

論文の内容の要旨

論文題目 創傷治癒における protease の血管新生機構
氏名 鈴木 みなみ

【背景】

わが国では急速な高齢人口の増加、欧米型の生活様式・食生活の変化を背景として糖尿病などの生活習慣病の増加をきたし、末梢動脈疾患 (Peripheral Arterial Disease; PAD) 患者も増加の一途をたどっている。PAD の症状としては、冷感やしびれ感、間歇性跛行、安静時疼痛、潰瘍・壊疽があり、病態の重症度を分類するものとして Fontaine 分類や Rutherford 分類が用いられる。しかし、末期腎不全患者や糖尿病性神経障害などを合併する場合には、症状が段階通りに悪化せずに急激に悪化することも多く、無症候性であっても注意を要する。ガイドラインでは高脂血症・糖尿病・高血圧などを有する場合はその治療をまず行い、血行不良に伴う上記症状を認める場合には血行再建治療の適応となっている。血行再建治療のみでは十分な治療効果が得られない場合に、医療用ウジ療法を含む補助療法を行う。下肢血流の悪化に加え、易感染性・創傷治癒遅延・多剤耐性菌の繁殖等などがおこると患肢切断へと至る可能性も非常に高くなり、より早期の治療介入が必要となる。医療用ウジ療法は難治性壊疽・潰瘍に対しても有効な治療法であり、臨床的には、多剤耐性菌に対する有効性や早期のデブリドメント、その後の良好な肉芽形成効果が報告されているが、そのメカニズムは不明な点が多い。一方、PAD や重症心不全における Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) の遺伝子治療の有効性が複数報告されており、現在では創部局所における VEGF 発現増加を誘導する遺伝子治療の有効性が広く認識されている。線維芽細胞はフィブロネクチンやコラーゲン等の創傷治癒時の肉芽形成に強く関与する細胞外マトリックスを産生するほか、VEGF や Hepatocyte Growth Factor (HGF) などのサイトカインを産生することが知られている。医療用ウジ療法を施行した 9 例の報告において、患肢大腿静脈血中の HGF はわずか 48 時間の治療の前後で有意に上昇し、VEGF は上昇する傾向が見られていた。HGF についてはその受容体である cMet に結合し、c-Src、Stat3 を介したメカニズムが過去に報告されたが、VEGF に関連した機構については未解明である。本検討においては、創傷治癒における血管内皮細胞との関係において重要な役割を演じる線維芽細胞を用いて医療用ウジ療法における VEGF を介する治療効果発現メカニズムの検討を *in vitro* の系を用いて行った。

【方法】

医療用ウジ療法に使用する *Lucilia sericata* より抽出した excretion/secretion (ES) をマウス線維芽細胞に作用させ、ES の濃度・時間による変化、protease inhibitor (PI) 添加、basic fibroblast growth factor (bFGF) 添加による *Vegf* の発現への影響を検討した。ES、PI 投与の有無による *Insulin-like growth factor (Igf-1)*、*Transforming growth factor β (Tgf β)* の発現、線維芽細胞の遊走能に関しても評価した。cMet を knockdown した系における ES 添加の有無による *Vegf*、*Hgf* の発現の変化についても検討を行った。また、ES ないしは PBS を作用させた recombinant VEGF の cell viability の評価を行った。ES を作用させた recombinant VEGF の切断、及び切断された VEGF による ERK リン酸化・Vascular Endothelial Receptor2 (VEGFR2) のリン酸化についても評価を行った。さらに、Zymogram を用いた ES の protease 活性の有無の確認を行った。

【結果】

ES をマウス線維芽細胞に作用させると、0.025-0.5 μ g/mL の範囲で濃度依存性に *Vegf* の発現上昇を認めた。*Vegf* の発現は 12 時間で前値の約 6.06 倍まで増加し 24 時間後には減少したが、この *Vegf* 発現上昇は PI 添加により 0.15 倍に抑制された。*Igf-1*、*Tgf β* では同様の傾向はみられなかった。線維芽細胞の遊走に関しては通常メディウムに ES を加えた群でのみ治療開始後 48 時間において線維芽細胞の遊走を認めたが、通常メディウム群、ES+PI 群では認めなかった。ES 投与後の *Vegf* の発現は 24 時間後に有意に増加した。cMet を knockdown した系においては control 群と同様に、ES 投与による *Vegf* 発現上昇を認めていたが、*Hgf* では ES 投与による発現上昇は見られなくなっていた。また、ES を作用させた recombinant VEGF189 50ng/mL を培養液中に添加すると、2-24 時間の範囲で cell viability が有意に上昇したが、VEGF165 ではこの傾向が見られなかった。22kD の recombinant VEGF189 は ES を 30 分間作用させると ES の濃度依存性に 14 kD、10 kD へと切断され、この切断は PI 添加により抑制された。ES を作用させた VEGF189 は、PBS を作用させた VEGF と比較して 10-30 分後に VEGFR2 のリン酸化、6 時間後に ERK リン酸化が有意に促進していた。Zymogram では 40 kDa、34 kDa、30 kDa にバンドを認めており、中でも 40 kDa のバンドが一番強い protease 活性を有していた。Zymogram gel 上の protease 活性を示していた各々のバンドから protein extraction kit を用いて抽出した抽出溶液を、recombinant VEGF と共に培養することにより VEGF の切断活性の評価を行ったが、得られた抽出溶液による切断活性は評価困難であった。

【結論】

医療用ウジ療法に使用する *Lucilia sericata* の幼虫から得た ES による創傷治癒機構としては、ES 中の protease による線維芽細胞からの濃度依存性・時間依存性の *Vegf* 発現上昇、線維芽細胞の遊走能向上に加えて、創傷部位局所における VEGF の切断にともなう VEGF の活性化をきたし、下流の VEGFR2/ERK の系を活性化していること示唆された。創傷部位局所における VEGF の発現上昇・活性化により、創傷治癒における血管新生、肉芽増生の機序に関与していると考えられた。検討した範囲内では ES 投与による明らかな細胞毒性などは認められず、今後 *Lucilia sericata* などの生物由来の protease の機能・成分解析を行うことで今後の PAD における治療薬の開発の一助になることが期待される。