

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18436

研究課題名（和文）低細胞毒性の界面活性剤が有する細胞増進促進作用の研究

研究課題名（英文）Study of the Promotive Effect of Low-Cytotoxic Surfactants on Cell Growth

研究代表者

石田 泰久（Ishida, Yasuhisa）

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：10457062

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）：申請者らは両親媒性界面活性剤Pluronic F68を細胞培養培地に添加することで細胞増殖が促進され高濃度でも細胞毒性を呈さないことを明らかにした。またヒト培養線維芽細胞を塩基性線維芽細胞増殖因子のみと、塩基性線維芽細胞増殖因子とPluronic F68を添加し培養したものを比較したところPluronic F68を添加している群の細胞増殖がより促進されることを確認した。

この原理を明らかにするべく繊維芽細胞をbFGFのみ、およびbFGF+Pluronic F68を添加し細胞培養を行い電気泳動によりpERK、ERKの量を計測し細胞増殖の活性化の程度を調べたがいずれも有意な所見を得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体にとって低毒性である両親媒性界面活性剤が細胞増進を促進することを明らかにすることで、今後、この両親媒性界面活性剤が創傷治療、特に難治性潰瘍の保存的治療（創傷被覆材や軟膏、洗浄剤）に活用することが出来る可能性があることを示唆している。また基礎的実験において細胞培養を行う際の添加材料として活用することが出来る可能性もあると考えた。

研究成果の概要（英文）：Applicants have demonstrated that the addition of an amphiphilic surfactant, Pluronic F 68, to cell culture media promotes cell growth and does not cause cytotoxicity even at high concentrations. We also compared cultured human fibroblasts with basic fibroblast growth factor alone and those with basic fibroblast growth factor and Pluronic F 68, and confirmed that cell growth was enhanced in the group with Pluronic F 68.

To clarify this principle, we added bFGF alone and bFGF + Pluronic F 68 to fibroblasts, cultured them, and measured the amounts of pERK and ERK by electrophoresis to determine the degree of activation of cell proliferation, but no significant findings were obtained.

研究分野：形成外科

キーワード：両親媒性界面活性剤 線維芽細胞 細胞増進 創傷治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

界面活性剤は日常生活において様々な用途で用いられており、その多くが油脂への洗浄効果を有し、高濃度では細胞毒性を呈する。両親媒性界面活性剤の一部は高濃度であっても細胞毒性を呈さないため、コンタクトレンズの洗浄液や創傷洗浄剤などに利用されている。申請者が属するグループはこれまで、両親媒性界面活性剤の Pluronic® F68 を細胞培養の培地に添加することで細胞増殖が促進されることを証明してきており、創傷治療に応用できる可能性を示唆してきた。しかし、なぜこの Pluronic® F68 が細胞増殖に作用するのかは明らかになっておらず、また生体において創傷治療に応用できるか証明出来ていない。

2. 研究の目的

本研究課題では両親媒性界面活性剤の Pluronic® F68 がどのような機序で細胞増殖に作用するのかを明らかにし、動物の創傷モデルに使用して創傷治療に活用できることを証明することを目指す。

3. 研究の方法

両親媒性界面活性剤の Pluronic® F68 を細胞培養の培地に添加することで細胞増殖が促進され、また高濃度でも細胞毒性を呈さないことを明らかにする。この機序を明らかにするため繊維芽細胞を「bFGFのみ」および「bFGF+Pluronic F68」で濃度勾配をつけて刺激し、pERK、ERK の量を計測することで細胞増殖の活性化の程度を調べることにした。

4. 研究成果

図1はヒト培養線維芽細胞を96ウェルディッシュに播種し Pluronic® F68 と塩基性線維芽細胞増殖因子を添加して3日間細胞培養した際の結果である。5,000cells/well、10,000cells/well とともに細胞増殖が促進される結果となった。

また図2に示すようにヒト培養線維芽細胞を塩基性線維芽細胞増殖因子のみ添加し培養したものと、塩基性線維芽細胞増殖因子と Pluronic® F68 を添加し培養したものを比較したところ、Pluronic® F68 を添加している群の細胞増殖がより促進されることを確認した。他の界面活性剤(SDS、TritonX-100)と比較したものでは、図3に示すように、他の界面活性剤では高濃度で細胞毒性を示すのに対して、Pluronic® F68 は高濃度であっても細胞毒性を呈さず、細胞増殖を促進することが明らかとなった。

図1

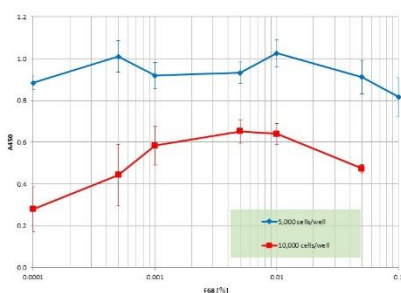


図2

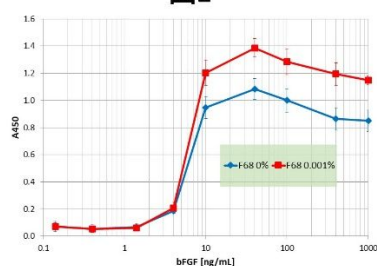
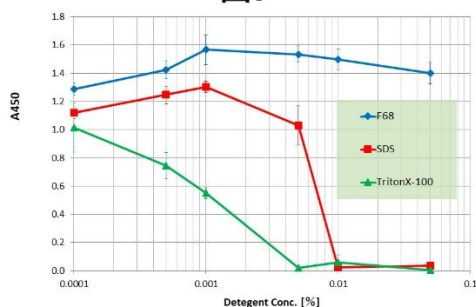


図3



上記の結果を踏まえ繊維芽細胞を bFGF、bFGF+F68 で濃度勾配をつけて刺激し、pERK、

ERK の量を計測することで細胞増殖の活性化の程度を調べることとした。

Fibro を Dish に播種し培養したうえで実験前日にスタベーションし、MEK inhibitor で 37 30 分インキュベートし、bFGF(+F68)で濃度勾配をつけて刺激した。破碎しサンプル回収した上で、タンパク定量及び調整した。作成したゲルを用いて電気泳動し membrane に転写した。転写した membrane をブロッキングし、一次抗体処理を行った。二次抗体処理をして、ChemiDocXRSPPlus で検出を行った。

pERK の計測結果は最も細胞増殖が促進されたのは F68 添加の 4ng/μl であった。ERK に関しては差が大きく、有意な結果を得る事ができなかった。

このため、再度同様の試験を行ったが、pERK、ERK ともに F68 添加の有無にかかわらず、bFGF の濃度勾配に沿った細胞増殖が起こったという結果が得られなかった(図 4-1、図 4-2)。

次に、F68 を添加せずに実験を行った。bFGF の至適濃度は 400ng/μl であったが、入れなかった場合よりも 4、40ng/μl の濃度の方が低く出ており、有意な結果が得られなかった(図 5-1、図 5-2)。

以上から Pluronic® F68 は細胞増殖を促進する作用があることは明らかではあったが、そのメカニズムまでは解明することはできなかった。

図 4-1

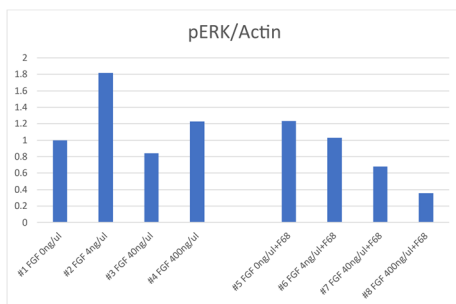


図 4-2

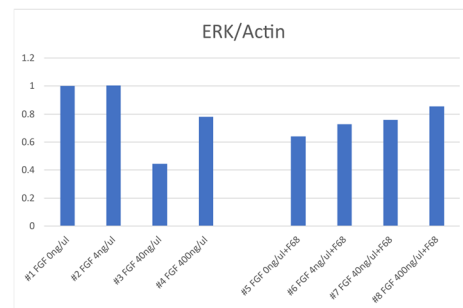


図 5-1

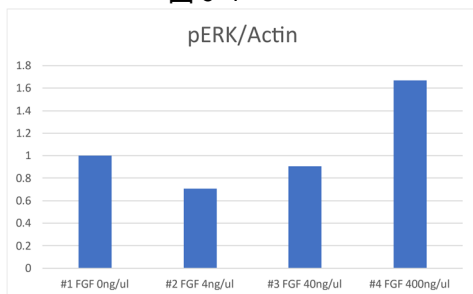
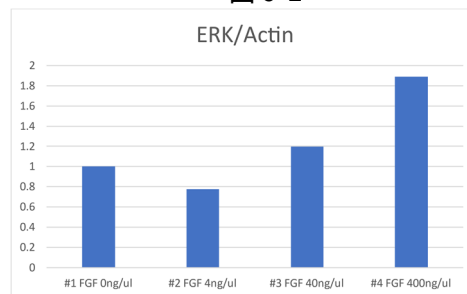


図 5-2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------