

平成 22 年 05 月 31 日現在

研究種目：	基盤研究 (C)
研究期間：	2007~2009
課題番号：	19590072
研究課題名 (和文)	オータコイドによる血管新生の制御を介した 線維症治療の基礎研究
研究課題名 (英文)	Primary approach for therapy of fibrosis by manipulating angiogenesis induced by biologically active autocooids
研究代表者	林 泉 (HAYASHI IZUMI) 日本薬科大学・医療薬学科・教授
研究者番号：	90172999

研究成果の概要 (和文) : 線維化は創傷治癒において損傷を受けた組織の修復にとって、必須な過程である。しかしながらこの線維化の調節が不十分な場合には、治癒の遅延、あるいは過度の線維化による臓器機能障害を引き起こし、病態に予後を悪化させる。本研究ではカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) が、一次求心性神経終末から神経性に放出され、血管新生を介して損傷された組織の修復、すなわち肉芽の形成や線維化に深く関わることを示した。

研究成果の概要 (英文) : Fibrosis is an essential event for repair of damaged tissue in wound healing. However, delay of wound healing or dysfunction of organ by excessive fibrosis resulting deterioration of prognosis in the disease. In the present study, calcitonin gene-related peptide (CGRP) neurogenically released from primary afferent sensory neurons, could repair the impaired tissue via angiogenesis, suggesting a significant involvement of the autocoid in formation of granuloma and fibrogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	900,000	270,000	1,170,000
2008 年度	800,000	240,000	1,140,000
2009 年度	800,000	240,000	1,140,000
年度			
年度			
総計	2,400,000	750,000	3,150,000

研究分野：病態生理学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：オータコイド・線維化・血管新生・生理活性・  
カルシトニン遺伝子関連ペプチド・創傷治癒

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者はこれまでに心筋梗塞・血管新生・腫瘍増殖・肺高血圧症・肺線維症などの他の疾患でプロスタグランジンやブラジキニンを始めとした幾つかのオータコイドが共役していることを報告してきている。(2)

一方組織の線維化は、外傷・火傷における創傷治癒のみならず、癒痕の形成、ひいては組織の線維化に続く線維症を引き起こす。また細胞レベルにおけるミクロな線維化現象は、さらに組織の再生結節や血管構築の歪みを引き起こし、臓器の内部構造にマクロな変化

を生じさせる。線維芽細胞の増殖には、必然的に増殖因子が必須であるが、その供給元の一つとして臓器局所における新生脈管、特に微小血管とリンパ管が推定される。(3) このような研究過程から血管作動と細胞増殖は新生血管の形成ならびに組織修復と線維化と密接に連動することが予想される。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、オータコイドとして血管作動物質、細胞増殖因子誘導物質、そして血管新生調節物質である脂質メディエーターやペプチド性メディエーターの血管新生や、肉芽増殖、線維化における関与を調べる。すなわち、これらオータコイドによる血管新生の調節を介して、血管構築の破綻と細胞の異常増殖を伴う線維症を制御できるか否かについて追及することが最終的な目的となる。

## 3. 研究の方法

(1) オータコイドとして、神経性ペプチドであるカルシトニン関連遺伝子 (calcitonin gene-related peptide; CGRP) の役割に焦点を当てた。

(2) CGRP の血管新生、線維化、創傷治癒における生体内の役割を調べるために、胃粘膜障害モデル、担癌モデル、後根神経節除神経モデルといった *in vivo* モデルを作成した。

(3) 内因性 CGRP の関与を証明するために、上記の病態モデルにおける生体内反応について、CGRP ノックアウトマウスを用いて検討した。

## 4. 研究成果

(1) 神経性ペプチド CGRP による血管新生と創傷治癒：カルシトニン関連遺伝子関連ペプチドは、前駆体の遺伝子産物から切り出される神経性ペプチドである。中枢や末梢組織に広く分布し、求心性ニューロンにおいて侵襲に対して防御的な役割を演じる。そこで内因性の CGRP が、エタノールや酢酸で誘発した胃粘膜の損傷や潰瘍に対してどのような作用を及ぼしているのかを検討した。*in vivo* 麻酔下マウスの胃を 50%エタノールで灌流すると胃粘膜障害を生じる。この障害は、内因性 CGRP を遊離させるカプサイシンや 1M NaCl の同時灌流処置により用量依存的に軽減された。この時胃内の CGRP 量は増加していた。また CGRP ノックアウトマウスでは野生型に比して、酢酸誘発胃潰瘍における障害の治癒が顕著に遅延していた。一方で 1M NaCl の同時灌流による 50%エタノール胃粘膜損傷は、CGRP ノックアウトマウスで消失した。野生型マウスでは胃粘膜障害に続いて、創傷治癒の過程として潰瘍基部に肉芽や新生血管の形成を認めしたが、CGRP ノックアウトマウスではこれらの

修復現象は乏しかった (図 1・2)。これらの結果から組織侵襲から組織修復における生体防御に、CGRP といった神経性ペプチドが関与することが判明した。すなわち、過酸やエタノールによる胃粘膜刺激に対して、感覚神経の軸索反射により内因性の CGRP が遊離され、この神経性ペプチドが微小循環の損傷を防御、すなわち微小血管に拡張による血流を維持すること、ならびに軸索反射で遊離された CGRP が血管新生を介して組織の修復に働くことが推定される。

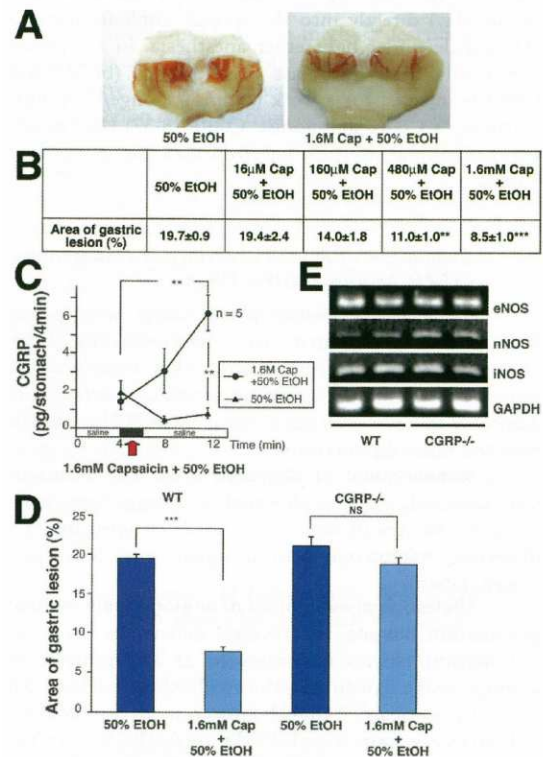


Figure 1. Lack of capsaicin-induced gastric mucosal protections against ethanol in  $CGRP^{-/-}$ . (A) Typical appearance of gastric mucosa in WT after ethanol for 2 minutes. Left Panel; 50% ethanol alone. Right panel: 50% ethanol containing capsaicin (1.6 mmol/L). (B) Dose-dependent prevention by capsaicin in WT. Ethanol solution was applied to gastric lumen for 2 minutes. Mean  $\pm$  SEM (n=5), \*\* $P < .01$ ; \* $P < .001$  (ANOVA). (C) CGRP levels in intragastric perfusates. Stomachs of the anesthetized WT were perfused as described in Materials and Methods. The perfusate of one group was replaced with 50% ethanol (open triangles), and that of the other was replaced with 50% ethanol containing 1.6 mmol/L capsaicin (closed circles) for 2 minutes. CGRP released every 4 minutes was determined. Means  $\pm$  SEM (n=5), \*\* $P < .01$  (ANOVA). (D) Gastric mucosal lesions in WT and  $CGRP^{-/-}$ . Stomachs of  $CGRP^{-/-}$  and WT were perfused with 50% ethanol (dark blue columns) or 50% ethanol containing capsaicin (light blue

After perfusion, stomachs were excised and injured area was determined as a percentage of the injured area in glandular stomach. Means  $\pm$  SEM from CGRP<sup>-/-</sup> (n=5) and WT (n=6). \*\*\*P<.001; NS, not significant (ANOVA). (E) Results from RT-PCR on NOS expression in stomachs from WT and CGRP<sup>-/-</sup>. Constitutive NOS and inducible NOS were detected after perfusion with 50% ethanol and 1.6 mmol/L capsaicin. Two representative results were shown.

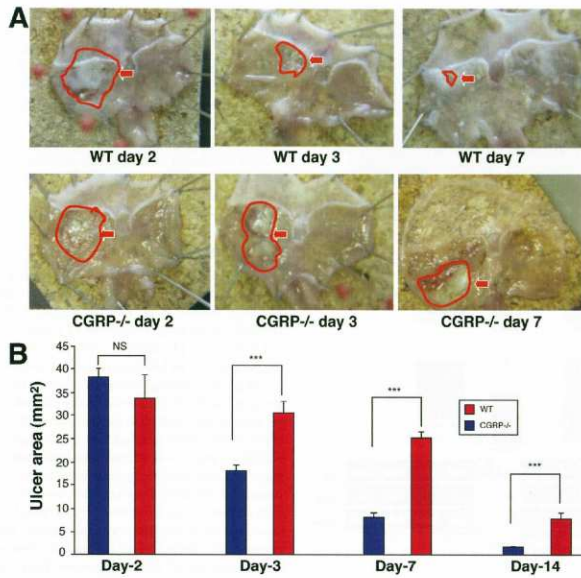


Figure 2. Delay in acetic acid-induced ulcer healing in CGRP<sup>-/-</sup>. (A) Typical appearance of ulcers generated on gastric mucosa in WT (upper panels) and CGRP<sup>-/-</sup> (lower panels). (B) Summarized results on changes of the ulcer area in CGRP<sup>-/-</sup> and WT. Means  $\pm$  SEM from CGRP<sup>-/-</sup> (n=5-6) and WT (n=8). \*\*\*P<.001 (ANOVA).

(2) 神経ペプチド依存的に新たな経路で誘導される血管新生：(1)の実験結果から、プロスタグランジンやキニンなど血漿や細胞から産生され、autocrine、paracrine的に標的の細胞・組織に作用を及ぼす従来のオータコイドの作用様式とは異なり、CGRPは、外部からの生理学的なシグナルにより、神経を介した軸作反射により放出のスイッチが入り、神経から遊離後に生理作用を發揮する。すなわち、放出の機序は神経伝達物質に類似し、作用の機序はオータコイドの様式に属する点で、神経性メディエーターとして特徴的である。そこでCGRPの役割をさらに掘り下げ、組織の線維化に深く関わる血管新生の観点から、この神経性メディエーターの作用を解析した。まず血管新生の *in vivo* 評価系としてスポンジ皮下移植モデルを用いて検討した。CGRP ノックアウト

トマウスではその野生型に比べ、新生血管の増殖が有意に低下していることが判明した (図3)。更に Lewis lung carcinoma 腫瘍細胞を担癌した際に、やはり CGRP ノックアウトマウスにおける腫瘍増殖と腫瘍組織における血管新生は有意に低下した。一方野生型マウスに CGRP 拮抗ペプチドである CGRP8-37 を持続投与すると、Lewis lung carcinoma 腫瘍細胞の増殖および血管新生は減少した。加えて野生型マウスの坐骨神経を除神経することにより、除神経部位における Lewis lung carcinoma 細胞の増殖は抑制された。また腫瘍細胞を移植した部位における後根神経節での CGRP 前駆体 mRNA の発現は上昇し、その発現増加は除神経処置により抑制を示した (図4)。これらの結果から、知覚神経一次線維を含む神経系から産生される内因性 CGRP は、腫瘍増殖とそれに伴う血管新生を増強すること、さらに CGRP がそれらの増殖を抑制する治療標的分子となることが示唆された。

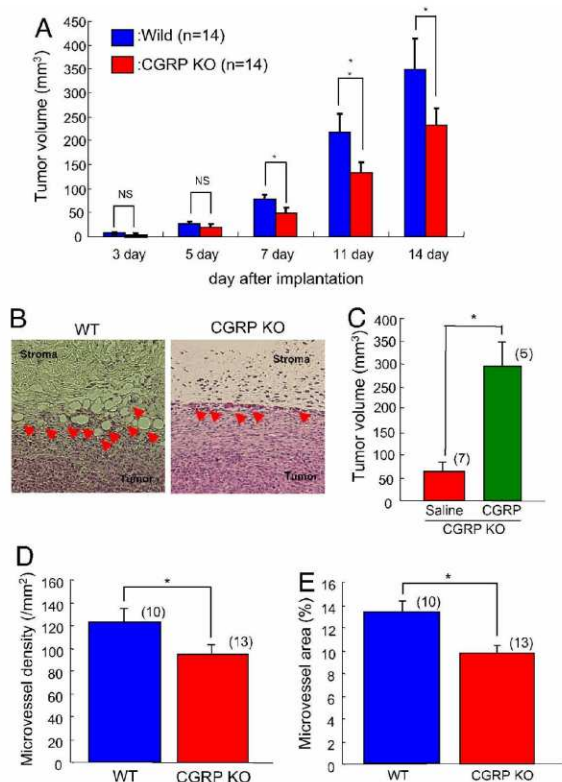


Figure 3. Reduced tumor-associated angiogenesis and tumor growth in CGRP<sup>-/-</sup> knockout (KO) mice. (A) Tumor growth after implantation in CGRP-knockout mice and their WT counterparts. LLC cells were implanted s.c. Results compared with growth in WT counterparts on the

same day and are mean  $\pm$  SEM from 14 animals. ANOVA was used. \*,  $P < 0.05$ . NS, not significant. (B) Typical H&E staining of tumors (day 14) in CGRP-KO mice (Left) and their WT counterparts (Right). Arrowheads indicate newly formed blood vessels. (C) Tumor growth in CGRP<sup>-/-</sup> infused with CGRP continuously (0.1 nmol/h) by using miniosmotic pumps. LLC cells were implanted s.c. to the site of CGRP infusion. Results were compared with growth in vehicle-infused CGRP<sup>-/-</sup> on day 7 and are mean  $\pm$  SEM from 5~7 animals. Student's t test was used. \*,  $P < 0.05$ . (D) In the histologic tumor samples isolated from the mice 14 days after implantation, microvessel density was determined. Results from the sham operation group (blue column) were compared with those of denervation (red column) and are mean  $\pm$  SEM from 10~13 animals. Student's t test was used. \*,  $P < 0.05$ . (E) Microvessel area was determined in the same specimen as in C. Results from the CGRP-KO mice (red column) were compared with those of WT (blue column) and are mean  $\pm$  SEM from 10~13 animals. Student's t test was used. \*,  $P < 0.05$ .

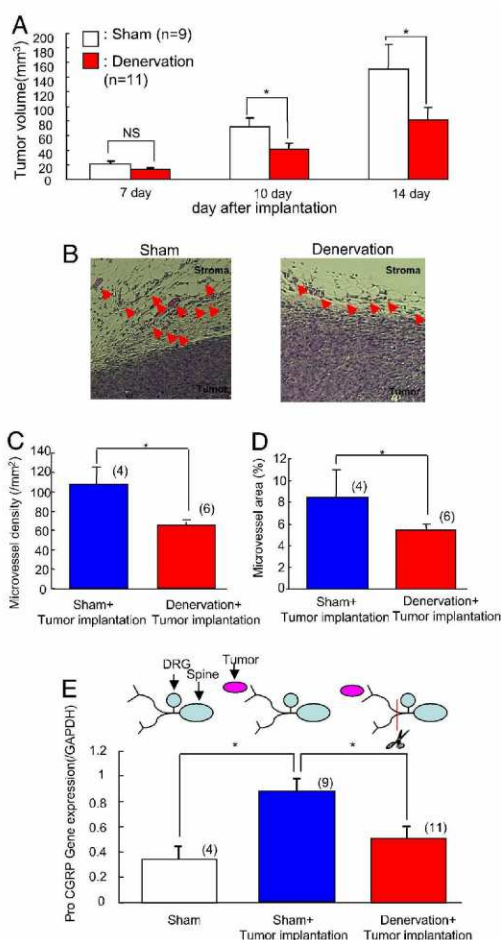
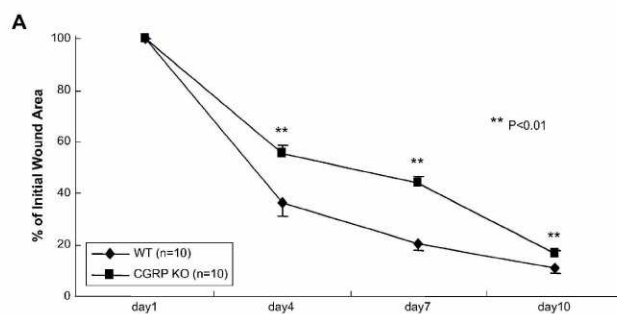
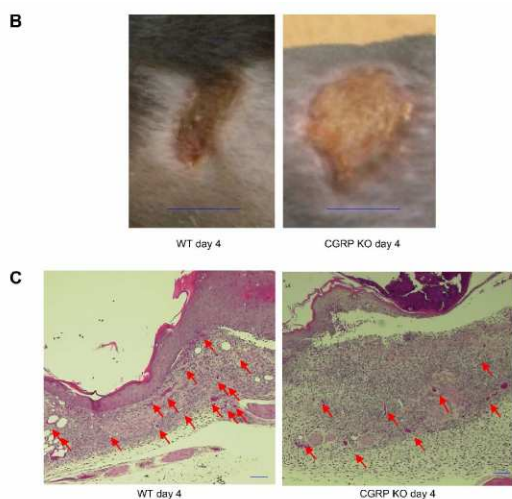


Figure 4. Effect of sciatic nerve denervation on tumor growth and tumor-associated angiogenesis in an LLC implantation model. (A) Tumor growth

after implantation. LLC cells were implanted s.c. into WT. Sciatic nerve denervation was performed as described in Materials and Methods. Results were compared with those from sham-operated mice and are mean  $\pm$  SEM from 9~11 animals. ANOVA was used. \*,  $P < 0.05$ . NS, not significant. (B) Typical H&E staining of a tumor (day 14) after sham operation (Left) or denervation (Right). Arrowheads indicate newly formed blood vessels. (C) In the histologic tumor samples isolated from the mice 14 days after implantation, microvessel density was determined. Results from the sham-operation group (blue column) were compared with those after denervation (red column) and are mean  $\pm$  SEM from 4~6 animals. Student's t test was used. \*,  $P < 0.05$ . (D) Microvessel area was determined in the same specimen as in C. Results from the sham operation group (blue column) were compared with those after denervation (red column) and are mean  $\pm$  SEM from 4~6 animals. Student's t test was used. \*,  $P < 0.05$ . (E) Effects of sciatic nerve denervation on pro-CGRP mRNA levels in DRG in tumor-bearing mice. Tumor implantation to the area innervated by L<sub>1-5</sub> resulted in increased expression of pro-CGRP in sham-operated WT (blue column). Sciatic nerve denervation reduced expression of pro-CGRP (red column). Mean  $\pm$  SEM from 4~11 animals is shown. ANOVA was used. \*,  $P < 0.05$ .

(3) 創傷治癒における神経性ペプチドの関与：求心性ニューロンから遊離される内因性の神経性ペプチド CGRP が、血管新生を促進することを介して組織の修復に関与することを示した。そこでこのペプチドが実際に創傷治癒の *in vivo* の内因性の因子であるかことの証明を試みた。マウスの背部皮下の中心部に外科的に創傷を作成し、その後の創傷部位の面積を定量化した。その結果、CGRP ノックアウトマウスの創傷治癒に要する時間は、そのワイルドタイプのマウスに比較して有意に延長していた。さらに CGRP ノックアウトマウスにおける肉芽の形成量もまた、ワイルドタイプと比べて有意な低下を示した (図 5)。

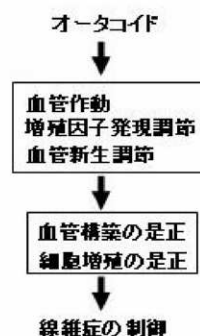




**Figure 5.** Delayed wound healing in CGRP knockout mice. Surgical wounds were made on the backs of CGRP knockout mice (CGRP<sup>-/-</sup>) and of their wild-type counterparts (WT), and wound closure was determined as described in the Materials and Methods. (A) Time course of wound closure in CGRP<sup>-/-</sup> and WT. Data are means  $\pm$  SEM for the indicated number of mice. \*\* $p < 0.01$  versus WT mice (ANOVA). (B) Typical appearance of wounds in CGRP<sup>-/-</sup> and WT on day-4. The original diameter of the wounds was 8 mm. Scale bar in the panel indicates 5mm. (C) Helllatoxylin-eosin staining was performed for wound tissues including granulation tissues in CGRP<sup>-/-</sup> and WT. Tissues were fixed on day-4. Arrowheads indicate micmessel-like constructions. Scale bar in the panel indicates 100 mm.

(4) 以上の検討から創傷部位の局所では、その修復のために、創傷という物理化学的損傷が直接的刺激となり、一次知覚神経求心性ニューロンの興奮伝導を導き、神経性メディエーターの一つである CGRP が放出される。内因性の CGRP は血管新生を誘導し、新生血管の周囲では、線維芽細胞の遊走や肉芽の増殖が活発となり、損傷部位の組織を修復の過程へと導き、すなわち治癒に至る可能性が推測される。このように、生体防衛反応の一つの機構として、[外界からの生体への侵襲→求心性ニューロンの興奮→CGRP の遊離→CGRP による生理活性→生体防衛]という一連の CGRP の作用形式は、プロスタグランジンやキニン、アンジオテンシンといった他のオータコイドとは異なり、神経伝達物質とオータコイドの両者の性質を持ち合わせているという点で特有であると考えられる。組織・器官の修復には、様々な再生因子の関与が推定さ

れている。創傷治癒は、損傷部位の細胞の恒常的な機能を回復させる点では必須な自律的修復機構である。組織の機能の回復を早めるためには、この機構を促進させることが考えられる。一方でこの機構が過剰に促進された場合には、組織の瘢痕化や、線維症に伴う臓器不全に陥ることが予想される。線維症の推定患者数は、数 10 万人から 100 万人と罹患率は高い。その病態は長期にわたり、患者の QOL を損なうだけでなく、末期では生命の予後にかかわる重篤な疾患である。線維症において最も重要な臨床的問題は、現在までに重篤な疾患にステロイド薬を使用する以外に、特異的な治療薬が見出されていないことである。以上の観点から CGRP などのオータコイドによる血管新生を positive あるいは negative に制御することは、その後の組織修復の調節に繋がることになると推定される。本研究の成果を、今後さらに線維症の臨床的治療の新しい機序に進展させることを望む。



## 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)

(1) Hashimoto A, Murakami Y, Kitasato H, Hayashi I, Endo H. Glucocorticoids co-interact with lipoxin A4 via lipoxin A4 receptor (ALX) up-regulation. *Biomed Pharmacother.*, 査読有, 61:81-85, 2007.

(2) Hashimoto A, Hayashi I, Murakami Y, Sato Y, Kitasato H, Matsushita R, Iizuka N, Urabe K, Itoman M, Hirohata S, Endo H. Antiinflammatory mediator lipoxin A4 and its receptor in synovitis of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.*, 査読有, 34:2144-2153, 2007.

(3) Ohno T, Hattori Y, Komine R, Ae T, Mizuguchi S, Arai K, Saeki T, Suzuki T, Hosono K, Hayashi I, Oh-Hashi Y, Kurihara Y, Kurihara H, Amagase K, Okabe S, Saigenji K, Majima M. Roles of calcitonin gene-related peptide in maintenance of gastric mucosal integrity and in enhancement of ulcer healing and angiogenesis.

Gastroenterology, 査読有, 134:215-225, 2008.

(4) Toda M, Suzuki T, Hosono K, Kurihara Y, Kurihara H, Hayashi I, Kitasato H, Hoka S, Majima M. Roles of calcitonin gene-related peptide in facilitation of wound healing and angiogenesis. Biomed Pharmacother., 査読有, 62(6):352-359, 2008.

(5) Kamijo Y, Hayashi I, Ide A, Yoshimura K, Soma K, Majima M. Effects of inhaled monoethanolamine on bronchoconstriction. J Appl Toxicol., 査読有, 29:15-19, 2009.

(6) Toda M, Suzuki T, Hosono K, Hayashi I, Hashiba S, Onuma Y, Amano H, Kurihara Y, Kurihara H, Okamoto H, Hoka S, Majima M. Neuronal system-dependent facilitation of tumor angiogenesis and tumor growth by calcitonin gene-related peptide. Proc Natl Acad Sci USA, 査読有, 105:13550-13555, 2008.

(7) Kamata Y, Fujita T, Kato T, Hayashi I, Kurosaka M, Katori M, Fujita Y, Majima M. An ATP-sensitive potassium channel blocker suppresses sodium-induced hypertension through increased secretion of urinary kallikrein. Hypertens Res., 査読有, 32:220-226, 2009.

(8) Ogawa Y, Suzuki T, Oikawa A, Hosono K, Kubo H, Amano H, Ito Y, Kitasato H, Hayashi I, Kato T, Sugimoto Y, Narumiya S, Watanabe M, Majima M. Bone marrow-derived EP3-expressing stromal cells enhance tumor-associated angiogenesis and tumor growth. Biochem Biophys Res Commun., 査読有, 15:382:720-725, 2009.

(9) Amano H, Ito Y, Suzuki T, Kato S, Matsui Y, Ogawa F, Murata T, Sugimoto Y, Senior R, Kitasato H, Hayashi I, Satoh Y, Narumiya S, Majima M. Roles of a prostaglandin E-type receptor, EP3, in upregulation of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor during enhancement of tumor metastasis. Cancer Sci., 査読有, 100:2318-2324, 2009.

(10) Hayashi I, Endo H, Katagiri M, Kitasato H. Role of prostaglandin (PG) and peroxisome proliferator-activated gamma (PPAR $\gamma$ ) in pulmonary fibrosis. Current Respiratory Med Rev, 査読有, 5:3-5, 2009.

(11) Ueno T, Suzuki T, Oikawa A, Hosono K, Kosaka Y, Amano H, Kitasato H, Toda M, Hayashi I, Kato T, Ito Y, Sugimoto Y, Narumiya S, Okamoto H, Majima M. Recruited bone marrow cells expressing the EP3 prostaglandin E receptor subtype enhance angiogenesis during chronic inflammation. Biomed Pharmacother.,

査読有, 64:93-100, 2010.

(12) Kubo H, Hosono K, Suzuki T, Ogawa Y, Kato H, Kamata H, Ito Y, Amano H, Kato T, Sakagami H, Hayashi I, Sugimoto Y, Narumiya S, Watanabe M, Majima M. Host prostaglandin EP3 receptor signaling relevant to tumor-associated lymphangiogenesis. Biomed Pharmacother., 査読有, 64:101-106, 2010.

[雑誌論文] (計 12 件)

[学会発表] (計 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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 泉 (HAYASHI IZUMI)

研究者番号 : 9 0 1 7 2 9 9 9

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :