

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月1日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591989

研究課題名（和文） 筋線維芽細胞の特性に着目した皮膚創傷治療法の開発に関する基礎的研究

研究課題名（英文） A fundamental study of development of the wound healing therapy focusing on the characteristic of myofibroblast.

研究代表者

安部 正敏 (ABE MASATOSHI)

群馬大学・医学部・講師

研究者番号：80302462

研究成果の概要（和文）：本研究は、創傷治癒における線維芽細胞と筋線維芽細胞の挙動の相違を明らかにすることで、より効率的な創傷治療を開発するための基礎的研究である。本研究の最初の目的は基礎的エビデンスを得る目的で皮膚創傷治癒に有効と考えられる増殖因子について、それらが線維芽細胞および筋線維芽細胞に及ぼす影響を細胞内シグナル伝達系において検討し、両細胞間におけるシグナル伝達系の異同を明らかにすることであった。

そこでまず、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)が臨床的に、難治性皮膚潰瘍においては治癒を促進するのみではなく、創傷治癒の質的改善いわゆる scarless wound healing をもたらすことが明らかとなった事実に着目した。その機序は長らく不明であったが、近年アポトーシスの関与が注目されるようになった。今回我々は、bFGFによるアポトーシス誘導について、線維芽細胞と筋線維芽細胞間で比較検討した。方法として、ヒト正常真皮由来線維芽細胞を transforming growth factor- β (TGF β) 存在下で培養することにより筋線維芽細胞を得た。得られた細胞を用い、b-FGFのアポトーシス誘導能を線維芽細胞と比較検討した。さらに、アポトーシス誘導に関与するシグナル伝達系について、それぞれの阻害剤を用いて検討した。その結果、b-FGFは線維芽細胞に比較し、筋線維芽細胞で高率にアポトーシス誘導した。この機序として、筋線維芽細胞においてはAkt および phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)の阻害薬前処置により、b-FGFのアポトーシス誘導が著しく抑制されたことから、PI3K \rightarrow Aktのシグナル伝達系の関与の可能性が示唆された。ここまでの結論として、b-FGFは創傷治癒過程成熟期における筋線維芽細胞において、アポトーシス誘導を誘導することで、創傷治癒の質的变化をもたらす可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Although recent clinical reports have indicated that recombinant basic fibroblast growth factor (bFGF) promotes scarless wound healing, the mechanism remains unclear. The present study was carried out to elucidate the mechanisms. The protein levels of cellular α -smooth muscle actin increased at 2-4 days after TGF β treatment alone and at 4 to 6 days after a costimulation of bFGF and TGF β . A spontaneous contraction of stressed myofibroblast-collagen matrix was cancelled by bFGF, which was restored under the presence of C3 exotransferase or Y27632. bFGF stimulation of myofibroblasts as well as fibroblasts elicited a transient Rac and Rho activation. bFGF promoted apoptosis of the myofibroblasts but not of the fibroblasts, even in the presence of two different inhibitors, either LY294002 or an Akt inhibitor. The present study suggests that the phosphatidylinositol-3-kinase to Akt as well as the Rho to Rho kinase signaling pathway is involved in bFGF-promoted myofibroblast apoptosis, and bFGF can promote the scarless wound healing upon the induction of apoptosis of myofibroblasts, but not fibroblasts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1,500,000	450,000	1,950,000

研究分野：医学

科研究費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：創傷治癒、細胞生物学、筋線維芽細胞、増殖因子、アポトーシス、Akt

1. 研究開始当初の背景：近年、創傷治療学においては、様々な基礎的研究からそのメカニズムと、それに応じた治療戦略が明らかとなり大きな進歩を遂げている。なかでも本邦では塩基性線維芽細胞増殖因子 bFGF が臨床応用され、高い臨床効果が明らかとなった。本剤は創傷治癒の細胞増殖期に作用する薬剤であると考えられるが、実際の臨床現場においてはケロイドや肥厚性瘢痕を来しにくい事実が明らかとなり、速やかな治癒とともにいわゆる **scarless wound healing** と称される創傷治癒の質的向上が図られることが明らかとなっている。創傷治癒の成熟期において、ケロイドや肥厚性瘢痕の発生には筋線維芽細胞が深く関係しているが、筋線維芽細胞は創傷治癒においてマイナスのみに働くわけではなく、むしろ細胞増殖期においては創収縮を促すといった重要な役割を果たす。つまり創傷の真皮においては、線維芽細胞と筋線維芽細胞が共存している状況であり、それらの比率、さらには個々の役割を明らかにすることは創傷治癒理論に沿った治療手段を見出す手掛かりとなる。そこで、本研究では基礎的エビデンスを得る目的で皮膚創傷治癒に有効と考えられる各種増殖因子について、それらが線維芽細胞および筋線維芽細胞に及ぼす影響を細胞内シグナル伝達系において検討し、両細胞間におけるシグナル伝達系の異同を明らかにする。さらに、両細胞を様々な比率で混合し、コラーゲンゲル収縮を検討することにより最適な創傷治癒環境を検討する。これらの2点を明らかにすることにより、速やかな治癒、かつ **scarless wound healing** を踏まえた新たな創傷治癒のストラテジーを明らかにすることを目的とする。

2. 研究の目的：創傷治癒における線維芽細胞と筋線維芽細胞の挙動の相違を明らかにすることで、より効率的な創傷治療を開発す

るための基礎的知見を得る。

3. 研究の方法：患者の同意を得た上で、手術時に得られた正常部皮膚を用い、型どおりの explant culture 法にてヒト真皮線維芽細胞を得た。線維芽細胞は継代培養後7代以前の細胞を実験に供した。ヒト真皮筋線維芽細胞は、得られた線維芽細胞をヒト Transforming Growth Factor (TGF)- β 1 10ng/ml 存在下で培養し、抗 α -smooth muscle actin (SMA) 抗体を用いて α -SMA の発現を確認の上実験に供した。なお、実験は異なる5系列の細胞で行った。実験は直径12mmのヒト筋線維芽細胞含有コラーゲンゲルを作成し、異なる2系列を設定した。一つはゲル製作後、すぐに培養液中のゲルを遊離した後、増殖因子にて刺激する系で、これを Floating matrices contraction (FMC) と呼ぶ。もう一方はコラーゲンゲル製作後、ゲルをディッシュ底につけたまま少なくとも24時間血清存在下で培養し、その後非血清含有培養液内でゲルを遊離させ、増殖因子にて刺激する系で、Stressed matrices contraction (SMC) と呼ぶ。コラーゲンゲル内の線維芽細胞をファロイディンにて染色すると、FMC ではアクチンストレスファイバーの形成はみられず、よって FMC は創傷治癒初期段階のモデルと考えることができる。他方、SMC ではコラーゲンゲル内の線維芽細胞に豊富なアクチンストレスファイバーの形成が観察され、創傷治癒晩期段階のモデルと考えられる。まず、それぞれの系において bFGF が及ぼすゲル収縮の変化を検討した。さらに、ゲルをファロイディンで染色し、筋線維芽細胞の形態学的変化を観察した。

次に、ヒト線維芽細胞含有コラーゲンゲル

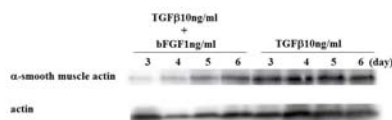
の FMC に関する Rac および Rho の活性化の有無につき、筋線維芽細胞において、定量化を目的に Rac1 Activation Assay Biochem Kit, G-LISA および Rho A Activation Assay Biochem Kit, G-LISA を用いて検討した。さらに、ゲルおよび細胞収縮に関する細胞モーター蛋白であるミオシン軽鎖のリン酸化の有無について、抗ミオシン軽鎖リン酸化抗体を用いたウエスタンブロット法により、線維芽細胞と筋線維芽細胞において比較検討した。

最後に、bFGF がもたらすアポトーシスについて、線維芽細胞と筋線維芽細胞において定量化を目的として、ApoStrand ELISA Apoptosis Detection Kit を用い比較検討した。同時にその機序を検討する目的で、PI3K の阻害剤である LY294002、Akt 阻害剤、Rho 阻害剤であるボツリヌス菌由来エキソエンザイム C3 および ROCK の阻害剤である Y27632 の効果を検討した。

統計学的検討は Fisher PLSD tests を用い $p < 0.05$ を有意と判定した。

4. 研究成果: TGF- β 1 によるヒト真皮線維芽細胞の α -SMA 発現誘導における bFGF の効果

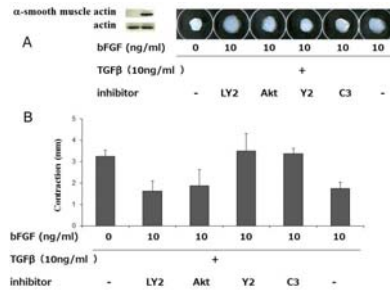
予備実験として、TGF- β 1 によるヒト真皮線維芽細胞の α -SMA 発現誘導における bFGF の効果について検討した。その結果、TGF- β 1 10ng/ml 単独培養下では、培養開始後 3 日目には α -SMA 発現がみられ 4~5 日でピークを迎えるが、TGF- β 1 10ng/ml と bFGF 10ng/ml 共存下で培養すると、 α -SMA の発現は抑制された。



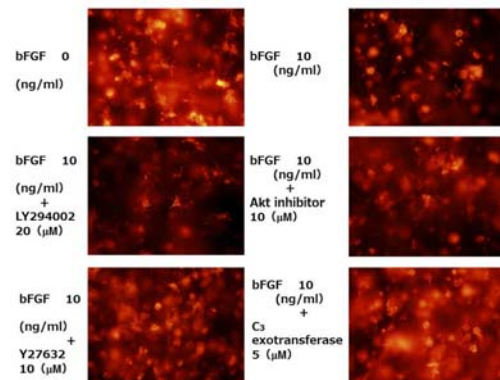
bFGF のヒト真皮筋線維芽細胞含有コラーゲンゲル収縮への影響

まず、bFGF がおよぼすヒト真皮筋線維芽細胞含有コラーゲンゲル収縮を検討した。その結果、SMC においてヒト真皮筋線維芽細胞含有コラーゲンゲル収縮は無刺激で収縮がみられるが、bFGF 10ng/ml で刺激するとその収縮効果はみられなかった。この機序を検討する目的で、LY294002、Akt 阻害剤、C3 エキソエンザイム、Y27632 にて前処置し同様に検討すると、C3 エキソエンザイムおよび Y27632 処置では、無刺激同様ゲルは収縮したが、

LY294002、Akt 阻害剤では、bFGF 10ng/ml 刺激時同様収縮効果はみられなかった。他方、bFGF はヒト真皮筋線維芽細胞含有コラーゲンゲルの FMC を惹起しなかった。



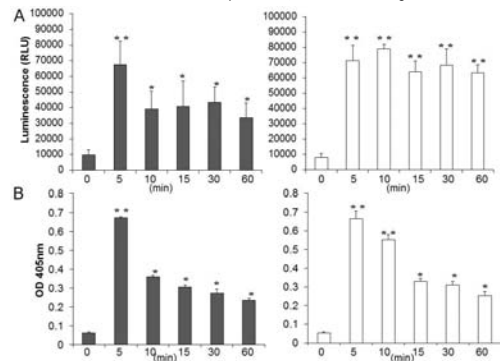
ヒト真皮筋線維芽細胞含有コラーゲンゲルの SMC における形態学的変化を検討した。その結果 bFGF 無刺激下では、細胞が様々な方向に突起を形成する。bFGF 10ng/ml 刺激では、同様の傾向がみられるが、視野あたりの細胞数が減少する傾向がみられた。この傾向は、LY294002 および Akt 阻害剤前処置でも同様であった。一方、C3 エキソエンザイムおよび Y27632 前処置は、細胞数は bFGF 無刺激群と変化がなかったが、突起形成が減少した。



bFGF のヒト真皮筋線維芽細胞における Rac および Rho 活性化に及ぼす効果

次に細胞内シグナル伝達を解析する目的で、線維芽細胞において bFGF が活性化する Rac および Rho について検討した。

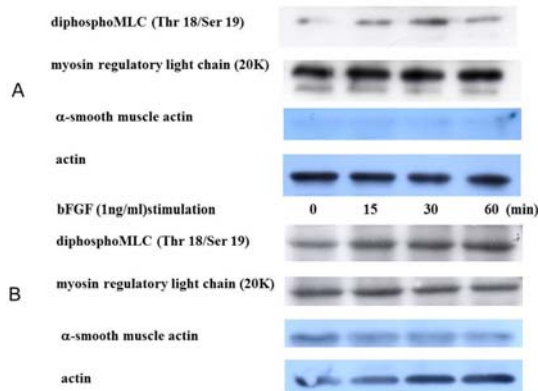
その結果、ヒト真皮筋線維芽細胞においても、線維芽細胞同様、bFGF 刺激後速やかに Rac および Rho の活性化がみられた。



bFGF がおよび筋線維芽細胞および線維芽細胞におけるミオシン軽鎖のリン酸化

筋線維芽細胞においても、Rho の活性化がみられたことから、その下流に存在する ROCK が関与する細胞のモーター蛋白であるミオシン軽鎖のリン酸化について検討した。なお、ROCK はミオシン軽鎖キナーゼとともにミオシン軽鎖のリン酸化を促進し、脱リン酸化酵素を抑制する。

その結果、線維芽細胞においては bFGF 刺激後 30 分をピークとしてミオシン軽鎖のリン酸化がみられたが、筋線維芽細胞においては、bFGF 刺激前よりミオシン軽鎖はリン酸化しており、更なる増強効果はみられなかった。



bFGF がもたらすアポトーシスの効果とその機序

最後に筋線維芽細胞および線維芽細胞における bFGF 刺激によるアポトーシス誘導を検討した。

その結果、筋線維芽細胞においては bFGF 10ng/ml 刺激により明らかなアポトーシス誘導がみられた。LY294002 および Akt 阻害剤で前処置したところ、やはり明らかなアポトーシス誘導がみられたが、bFGF 10ng/ml 単独刺激時に比較しその効果は減弱した。また、C3 エキソエンザイムおよび Y27632 前処置においては bFGF 無刺激と変化がなかった。一方、線維芽細胞においては bFGF 10ng/ml 刺激においてもアポトーシス誘導は全くみられなかった。

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 3 件)

1) Abe M, Yokoyama Y, Ishikawa O. A possible mechanism of basic fibroblast growth factor-promoted scarless wound healing: the induction of myofibroblast apoptosis. *Eur J Dermatol*. 22: 46-53, 2012. 査読有

2) Abe M, Syuto T, Yokoyama Y, Ishikawa O.

Improvement of quality of life and clinical usefulness of cyclosporin administration in patients with nail psoriasis. *J Dermatol* 38: 916-8, 2011. 査読有

3) Abe M, Yasuda M, Yokoyama Y, Ishikawa O. Successful treatment of combination therapy with tacalcitol lotion associated with sunscreen for localized Darier's disease. *J Dermatol* 37: 718-21, 2010. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1) Abe M, Yokoyama Y, Syuto T, Ishikawa O. Effects of Cyclosporin A on extracellular matrix metabolism by human dermal fibroblasts., 第 4 回世界創傷治癒連合会議 (招待講演) 横浜, 2012.9.2-6

2) Abe M, Ishikawa O. Differential diagnosis of intractable chronic wounds, 第 4 回世界創傷治癒連合会議 (招待講演) 横浜, 2012.9.2-6

3) Abe M, Ishikawa O. Basic fibroblast growth factor treatment on wound healing in Japan; past, present and future perspectives. The 22th World Congress of Dermatology, Korea, 2011.5.24-29

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 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

安部 正敏 (ABE MASATOSHI)

群馬大学・医学部・講師

研究者番号: 80302462

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者