

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：34419
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2011～2013
課題番号：23590268
研究課題名(和文)新規ペプチドによる組織修復・再生促進機能の解析とその応用

研究課題名(英文)New synthetic peptide enhances regeneration of tissues

研究代表者

岡田 清孝 (OKADA, Kiyotaka)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：20185432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：スタフィロキナーゼのアミノ酸配列中の一部の配列に相当する合成ペプチドは、プラスミノゲン (Plg) 活性化を促進させる。このペプチドは、マウス皮膚の創傷治癒モデルにおけるbFGFの治癒作用を増強させた。また、合成ペプチドは、皮膚線維芽細胞に対してbFGFとPlg存在下での細胞浸潤能を促進させた。以上の結果より、新規ペプチドは、マウスの皮膚創傷治癒をbFGF存在下で促進させた。このペプチドは、新しいメカニズムによる創傷治癒促進物質として、臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：A new synthetic nonadecapeptide corresponding to Glu22-Leu40 of staphylokinase molecule bound to plasminogen (Plg) and enhanced the activation of Plg by Plg activator (PA). When new synthetic peptide and bFGF were administrated in mouse skin wound healing model, acceleration of skin healing was observed than in mice with vehicle administration. Thus, new synthetic peptide enhanced Plg activation and induced effective tissue repair.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：ペプチド 創傷治癒 プラスミノゲン bFGF 線溶系 線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

新規ペプチドは、線溶系の酵素前駆体である plasminogen (Plg) に結合してその活性化を促進する因子として、我々が見出した物質である (Okada K et al; Thromb Haemost 2007)。線溶系は、Plg がその活性化因子である Plg activator (PA) により plasmin に変換され、この plasmin が血栓の主成分であるフィブリンを分解することで、血栓溶解を誘導する。この PA には、組織性 PA (t-PA) とウロキナーゼ型 PA (u-PA) の二種類が存在する。また、線溶系には、抑制系として PA に対し PA inhibitor (PAI) が、plasmin に対し α_2 -antiplasmin (α_2 -AP または α_2 -plasmin inhibitor; α_2 -PI) がそれぞれ存在する。

血栓症に対しては、PAs が血栓溶解薬として使用されている。これまで我々は、Pro u-PA、t-PA や staphylokinase (SAK) などの PAs の血栓溶解機序について勢力的に研究を進めてきた。この SAK の作用機序をさらに詳細に解明する目的で、そのアミノ酸配列の一部に即したペプチドを合成し、Plg との反応性を検討した。その結果、合成ペプチドの中に PA による Plg 活性化を促進する物質を見出した (Okada K et al; Thromb Haemost 2007)。このペプチドは、SAK アミノ酸配列の 22 番目から 40 番目に相当する配列で、Plg の C 末端領域側の SAK 結合部位とは異なる場所に結合し、Plg の構造変化を誘導することで活性化促進作用を発現する。さらに、マウス血栓モデルの解析では、ペプチドが血栓の自然溶解を亢進させることを明らかにした。このような点から、ペプチドは、今までに全く報告のない新たな Plg 活性化促進機序を発揮すると推測される。

一方、各組織の細胞の膜表面には、線溶系因子の受容体や結合部位が存在し、その結合により細胞周囲の蛋白分解活性や細胞内情報伝達に関与することが知られている。また、各線溶系因子の遺伝子欠損 (-/-) マウスが開発され、そのマウスを使用した各組織での生理機能や病態への関わりが検討されている。それらの研究から線溶系因子は、血栓溶解反応のみならず細胞の遊走、浸潤、転移や血管新生、さらには組織修復などに重要な役割を果たしていることが解明されつつある。

我々は、線溶系因子の遺伝子欠損マウスを用いて組織障害後の修復・再生過程における線溶系因子の役割について検討してきた。その中で、plasmin/ α_2 -AP 系は、皮膚の創傷治癒モデルや心・血管系の障害後の修復過程で vascular endothelial growth factor (VEGF)、transforming growth factor- β (TGF- β) の発現調節に関

わり、血管新生や修復に重要な役割を果たすことを解明した。また、肝臓の障害後の修復・再生過程においては、plasmin/ α_2 -AP 系による障害組織の除去や u-PA/PAI-1 系による hepatocyte growth factor (HGF) の活性化制御に関わっていることを解明した。さらに、再生肝細胞上での u-PA receptor (u-PAR) を介した Pro u-PA/Plg 活性化の増幅機構の解明や、u-PA/plasmin 系による肝障害後の炎症性細胞の誘導・活性化に対する重要性を明らかにした。これらの結果から、組織障害後の修復・再生能は、線溶系酵素の蛋白分解活性に依存して亢進し、阻害因子による酵素活性抑制により低下した。また、組織障害後の修復・再生過程には、VEGF、HGF、basic fibroblast growth factor (bFGF) などの増殖因子が関わり血管新生を誘導する。これらの増殖因子は、血管内皮細胞などに作用して u-PA や t-PA の発現を亢進させて、組織の修復・再生に関わる。このようなことから、線溶系因子による蛋白分解活性は、組織障害後の修復・再生を促進する役割を果たすことが示唆される。

そこで、組織障害後の修復・再生過程に対して Plg の活性化促進作用を持つペプチドを用いることは、蛋白分解活性の増強を引き起こし、修復・再生の促進を期待される。同時に、これらの過程に増殖因子を加えることで、組織再生過程に必要な血管新生の誘導のみならず、線溶系酵素の発現を亢進させ、ペプチドによる効率良い蛋白分解酵素活性の発現を引き起こすことが期待される。

2. 研究の目的

プラスミノゲン活性化促進作用を持つ新規ペプチドによる組織障害後の修復・再生過程での蛋白分解活性の調節機構の重要性を解明し、さらにペプチドの再生促進作用としての再生医療への応用性を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ペプチドの合成

ペプチドはスタフィロキナーゼのアミノ酸配列に対応する 19 アミノ酸残基 (Gly22-Leu40) を含有するものをペプチド合成機 (PSSM-8, Simazu) で作成した。

(2) マウス皮膚創傷治癒の解析

・マウス皮膚創傷治癒モデル

マウスの背部に 6mm の Biopsy punch (カイインダストリーズ) を用いて皮膚に損傷部位を作成した。実験動物は、Plg^{-/-}マウス、u-PA^{-/-}マウスおよび

それぞれに対する対照 (+/+) マウスを用いた。

・皮膚創傷治癒に対する bFGF とペプチドの影響

皮膚創傷 1 日後のマウスに bFGF (100 ng) またはペプチド (10 μg) を徐放投与 (MedGel P15;メドジェル) した。

・治癒過程の評価

皮膚の創傷治癒過程は、損傷部位の変化を経時的評価した。また、損傷部位の組織切片に対する HE 染色を行い、解析した。

(3) 線維芽細胞の線溶系因子発現解析

・線維芽細胞の培養

マウスの皮膚より線維芽細胞を分離し、10%FBS 含有の RPM-1640 培地で初代培養を行った。

・線維芽細胞の PA 活性

線維芽細胞を bFGF 含有・非含有の RPM-1640 培地で培養し、培養上清液および細胞抽出液中の PA 活性を fibrin zymography 法で解析した。

(4) 線維芽細胞の浸潤能の解析

線維芽細胞の浸潤能は、5 μm のポアサイズの上層チャンバー (ケモタキセル; クラボウ) を用いた二層培養法で解析した。上層チャンバーに播種した線維芽細胞の下層チャンバーのコラーゲンゲル (タイプ 1-A; 新田ゼラチン) 内への浸潤能を bFGF (100 ng/ml)、Plg (10 μg/ml) およびペプチド (0.1 ~ 10 μg/ml) の存在・非存在下で解析した。

4. 研究成果

(1) マウス皮膚創傷治癒の解析

・ペプチドの創傷治癒促進作用

マウス背部の創傷後の肉眼的観察では、約 14 日で治癒した。また、bFGF (100 ng) の徐放投与は、治癒を促進させた。さらに、bFGF (100 ng) とペプチド (10 μg) の両者の投与は、bFGF の治癒促進作用を増強させた。しかし、ペプチド (10 μg) 単独投与では、治癒促進作用を示さなかった (図 1)。

また、治癒過程の皮膚組織切片の HE 染色像の解析では、損傷 7 日後において bFGF 単独投与でコントロールに比べて有意な組織の回復が認められた。さらに、ペプチドは、bFGF の皮膚組織回復効果を有意に促進した。

・Plg^{-/-}マウスの皮膚創傷治癒

Plg^{-/-}マウスの皮膚創傷後の治癒は、Plg^{+/+}マウスに比べて遅延した (図 2)。また、治癒過程の皮膚組織切片の HE 染色像の解析では、損傷 7 日後において Plg^{-/-}マウスが Plg^{+/+}マウスに比べて有意な組織の回復遅延を認めた。

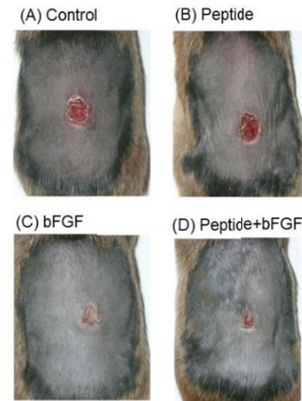


図 1. マウス皮膚創傷治癒モデルにおける bFGF とペプチドの影響

(A) マウス背部の損傷 7 日後の治癒状態、(B) ペプチド (10 μg) または (C) bFGF (100 ng)、(D) ペプチド (10 μg) と bFGF (100 ng) の投与による治癒効果。

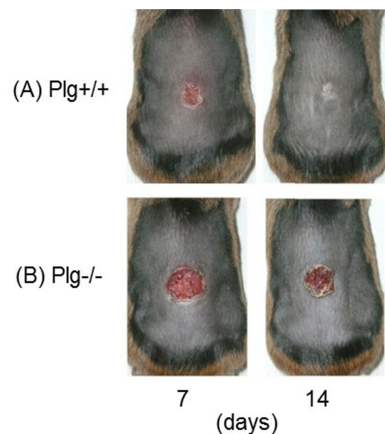


図 2. Plg^{+/+}および Plg^{-/-}マウスの皮膚創傷治癒の解析

(A) Plg^{+/+}マウスと (B) Plg^{-/-}マウスの背部損傷 7 日後と 14 日後の治癒状態。

・u-PA^{-/-}マウスの皮膚創傷治癒

u-PA^{-/-}マウスの皮膚創傷 7 日後の治癒は、u-PA^{+/+}マウスに比べて遅延した (図 3)。

また、u-PA^{-/-}マウスは、bFGF およびペプチドの治癒促進作用を示さなかった (図 3)。

また、治癒過程の皮膚組織切片の HE 染

色像の解析では、損傷 7 日後において u-PA^{-/-} マウスが u-PA^{+/+} マウスに比べて有意な組織の回復遅延を認めた。

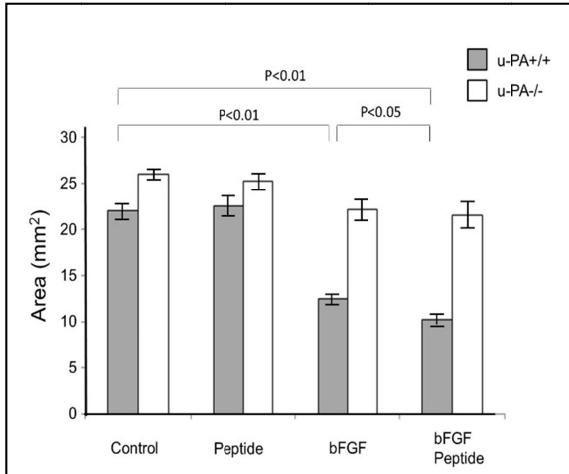


図 3 . u-PA^{+/+}および u-PA^{-/-}マウスの皮膚創傷治癒の解析

u-PA^{+/+}マウス(■)と u-PA^{-/-}マウス(□)の背部損傷 7 日後の残存損傷面積。皮膚創傷治癒に対するペプチド (10 μg) および bFGF (100 ng) 投与の影響

(2). 線溶系因子の発現解析

線維芽細胞の線溶系因子発現解析

マウスの皮膚線維芽細胞の培養上清液に u-PA と t-PA 活性が確認された。また、u-PA 活性は、bFGF の濃度依存性に増加した (図 4)。

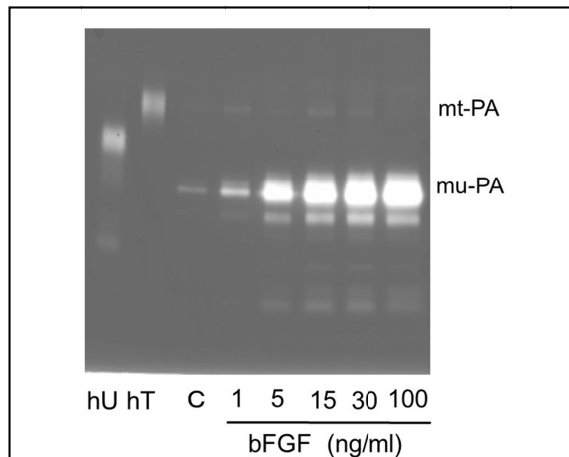


図 4 . 線維芽細胞の PA 活性発現に対する bFGF の影響

マウス皮膚の線維芽細胞を bFGF (1 ~ 100 ng/ml) の存在下で 48 時間培養した。その培養上清液中の PA 活性を fibrin zymography 法で解析した。

マウス皮膚組織における線溶系因子発現解析

マウスの皮膚組織抽出液中の PA 活性は、bFGF (100 ng) の徐放投与 2、5、7 日後の検体について fibrin zymography 法で解析した。u-PA および t-PA 活性は、bFGF 投与により増加した (図 5)。bFGF の PA 活性発現増加は、投与 7 日後でも持続していた。

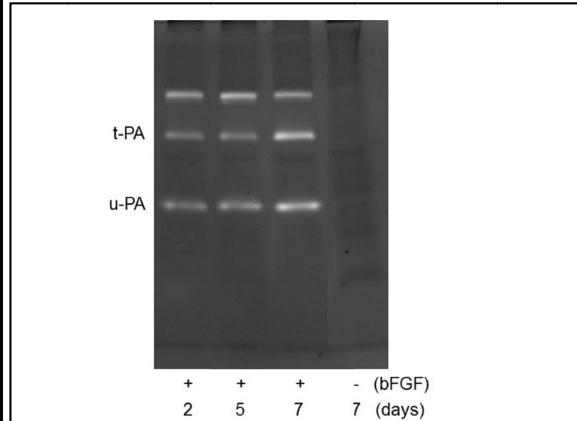


図 5 . 皮膚組織抽出液の PA 活性発現に対する bFGF の影響

bFGF (100 ng) を徐放投与 2、5、7 日後のマウス皮膚組織抽出液の PA 活性を fibrin zymography 法で解析した。

(3). 線維芽細胞の浸潤能の解析

線維芽細胞の浸潤能は、bFGF (100 ng/ml) により有意に促進した。また、ペプチドは、bFGF (100 ng/ml) と Plg (10 μg/ml) 存在下で線維芽細胞の浸潤能を濃度依存性に有意に促進した (図 6)。

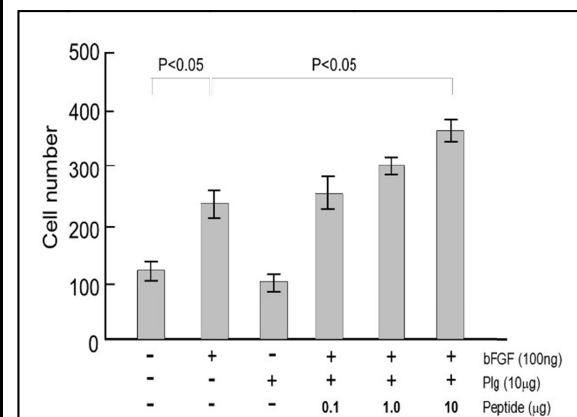


図 6 . マウス皮膚繊維芽細胞の浸潤能
線維芽細胞の浸潤能に対する bFGF、Plg、ペプチドの影響を二層培養系で解析した。

以上の結果より、新規ペプチドは、マウスの皮膚創傷治癒をbFGF存在下で促進させた。この効果は、皮膚線維芽細胞に対するbFGFのPA活性発現増強を伴うペプチドのPIg活性化促進作用によると推測される。また、このペプチドのPIg活性化促進は、皮膚創傷治癒過程における線維芽細胞の浸潤能の誘導を引き起こし、治癒促進に働くと考えられる。よって、このペプチドは、新しいメカニズムによる創傷治癒促進物質として、臨床応用が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

Mao L, Tamura Y, Kawao N, Okada K, Yano M, Okumoto K, Kaji H. Influence of diabetic state and vitamin D deficiency on bone repair in female mice. *Bone* 61:102-8, 2014, doi: 10.1016/j.bone.2013.12.024. 査読有
Okada K, Ueshima S, Kawao N, Yano M, Tamura Y, Tanaka M, Sakamoto A, Hatano M, Arima M, Miyata S, Nagai N, Tokuhisa T, Matsuo O. Lack of both α_2 -antiplasmin and plasminogen activator inhibitor type-1 induces high IgE production. *Life Sci* 93:89-95, 2013, doi: 10.1016/j.lfs.2013.05.023. 査読有
Sugioka K, Kodama A, Okada K, Iwata M, Yoshida K, Kusaka S, Matsumoto C, Kaji H, Shimomura Y. TGF- β_2 promotes RPE cell invasion into a collagen gel by mediating urokinase-type plasminogen activator (uPA) expression. *Exp Eye Res* 115:13-21, 2013, doi: 10.1016/j.exer.2013.06.020. 査読有
Kawao N, Tamura Y, Okumoto K, Yano M, Okada K, Matsuo O. Kaji H. Plasminogen plays a crucial role in bone repair. *J Bone Miner Res* 28:1561-74, 2013, doi: 10.1002/jbmr.1921. 査読有
Kanno Y, Kawashita E, Kokada A, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Mastuno H. Alpha₂-antiplasmin regulates the development of dermal fibrosis by PGF2a synthesis through ATGL/iPLA2. *Arthritis Rheum* 65:492-502, 2013, doi: 10.1002/art.37767. 査読有
Kawao N, Nagai N, Tamura Y, Horiuchi Y, Okumoto K, Okada K, Suzuki Y, Umemura K, Yano M, Ueshima S, Kaji H, Matsuo O. Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen mediate activation of macrophage phagocytosis during liver repair in vivo. *Thromb Haemost*

107:749-59, 2012, doi: 10.1160/TH11-08-0567. 査読有

Hori K, Matsuda A, Ebihara N, Imai K, Mori K, Funaki T, Watanabe Y, Nakatani S, Okada K, Matsuo O, Murakami A. Involvement of plasminogen activator inhibitor-1 in the pathogenesis of atopic cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53:1846-1851, 2012, doi: 10.1167/iovs.11-8380. 査読有

Kawao N, Nagai N, Tamura Y, Okada K, Yano M, Suzuki Y, Umemura K, Ueshima S, Matsuo O, Urokinase-type plasminogen activator contributes to heterogeneity of macrophages at the border of damaged site during liver repair in mice. *Thromb Haemost* 105:892-900, 2011, doi: 10.1160/TH10-08-0516. 査読有

Kanno Y, Ishisaki A, Kawashita E, Chosa, N, Nakajima K, Nishihara T, Toyoshima K, Okada K, Ueshima S, Matsushita K, Matsuo O, Matsuno H, Plasminogen/plasmin modulates bone metabolism by regulating the osteoblast and osteoclast function. *J Biol Chem* 286:8952-8960, 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.152181. 査読有

Okada K, Ueshima S, Matsuno H, Nagai N, Kawao N, Tanaka M, Matsuo O, A synthetic peptide derived from staphylokinase enhances plasminogen activator by tissue-type plasminogen activator. *J Thromb Haemost* 9:997-1006, 2011. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04257.x. 査読有

[学会発表](計8件)

岡田清孝 「The both α_2 -antiplasmin and plasminogen activator inhibitor type-1 gene deficient mice induces high IgE production」第91回日本生理学会大会 2014年3月16-18日 鹿児島

岡田清孝 「新規ペプチドの皮膚創傷治癒促進作用の解析」第13回日本再生医療学会学術集 2014年3月4-6日 京都

岡田清孝 「The mechanism of enhancement on plasminogen activation and thrombolysis by synthetic nonadecapeptide」第90回日本生理学会大会 2013年3月27-29日 東京

岡田清孝 特別講演「創傷治癒過程における細胞性線溶を中心とした蛋白分解力スケードの機能」第16回眼創傷治癒研究会. 2012年8月25-26日 奈良

岡田清孝 「肝細胞周囲での線溶系酵素/受容体系による肝再生制御機構」第11回日本再生医療学会総会 2012年6月

13-14日 横浜

岡田清孝 「新規合成ペプチドとプラスミンノーゲンの相互作用」 第34回日本血栓止血学会学術集会 2012年6月7-9日 東京

Okada K. A new synthetic peptide (SP) enhances plasminogen activation by t-PA. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. July 23-28, 2011 Kyoto

岡田清孝 特別講演「細胞性線溶と創傷治癒」第14回近畿眼科先進医療研究会. 2011年6月8日 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 清孝 (OKADA, Kiyotaka)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：20185432

(2) 研究分担者

松尾 理 (MATSUO, Osamu)

近畿大学・医学部・顧問

研究者番号：40030879

河尾 直之 (KAWAO, Naoyuki)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：70388510