

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792043

研究課題名（和文） Rho/Rho kinase の創傷治癒における役割の解明

研究課題名（英文） The role of Rho/Rho kinase in wound healing

研究代表者

金澤 成行 (SHIGEYUKI KANAZAWA)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50506243

研究成果の概要（和文）：

Rho kinase 阻害群ではコントロール群と比較し、gap size の縮小、細胞の移動速度の有意な促進を認めた。また、ウェスタンブロッティング法によるタンパクの解析において、Rho kinase 阻害によって cofilin の活性化が認められた。そして、糖尿病モデルマウスにおいて、コントロール群に比べ、Rho kinase 阻害群が有意に潰瘍面積の縮小を認め、組織検査において著明な細胞遊走が認められた。以上から、創傷治癒において Rho kinase 阻害剤の有用性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Rho kinase-inhibited cells increased the migration rate as compared to the control cells in the wound healing assay. Moreover, Rho kinase-inhibited cells showed activation of cofilin in western blotting. Inhibition of Rho kinase promoted cell migration and wound healing in DM model mouse. These data showed that inhibition of Rho kinase have positive effects in wound healing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：創傷治癒学

## 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。申請者らは、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う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、同じ低分子量 G 蛋白である Rho については創傷治癒における役割は未だ解明されていない。細胞の種類によって Rho/Rho kinase は遊走に対して促進的に働く、あるいは阻害的に働くなど、報告が様々であり、現在も一定の見解は得られていない。これに対して、申請者はすでに予備実験において、Rho の標的分子である Rho kinase の阻害剤を用いて、*in vitro* (wound healing assay 法) で皮膚線維芽細胞の遊走が促進するというデータを獲得している。さらに、9 週齢 ICR

マウスの背部皮膚潰瘍において Rho kinase 阻害剤の皮下注射による潰瘍面積の縮小も確認できた。我々はこれらの結果をさらに発展させ、Rho/Rho kinase の創傷治癒における役割を *in vitro/in vivo* 両方の側面から明らかにするために、本研究を着想するに至った。

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

本研究は細胞の接着、運動、分化、生存など様々な細胞機能の分子スイッチとして働いている低分子量 G 蛋白の一つである Rho、そしてその標的分子である Rho kinase の皮膚創傷治癒における役割を *in vitro/in vivo* 両方の側面から明らかにするものであり、以下の3つを目的とする。

(1) 皮膚線維芽細胞の遊走における Rho/Rho kinase の役割を解析する。

(2) Rho/Rho kinase の創傷治癒におけるシグナル伝達経路の解明を行う。

(3) 糖尿病モデルマウスの背部皮膚潰瘍における Rho kinase 阻害剤の有効性を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 皮膚線維芽細胞の遊走における Rho/Rho kinase の役割を解析する。

siRNA や阻害剤を用いて Rho/Rho kinase を阻害し、wound healing assay を行い、コントロール群と Rho/Rho kinase 阻害群で、創傷の size、線維芽細胞の遊走速度を比較する。

(2) Rho/Rho kinase の創傷治癒におけるシグナル伝達経路の解明を行う。

western blotting、wound healing assay を用いて Rho/Rho kinase の標的分子である cofilin の活性化と皮膚線維芽細胞の遊走との相関について明らかにする。

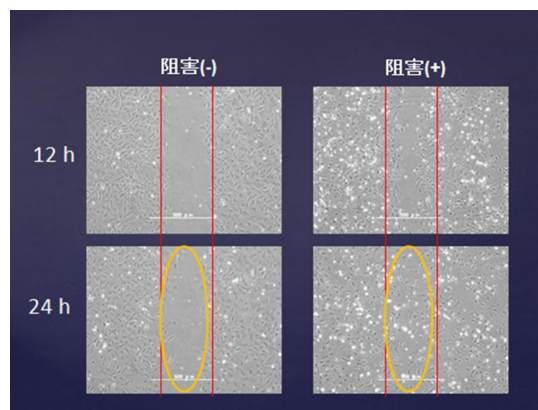
(3) 糖尿病モデルマウス皮膚潰瘍における Rho kinase 阻害剤の有効性を検討する。

糖尿病モデルマウスに皮膚欠損創を作成し、Rho kinase 阻害剤を皮下注射し、コントロール（生理食塩水）群と治癒面積を比較する。組織を回収し H. E. 染色・免疫染色を行う。

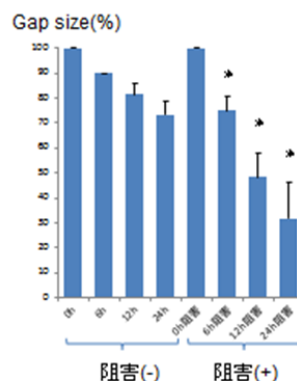
## 4. 研究成果

まず、siRNA トランスフェクション法を用いて Rho を阻害、Rho kinase 阻害剤 10  $\mu$ M を用

いて Rho kinase を阻害し、皮膚線維芽細胞の遊走能力に及ぼす効果についての解析を行った。500  $\mu$ m の溝 gap (仮定の創傷) を作成し、gap size、細胞の移動速度をコントロール群、阻害群でそれぞれ計測した (wound healing assay)。Rho 阻害では、コントロール群と比較して、6h・12h・24h で明らかな有意差は認めなかった。しかし、Rho kinase 阻害群ではコントロール群と比較し、gap size の縮小、細胞の移動速度において有意な促進を認めた。



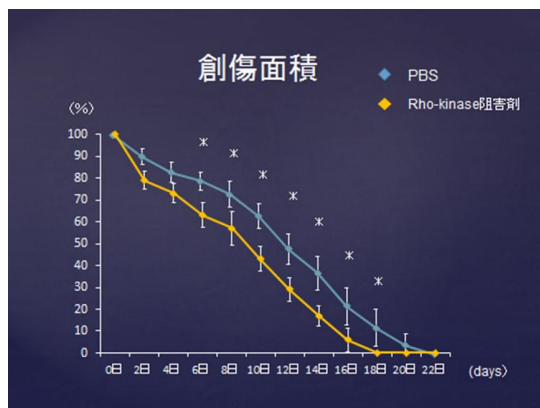
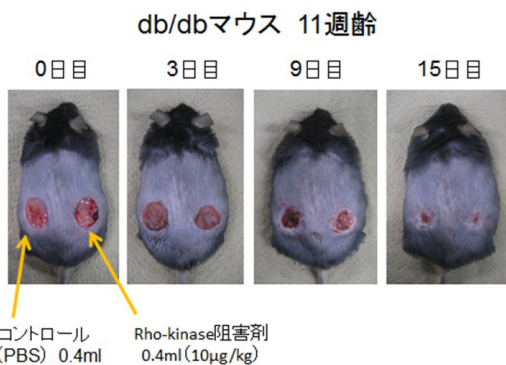
Gap size(%) mitomycin 5 $\mu$ g/ml  
Rho kinase阻害剤 10 $\mu$ M



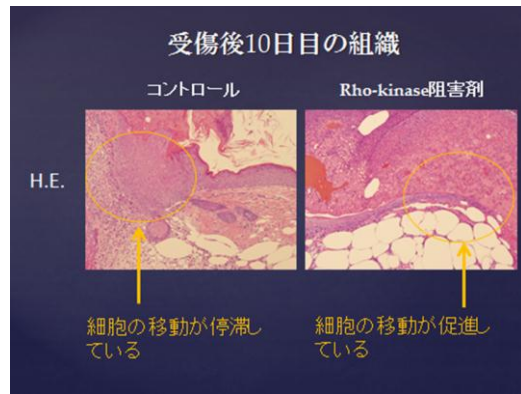
さらに、タイムラプス顕微鏡システムを用いて、リアルタイムで細胞が溝 gap に向かって遊走し、埋めていく様子を観察した。Rho kinase 阻害群では線維芽細胞の形状がダイナミックに変化することで、細胞遊走速度が上昇することがわかった。

次に、Rho/Rho kinase のシグナル伝達経路を解明するために、Rho/Rho kinase の標的分子である cofilin の活性化の状態と線維芽細胞遊走との相関について調べた。siRNA 法により、cofilin を阻害し wound healing assay を行ったところ線維芽細胞の遊走が著明に阻害された。また、Rho kinase 阻害によって cofilin の活性化 (western blotting で解析) が認められたことから、Rho kinase 阻害による線維芽細胞遊走の促進のメカニズムにおいて cofilin の関与が示唆された。

糖尿病モデルマウス皮膚潰瘍における Rho kinase 阻害剤の有効性を検討した。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 1 cm 大の皮膚欠損を作成した。これに対して左をコントロール群として生理食塩水、右には Rho kinase 阻害剤 (1mg/ml) を皮膚欠損部周囲にそれぞれ合計 0.4ml (10 mg/kg) 皮下注射を行い、潰瘍面積をそれぞれ計測した。コントロール群に比べ、Rho kinase 阻害群が有意に潰瘍面積の縮小を認めた。



また、Rho kinase 阻害剤を投与後、5 日目、10 日目、15 日目の背部皮膚をサンプルとして採取し、免疫染色、および H.E. 染色を行った。これにより、コントロール群と比較して細胞が遊走してきている程度を明らかにできた。以上から、糖尿モデルマウスの創傷治癒において Rho kinase 阻害剤の有効性を明らかにすることができた。



## 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)

[学会発表] (計 1 件)

金澤成行

Rho/Rho kinase 阻害が創傷治癒に与える効果について

第 21 回日本形成外科学会基礎学術集会

2012 年 10 月 04 日～10 月 05 日 (福島)

[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・助教

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：