

平成 21年 6月 5日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間： 2006～2008
 課題番号：18780234
 研究課題名 (和文)
 ラミニン-5の活性部位由来の合成ペプチドを用いた角膜創傷治癒薬の開発
 研究課題名 (英文)
 Development of therapeutic agent for corneal wound based on synthetic peptide coding an active site of laminin-5
 研究代表者
 百田 豊 (Momota Yutaka)
 日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教
 研究者番号：50418612

研究成果の概要：ラミニンは、基底膜におもに存在し、上皮と間質の結合を支持するとともに種々の細胞生物学的機能を有している。我々はラミニン-5α3鎖のLG4ドメインが、表皮細胞の遊走活性を持つことを示した。皮膚の基底膜を構成するラミニン-5が表皮-細胞間結合のみならず、ラミニン-5が皮膚の創傷治癒に重要な役割を果たしていることを示した。本研究で、角膜の基底膜を構成するラミニンが角膜の創傷治癒に寄与しているという報告からラミニンが有する創傷治癒促進作用を調べた。我々のグループの研究結果において、ラミニンのC末端のLG4ドメインに表皮細胞の細胞接着活性と細胞遊走活性を有することから、ラミニン-1における同部位をコードするAG73ペプチドを用いて角膜創傷におけるラミニンの生物学的活性と創傷治癒促進する新規薬剤の可能性を検討した。ヒトの角膜上皮細胞の細胞株に用いた *In vitro* のAG73ペプチドに対して化学走性を示した。また、その化学走性はp38MAPK依存性であった。*In vivo* では、n-heptanolによるアルカリ創傷で作成した角膜潰瘍モデルにおいて、潰瘍作成後12時間で有意な創部の縮小が認められた。本実験で明らかになったように、ラミニン-1鎖C末端のLG4ドメインの生理活性部位をコードするAG73ペプチドが *in vitro* と *in vivo* 誘導するという事実は、創傷治癒における、ラミニン-1の生物学的な意義を示唆し、AG73ペプチドがEvidence Based Medicineに合致する創傷治癒促進する新規薬剤の可能性を示すことができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,700,000	0	1,700,000
2007年度	900,000	0	900,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	270,000	3,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：再生医学、生理活性、糖鎖、生体分子、臨床

1. 研究開始当初の背景

創傷治癒は、環境からの様々な因子により受けた障害を修復し生物が恒常性を保つのに必須の機構である。加齢や自己免疫疾患、代謝性疾患が創傷治癒を遅らせる原因である。

角膜びらんや角膜潰瘍は日常診療で頻繁に遭遇する疾患である。皮膚病と並んでオーナーが気にする疾患であり、処置を誤れば、潰瘍が進み失明に到る可能性がある。アレルギー性結膜炎や乾性角結膜炎、糖尿病・クッシング症候群等の原疾患の続発症として、パ

グヤシーザーなど短頭種特有の解剖学的特徴による物理的な障害により、角膜びらん・潰瘍に到ることが知られている。角膜潰瘍の治癒過程の検討、その機序に基づく潰瘍の治療法の改善と発展が、小動物の角膜創傷治癒の理解に必要と考えられていた。

2. 研究の目的

近年、角膜潰瘍における創傷治癒において、ラミニンが重要な役割を演じていることが報告されている。そこで、皮膚における申請者が解明した知見をもとに、ラミニンが角膜創傷治癒に寄与する役割・機能を解析する。

3. 研究の方法

理研セルバンクより提供をうけた株化ヒト角膜上皮細胞 HCE-T 細胞 (RCB2280) を使用した。AG73 および scramble AG73 は東京薬科大学の野水基義教授のご好意により譲り受けた。

(1) ボイデンチャンバーアッセイによる細胞走化活性の評価

HCE-T cell を BSA (-) DMEM 培地でスターブ状態におき、37°C で 24 時間培養した。12well プレートサイズの上方チャンバーに細胞 1.0×10^{-4} 、下方チャンバーに様々な濃度の AG73 (0.05, 0.1, 0.2 mg/ml) を含む BSA (-) DMEM 培地を注入し、37°C で 24 時間インキュベートした。コントロールには AG73 ペプチドのアミノ酸配列をランダムに変更した scramble AG73 (0.1 mg/ml) を用いた。その後、チャンバーを取り出し、上方チャンバーの培地を捨て、チャンバー下面をホルマリン含有クリスタルバイオレットで固定・染色した。フィルター上面の細胞 (フィルターを通過していない細胞) を綿棒で掻破した後、フィルターを通過しチャンバー下面に移動した細胞数を顕微鏡下でカウントした。

(2) AG73 が活性化するシグナルカスケードの検索

(a) HCE-T cell を 12 well に 1.0×10^{-5} 播種し、37°C 24 時間培養した。細胞がサブコンフルエントの状態となったところで培地を吸引し、PBS (-) で 2 回ウォッシュした後、BSA (-) の DMEM 培地に換えてスターブ状態にし 37°C で 12 時間培養した。AG73 (0.1 mg/ml) を含む新しい FBS (-) 培地を添加した。15、60 分後に培地を吸引し、氷冷 PBS (-) で 2 回ウォッシュした後、Cell Lysis Buffer を加えゆっくり振盪した。5 分後細胞抽出液を回収し 4°C -15000rpm で 7 分遠心した後、その上清を回収しサンプルとした。サンプルを 95°C 5 分間加熱した後、10% SDS-PAGE を行った。PVDF 膜に転写し 5% スキムミルク TBS-T でブロッキングした後、1000 倍希釈した一次抗体 (anti p38MAPK および anti p-p38MAPK) と 4°C オーバーナイトで反応させた。TBS-T で 5 分×3 回ウォッシュした後、5000 倍希釈した二次抗体と 37°C 1 時間反応

させた。TBS-T でウォッシュした後、ECL を用いて暗室にて発光を検出した。

(b) SB203580 (p38MAPK inhibitor) による細胞移動の阻害

AG73 の細胞走化活性が p38MAPK を介したシグナルカスケードによるものか確認するため、ボイデンチャンバーアッセイを用いた細胞走化活性を p38MAPK inhibitor の存在下で行った。

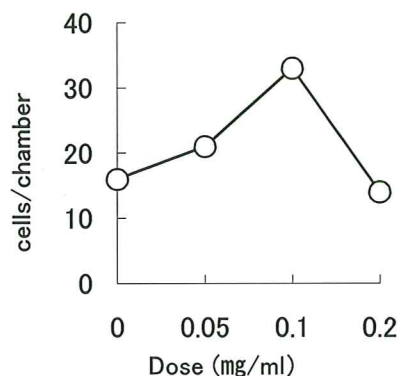
(3) ラット角膜創傷モデルを用いた創傷治癒活性の検討

retire-Wister ラット (♂, 660-720g 週齢不明) を用いた。全身麻酔、眼球表面麻酔を施したラットの角膜中央部に、n-heptanol に浸漬したフィルターを圧着し角膜潰瘍を作成した。創傷の作成直後にフルオレセイン染色および写真を撮影行い、角膜上皮欠損部の面積および外周長を測定した。左眼に Scramble peptide (コントロール)、右眼に *in vitro* の結果を基に決定した 3 種類の濃度の AG73 をそれぞれ $10 \mu\text{L}$ 点眼した。2.5 時間毎に total 5 回点眼を行い、12 時間後に測定した。創傷周長の平均と面積変化を組み合わせて創傷治癒活性の評価を行うこととした。 $D = \Delta A \div p$ ($D = \text{linear healing}$, $\Delta A = \text{change in area}$, $p = \text{mean perimeter}$) 右眼に AG73 投与、左眼をコントロールとして linear healing を測定し、個体ごとにコントロールと AG73 の比較を行った。ラットを安楽死させた後、角膜を採材し組織病理学的評価を行った。

4. 研究成果

(1) 図 AG73 の Dose-dependent な細胞走化活性

ボイデンチャンバーアッセイによる AG73 ペプチドの HCE-T cell に対する細胞走化活性の評価。0.05、0.1 mg/ml までは Dose-dependent に細胞走化活性が上昇したが、0.2 mg/ml では逆に低下した。



ボイデンチャンバー底部全体の細胞数をカウントした

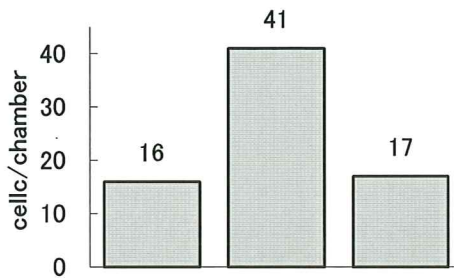
(2)

(a) AG73 が活性化する signal pathway の検索 AG73 を apply 後 15、60 分の細胞抽出液を sample として western blotting により細胞

内 signal pathway の検索を行ったところ p38MAPK のリン酸化の亢進が認められた。p38 のリン酸化の p-p38/p38 で評価し、コントロール群の値を 1.0 とした。15、60 分ともに AG73 投与群で p38MAPK のリン酸化が亢進している。

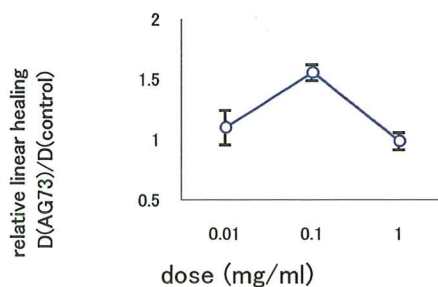
time	15min		60min	
	+	-	+	-
AG73	+	-	+	-
p-p38	+ 15min - 		+ 60min - 	
	10711	3095	8901	6532
p38				
p-p38/p38	1.6	1.0	1.6	1.0

(b) SB23180 (P38MAPK inhibitor) による細胞移動の阻害 (24H)
ボイデンチャンバーアッセイを p38inhibitor の存在下で行った。inhibitor を投与すると AG73 の細胞走化活性が阻害される。AG73 の濃度は 100 μg/ml



SB203580	-	-	+
AG73	-	+	+

(3) 図 4 *in vivo* における AG73 の創傷治癒活性の評価 (12H)
.0.1mg/ml 投与群で創傷面積の縮小がコントロールである左眼と比較して約 1.5 倍促進された。しかし、0.01、1.0mg/ml 投与群では活性がみられない



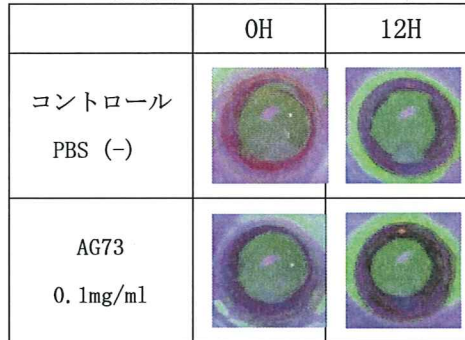
linear-healing

$D = \Delta A \div p$, where D = linear healing, ΔA = change in area, and p = mean perimeter

in vivo における AG73 の創傷治癒活性の評価 (12H)

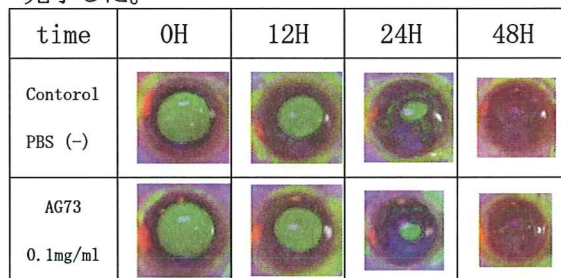
写真上段は PBS (コントロール) 下段は AG73 (0.1mg/ml) 投与 (フルオレセイン染色)

AG73 が創傷治癒を促進している。



in vivo における角膜創傷の経時的変化 (~48 時間まで)

写真上段は PBS (コントロール) 下段は AG73 (0.1mg/ml) を投与。角膜の再上皮化は基礎疾患のない個体であれば速やかに進行する。AG73 投与群で 12、24 時間の時点でコントロールより創傷治癒を促進している。どちらの群も上皮欠損部の再上皮化は 48 時間までに完了した。



結論として、AG73 ペプチドについて、角膜上皮における創傷治癒効果を *in vitro* および *in vivo* の実験にて検討を行った。その結果、第 2 章での *in vitro* の検討では、ヒト角膜上皮細胞に対して細胞走化活性を有すること、また、その際の細胞内シグナル経路としては p38MAPK のリン酸化が関与している可能性が示唆された。第 3 章の *in vivo* の検討では、ラット角膜創傷モデルにおいて角膜の創傷治癒を促進する可能性が示唆された。

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 4 件)

①Eri Araki, Yutaka Momota, Takeshi Togo, Miki Tanioka, Kentaro Hozumi, Motoyoshi Nomizu, Yoshiki Miyachi, Atsushi Utani,

Molecular Biology of the Cell、Epub ahead of print、2009、査読(有)

② Yuichi YAMADA, Reeko SATO, Saori KOBAYASHI, Careen HANKANGA, Osamu INANAMI, Mikinori KUWABARA, Yutaka MOMOTA, Nobuyuki TOMIZAWA and Jun YASUDA、Journal of Veterinary Medical Science、70、443-448、2008、査読(有)

③ Careen HANKANGA, Saori KOBAYASHI, Yuichi YAMADA, Yutaka MOMOTA, Nobuyuki TOMIZAWA, Reeko SATO and Jun YASUDA、Journal of Veterinary Medical Science、69、881-885、査読(有)

④ Hasegawa M., Furuya M., Kasuya Y., Nishiyama M., Sugiura T., Nikaido T., Momota Y., Ichinose M. Kimura S.、87、882-892、2007、査読(有)

[学会発表] (計 1 件)

①松本洋介、百田 豊、片山泰章、生澤充隆、野水基義、宇谷厚志、谷健二、第145回 日本獣医学会、2008年3月30日、麻布大学

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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◇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

百田 豊 (Momota Yutaka)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教

研究者番号：50418612

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：