

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670128

研究課題名(和文) IGF-1のIGF受容体非依存性シグナル解析による創傷治癒薬への応用

研究課題名(英文) Analysis of IGF-1 receptor-independent signaling from IGF-1 and its application for drug development

研究代表者

乾 誠 (INUI, Makoto)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70223237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：インスリン様成長因子(IGF-1)等の成長因子は、皮膚の創傷治癒の過程で重要な役割を果たしている。IGF-1による表皮細胞遊走促進作用や創傷治癒促進作用は、これまでその機能が知られていないCドメイン、更にはその中の4つアミノ酸からなるSSSRペプチドによってもたらされることを明らかにしてきた。本研究ではそのメカニズムを解析し、SSSRペプチドがIGF-1受容体を活性化するのではなく、アンジオテンシン系のシグナル伝達系を活性化することを明らかにした。これらの結果は、IGF-1の機能の新たな作用メカニズムを明らかにすると共に、新たな皮膚創傷促進薬の開発に繋がるものである。

研究成果の概要(英文)：Growth factors including insulin-like growth factor (IGF-1) play important roles in epithelial wound healing. We previously demonstrated that the C domain of IGF-1 as well as a tetrapeptides derived from the C domain, SSSR is responsible for the promotion of keratinocyte migration and cutaneous wound healing by IGF-1. Here we studied the molecular mechanisms of the action of SSSR in keratinocytes. We demonstrated that the promotion of keratinocyte migration by SSSR or IGF-1 did not require the IGF-1 receptor but rather was mediated by signaling from angiotensin II generated by angiotensin I-converting enzyme. Our results provide new insight into the action of IGF-1 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 細胞遊走 インスリン様成長因子 ペプチド アンジオテンシン

1. 研究開始当初の背景

IGF-1 は、その分子内の A 及び B ドメインを介して IGF 受容体に結合し、多様な生理作用を示すことが知られている。本研究者は、IGF-1 の C ドメイン及びその中の 4 個アミノ酸のペプチド SSSR が、角膜、皮膚の上皮細胞の遊走を促進し、創傷治癒を促進することを見出してきた。しかしながら、IGF-1 の C ドメイン及び SSSR ペプチドは、上皮細胞の遊走を促進するが、タイプ 1 及び 2 の IGF 受容体には全く結合しない。また、IGF-1 中の SSSR 配列を SASR に換えた変異 IGF-1 (IGF-1M) は、野生型 IGF-1 と同様に IGF 受容体を活性化するが、上皮細胞遊走促進作用は全くない。これらの予備実験の結果は、IGF-1 の C ドメイン或いは SSSR ペプチドの作用は IGF 受容体を介していないことを示していた。即ち、IGF-1 の C ドメイン或いは SSSR ペプチドは、IGF-1 受容体を介さない新たな作用機序で上皮細胞遊走及び創傷治癒を促進すると考えられた。この SSSR ペプチドの創傷治癒作用は、皮膚で既に治療薬として使われている bFGF と同等以上に強力である。従って、その作用機序の解明は、角膜、皮膚の新たな創傷治癒治療法につながるが予想される。

2. 研究の目的

本研究では、IGF-1 の C ドメイン由来の SSSR ペプチドを利用し IGF-1 による皮膚、角膜の創傷治癒促進作用の新たな作用機序を解明し、創傷治癒促進薬の開発に応用するため、以下のことを明らかにすることを目的とした。

- (1) SSSR ペプチドが標的とする分子を同定する。
- (2) SSSR ペプチドによる上皮細胞遊走促進作用の細胞内シグナル伝達系を解明する。

3. 研究の方法

(1) 皮膚表皮細胞遊走能の測定実験

ヒト表皮細胞の不死化株である HaCat 細胞は、Cell Lines Service (Eppelheim 社) から入手し 10% FBS を含有する DMEM 培地で維持した。新生児皮膚由来の初代表皮細胞 (NHEK) は、クラボウ社から入手し HuMedia-KG2 培地で維持した。

インビトロ創傷治癒実験 (スクラッチ・アッセイ)

コンフルエントになった HaCat 細胞或いは NHEK 細胞を DMEM 培地或いは HuMedia-KB2 培地で 12 時間培養した後、幅 1 mm の傷を付け洗浄した後、種々の試薬を含んだ DMEM 培地或いは HuMedia-KB2 培地でさらに 12 時間培養し、傷部分へ入り込んだ細胞の面積を測定した。

単一細胞の遊走実験

HaCat 細胞或いは NHEK 細胞を DMEM 培地或いは HuMedia-KB2 培地で 8 時間培養した後、トリプシン-EDTA で細胞を剥がし、3.5-cm デ

イシユに 5×10^4 個の細胞を播種、DMEM 培地或いは HuMedia-KB2 培地で 4 時間培養した。その後、必要に応じて試薬を添加し、2 分毎に 1 時間顕微鏡で写真を撮った。この写真から個々の細胞の動いた距離を NIH ImageJ ソフトウェア (<http://imagej.nih.gov/ij>) を用いて測定した。

(2) アンジオテンシン I 及び II の測定

HaCat 細胞を DMEM 培地で 8 時間培養した後、トリプシン-EDTA で細胞を剥がし、3.5-cm デイシユに播種、DMEM 培地で 4 時間培養した。種々の試薬を含んだ DMEM 培地に交換し、1 時間後に培養上清を得た。アンジオテンシン I の測定では、C18 カラムで抽出、凍結乾燥で濃縮後、Angiotensin I ELISA キット (Enzo Life Science 社) を用いて定量した。アンジオテンシン II の測定では、培養上清を凍結乾燥で濃縮後、Angiotensin II SPIE-IA キット (Bertin Pharma 社) を用いて定量した。

(3) マウスの皮膚創傷治癒実験

8 週齢の C57BL/6J マウス及びアンジオテンシンのタイプ 1 受容体ノックアウトマウスの背中に直径 5 mm の皮膚全層の傷を作成した。1 日 2 回 $10 \mu\text{l}$ の生理食塩水、0.0003% SSSR、0.005% FGLM ペプチド (後述) 両ペプチドの混合物を塗布し、傷の大きさを測定した。アンジオテンシン II のタイプ 1 受容体ノックアウトマウスは、愛媛大学医学部の岩井将先生より供給を受けた。

4. 研究成果

(1) SSSR ペプチドの表皮細胞遊走促進作用における細胞内シグナル伝達系の解明

SSSR ペプチドの表皮細胞遊走促進作用におけるアンジオテンシン II 受容体の活性化

SSSR ペプチドによる表皮細胞遊走促進作用において、SSSR ペプチド単独では μM レベルのペプチドを要するが、サブスタンス P 或いはその C 末端の 4 アミノ酸である FGLM ペプチド存在下では nM レベルの極めて低い濃度の SSSR ペプチドでその作用を発揮する。FGLM ペプチド存在下、非存在下のいずれの場合でも、SSSR ペプチドによる表皮細胞遊走促進作用は、アンジオテンシン II のタイプ 1 受容体の阻害薬であるカンデサルタンで完全に阻害された。驚いたことに、アンジオテンシン II のタイプ 2 受容体の阻害薬である PD123319 でも同様に阻害された。即ち、SSSR ペプチドの表皮細胞遊走促進作用には、アンジオテンシン II のタイプ 1 及びタイプ 2 の両受容体の活性化が必須であることが明らかとなった。さらに、アレスチンを活性化するリガンドを用いた実験並びにアレスチンの発現抑制実験から、SSSR ペプチドの表皮細胞遊走促進作用には、アンジオテンシン II のタイプ 1 受容体の下流でアレスチン経路の活性化が必須であることが明らかとなった。

SSSR ペプチドによる皮膚創傷治癒促進作用におけるアンジオテンシン II 受容体の関与

SSSR ペプチドによる表皮細胞遊走促進作用にアンジオテンシン II 受容体が関与することが明らかとなったので、マウスの皮膚創傷治癒モデルを用いて SSSR による皮膚創傷治癒促進作用にもアンジオテンシン II 受容体が関与しているか否かをアンジオテンシン II タイプ1受容体のノックアウトマウスを用いて解析した。ノックアウトマウスでは、SSSR ペプチドによる皮膚創傷治癒促進作用が全く認められないことから、in vivo での SSSR ペプチドの作用にもアンジオテンシン II 受容体活性化が必須であることが明らかとなった。

アンジオテンシン II 受容体以下の下流シグナル

SSSR ペプチドによる表皮細胞遊走促進作用におけるアンジオテンシン II 受容体以下のシグナル伝達系を種々の阻害薬と中和抗体を用いて解析した。その結果、SSSR ペプチド及びアンジオテンシン II による表皮細胞遊走促進作用が、TGF- β の阻害薬である SB431542 および TGF- β の中和抗体で阻害されることが明らかとなった。即ち、SSSR ペプチドによるアンジオテンシン II 受容体活性化が、TGF- β 分泌を促進し TGF- β 受容体の活性化することが明らかとなった。TGF- β 受容体の活性化は、EGF 受容体の活性化を介して細胞遊走を促進することが知られている。実際、SSSR ペプチドによる表皮細胞遊走促進作用は、EGF 受容体の阻害抗体により阻害された。しかしながら、アンフィレグリン、HB-EGF、TGF- β など EGF 受容体リガンドの中和抗体では SSSR ペプチドによる表皮細胞遊走促進作用が阻害されないことから、これらのリガンドを介さずに TGF- β 受容体と EGF 受容体との直接相互作用により EGF 受容体を活性化する考えられる。

(2) SSSR ペプチドが標的とする分子の同定

SSSR ペプチドがアンジオテンシン II 受容体を活性化することから、SSSR ペプチドが表皮細胞からのアンジオテンシン II 産生を増加させているかを調べた。その結果、SSSR ペプチドで処理した表皮細胞の培養上清ではアンジオテンシン II 量が有意に増加していた。この結果は、SSSR ペプチドがアンジオテンシン I からアンジオテンシン II へ変換する酵素 ACE を活性化している可能性を示唆する。SSSR ペプチドによる表皮細胞遊走促進作用への ACE 阻害薬であるエナラプリラートの効果を調べた結果、エナラプリラートは SSSR ペプチドによる表皮細胞遊走促進作用を完全に阻害した。これに対し、アンジオテンシン I の上流でアンジオテンシノーゲンからアンジオテンシン I に変換するレニンの阻害薬であるアリスキレンでは、SSSR ペプチドによる表皮細胞遊走促進作用は阻害されなかった。さらに、SSSR ペプチドで処理した表皮細胞で培養上清のアンジオテンシン I 量の増加は認められなかった。以上の結果は、SSSR ペプチドが ACE を活性化することを示している。

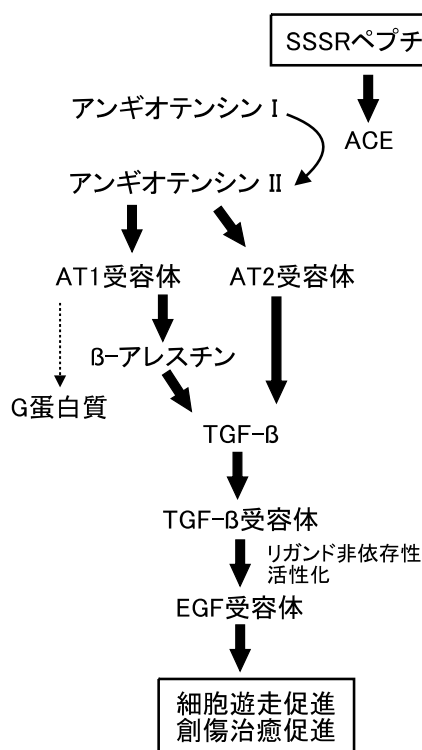


図1 SSSRペプチドによる表皮細胞遊走促進のメカニズム

今回明らかになった SSSR ペプチドの標的とそれ以下のシグナル伝達系を図1に示す。これらの結果から、SSSR ペプチドによる創傷治癒作用がこれまでに知られていない新たなメカニズムでもたらされていることが明らかになった。

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6件)

Sakai, H., Matsuura, K., Tanaka, Y., Honda, T., Nshida, T., and Inui, M. Signaling mechanism underlying the promotion of keratinocyte migration by angiotensin II. **Mol. Pharmacol.** 査読有、Vol. 87. 2015. pp. 277-285. DOI: 10.1124/mol.114.096461

Ishiguro, S., Yoshimura, K., Tsunedomi, R., Oka, M., Takao, S., Inui, M., Kawabata, A., Wall, T., Magafa, V., Cordopatis, P., Tzakos, A., and Tamura, T. Involvement of angiotensin II type 2 receptor (AT2R) signalling in human pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC): a novel AT2R agonist effectively attenuates growth of PDAC grafts in mice. **Cancer Biol. Ther.** 査読有、Vol. 16. 2015. pp. 307-316. DOI: 10.1080/15384047.2014.1002357

Nishida, T., Inui, M., and Nomizu, M.

Peptide therapies for ocular surface disturbances based on fibronectin-integrin interactions. **Prog. Retin. Eye Res.** 査読有、Vol. 47. 2015. pp. 38-63.
DIO: 10.1016/j.preteyeres.2015.01.004

Sakai, H., Ikeda, Y., Honda, T., Tanaka, Y., Shiraiishi, K., and Inui, M. A cell-penetrating phospholamban-specific RNA aptamer enhances Ca²⁺ transients and contractile function in cardiomyocytes. **J. Mol. Cell. Cardiol.** 査読有、Vol. 76. 2014 pp. 177-185.
DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.09.006

Maeda, N., Yoshimura, K., Yamamoto, S., Kuramasu, A., Inoue, M., Suzuki, N., Watanabe, Y., Maeda, Y., Kamei, R., Tsunedomi, R., Shindo, Y., Inui, M., Tamada, K., Yoshino, S., Hazama, S., and Oka, M. Expression of B7-H3, a potential factor of tumor immune evasion in combination with the number of regulatory T cells, affects against recurrence-free survival in breast cancer patients. **Ann. Sur. Oncol.** 査読有、Vol. Suppl 4. 2014. pp. S546-S554.
DOI: 10.1245/s10434-014-3564-2

Honda, T., Ishii, A., and Inui, M. Regulation of adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells by PDZRN3. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.** 査読有、Vol. 304. 2013. pp. C1091-C1097.
DOI:10.1152/ajpcell.00343.2012

〔学会発表〕(計5件)

酒井大樹、松浦健二、本田健、西田輝夫、乾 誠、IGF-1 promotes epithelial wound healing independently of the IGF-1 receptor via angiotensin II signaling. 第89回日本薬理学会、2016年3月11日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

酒井大樹、松浦健二、本田健、西田輝夫、乾 誠、皮膚創傷治癒過程における IGH-1 と知覚神経由来のサブスタンスPとの協調作用のメカニズム、第68回日本薬理学会西南部会、2015年11月21日、海峡メッセ下関(山口県・下関市)

酒井大樹、池田安宏、本田健、田中貴絵、白石宏造、乾 誠、Enhancement of Ca²⁺ transient and contractile function of cardiomyocytes by phospholamban specific RNA aptamer. 第88回日本薬理学会、2015年3月19日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

酒井大樹、中島京、岩田博夫、乾 誠、Promotion of vascular endothelial cell migration and tube formation by SEK-1005. 第87回日本薬理学会 2014年3月21日 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

酒井大樹、中島京、岩田博夫、乾 誠、SEK-1005による血管内皮細胞の遊走及び管腔形成促進効果、第23回日本循環薬理学、2013年12月6日 福岡大学(福岡県・福岡市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計1件)

名称：消化器疾患治療剤
発明者：西田輝夫、乾 誠、松浦健二、中村雅胤、長野敬
権利者：山口大学
種類：特許
番号：特許第5707101号
取得年月日：平成27年3月6日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

乾 誠 (INUI, Makoto)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70223237

(2) 研究分担者

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