

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861685

研究課題名(和文) bFGF/ヘパリン併用による創傷治癒促進効果の研究

研究課題名(英文) Effect of the wound healing by the bFGF/ heparin combination

研究代表者

金澤 成行 (KANAZAWA, SHIGEYUKI)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：50506243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はbFGFとヘパリンの併用による創傷治癒促進効果を明らかにすることを目的とする。まずは、bFGF単独投与群とbFGF/ヘパリン併用群に分けて細胞数を比較したところ、併用群は有意な細胞数の増加を認めた。次に、細胞遊走試験により、併用群は細胞遊走を促進することが確認できた。さらには、細胞増殖や生存に関するタンパクであるERKやAkt、JNKの活性化の変化であるが、併用群ではそのリン酸化までの時間の短縮を認めた。糖尿病モデルマウスを用いて、両側背部に皮膚欠損を作成した結果、bFGF/ヘパリン併用群、bFGF単独群、bFGF投与無し群の順に創傷面積の縮小を認めた。

研究成果の概要(英文)：This study is intended to clarify a wound healing promotion effect by the combination of bFGF and heparin. At first after dividing it into the bFGF alone administrated group and the bFGF/ heparin combination group, and comparing the cell count, the bFGF/ heparin combination group recognized the increase of a meaningful cell count. Then, by the wound healing assay method, bFGF/ heparin combination group showed the promotion of cell migration. Besides, about an activated change of ERK and Akt which were the protein which participated in cell proliferation and survival and JNK, it showed shortening at time until the phosphorylation in the bFGF/ heparin combination group. As a result of having made a skin loss to the both sides back using a diabetes model mouse, it showed the reduction of the wound area in order of bFGF/ heparin combination group, bFGF alone group, a dosageless group.

研究分野：創傷治癒

キーワード：bFGF ヘパリン 創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

創傷治癒過程において、主要な役割を担っている細胞の一つに皮膚線維芽細胞がある。研究代表者は、これまで、basic fibroblast growth factor (bFGF)が皮膚線維芽細胞の遊走におよぼす作用とそのメカニズムについて研究してきた。そしてbFGFが線維芽細胞の遊走を促進させるといふ新しい創傷治癒のメカニズムを、そして未知であったbFGFのシグナル伝達経路を発見した(Kanazawa S et al. PLoS One, 2010)。さらに、低分子量G蛋白の一つであるRac1がbFGF刺激による遊走を加速させていることを明らかにした。しかし、bFGFの創傷治癒における分子生物学的なメカニズムは未だ不明なところが多い。

ヘパリンやヘパラン硫酸(HS)はFGFと結合して複合体を形成することで、FGFレセプターの活性化とシグナル伝達に関与するというが知られている(L Pellegrini et al. Nature, 2000)。そこで、研究代表者はbFGFとヘパリンを併用することで、FGFレセプターを活性化し、難治性潰瘍の治療成績を向上できないだろうかと考えた。bFGF/ヘパリン併用の創傷治癒における効果を *in vitro/in vivo* 両方の側面から明らかにするために、本研究を計画するに至った。

現在、糖尿病患者数は飛躍的に増加しており、厚生労働省による2010年度推計値は1080万人にも及ぶ。また、高齢社会に伴い寝たきり老人の数も非常に増加している。したがって、臨床の場において糖尿病性皮膚潰瘍や褥瘡をはじめとした難治性皮膚潰瘍の数が必然的に増加している。我々の研究結果を応用することで、新しい皮膚潰瘍治療薬の創薬、そして難治性皮膚潰瘍に対する治療成績の向上が期待できると考えている。

2. 研究の目的

FGFはヘパリンと結合し複合体を作ることによってFGFレセプターを活性化することが知られている。以下の実験計画により、bFGFとヘパリンの併用による創傷治癒促進効果を明らかにすることが本研究の目的である。

(1) bFGF/ヘパリン併用による皮膚線維芽細胞の増殖能力・遊走能力の変化を明らかにし、そのメカニズム(シグナル伝達経路)を解明する。

(2) 糖尿病モデルマウスの皮膚潰瘍におけるbFGF/ヘパリン併用の有効性を明らかにする。

3. 研究の方法

bFGF/ヘパリン併用を応用した新しい皮膚潰瘍治療薬の創薬、さらには臨床応用に展開するための基盤をつくるために、下記の研究を計画した。本研究は以下の通り遂行していく予定である。

(1) bFGF/ヘパリン併用による皮膚線維芽細胞の増殖能力の変化を明らかにする。

(2) bFGF/ヘパリン併用による皮膚線維芽細胞の遊走能力の変化を明らかにする。

(3) bFGF/ヘパリン併用の創傷治癒におけるシグナル伝達経路の解明を行う。具体的には、細胞増殖や生存に関与するタンパクであるERKやAktの活性化の変化、細胞遊走に関与するRac1やJNKなどの活性化の変化を調べ、それらのシグナル伝達経路を明らかにする。

(4) 糖尿病モデルマウスの皮膚潰瘍におけるbFGF/ヘパリン併用の有効性を明らかにする。

増殖能力の評価について、bFGF単独投与群とbFGF/ヘパリン併用群に分けて48時間後の細胞数を比較する。ラット皮膚より得た皮膚線維芽細胞を用いて、96ウェルプレートに濃度 1×10^5 /mlで培養する。その後、bFGF単独群はbFGF10ng/ml、bFGF/ヘパリン併用群はbFGF10ng/ml・ヘパリン10 μ g/mlを添加し、48時間後の細胞数を、吸光度490nmとして表されるホルマゼン産物の量を測定することで比較する。さらには、セルカウンターを用いて、実際に細胞数を計測する。

遊走能力の評価について、まず、野生型ラット3日齢の背部皮膚を採取し、これより線維芽細胞(場合によりNIH3T3 fibroblast)を培養する。細胞濃度を100%に近い状態にしたところで、ピペットチップで溝(仮想の創傷)を作成する。bFGF単独投与群(bFGF10ng/ml)とbFGF/ヘパリン併用群(bFGF10ng/ml・ヘパリン10 μ g/ml)で刺激することにより、細胞がどれだけの速度でこの溝に向かって遊走し、そして、溝を埋めるかを検討する(wound healing assay法)。評価は遊走距離/時間(μ m/h)で行う。本実験時には、マイトマイシン(5 μ g/ml)を添加する。これは、G1~S期のDNA複製を阻害することにより細胞増殖を停止させることで、純粋に遊走能力のみの評価を可能にさせるためである。

bFGF/ヘパリン併用の創傷治癒におけるシグナル伝達経路の解明について、細胞増殖や生存に関与するタンパクであるERKやAktの活性化の変化や、細胞遊走に関与することを申請者が発見したRac1やJNKの活性化の変化をウエスタンブロッティング法で解析し、bFGF単独投与群(bFGF10ng/ml)とbFGF/ヘパリン併用群(bFGF10ng/ml・ヘパリン10 μ g/ml)でそれぞれのタンパクの活性化の程度を比較する。また、このうち有意に活性化がみられたタンパクのシグナル伝達経路を明らかにする。具体的には各タンパクの阻害剤を用いて、下流のタンパクを同定し、そのタンパクの活性化をウエスタンブロッティング法で解析する。

糖尿病モデルマウスの皮膚潰瘍におけるbFGF/ヘパリン併用の有効性について、11週齢の糖尿病モデルマウス(BKS.Cg-Dock7m+/+Leprdb)を用いて、両側背

部に1個ずつ直径1cm大の皮膚欠損を作成する。これに対して左を bFGF 単独群 (bFGF10 μ g/ml) として、右を bFGF/ヘパリン併用群 (bFGF10 μ g/ml・ヘパリン 10mg/ml) として、0.5ml 皮膚欠損部に添加する。さらには、H.E. 染色、免疫組織染色法を用いて、bFGF/ヘパリン併用群が糖尿病モデルマウスの線維芽細胞に与えている影響を明らかにする。つまり、先に行った *in vitro* の結果 (線維芽細胞の増殖・遊走の促進) が *in vivo* でも同様なことがいえるかの証明を行う。具体的には、bFGF/ヘパリン併用後、5日目、10日目、15日目の背部皮膚をサンプルとして採取する。H.E. 染色および、線維芽細胞のマーカーである抗 vimentin 抗体を用いて免疫組織染色を行う。これを、bFGF 単独投与群と比較することで、線維芽細胞の増殖や遊走の程度を明らかにできると考えられる。以上から、糖尿病モデルマウスの創傷治癒において bFGF/ヘパリン併用の有効性 (bFGF 単独群よりも有意に治癒が促進されること) を明らかにする。

4. 研究成果

bFGF/ヘパリン併用による皮膚線維芽細胞の増殖能力の変化を明らかにした。bFGF 単独投与群と bFGF/ヘパリン併用群に分けて48時間後の細胞数を比較した。皮膚線維芽細胞を用いて、96 ウェルプレートに培養し、その後、bFGF 単独群は bFGF10ng/ml、bFGF/ヘパリン併用群は bFGF10ng/ml・ヘパリン 10 μ g/ml を添加し、48 時間後の細胞数を、吸光度 490nm として表されるホルマザン産物の量を測定することで比較した。結果であるが、bFGF 単独群と比較して、bFGF・ヘパリン併用群は有意な細胞数の増加を認めた。

bFGF/ヘパリン併用による皮膚線維芽細胞の遊走能力の変化を明らかにした。線維芽細胞を培養し、細胞濃度を 100% に近い状態にしたところで、ピペットチップで溝 (仮想の創傷) を作成した。bFGF 単独投与群 (bFGF10ng/ml) と bFGF/ヘパリン併用群 (bFGF10ng/ml・ヘパリン 10 μ g/ml) で刺激することにより、細胞がどれだけの速度でこの溝に向かって遊走し、そして、溝を埋めるかを検討した。評価は遊走距離/時間 (μ m/h) で行った。結果であるが bFGF/ヘパリン併用群は bFGF 単独群と比較して有意に細胞遊走を促進することが確認できた。

細胞増殖や細胞遊走に関与するタンパクの活性化の変化をウエスタンブロッティング法で調べた。細胞増殖や生存に関与するタンパクである ERK や Akt の活性化の変化であるが、bFGF 投与無し群に比べて、bFGF 単独投与群 (bFGF10ng/ml) では、それぞれのタンパクでリン酸化 (活性化) が確認できた。さらに、bFGF/ヘパリン併用群 (bFGF10ng/ml・ヘパリン 10 μ g/ml) ではそのリン酸化までの時間の短縮を認めた。さら

に、ERK、Akt それぞれの阻害剤を用いて、これらのタンパクをブロックしてやると、bFGF 刺激による細胞増殖が部分的に阻害された。したがって、bFGF 刺激による線維芽細胞増殖におけるシグナルに ERK、Akt の関与が示唆される結果であった。

次に細胞遊走に関与するタンパクである JNK の活性化の変化を調べた。bFGF 投与無し群に比べて、bFGF 単独投与群 (bFGF10ng/ml) では、それぞれのタンパクでリン酸化 (活性化) が確認できた。さらに、bFGF/ヘパリン併用群 (bFGF10ng/ml・ヘパリン 10 μ g/ml) ではそのリン酸化までの時間の短縮を認めた。さらに、JNK の阻害剤を用いて、これらのタンパクをブロックしてやると、bFGF 刺激による細胞遊走が部分的に阻害された。したがって、bFGF 刺激による線維芽細胞遊走におけるシグナルに JNK の関与が示唆される結果であった。

11 週齢の糖尿病モデルマウスを用いて、両側背部に1個ずつ直径1cm大の皮膚欠損を作成した。これに対して bFGF 投与無し群、bFGF 単独群 (bFGF10 μ g/ml)、bFGF/ヘパリン併用群 (bFGF10 μ g/ml・ヘパリン 10mg/ml) の3群に分けて、0.5ml 皮膚欠損部に添加した。結果であるが、bFGF/ヘパリン併用群 (bFGF10 μ g/ml・ヘパリン 10mg/ml)、bFGF 単独群 (bFGF10 μ g/ml)、bFGF 投与無し群の順に創傷治癒面積の縮小を認めた。

これらの組織を回収し、H.E. 染色および、線維芽細胞のマーカーである抗 vimentin 抗体を用いて免疫組織染色を行った。bFGF 単独投与群と比較すると、ヘパリン併用群では線維芽細胞の増殖や遊走の促進が認められた。また、H.E. 染色では上皮細胞の遊走が促進していることがわかった。

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 0件)

[学会発表](計 0件)

[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〕 なし
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金澤 成行 (SHIGEYUKI KANAZAWA)
大阪大学医学系研究科・形成外科・招聘教員
研究者番号：50506243

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：

(4) 研究協力者 なし
()