

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07319

研究課題名(和文) 成長因子と神経栄養因子の協調作用による創傷治癒促進機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of promoting wound healing by the coordinated action of growth factors and neurotrophic factors

研究代表者

酒井 大樹 (Sakai, Hiroki)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40464367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：創傷の警告としての痛みは感覚神経によって感知されるため、感覚神経は創傷治癒の過程で重要な役割を担う可能性があるが、そのメカニズムはよくわかっていない。本研究では、成長因子のIGF-1またはそのCドメインに由来するテトラペプチド(SSSR)と、神経栄養因子のサブスタンスPまたはそのアミノ末端テトラペプチド(FGLM-NH2)の協調作用によりACEが切断・放出を介して活性化され、AngII産生量を増加させることにより表皮細胞の遊走並びに創傷治癒を促進することを明らかにした。また、SSSR標的分子を同定するツールとして、ニトロベンゾオキサジアゾール(NBD)を導入したSSSRの合成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかにした成長因子IGF-1と神経栄養因子サブスタンスPの協調作用による創傷治癒の促進メカニズムは、これまでに知られていない新たな病態生理学的機序の解明である。IGF-1がNK1受容体活性化の下でACE活性化を介して作用を発揮するというIGF受容体非依存性のメカニズムは、生物学的にも重要な意味を持つ可能性がある。また、SSSR標的分子を同定するツールとして合成に成功したNBD-SSSRは、SSSRの創傷治癒促進メカニズムの全容解明を可能にするだけでなく、そのメカニズムを基盤とした新たな創傷治癒促進薬の開発にも繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Pain as an alert of wound is sensed by sensory nerves which might in turn play a role in the process of wound healing, although the mechanisms are largely unknown. Trophic effects of sensory nerves and growth factors play important roles in epithelial wound healing. Here we show that insulin-like growth factor (IGF-1) or a tetrapeptide (SSSR) derived from its C domain promotes keratinocyte migration independently of the IGF-1 receptor. Instead, this effect is mediated by angiotensin II generated by ACE in a manner dependent on activation of the NK1 receptor by the sensory neurotransmitter substance P or by its COOH-terminal tetrapeptide FGLM-NH2. Upon activation of NK1 receptor, SSSR induced shedding of ACE from keratinocytes, enhancing the ACE activity. Our results provide new insights into the interaction of sensory nerves and growth factors in wound healing as well as a foundation for a potential new peptide-based treatment of skin wounds.

研究分野：薬理学

キーワード：創傷治癒 表皮細胞 成長因子 神経栄養因子 アンギオテンシンII アンギオテンシン変換酵素 ペプチド

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

皮膚損傷時の痛みは創傷治癒に深く関わると考えられているが、その詳細は不明である。知覚神経は、痛覚の伝達のみならず侵害刺激で末梢に神経栄養因子であるサブスタンス P を放出する。サブスタンス P の受容体であるニューロキニン 1 (NK1) 受容体は、表皮細胞をはじめ皮膚の多くの細胞に発現している。実際、知覚神経の損傷や糖尿病などによる末梢神経機能低下で創傷部の再上皮化が遅延することが知られているが、そのメカニズムは明らかでない。

一方、皮膚創傷治癒過程は、様々な液性因子や細胞が複雑に協調して調節される。その初期過程では、表皮細胞が遊走・増殖することにより創傷部の再上皮化が起こり、その効率を高めることが治癒促進に重要であることが知られている (Singer and Clark, N Engl J Med, 341, 738-746, 1999)。この過程には、インスリン様成長因子-1 (IGF-1) や塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) などの成長因子が重要な役割を果たしている。現在、bFGF 製剤は創傷治癒促進薬として使用されているが、細胞増殖作用を有するために悪性腫瘍患者には使用できない。

これまで我々は、IGF-1 とサブスタンス P が協調的に働き、表皮細胞や角膜上皮細胞の遊走を促進及び *in vivo* の創傷治癒を促進することを明らかにした (Nishida et al, Prog Retin Eye Res, 47, 38-63, 2015)。この作用は、IGF-1 の C ドメインに由来する Ser-Ser-Ser-Arg (SSSR) とサブスタンス P の C 末端の Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> (FGLM-NH<sub>2</sub>) の 2 つのペプチドで置き換えることが出来る (Yamada et al, Invest Ophthalmol Vis Sci, 47, 3286-3292, 2006, Yamada et al, Invest Ophthalmol Vis Sci, 45, 1125-1131, 2004)。この協調作用では、IGF-1 (或いは SSSR) のみでは遊走促進効果は見られず、逆にサブスタンス P (或いは FGLM-NH<sub>2</sub>) のみでも見られない。さらに、この協調作用ではサブスタンス P (或いは FGLM-NH<sub>2</sub>) は NK1 受容体を介するが、IGF-1 (或いは SSSR) は IGF 受容体を介さないことを明らかにしている (Yamada et al, Invest Ophthalmol Vis Sci, 47, 3286-3292, 2006)。実際、IGF-1 の A・B ドメインを介した IGF 受容体への結合が表皮細胞の増殖をもたらすことはよく知られているのに対し、SSSR の存在する IGF-1 の C ドメインは、IGF 受容体への結合には関与しない。

この様に、IGF-1 (或いは SSSR) による表皮細胞の遊走促進効果は、これまで知られていない新たな作用機序に基づく生理作用である。これまで、NK1 受容体の活性化状態下で、SSSR (或いは IGF-1) による表皮細胞遊走促進作用にアンジオテンシン変換酵素 (ACE) の活性化とアンジオテンシン II (AngII) が関与することを予備検討から明らかにしている。また、AngII 以下のシグナル経路については、その詳細を既に明らかにしている (Sakai et al, Mol Pharmacol, 87, 277-285, 2015)。しかしながら、FGLM-NH<sub>2</sub> (或いはサブスタンス P) 存在下での SSSR (或いは IGF-1) が、どのようなメカニズムで ACE を活性化するかは未だ不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、知覚神経がどのようなメカニズムで創傷治癒に関与しているか明らかにすることを目的とし、特に神経栄養因子サブスタンス P と成長因子 IGF-1 の協調作用を介した ACE 活性化のメカニズムを解析した。

### 3. 研究の方法

#### 1) 細胞遊走試験

本研究では、Cell Lines Service (Eppelheim, Germany) より購入したヒト表皮角化細胞 (HaCaT) を用いた。HaCaT 細胞は 10% FBS を含む高グルコース DMEM で培養した。細胞遊走の測定は、スクラッチアッセイによる集団細胞の伸展開析及びタイムラプスイメージングによる単一細胞の遊走解析により行った。

スクラッチアッセイでは、コンフルエントまで培養した細胞を、血清を含まない培地で 12 時間培養した。Cell scratcher により幅 1 mm の細胞を剥離し、洗浄後、種々の試薬を添加した培地でさらに 12 時間培養し、剥離部分に進展した細胞面積を測定した。タイムラプスイメージングでは、サブコンフルエントの細胞を、血清を含まない培地で 8 時間培養した後、トリプシン-EDTA により細胞を剥離し、3.5 cm ディッシュで  $5 \times 10^4$  個の細胞を 4 時間培養した。その後、種々の試薬を添加し、恒温 CO<sub>2</sub> チャンバー付きの顕微鏡で 2 分毎に 1 時間写真を撮影した。撮影画像より個々の細胞の遊走距離を ImageJ ソフトウェアにより測定した。

#### 2) ACE 発現量の解析

HaCaT 細胞を、血清を含まない培地で 12 時間培養した後、種々の試薬を添加した。細胞ライセートより RNA を抽出し、逆転写及び定量 PCR により ACE 遺伝子発現量を測定した。切断・放出された ACE 発現量の解析は、ACE を安定発現した HaCaT 細胞の培養上清を限外濾過膜で濃縮し、イムノプロットにより測定した。

#### 3) AngII 産生量の測定

細胞遊走試験と同条件で HaCaT 細胞を培養し、得られた培養上清を限外濾過膜で濃縮した。

AngII 量は Angiotensin II SPIE-IA kit ( Bertin Pharma, Montigny le Bretonneux, France ) を用いて測定した。

#### 4) 標識化した SSSR ペプチドの合成

IGF-1 C ドメイン ( SSSR 配列を含む ) をビオチン標識試薬 ( Biotin-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CO-NHS ) と反応後、光架橋基 ( benzophenone あるいは diazirine ) と反応させた。反応物は、HPLC により精製した。

NBD 蛍光ラベリングを導入した SSSR ペプチドの合成は、①NBD-アルキン結合、②TBAF による脱保護、③SSSR アジド化を経て、クリックケミストリーにより行った。反応物は HPLC により精製した。

### 4 . 研究成果

#### 1) SSSR と NK1 受容体による ACE 活性化メカニズムの解明

HaCaT 細胞を用いた *in vitro* 遊走試験により、SSSR ( 或いは IGF-1 ) と FGLM-NH2 ( 或いはサブスタンス P ) の共処理による遊走促進効果が、アンジオテンシン受容体 ( I 型、II 型 ) や ACE 阻害薬により抑制された。加えて、アンジオテンシン受容体や ACE 遺伝子をノックダウンした表皮細胞でも同様に、遊走が抑制された。一方で、レニンの機能的阻害 ( 阻害薬、ノックダウン ) では遊走活性が抑制されないことが明らかになった。以上の結果は、SSSR と FGLM-NH2 による細胞遊走促進に ACE が関与していることを示す。また、HaCaT 細胞において、SSSR と FGLM-NH2 の投与により AngII 産生量が増加していた。AngII は ACE により AngI から変換されるため、次に HaCaT 細胞における AngI 産生量と ACE 発現量を解析した。しかしながら、SSSR と FGLM-NH2 の投与による AngI 産生量、ACE 遺伝子及びタンパク質の発現量の変化は認められなかった。以上より、AngII 産生量の増加は、AngI 産生量や ACE 発現量の変化によるものではないことが考えられた。

ACE は翻訳後修飾として、プロテアーゼにより切断・放出 ( shedding ) されることが知られている。そのため、SSSR と FGLM-NH2 による ACE shedding が、表皮細胞の遊走促進に関与しているか検討した。ACE を安定発現した HaCaT 細胞を用いて解析したところ、SSSR と FGLM-NH2 により培養上清中での ACE レベルの増加が認められた。またこの作用は、NK1 受容体阻害薬や ACE 阻害薬により抑制された。ACE shedding は幾つかの MMP や ADAM のようなプロテアーゼにより促進されることが知られているが、これらプロテアーゼの広範な阻害薬によっても、SSSR と FGLM-NH2 による効果が抑制されることを見出した。これらの結果は、SSSR と FGLM-NH2 による表皮細胞の遊走に、ACE shedding を介した活性化が大きく関与することを示唆する。

#### 2) SSSR 標的分子の探索

IGF-1 の C ドメインに位置する SSSR は、IGF 受容体と結合しない。SSSR と FGLM-NH2 の協調作用による表皮細胞の遊走促進メカニズムを明らかにするためには SSSR の標的分子を同定する必要がある。そのため本研究では、IGF-1 の C ドメインペプチドに光架橋基 ( benzophenone あるいは diazirine ) とビオチン分子を付加したペプチドを合成し、HPLC で精製した。これを HaCaT 細胞に投与し架橋実験を行い標的分子の探索を試みたが、特異的な結合分子を見出すことはできなかった。その原因として、光架橋基と SSSR の距離の問題が考えられたため、両者をより近接させ、ビオチン分子による立体障害を抑えるためにリンカー構造を追加したペプチドを合成した。この合成ペプチドを表皮細胞に添加し架橋実験を試みたが、特異的な結合分子は見られなかった。これら合成した分子は、HaCaT 細胞の遊走活性を有しておらず、SSSR と同様のメカニズムで作用していない可能性が考えられた。また、ビオチン分子は細胞に発現する分子と非特異的に結合する可能性が指摘されている。架橋実験では、実際に多くの非特異的な結合が認められたことから、生体分子と相互作用しない標識分子を用いることが重要と考えられた。

SSSR の新たな標識方法について、NBD 蛍光ラベリングを検討した。NBD 基は標的分子のアミン成分と共有結合し標的分子に移行するため、SSSR 標的分子自体が蛍光標識される。また、NBD は抗体が市販されており、それ自体が抗体アフィニティータグとして利用できるため、タグと架橋の両方を兼ね備え、より高効率で標的分子を探索できるという利点がある。本研究では NBD 基を導入した SSSR を合成し HPLC により精製することに成功した。この NBD-SSSR は、表皮細胞で未標識の SSSR と同等の細胞遊走活性を有することが確認でき、標的分子同定のための強力なツールを得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Honda Takeshi, Nishio Yusuke, Sakai Hiroki, Asagiri Masataka, Yoshimura Kiyoshi, Inui Makoto, Kuramasu Atsuo	4. 巻 83
2. 論文標題 Calcium/calmodulin-dependent regulation of Rac GTPases and Akt in histamine-induced chemotaxis of mast cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 109973 ~ 109973
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cellsig.2021.109973	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Dau Pham Thi, Ishibashi Hiroshi, Tuyen Le Huu, Sakai Hiroki, Hirano Masashi, Kim Eun-Young, Iwata Hisato	4. 巻 806
2. 論文標題 Assessment of binding potencies of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers with Baikal seal and mouse constitutive androstane receptors: Comparisons across species and congeners	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science of The Total Environment	6. 最初と最後の頁 150631 ~ 150631
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scitotenv.2021.150631	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hiroki Sakai, Takeshi Honda, Kouetsu Ogasawara, Masataka Asagiri
2. 発表標題 Enhancement of myogenic differentiation by MMP inhibition and attenuation of the enhancement effect in senescent cells
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi Honda, Hiroki Sakai, Inui Makoto
2. 発表標題 A novel intracellular drug-delivery system specific for cardiomyocytes using RNA aptamer
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chika Ishida, Miren Suzuki, Tetsuya Seto, Marina Otsuka, Hiroki Sakai, Masatoshi Takeiri, Yukino Tsunekage, Keiko Arai, Takeshi Honda, Yoshihide Kimura, Masataka Asagiri
2. 発表標題 Suppression of M1 macrophage activation and osteoclast differentiation by Apocynaceae plant extract
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hina Takegami, Hiyori Nakamura, Ayano Takeda, Mayu Matsuo, Hiroki Sakai, Takeshi Honda, Masataka Asagiri
2. 発表標題 Synthetic retinoid bexarotene inhibits differentiation of inflammatory osteoclasts
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Seiya Tanaka, Asuka Okamoto, Honoka Tsubaki, Tetsuya Seto, Hiroki Sakai, Takeshi Honda, Masataka Asagiri
2. 発表標題 Inhibitory effect of spermidine on differentiation of inflammatory osteoclasts
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔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
研究分担者	乾 誠 (Inui Makoto) (70223237)	山口大学・その他部局等 ・名誉教授  (15501)	

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
---------	---------