荷と H/R による抗酸化酵素群の発現

次に、MG132 負荷と H/R による抗酸化酵素群の発現について検討した。Nrf2、SOD1 については、MG132 の有無にかかわらず、再酸素化の直後 (0h) に有意な発現誘導を認め、CAT についても増加傾向を認めた。MG132 負荷による有意な違いを認めたのは再酸素化 12h における SOD1、CAT、Gpx1 の発現で、MG132 未処置の FC に比べて MG132 負荷群で有意な高発現を観察し、MG132 未処置の群では正常酸素濃度と同程度に戻っていた。また、これらの抗酸化酵素群の発現は、再酸素化 24h において MG132 を負荷した FC で酸化ストレスが増大しているにもかかわらず (図 3)、MG132 を負荷した FC でも正常酸素濃度と同程度に戻っていた。以上の結果は、再酸素化 24h における酸化ストレスに対して Nrf2 経路の下流で誘導される抗酸化酵素群の発現は効果的に働いていない可能性を示唆する結果と考えられる (図 4)。

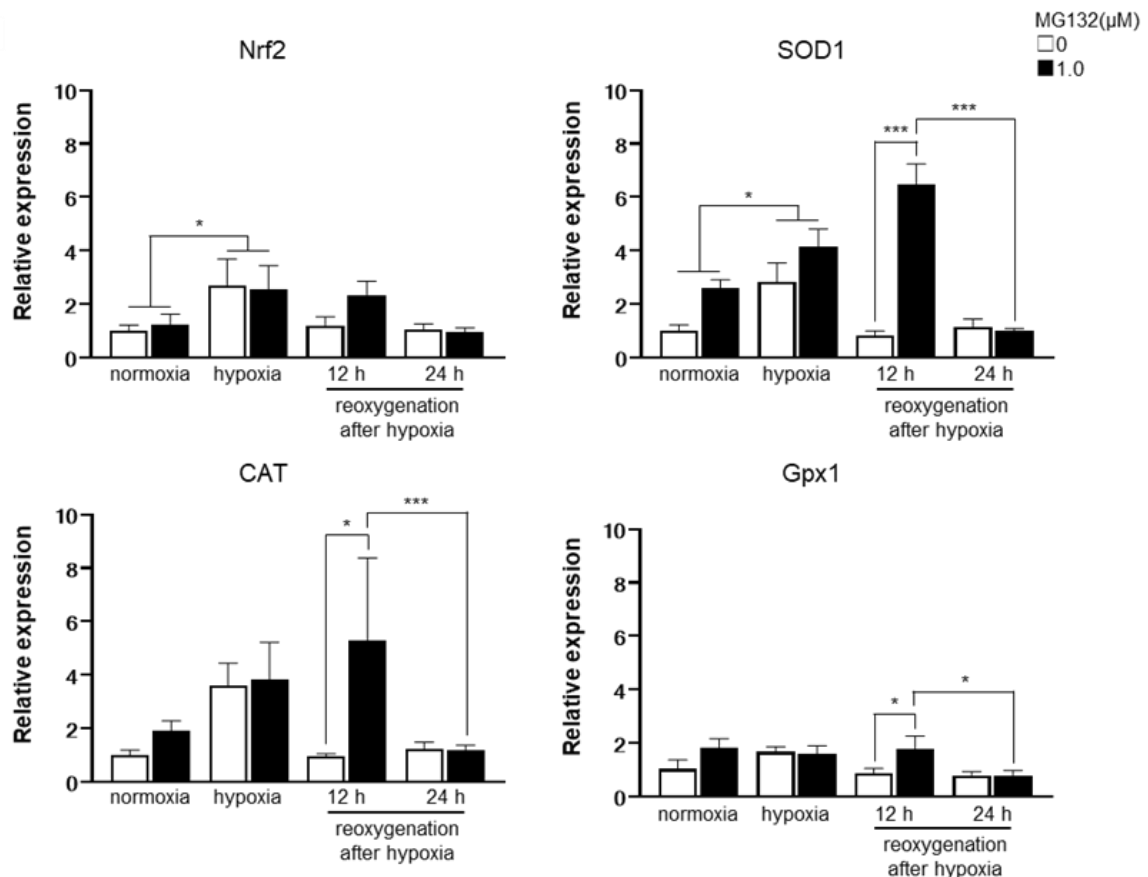


図 4. MG132 負荷と H/R による抗酸化酵素群の発現

normoxia、hypoxia、H/R における抗酸化酵素群の発現を qPCR により検討した。WT の FC を低酸素状態 (0.1% O₂) で 12 時間培養後、再酸素化し 12 時間または 24 時間培養した。MG132 1.0 μM を H/R の 24 時間前に負荷した。normoxia MG132 0 μM の平均発現量を 1 としてデータを解析した。各測定は 3 回行い、値は平均 ± 標準偏差で表した。*P < 0.05; ***P < 0.001。

2.3.3 MG132 負荷と H/R による細胞死

MG132 負荷により H/R 下の酸化ストレスが増大し、抗酸化遺伝子群の発現も十分に認めなかったことを受け、MG132 負荷と H/R による FC の細胞死の誘導について検討を行なった。その結果、MG132 負荷と H/R により、H/R 単独に比較して FC に有意な細胞死の増加を認め、プロテアソーム機能低下が H/R による FC の細胞死を助長していることが推定された (図 5)。

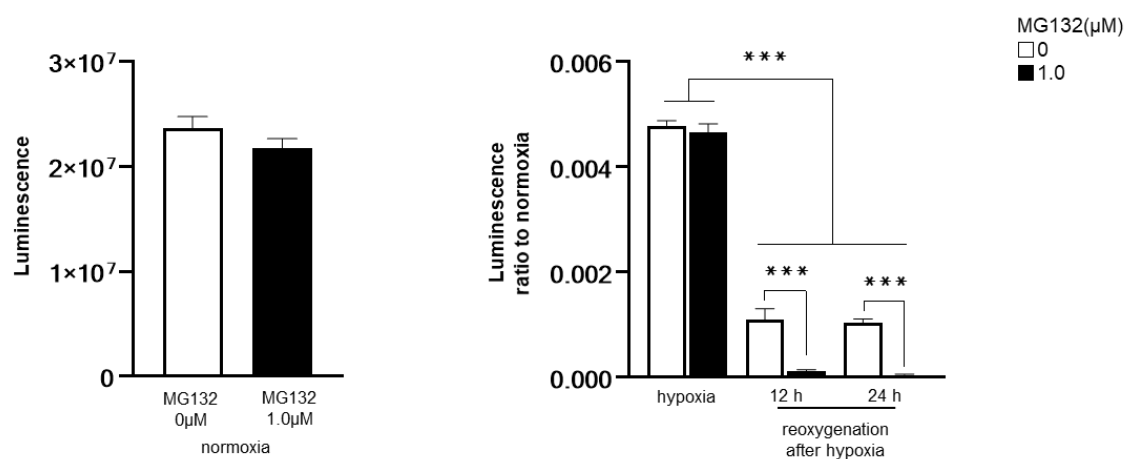


図 5. MG132 負荷と H/R による細胞死

normoxia、hypoxia、H/R における生細胞数を解析した。WT の FC を低酸素状態 (0.1% O_2) で 12 時間培養後、再酸素化し 12 時間または 24 時間培養した。MG132 1.0 μM を H/R の 24 時間前に負荷した。各測定は 3 回行い、値は平均 $\pm$ 標準偏差で表した。*** $P < 0.001$ 。

2.4 考察

第二章では第一章で観察された IRI 病態について、FC を用いて、プロテアソーム阻害剤や H/R モデルによる検討を行った。プロテアソームの機能低下は 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。これは、細胞において酸化ストレス防御が適切になされず、細胞傷害が蓄積し、細胞死の誘導が助長されている可能性が考えられる。

第一章における IRI、第二章における H/R のいずれにおいても、プロテアソーム機能障害により ROS の増加を認めた。H₂O₂ や NO などの ROS は、IRI により引き起こされる組織傷害の増悪因子として知られている (Kasuya et al., 2014)。プロテアソームと ROS の関係性では、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、細胞質ゾルの酸化を引き起こすことが知られている (Maharjan et al., 2014)。一方、20S プロテアソームは酸化損傷を受けたタンパク質を分解し、除去する働きを有するが (Raynes, Pomatto and Davies, 2016)、真核細胞では 26S プロテアソームが細胞内プロテアソームの主要な形態であり、定常状態でタンパク質の恒常性維持に働いている (Livnat-Levanon et al., 2014)。しかし、急性の酸化ストレスは、26S プロテアソームの 20S コアと 19S 調節サブユニットへの分解を引き起こし、26S プロテアソームの不活性化をもたらす (Livnat-Levanon et al., 2014)。ストレス条件下では、酸化変性タンパク質は 20S プロテアソームによって分解されるが、26S プロテアソームによって調節されるタンパク質の恒常性は高度に乱れる (Raynes, Pomatto and Davies, 2016; Livnat-Levanon et al., 2014)。プロテアソーム活性の低下は、IRI や H/R による ROS の産生増加をもたらし、産生された ROS が 26S プロテアソームの不活性化によるタンパク質恒常性の異常をきたし、組織傷害の悪循環を引き起こす可能性が考えられた。

IRI においては転写因子 Nrf2 が酸化ストレスの調節に働き、酸化ストレス下で Nrf2 は核内へ移行し、抗酸化応答配列 (antioxidant response element; ARE) に結合し、下流の抗酸化酵素遺伝子群の転写を誘導する (Kensler et al., 2007)。プロテアソーム阻害と H/R の実験では、プロテアソーム機能が低下した状態では、Nrf2 経路の活性化による抗酸化応答による制御が機能しない可能性が考えられた。他施設による検討では、Nrf2 のシグナル伝達は加齢により衰退することが報告されている (Suh et al., 2004; Suzuki et al., 2008; Du et al., 2009)。現在までに、プロテアソーム機能障害が ARE および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されていないが、プロテアソーム機能障害により誘発されるタンパク質恒常性の異常と Nrf2 活性経路の変化について解析を進めることにより、高齢者における IRI の分子メカニズムの解明が進むことが期待される。

第三章

フリーラジカル消去剤 Edaravone が 皮膚虚血再灌流障害及び細胞の低酸素/再酸素化に 与える効果

3.1 緒言

3.1.1 背景

第一章におけるマウスモデルの検討で、プロテアソーム機能低下は皮膚 IRI の初期段階における皮膚創傷を悪化させること、過剰な酸化ストレスを誘発するが、Nrf2 経路の活性化では皮膚創傷が改善されないことを明らかにした。第二章での FC を用いた検討により、プロテアソームの機能低下は H/R による ROS 産生を増大すること、過剰な酸化ストレスにより 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。これらの結果より、加齢によるプロテアソーム機能低下は生理的な酸化ストレス応答では制御できないレドックスバランスの異常を引き起こし、過剰な ROS 産生による細胞ストレス、細胞死が IRI の組織傷害の病態形成に働いている可能性が推定された。

フリーラジカル消去剤であるエダラボン (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one; 分子量 174.20, MCI-186, ラジカット注 30 mg; EDA) は、抗酸化剤であり強力なラジカル捕捉剤である (図 6)。世界初の脳保護剤として 2001 年 4 月にわが国で承認された (Watanabe et al., 1994)。最近の研究では、EDA は酸化ストレスを抑制し、IRI が引き起こす心臓と腎臓の組織損傷を保護することが明らかにされている (Yamawaki et al., 2004; Tahara et al., 2005)。

第三章では、ROS 消去剤である EDA の皮膚 IRI モデル、FC の H/R に与える効果について検討した。

3.1.2 目的

EDA が皮膚 IRI モデル、細胞の H/R に与える効果について検討する。

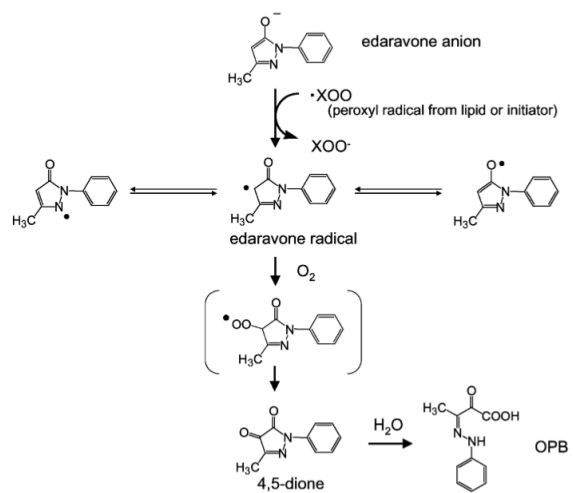


図 6. エダラボンの電子伝達系反応

- ・エダラボンアニオンが電子を供与しラジカルを消去する（エダラボンは補足型ではなく電子供与型である）。
- ・最終的にフリーラジカルとは無関係（酸化力を持たない）な OPB になる。

3.2 方法

3.2.1 使用動物

プロテアソーム機能低下マウスとして、キモトリプシン様活性が低い $\beta 5t$ サブユニットを全身に強制発現させたトランスジェニックマウス ($\beta 5t$ transgenic mouse; Tg) を用いた (Tomaru et al., 2012)。酸化ストレスの検討には、酸化ストレスを可視化できるレポーターマウス (Keap1-dependent Oxidative stress Detector, No-48; OKD) (Oikawa et al., 2012) (トランスジェニック社、福岡、日本) OKD と Tg を交配したマウス (OKD/Tg) を用いた。実験には 8-12 週齢のマウスを用いた。マウスは北海道大学医歯学総合研究棟実験生物部門 SPF (specific pathogen-free) 環境下で飼育された。実験は北海道大学動物実験に関する規程、北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定に従い実施した。

3.2.2 皮膚 IRI モデルへの EDA の投与

1.2.2 に記述した方法で、皮膚 IRI モデルを作製した。EDA (東京化学工業社、東京、日本) は 6mg/kg を、コントロール群には EDA と同量の PBS を皮膚 IRI の 30 分前に腹腔内投与した。EDA は酢酸で溶解した。皮膚サンプルはマグネット装着部位に辺縁部 2mm を加えた直径 14mm の範囲を採取し、肉眼的評価、組織学的評価及び関連遺伝子の発現解析に用いた。

3.2.3 EDA 投与後の IRI による皮膚創傷の肉眼的評価

1.2.3 に記述した方法で、EDA 投与後の皮膚 IRI 創傷の肉眼的評価を行った。DESIGN-R®を参考にし、肉眼的評価が容易な発赤、滲出液、表皮びらんの 3 点について、皮膚 IRI による創傷を評価した。score 0 を正常、score 1 を軽度、score 2 を中程度から重度と定義し、各スコアの合計を算出した。各マウスとも皮膚 IRI により左右 2 か所に形成される皮膚 IRI 領域の創傷の平均を score 値として検討した。

3.2.4 EDA 投与後の IRI による皮膚創傷の組織学的評価

1.2.4 に記述した方法で、IRI 皮膚創傷の組織学的評価を行った。表皮びらん、浸潤性炎症細胞の領域、および真皮間質の変性などの組織学的変化に従い、0 : 変化なし、1 : 軽度、2 : 中等度、3 : 高度、4 : 広範囲の炎症を伴う顕著な皮膚損傷の 5 段階で評価した。各マウスとも IRI により左右 2 か所に形成される IRI 領域の平均を score 値として検討した。

3.2.5 EDA 投与後の皮膚 IRI における酸化ストレスの検討

1.2.5 に記述した方法で、皮膚 IRI における酸化ストレスを検討した。実験には Tg と OKD を交配した OKD/Tg を用いた。皮膚 IRI 後のルシフェリンの発光量を測定し、酸化ストレスの検討を行った。ルシフェリンの発光量は ImageJ を用いて定量化した。マグネットを装着した部位の辺縁部 2mm を加えた直径 14mm の円内の輝度の平均値を算出し、各マウスとも皮膚 IRI により左右 2 か所に形成される皮膚 IRI 領域の平均を計測値として検討した。

3.2.6 細胞分離と細胞培養

2.1.1 に記述した方法で細胞培養を行った。EDA は DMSO で溶解し、培地への DMSO の添加量は 0.1% 以下になるように調整した。EDA は、H/R の 30 分前に FC 培養培地に 0.1 μ M を添加した。H/R 実験には無血清培地を使用した。PBS を MG132 と EDA の未処理群の対照群として使用した。

3.2.7 EDA を添加した FC における H/R 誘発性酸化ストレスと ROS の検出

2.1.2 に記述した方法で、EDA を添加した FC における H/R 誘発性酸化ストレスと ROS を検出した。

3.2.8 EDA 添加後の抗酸化酵素遺伝子群の発現変化の検討

2.1.3 に記述した方法で、EDA を添加した FC の抗酸化酵素遺伝子群の発現変化を検討した。qPCR の反応プログラム、プライマーは表 3 に示すとおりである。相対発現量は Actb を内部コントロールとし、 $\Delta\Delta$ Ct 法を用いて算出した。

3.2.9 統計学的検討

対応のない 2 群の比較では Student's t 検定を、3 群以上の多重比較では一元配置分散分析 (ANOVA) を行った。得られたデータは平均 $\pm$ 標準偏差で示し、0.05 未満の P 値を有意とした。

3.3 結果

3.3.1 EDA の Tg の皮膚 IRI と酸化ストレスに対する効果

IRI の 30 分前に EDA または同量の PBS をマウスに投与し、EDA の IRI に対する効果を検討した。その結果、EDA 投与群は、24h の肉眼的、組織学的評価において、皮膚 IRI が有意に改善した（図 7A, B）

OKD/Tg を用いて、皮膚 IRI における酸化ストレスに対する EDA の効果を IVIS イメージングシステムにより解析した。図 7C に示すように、発光シグナルは 24h に EDA を投与した OKD/Tg で有意に減少した。以上より、EDA はプロテアソーム機能低下が誘導する皮膚 IRI における酸化ストレスを効果的に抑制する効果があると考えられる。

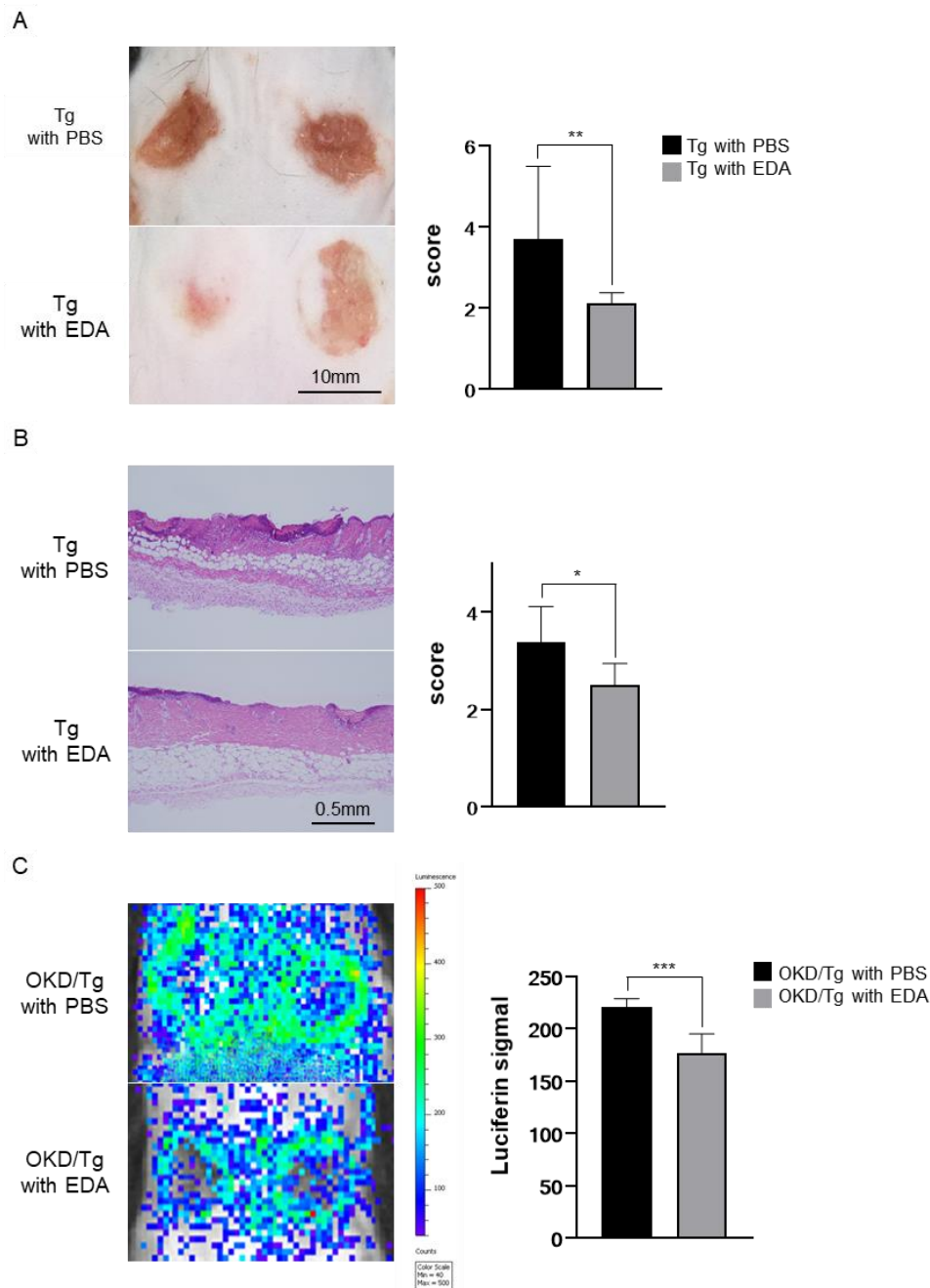


図 7. EDA の Tg の皮膚 IRI における酸化ストレスに対する効果

EDA を投与した Tg の IRI 24h における (A) 皮膚創傷の代表的撮像画像と肉眼的評価、(B) 組織の代表的撮像画像と組織学的評価、EDA を投与した OKD/Tg の IRI 24h の (C) IVIS イメージングシステムによる代表的画像とルシフェリンの発光量。EDA は 6mg/kg を IRI の 30 分前に投与し、対照群には EDA と等量の PBS を投与した。値は左右の創傷の平均値とし、値は平均±標準偏差で表した。各群 n=4-6、*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001。

3.3.2 EDA の MG132 負荷と H/R による酸化ストレス、ROS に対する抑制効果

MG132 負荷 FC における H/R の酸化ストレスに対する EDA の効果を検討した。再酸素化 24h における MG132 負荷 FC の酸化ストレスは、EDA の投与により有意に抑制された (図 8A)。

また、MG132 負荷 FC を用いて、H/R 誘導性の ROS に対する EDA の効果を検討した。MG132 負荷 FC の H/R 誘導性の ROS は、EDA の投与により再酸素化 24h において有意に抑制された (図 8B, C)。

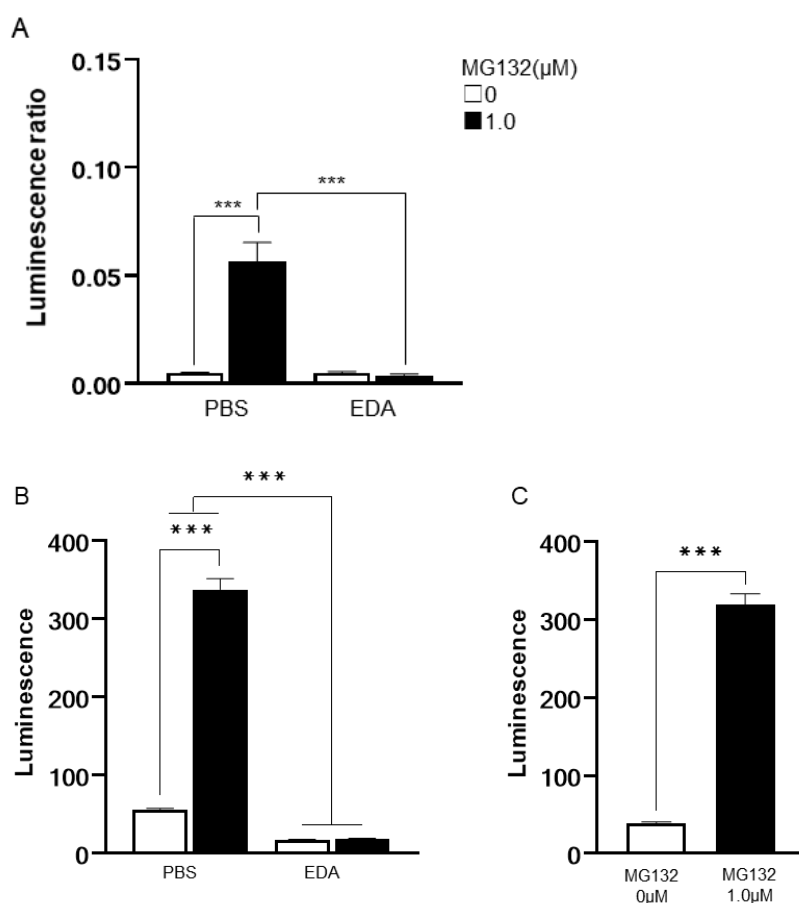


図 8. EDA の MG132 負荷と H/R による酸化ストレス、ROS に対する抑制効果

EDA の MG132 負荷と H/R 24h による (A) 酸化ストレス、(B, C) ROS に対する効果。(C) は ROS の減少量を示している。MG132 1.0 μ M は H/R の 24 時間前に負荷した。EDA 0.1 μ M は H/R の 30 分前に負荷し、対照群には等量の PBS を用いた。値は生細胞数で補正した。各測定は 3 回行い、値は平均 $\pm$ 標準偏差で表した。***P < 0.001。

3.3.3 EDA の MG132 負荷と H/R による抗酸化酵素群の発現に対する効果

MG132 負荷 FC を用いて、H/R による酸化ストレスに対する EDA の抗酸化酵素群の発現変化について検討した。EDA 投与による抗酸化酵素群の発現の亢進は見られなかった（図 9）。以上より、EDA は MG132 を負荷した FC の H/R による酸化ストレスを直接的に抑制すると考えられた。

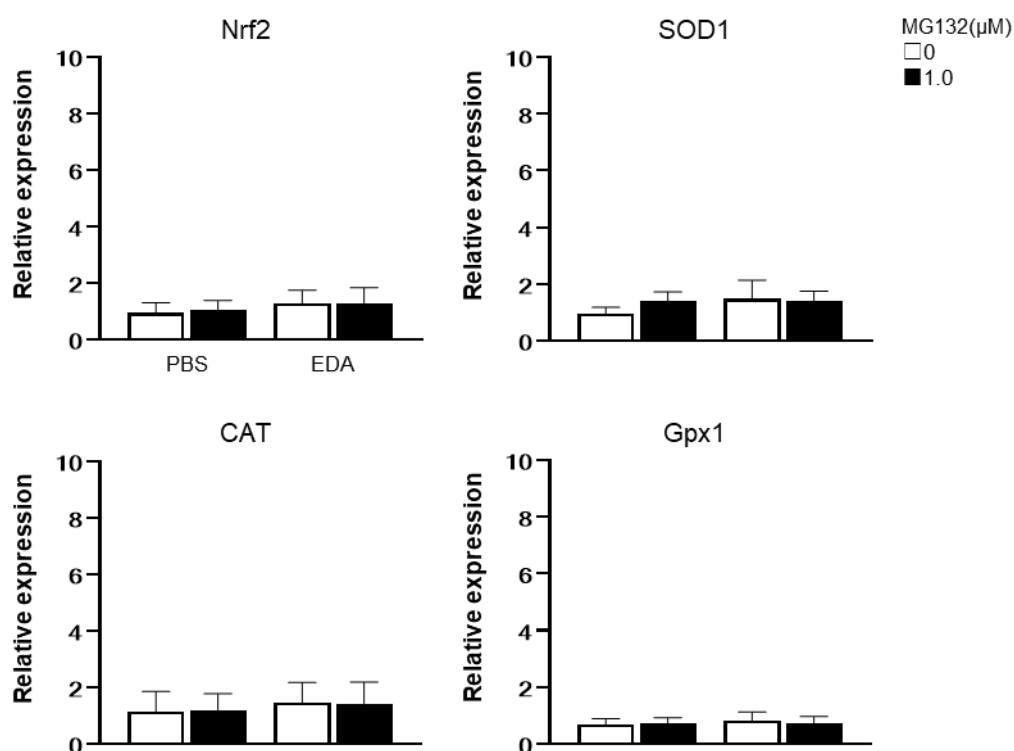


図 9. EDA の MG132 負荷と H/R による抗酸化酵素群の発現に対する効果

EDA 0.1 μM を H/R の 30 分前に投与し、H/R 24h における抗酸化酵素群の発現を qPCR により検討した。対照群には等量の PBS を用いた。MG132 1.0 μM は H/R の 24 時間前に負荷した。FC からの総 RNA を qPCR に用いた。normoxia MG132 0 μM の平均発現量を 1 としてデータを解析し、値は平均 ± 標準偏差で表した。各測定は 3 回行った。

3.3.4 EDA の MG132 負荷と H/R による細胞死に対する抑制効果

MG132 負荷 FC を用いて、H/R 誘導性の細胞死に対する EDA の効果を検討した。MG132 を負荷した FC の H/R 誘導性の細胞死は、EDA の投与により有意に抑制された（図 10）。

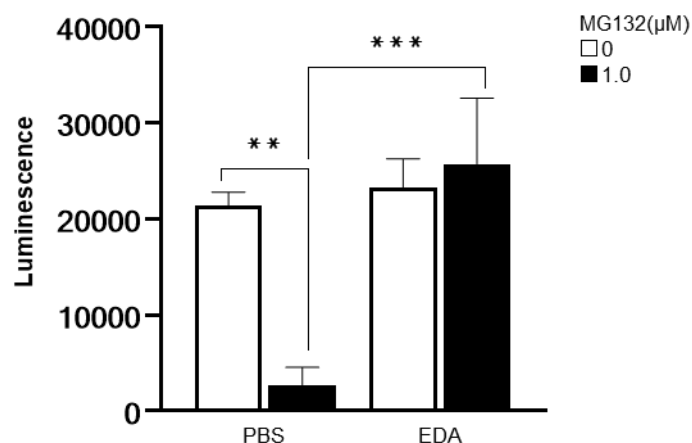


図 10. EDA の MG132 負荷と H/R による細胞死に対する抑制効果

EDA0.1μM を H/R の 30 分前に投与し、H/R 24h における生細胞数を解析した。対照群には等量の PBS を用いた。MG132 1.0μM は H/R の 24 時間前に負荷した。各測定は 3 回行い、値は平均±標準偏差で表した。**P < 0.01; ***P < 0.001。

3.4 考察

EDA は、プロテアソーム機能低下により皮膚 IRI における酸化ストレスと H/R における ROS を効果的に抑制した。この結果は、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 の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。

第一章において、プロテアソーム機能が低下した Tg では皮膚 IRI により酸化ストレスの増大を認めたが、*keap-1*^{-/-}/Tg を用いた検討では、Nrf2 経路の活性化では Tg の皮膚 IRI を十分には改善しなかった。一方、第三章で行なった EDA 投与は有意に IRI による組織傷害を抑制した。加齢によりプロテアソーム機能が低下した状態では、Nrf2 経路の活性化よりも、ROS を直接消去する EDA の投与が初期段階の褥瘡形成に予防効果を発揮する可能性が考えられる。

EDA の効果には複数の経路が推定されており、1 つには抗酸化酵素群の発現が上昇するという報告がある(Lei et al., 2019)。しかしながら、本研究では EDA の投与は抗酸化酵素群の発現に影響を及ぼさず、EDA の H/R に対する効果は直接的な ROS 消去によるものである可能性が考えられる。また、EDA はプロテアソーム阻害と H/R により誘導される細胞死を効果的に抑制した。IRI による過剰な ROS 産生が誘因となる細胞死を効果的に抑制する効果が期待され、脳虚血や褥瘡にとどまらず、腎臓の IRI 等、様々な疾患への応用が考慮される。

4. 総括および結論

4.1 本研究から得られた新知見

第一章

Tg では、皮膚 IRI における酸化ストレスの亢進と組織傷害の増悪を認めた。

第二章

H/R では、FC に対するプロテアソーム阻害剤の負荷により、酸化ストレスの亢進と ROS の産生増大及び細胞死の増加を認めた。

プロテアソーム機能低下は Nrf2 経路の活性化による抗酸化応答に障害を与える可能性を示した。

第三章

EDA は、プロテアソーム機能低下による酸化ストレスの改善をもたらし、ROS の産生と細胞死を抑制した。

4.2 新知見の意義

本研究は、高齢者における褥瘡形成を念頭においたモデルとして、Tg 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。老齢期の褥瘡の初期段階における病態形成メカニズムに焦点を当てた点において意義がある。

4.3 今後の展開

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。

今後は加齢により進行するプロテアソーム機能低下と皮膚 IRI の病態形成に関与する病態制御分子の解明を進める必要があると考えられる。褥瘡の予防を考える上では、現状ではプロテアソーム機能自体を改善する臨床応用可能な薬剤は報告されておらず、プロテアソーム機能低下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。これらの研究は、皮膚 IRI による褥瘡のみならず、様々な老化関連疾患をターゲットとした予防や治療法開発への新しいアプローチになることが期待される。

4.4 今後の課題

加齢によりプロテオスタシスの乱れが生じ、様々な疾患病態に関連する。しかし、加齢によるプロテオスタシスの変化については十分に解明されていない。老化によるプロテオスタシスの異常について、プロテオーム解析等を進めることにより、老齢期の病態発症のメカニズムを解明できると考えられる。個体の老化により、様々な生理機能の変化を生じるため、病態モデルの開発や予防・治療法の考察に適したモデルの開発と応用が必要である。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂きました北海道大学大学院医学院病理学講座分子病理学教室 笠原正典教授に深く感謝を申し上げます。

併せまして、終始直接のご指導ご鞭撻を賜りました北海道大学大学院医学院病理学講座分子病理学教室 外丸詩野准教授に深く感謝を申し上げます。

最後に本研究を支えて頂き、貴重な御助言と御協力を賜りました、分子病理学教室の皆様、北海道大学大学院保健科学研究所病態解析学分野の皆様に心より感謝を申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Birben, E. et al. (2012) ‘Oxidative Stress and Antioxidant Defense’, World Allergy Organization Journal. BioMed Central Ltd., 5(1), pp. 9–19.

Chondrogianni, N. and Gonos, E. S. (2005) ‘Proteasome dysfunction in mammalian aging: Steps and factors involved’, Experimental Gerontology. Pergamon, 40(12), pp. 931–938.

Coux, O., Tanaka, K. and Goldberg, A. L. (1996) ‘Structure and Functions of the 20S and 26S Proteasomes’, Annual Review of Biochemistry, 65(1), pp. 801–847.

Dahlmann, B. (2007) ‘Role of proteasomes in disease’, BMC Biochemistry, 8(Suppl 1), p. S3.

Du Y, Wooten MC, Gearing M, et al. Age-associated oxidative damage to the p62 promoter: implications for Alzheimer disease. Free Radic Biol Med 2009; 46: 492-501.

Hwang JS, Hwang JS, Chang I, et al. Age-associated decrease in proteasome content and activities in human dermal fibroblasts: restoration of normal level of proteasome subunits reduces aging markers in fibroblasts from elderly persons. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2007; 62: 490-499.

Inoue Y, Uchiyama A, Sekiguchi A, et al. Protective effect of dimethyl fumarate for the development of pressure ulcers after cutaneous ischemia-reperfusion injury. Wound Repair Regen 2020.

Kasuya A, Sakabe J, Tokura Y. Potential application of in vivo imaging of impaired lymphatic duct to evaluate the severity of pressure ulcer in mouse model. Sci Rep 2014; 4: 4173.

Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2007; 47: 89-116.

Kozziel R, Greussing R, Maier AB, et al. Functional interplay between mitochondrial and proteasome activity in skin aging. *J Invest Dermatol* 2011; 131: 594-603.

Lei Z, Yingying G, Heying W, et al. 'Edaravone reduces A β -induced oxidative damage in SH-SY5Y cells by activating the Nrf2/ARE signaling pathway', *Life Sciences*.2019; 221,15:259-266.

Livnat-Levanon N, Kevei E, Kleifeld O, et al. Reversible 26S proteasome disassembly upon mitochondrial stress. *Cell Rep* 2014; 7: 1371-1380.

Löw, P. (2011) 'The role of ubiquitin–proteasome system in ageing', *General and Comparative Endocrinology*, 172(1), pp. 39–43.

Maharjan S, Oku M, Tsuda M, et al. Mitochondrial impairment triggers cytosolic oxidative stress and cell death following proteasome inhibition. *Sci Rep* 2014; 4: 5896.

Oikawa, D. et al. (2012) 'A transgenic mouse model for monitoring oxidative stress', *Scientific Reports*, 2(1), p. 229.

Peirce SM, Skalak TC, Rodeheaver GT. Ischemia-reperfusion injury in chronic pressure ulcer formation: a skin model in the rat. *Wound Repair Regen* 2000; 8: 68-76.

Poppek, D. and Grune, T. (2006) 'Proteasomal Defense of Oxidative Protein Modifications', *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(1–2), pp. 173–184.

Raynes R, Pomatto LC, Davies KJ. Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways. *Mol Aspects Med* 2016; 50: 41-55.

Saito Y, Hasegawa M, Fujimoto M, et al. The loss of MCP-1 attenuates cutaneous ischemia-reperfusion injury in a mouse model of pressure ulcer. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 1838-1851.

Seal JB, Gewertz BL. Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury. *Ann Vasc Surg* 2005; 19: 572-584.

Suh JH, Shenvi SV, Dixon BM, et al. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 3381-3386.

Suzuki M, Betsuyaku T, Ito Y, et al. Down-regulated NF-E2-related factor 2 in pulmonary macrophages of aged smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 39: 673-682.

Tahara M, Nakayama M, Jin MB, et al. A radical scavenger, edaravone, protects canine kidneys from ischemia-reperfusion injury after 72 hours of cold preservation and autotransplantation. *Transplantation* 2005; 80: 213-221.

Takagi T, Kitashoji A, Iwawaki T, et al. Temporal activation of Nrf2 in the penumbra and Nrf2 activator-mediated neuroprotection in ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 2014; 72: 124-133.

Tomaru, U. et al. (2012) 'Decreased Proteasomal Activity Causes Age-Related Phenotypes and Promotes the Development of Metabolic Abnormalities', *The American Journal of Pathology*. Elsevier Inc., 180(3), pp. 963–972.

Wakabayashi N, Itoh K, Wakabayashi J, et al. Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nat Genet* 2003; 35: 238-245.

Watanabe T, Yuki S, Egawa M, et al. Protective effects of MCI-186 on cerebral ischemia: possible involvement of free radical scavenging and antioxidant actions. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 268: 1597-1604.

Wu, M.-Y. et al. (2018) 'Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury', *Cellular Physiology and Biochemistry*. S. Karger AG, 46(4), pp. 1650–1667.

Yamawaki M, Sasaki N, Shimoyama M, et al. Protective effect of edaravone against hypoxia-reoxygenation injury in rabbit cardiomyocytes. Br J Pharmacol 2004; 142: 618-626.

上出良一(2009). ‘褥瘡発生の要因 褥瘡治療・ケアトータルガイド’, 照林社, 東京, 24.

日本褥瘡学会 実態調査委員会(2018). ‘療養場所別自重関連褥瘡と医療関連機器圧迫創傷を併せた 「褥瘡」の有病率, 有病者の特徴, 部位・重症度’, 日本褥瘡学会誌, 20(4), pp. 423–445.