

(様式4)

学位論文の内容の要旨

山崎 咲保里 印

(学位論文のタイトル)

Apelin/APJ signaling suppresses the pressure ulcer formation
in cutaneous ischemia-reperfusion injury mouse model

(アペリン/APJシグナルは皮膚虚血再灌流障害マウスモデルにおける褥瘡形成を抑制する)

(学位論文の要旨)

褥瘡は高齢者や体動困難な患者にしばしば生じる皮膚疾患である。褥瘡の病態は外力と虚血により生じると考えられているが、近年褥瘡の発生機序において虚血再灌流障害も重要であることが明らかになってきた。虚血再灌流障害とは、一度虚血に至った組織に血液が再灌流することにより生じる細胞障害である。低酸素組織へ血液が再灌流すると、血栓や毛細血管狭窄などの有害事象が生じ、血管障害、炎症細胞浸潤、炎症性サイトカインの産生を引き起こして細胞のアポトーシスと組織の壊死に至る。虚血再灌流障害は脳、心臓、腎臓などにおいても梗塞などの様々な疾患を生じうる。

アペリンはG蛋白共役型受容体 (GPCR) であるAPJのリガンドであり、血管内皮細胞、線維芽細胞、脂肪細胞などから産生される。アペリン/APJシグナルは循環動態の調整、血管新生、脂肪細胞機能などの様々な機能に関わっている。APJは広く発現しているが、特に血管内皮細胞、血管平滑筋細胞に多く発現している。近年の報告ではアペリン/APJシグナルが酸化ストレスを抑制し、腎臓・心臓・脳の虚血再灌流障害によって生じる組織損傷を防ぐことが示されている。そこで、本研究では褥瘡形成における虚血再灌流障害に対するアペリン/APJシグナルの役割や制御機構について検討した。

まず、マウスの背部を12時間マグネットで圧迫後、解除することによって皮膚虚血再灌流障害を誘導する褥瘡モデルマウスを用いて、アペリン量の変化を検討した。mRNAレベルのアペリン量は虚血再灌流後4時間まで増加し、4-12時間後は一旦減少した後、1-3日後まで徐々に増加した。組織の免疫染色では真皮内のCD31陽性の血管内皮細胞周囲でアペリンが増加した。アペリンは皮膚虚血再灌流による低酸素により増加し、主に血管内皮細胞より分泌されることが示された。

次にアペリンの効果を検討するため、褥瘡モデルマウスの虚血部位にアペリンを皮下投与したところ、褥瘡による皮膚潰瘍の形成が抑制された。虚血部位の皮膚組織を採取し、免疫染色を用いて血管とペリサイトについて検討した。虚血再灌流障害によって血管やペリサイトは減少したが、アペリンを投与するとその減少が抑制された。また、低酸素領域、アポトーシス細胞数は虚血再灌流によって増加するが、アペリンを投与するといずれも減少した。これらの結果により、アペリンの皮下投与は、虚血再灌流障害による組織の血管障害、低酸素を改善し、アポトーシスを抑制することが示唆された。また、アペリン投与によってMPO陽性好中球、CD68陽性マクロファージ、CD3陽性Tcellは虚血再灌流後1日で有意に抑制され、マクロファージとTcellの浸潤のPeakが遅延することが明らかになった。TNF α 、IL-6は両群で有意差はなく、IL-10、bFGF、TGF- β

については虚血再灌流後1-4日でアペリン群において増加していた。アペリン投与が褥瘡の初期課程で炎症細胞浸潤を抑制し、種々の成長因子やサイトカイン産生を変化させる可能性が示された。

続いて、アペリンの酸化ストレスに対する作用を検討した。まず、酸化ストレス可視化マウス（OKD48トランスジェニックマウス）を用いて生体内での酸化ストレスについて検討したところ、虚血部位では強い酸化ストレスが生じて強く発光するが、アペリンの投与によって発光は有意に減弱した。また、酸化ストレスによって誘導される因子であるNrf2, Trx2, HO-1の組織におけるmRNA発現量は虚血再灌流によって上昇し、アペリン投与で有意に減少した。次にアペリンの細胞に対する直接的作用を検討するために、血管内皮細胞や線維芽細胞を用いて、H₂O₂刺激による細胞のROS産生やアポトーシス量を検討した。刺激を行うとROSが増加するが、アペリンを投与すると有意に抑制された。フローサイトメトリーにより検討したところ、H₂O₂刺激でアポトーシスおよびネクローシスは著明に増加するものの、アペリンを投与するとその割合が減少した。これらの結果より、*in vivo*、*in vitro*で、アペリンが虚血再灌流障害による酸化ストレス障害、それによるアポトーシスを間接的・直接的に抑制する可能性が示唆された。

更により高い治療効果を発揮する可能性のある創薬開発を目指し、アペリン/APJシグナルを活性化させる物質として、APJのバイアス型アゴニストであるMM07に着目した。バイアス型アゴニストは、GPCRの細胞内取り込みを促進させるβアレスチンには応答せずに、シグナルを伝えるため、APJに結合しても細胞内に取り込まれずに、持続してAPJシグナルを活性化させることができ、より強力な効果を発揮することが知られている。アペリンとMM07はヒトへの投与実験で局所の循環血液量を増加させることが示されており、その効果と安全性が実証されている。アペリンと同様に褥瘡モデルマウスへMM07投与を行ったところ創傷面積が有意に縮小した。MM07はアペリンの1/10量でもより高い効果を示しており、アペリンより強い潰瘍形成抑制効果を有する可能性が示唆された。

今回の検討により、アペリンやAPJアゴニストであるMM07による皮膚虚血再灌流障害の制御が示され、急性期褥瘡を発見した時点でこれらを投与することで、酸化ストレス障害、血管障害、アポトーシスなどが抑制され、潰瘍形成の抑制につながることを示唆された。