

博士論文

創傷治癒における protease の血管新生機構

鈴木 みなみ

論文題目

創傷治癒における protease の血管新生機構

東京大学大学院医学系研究科

平成 25 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

指導教員 南学 正臣 教授

申請者 鈴木 みなみ

目次

1. 目次	3
2. 要旨	4
3. 略語一覽	5
4. 序文	7
5. 目的	25
6. 方法	26
7. 結果	38
8. 考察	56
9. 結論	68
10. 引用文献	69
11. 謝辞	84

要旨

医療用ウジ療法の治療前後で VEGF が増加傾向にあるが、そのメカニズムは明らかでない。医療用ウジの excretion/secretion (ES)の役割を検討した。医療用ウジの ES をマウス線維芽細胞に作用させることにより、*Vegf* の濃度依存性かつ経時的な発現上昇および細胞の遊走を認め、これは protease inhibitor (PI)により抑制された。また、ES を作用させた recombinant VEGF₁₈₉ は切断されていたが、PI により抑制された。ES 作用後の recombinant VEGF₁₈₉ は対照群と比較し、cell viability の上昇、VEGFR2、ERK リン酸化の促進を認めており、ES 内の protease は線維芽細胞における VEGF 産生増加、VEGF の切断を介して創傷治癒を促進させる機序が考えられた。

略語一覧

ABI: ankle branchial pressure index

ASO: arteriosclerosis obliterans

bFGF: basic fibroblast growth factor

CLI: critical limb ischemia

EGF: epidermal growth factor

IGF-1: Insulin-like growth factor-1

Erk: extracellular signal-regulated kinase

ES: excretion/secretion

FDA: food and drug administration

HGF: hepatocyte growth factor

MDT: maggot debridement therapy

MRSA: methicillin-resistant staphylococcus aureus

PAD: peripheral arterial disease

PBS: phosphate-buffered saline solution

pErk: phosphorylated extracellular signal-regulated kinase

PI: protease inhibitor

pVEGFR: phosphorylated vascular endothelial growth factor receptor

Q-PCR: real-time quantitative polymerase chain reaction

TAO: thromboangiitis obliterans

TASC II : trans atlantic inter-society consensus II

TGF- β 1: transforming growth factor- β 1

TNF- α : tumor necrosis factor- α

VEGF: vascular endothelial growth factor

VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor

序文

わが国では急速な高齢人口の増加、欧米型の生活様式・食生活など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[1]。慢性疾患末梢性動脈疾患は閉塞性動脈硬化症 (Arteriosclerosis Obliterans: ASO) と閉塞性血栓血管炎 (Thromboangiitis Obliterans: TAO)が大部分を占めており、ほかに線維筋性異形成症等がある。TAO は、我が国において 1970 年頃までは慢性動脈疾患の 60～70% を占めていたが、近年では著明に減少しており、現在では ASO がその大部分を占めるようになっており、PAD と ASO はほぼ同義語として使われるようになってきている。

下肢閉塞性動脈硬化症の症状としては、冷感、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 (表 1、2)。血行再建治療の適応となるのは、下肢動脈血流不全を原因として上記のような症状が出現している場合となっており、中でも重症下肢虚血 (critical limb ischemia: CLI)は「重度の慢性虚血により安静時疼痛または潰瘍・壊死をきたす状態」と定義され、血行再建術の積極的な適応となっている[2]。

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。

表 1 Fontaine 分類

Fontaine 分類	
stage	臨床症状
I	無症候
II a	軽度の跛行
II b	中等度～高度の跛行
III	安静時疼痛
IV	潰瘍、壊疽

表 2 Rutherford 分類

Rutherford 分類	
Category	臨床症状
0	無症候
1	軽度跛行
2	中等度の跛行
3	高度の跛行
4	安静時疼痛
5	組織欠損(小)
6	組織欠損(大)

PAD の疫学

PAD を疫学的に調査する際には、血管内治療やバイパス術と言った侵襲的な治療の施行歴、Fontaine 分類や Rutherford 分類に示される各種症状や表在動脈の触知といった他覚的所見、CT angiography (CTA)や MR angiography (MRA)などの画像検査、ABI (ankle branchial pressure index)などの生理学的検査により検出することが一般的である[3]。画像検査、あるいは皮膚組織還流圧 (skin perfusion pressure: SPP)、経皮的酸素分圧測定(transcutaneous partial pressure oxygen: tcPO2)といった ABI 以外の生理学的検査は疫学的評価を行うには煩雑であるため、ABI 0.90 未満あるいは 0.90 以下を PAD と定義して有病率の研究が行うことが行われてきた[3-5]。本邦における PAD の主な疫学研究として久山町研究 [6]、Kyushu and Okinawa Population Study (KOPS) 研究 [7]、端野・壮瞥研究[8]が挙げられ、PAD の有病率はそれぞれ 1.47%、1.71%、2.7%とされている。これらの報告は 2002 年から 2006 年の間にされた調査であり、2000 年代前半の本邦における中高年一般人口住民の PAD の有病率は 1-3%と推定される。人口の高齢化や透析患者人口の増加などを考慮すると、更なる有病率の増加も懸念されるため、今後もその時代ごとの疫学調査が望まれる。

また、脳血管疾患、虚血性心疾患、PAD などを含むアテローム血栓症に関す

る世界的規模の登録研究である Reduction of Atherothrombosis for Continued Health registry (REACH registry)において、上記3疾患は overlap が多く存在することが明らかになった[9]。その内訳をみると、PAD 患者のうちで、PAD を単独で有する者は 38.5%程度であり、脳血管疾患との合併は 9.8%、冠動脈疾患との合併は 38.5%、3 疾患すべて有する者は 13.1%であった。PAD 患者の約 61%が他の動脈硬化性疾患をすでに伴っていたということになる。また、REACH registry 開始 1 年後の死亡率・急性心筋梗塞・脳卒中の発症率は、アテローム血栓症のリスク因子のみを有する群では 2.2%なのに対し、3 疾患を有する群では 9.2%と報告されており、併存疾患が多いほど増加していた[10]。

PAD の治療

図 1 の PAD 患者の治療アルゴリズムに示すように、PAD の治療としては、まず危険因子を減らすことが重要とされており[2]、喫煙などの生活習慣を改善し、高脂血症や糖尿病、高血圧などのリスクファクターを改善する治療を行う。次に、個々の活動度や運動制限にあわせて運動療法・シロスタゾールなどの抗血小板薬による薬物療法や、中枢側の病変であれば血管内治療を含めた外科的な血行再建を行うとされている。

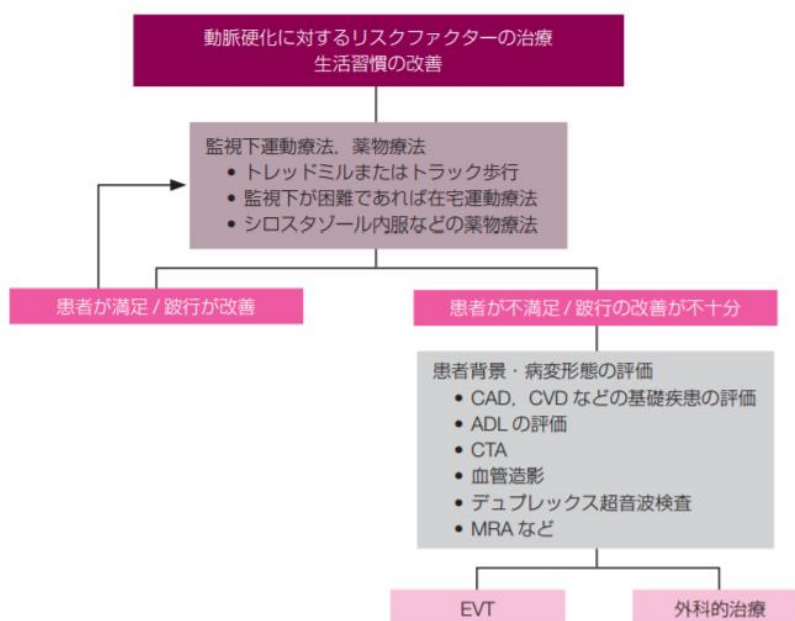


図 1 間欠性跛行を有する PAD 患者の治療アルゴリズム(文献 2 より引用)

CLI に対する第一選択の治療法は血行再建術であるとされているが、血行再建術のみでは創傷治癒、および下肢大切断を回避するための血流を十分に得る

ことができない場合には、補助療法を組み合わせた集学的な治療が必要となる。

LDL アフェレーシス[11]、高圧酸素療法[12]、血管新生療法、脊髄電気刺激療法[13]に加え、外用薬治療、外科的デブリードマン等の局所療法の併用が推奨されており、医療用ウジ療法は PAD の補助的治療法として位置づけられている。

糖尿病・慢性腎臓病患者における PAD の特徴

糖尿病と末期腎不全は血管病変の局在とも強く関連している。CLI に対して血管内治療を受けた患者において、糖尿病の合併と維持透析中であることは膝下動脈病変の存在と独立した関連を示しており、また膝下単独病変に対して血管内治療を受けた CLI 患者において、糖尿病の合併と維持透析中であることは病変の石灰化と有意に関連していると報告されている[14]。このため、末期腎不全患者における血管内治療やバイパス治療による血行再建療法は、末梢病変の血管径が小さいためにガイドワイヤーが通過しない、責任病変が複数存在する、血管石灰化のために run-off vessel に乏しくバイパス手術が困難であるなどの理由から、治療自体が困難であることや治療後の改善が乏しいケースが少なくない。また、糖尿合併維持透析患者においては、血管内治療後の主要下肢事故のリスクが高いと報告されており、外科バイパス術後の予後に対する検討においても、糖尿病の合併と末期腎不全は予後不良因子であると報告されている[15]。

PAD の患者が CLI へと進展する場合に、前述の Fontaine 分類や Rutherford 分類の段階通りに症状が進展するとは限らない。日頃、出歩く機会が健常人と比較すると少ない末期腎不全患者、中でも神経障害を有する糖尿病を合併する末期腎不全患者においては、間欠性跛行 (Fontaine II / Rutherford 1-3)を訴える頻度は少なく、無症候 (Fontaine I / Rutherford 0)の状態から、小外傷などを契機に急激な悪化をきたし、虚血性潰瘍・壊疽 (Fontaine IV/ Rutherford 5-6)で発見されることも少なくない。無症候であつても非常に CLI 発症のリスクが高く、欧米諸国をはじめ日本などのアジア諸国を含む 16 学会の検討により 2007 年に作成された Trans-Atlantic Inter-Society Consensus II (TASC II)の中でも慢性潜在性下肢虚血 (chronic subclinical limb ischemia)[16]と呼ばれており、注意を要する集団と考
えるべきとされている。

医療用ウジ療法 (Maggot Debridement Therapy: MDT) の概要と歴史

PAD 治療において、局所の補助療法として位置づけられている医療用ウジ療法は、古くからその有効性は認識されており、オーストラリア原住民や旧ビルマの伝統医などが数千年前の潰瘍治療に使用していたことが記録されている[17]。現在の医療用ウジ療法は、当時第一次世界大戦に軍医として従軍していた Johns Hopkins 大学整形外科医の William S. Baer が、戦場でウジが湧いた兵士の外傷が治癒していくのを見たことから、1930 年代に 89 人の慢性骨髓炎の患者に対するクロバエの幼虫を用いた治療を行い 90%以上の効果を認めたことを報告した[18]ことがきっかけとされている。1930～40 年代前半は医療用ウジ療法が広く使われるようになっていた[19]が、抗菌薬の出現で一時姿を消していた。その後、多剤耐性菌の出現などを背景に、1990 年頃より再び脚光を浴びることとなり、英国では 1995 年国民健康保険 (National Health Service: NHS)に、米国では 2004 年食品医薬品局 (Food and Drug Administration: FDA) に認可され、欧米を中心に広く普及している治療法となった。

現在では医療用ウジ療法は世界 40 か国以上にて難治性創傷の治療に取り入れられている。本邦においては 2004 年に岡山大学心臓外科の三井らによってはじめて行われ、膝下切断適応の重症虚血肢患者に対して良好な治療効果が報告された[20]。人口の高齢化、糖尿病患者や透析患者の増加に伴って虚血性病変を伴

う、あるいは伴わない難治性潰瘍・壊疽が増加していることを背景に 2004 年以降全国において徐々に関心が高まり、日本マゴットセラピー研究会 (The Japanese Association for Maggot Therapy) が設立された。また、2017 年 10 月の時点において、厚生労働省は本治療を「医療技術評価分科会における評価の対象となる技術」として扱っており、臨床上のアウトカムを改善させるとしている[21]。

医療用ウジ療法の治療の実際

医療用ウジ療法は、難治性創傷治療における集学的治療介入の一手段であり、適応疾患としては、糖尿病性壊疽をはじめ、慢性末梢性動脈疾患、感染を伴う難治性創傷など多岐にわたる (表 3)。創部の状態としては、壊死組織が多く認められている段階で用いることが多く、創部が広範囲に及ぶ症例では潰瘍部位については医療用ウジ療法を行い、創部辺縁の比較的良好な肉芽が見られる部位にはフィブラストスプレー® (bFGF 製剤)を噴霧する等、複数の治療法を並行して行うことも少なくない。感染や壊疽が急速に拡大している症例や、創部が体内の深部に及ぶ症例、過去にウジに対してアレルギーを認めたことがある症例は適応外となる。現在行われている医療用ウジ療法は、無菌的に飼育された医療用ウジである *Lucilia sericata* (*L. sericata*、日本名：ヒロズキンバエ)を患部に 1 cm²あたり 5-10 匹おき、約 2-3 日後に成長した医療用ウジを除去するというもの

であり、創部の状態を見ながら 1-4 回実施することが多い。安全性を確保して、患部に医療用ウジを置くのみで、後は医療用ウジ自体がその生理学的特性として腐敗組織のみを貪食し、患部を洗浄し、肉芽組織の発育を促すというものである。治療開始時には医療用ウジの大きさは 1-2 mm 程度であるが、壊死組織を求め蠕動運動を行い、*L. sericata* からの滲出液／分泌液 (extraction/secretion: ES) により壊死組織を融解しながら貪食し、治療終了直後には体長が 10 数 mm に成長している姿が確認される。使用後の医療用ウジの処理については、凍結などにより死滅させたうえで廃棄することが一般的である。一方、この治療による副作用は治療中の疼痛と軽度の発熱の他には認めておらず、いずれも解熱鎮痛薬の経口投与にて自制範囲内であることが多い。2017 年現在の我が国において、医療用ウジ療法は保険適応とはなっておらず、先述の通り医療技術評価分科会で検討中である。これまでは、血行再建療法の適応がある虚血性潰瘍症例では血行再建後に一度退院し、再入院後にあるいは外来で壊死組織の除去と良好な肉芽組織の形成を目的として行われることが一般的であったが、今後臨床での使用については変化していく可能性がある。

表 3 医療用ウジ療法の適応疾患

糖尿病性壊疽
末梢動脈疾患、コレステロール塞栓症などの虚血性潰瘍・壊疽
静脈性潰瘍
褥瘡
感染を伴う難治性感染創
その他(外傷、熱傷、術後創傷)

医療用ウジ療法の治療メカニズム

臨床的には methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)感染を伴う糖尿病性足潰瘍[22]や、多剤耐性緑膿菌感染を伴う糖尿病性壊疽[23]への医療用ウジ療法の有効性を示唆する報告もなされている。また、医療用ウジ療法が難治性糖尿病性足潰瘍[24]、および褥瘡[25]において外科的デブリードマンを含む既存の治療と比較してより早期に壊死組織の除去および良好な肉芽増生を促したことが報告されている。創傷治癒における医療用ウジ療法の効果を検証したランダム化比較試験においては、ハイドロゲル型創傷被覆材治療と比較し、デブリードマン終了までの時間が有意に早かったことが報告されている[26]。

医療用ウジは創傷部位において、周囲に消化液を分泌し、壊死した組織のみを溶解し、それを貪食して体内に取り込んでいる。医療用ウジの ES はアルカリ性 (pH 8.0)で、分泌液中には MRSA などの多剤耐性菌や緑膿菌に対しても有効な抗菌ペプチド[27,28]や、肉芽の増生を促す EGF や HGF などの growth factor[29, 30]の産生を促進する物質が含まれるとされている。医療用ウジ療法の創部改善の機序は大きく分けて、①壊死組織の除去、②抗菌作用、③良好な肉芽組織の形成の 3 つの機序が挙げられているが、その詳細については不明な点が多い。

医療用ウジ療法における HGF・その他の成長因子の関与

本田らは、下肢の難治性潰瘍・壊疽に対して医療用ウジ療法 (Maggot Debridement Therapy: MDT) を施行した 9 例の症例において治療前後の患肢大腿静脈血中の各種増殖因子の検討を行った[30]。いずれの患者も血行再建や幹細胞移植などを含む従来治療に対し不応性であったが、平均 2.00 ± 0.47 回の MDT を行うことにより、臨床的に壊死組織の減少、良好な肉芽組織の形成などが得られた。解熱鎮痛剤内服にて自制範囲内の疼痛以外には特記すべき有害事象は認めなかった。単回の MDT 前後の hepatocyte growth factor (HGF)・vascular endothelial growth factor (VEGF)・basic fibroblast growth factor (bFGF)・transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)・tumor necrosis factor- α (TNF- α)等の各種成長因子の評価を行い、HGF は治療前後で有意な上昇を認めた(Mann-Whitney U test, $p = 0.035$; 図 2A)。一方、VEGF では、合併する消化管出血・腎性貧血により重症貧血を有していた 2 症例を除いた 7 症例において、治療前後で上昇傾向を認めていた(Mann-Whitney U test, $p = 0.056$, unpublished data)。そのほかの成長因子では有意差を認めなかった。

さらに、同報告の中でマウス線維芽細胞を用いた *in vitro* の系を用いて ES 中の protease による HGF の発現上昇、HGF/cMet/STAT3 の経路の活性化について示している。

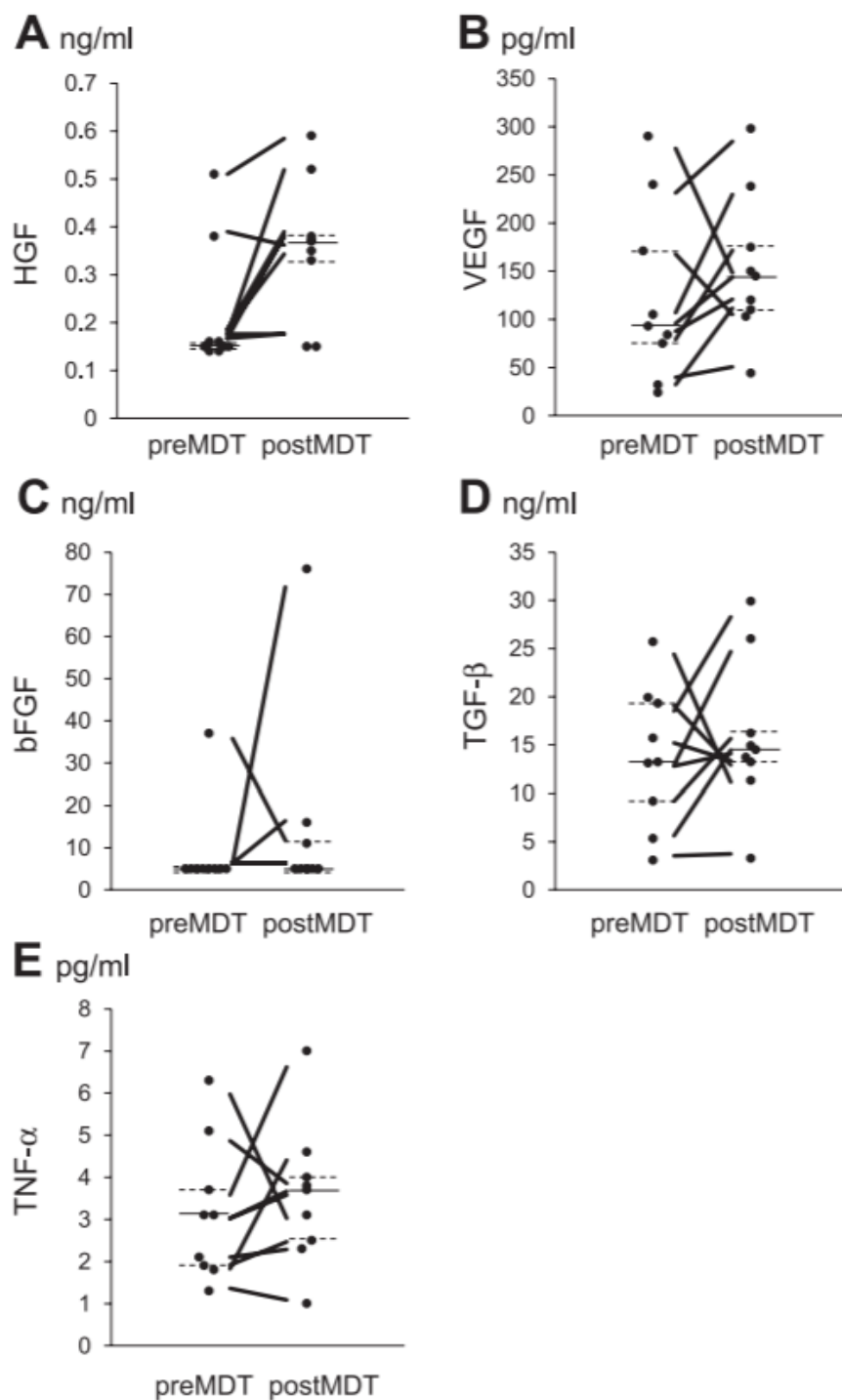


図2 各種成長因子の治療前後の推移 (文献 30 より引用)

A: hepatocyte growth factor (HGF). B: vascular endothelial growth factor (VEGF). C: basic fibroblast growth factor (bFGF). D: transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). E: tumor necrosis factor- α (TNF- α)

創傷治癒と VEGF

血管新生は脊椎動物の胎生期における循環器系の形成や多くの組織構築において重要な役割を果たすとともに、成熟個体における性周期における一過性の子宮内膜の増殖や胎盤形成、創傷治癒過程、糖尿病性網膜症の進展などにも深く関与している。血管新生はもともと Folkman らが提唱した腫瘍発育における栄養血管の新生に関する研究に発端をなしており[31]、1980年代に複数のグループによって血管内皮増殖因子(VEGF)が発見、同定された[32,33]。発見当初は内皮細胞のみが VEGF を特異的に産生すると考えられていたが、現在では内皮細胞のみならず、線維芽細胞、血小板、マクロファージ、ケラチノサイト等の各種細胞からも産生されることが明らかとなっている[34]。

VEGF は、血管形成の一連の過程で血管内皮細胞に主に作用する重要な増殖因子であり、血管透過性亢進作用も有する物質である。また、VEGF は、管腔形成の促進や内皮細胞の遊走、腫瘍血管における病的血管新生などの作用も有している。VEGF には異なる遺伝子にコードされる VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D など複数のアイソフォームが存在することが報告されており、このうち VEGF-A は血管新生促進作用を持つ主要なアイソフォームである。図 3 に示すように、ヒトの VEGF-A では mRNA のスプライシングの違いにより 4 つのサブタイプ (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆)が存在し、いずれの型もシグナルペ

プチドをもち、細胞外に分泌される[35]。中でも、VEGF₁₈₉とVEGF₂₀₆にのみ存在する exon 6 にコードされる部位は塩基性アミノ酸に富んでおり、細胞膜表面のヘパリン様物質に結合する性質がある[36]。VEGF ファミリーの受容体としてはチロシンキナーゼ型受容体である VEGFR1(Flt-1)、VEGFR2(KDR/Flk-1)、VEGFR3(Flt-4)、ニューロピリン-1 が同定されており、血管新生、リンパ管新生、血管透過性のシグナルを伝達するが、VEGF-A は、レセプターとして VEGFR1 (Flt-1)、VEGFR2 (KDR/Flk-1)受容体型チロシンキナーゼを利用する（図 4）。VEGFR-3 (Flt-4) は VEGF-C、VEGF-D のレセプターであり、リンパ管新生を誘導するとされている[37]。

VEGF-A とレセプターの結合の強さに関しては、既存のノックアウトマウスの報告から、VEGFR-1 が VEGFR-2 よりも 10 倍以上強いとする一方で、受容体のチロシンキナーゼ活性や自己リン酸化の程度は、VEGFR-1 が VEGFR-2 に比べて 1/10 程度といわれており、VEGFR-2 がメインの伝達経路として機能していると考えられている[38-40]。VEGFR-2 は内皮細胞系を中心に存在するとされているが[41]、一部線維芽細胞にも発現を認めており[42]、その活性化は PLC γ pathway を介して血管内皮細胞の遊走と関連すると報告されている[43]

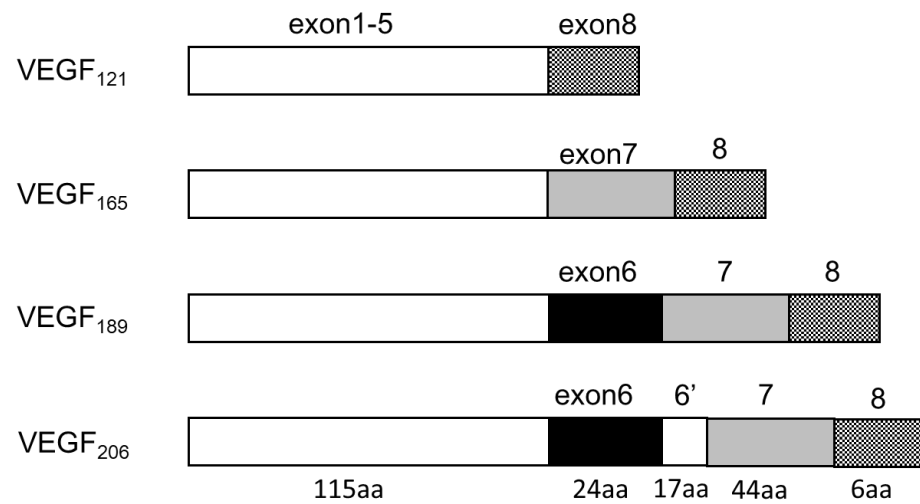


図3 VEGF-A のスプライシング部位による違い(文献 35 をもとに作成)

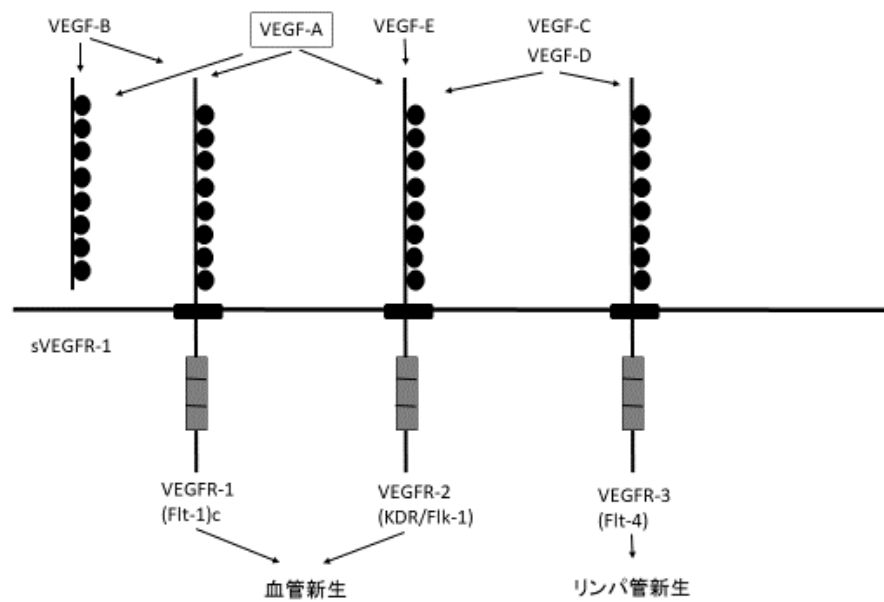


図4 VEGF-A,B,C,D とレセプター(文献 47 をもとに作成)

VEGF による遺伝子血管新生療法

1995 年に米国タフツ大学 Isner らを中心に、VEGF 遺伝子を用いた PAD に対する遺伝子治療が始まっており、良好な成績をあげている[44]。彼らはウサギの下肢虚血モデルにおいて VEGF などの内皮細胞増殖因子のプラスミドを筋肉内に投与することで、血管新生因子の産生が促進されることが明らかにされたことを受け、PAD 患者の下肢に VEGF₁₆₅ 遺伝子プラスミドを筋肉注射し、著明な ABI 上昇など血流改善に加え、難治性潰瘍の改善も認め、従来の治療では十分な治療効果を得られない重症虚血肢に有効な治療であることを示した[45]。さらに、VEGF 遺伝子による治療的血管新生療法は、Buerger 病においても有効であることも報告した[46]。

循環器領域においても VEGF を用いた治療的血管新生療法が発達してきている[47]。前述の Isner らは、PAD のみではなく VEGF 遺伝子による心筋梗塞治療の臨床試験開始の許可を FDA より得て、重症心不全患者の心筋内に直接 VEGF のプラスミドを注入することにより、血流の増加と狭心症症状の改善を報告した[48]。それ以降も coronary artery bypass grafting (CABG)と同時にアデノウィルスベクターを用いた心筋への VEGF₁₂₁ 遺伝子投与 CABG と同時に心筋内へ投与する有効性なども報告しており[49]、VEGF の創部局所での発現増加を誘導する VEGF の遺伝子療法はその有効性を広く認識されるに至った。

目的

医療用ウジ療法による創傷治癒のメカニズムについては、既報から ES が何らかの重要な働きをしていることは示唆されているが、その詳細は依然として明らかではない。一方で上述のように創傷治癒において VEGF が中心的な働きをしていることは基礎及び臨床研究から明らかにされており、医療用ウジ療法のメカニズムにおいても寄与している可能性が考えられる。

そこで我々は、医療用ウジ療法における ES を介した組織新生機構に VEGF が関与するという仮説を立てた。創傷部位に豊富に存在する線維芽細胞が VEGF の産生および活性化に関与しているかどうか、またどのような経路で VEGF を介した組織新生作用が見られるのかどうかを明らかにすることを目的とした。

ES 中の protease が HGF 産生を促進させていた報告から、ES 中の protease に着目することとした。

方法

Excretion/secretion (ES) の抽出

医療用ウジ療法に使用する *L. sericata* の 3 齢虫(バイオセラピーメディカルより提供)約 100 匹を 37℃の恒温環境で 10 mL の phosphate-buffered saline solution (PBS, pH 7.3; Invitrogen)内で培養することにより ES を抽出した。ここで得られた ES の濃度を後述の方法で測定して調整し、以降の実験に使用した。

細胞刺激実験

Passage number 4-10 のマウス線維芽細胞 (NIH-3T3 cell)を用いた。細胞の継代を行う際には 10 cm dish (Corning)を用い、 1×10^4 cells/cm² の細胞を播き、37℃の湿潤環境下の CO₂ インキュベーター(5%(v/v) CO₂)の中で培養した。培養液は Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen)、10% fetal bovine serum、100 u/mL penicillin (Gibco)、100 µg/mL streptomycin (Gibco)を用いた。

全 RNA 用には、1 well あたり培養液 1 mL を入れた 12 well plate (Corning)に、lysate 用には 1 well あたり培養液 2 mL を入れた 6 well plate (Corning)にマウス線維芽細胞を播き、37℃の湿潤環境下の CO₂ インキュベーター(5% (v/v)CO₂)の中で培養し、50-60% confluent になった時点で、図 5 に示すように下記の 4 種の刺激を加えた。第一に、蛋白濃度を 0.05 µg/mL に調整した ES を添加する時間を 4

時間、12 時間、24 時間とした。第二に、ES の蛋白濃度を 0.025 $\mu\text{g/mL}$ 、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ に調整して ES を 12 時間添加した。第三に、ES (もしくは同量の PBS) を加えた群と ES + Protease Inhibitor Cocktail (PI cocktail)を加えた群を作成した。なお PI cocktail の組成は aprotinin 1.9×10^4 TIU/g prot、leupeptin 1.37×10^{-2} g/g prot、phenylmethylsulfonyl fluoride 0.683 mol/g prot とした。第四に、ES と bFGF を単独、もしくは共投与した群を作成した。bFGF 投与に関しては臨床におけるフィブラストスプレー® (bFGF 製剤)の使用を想定している。ES を投与した群においては蛋白濃度を 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、bFGF を投与した群においては、bFGF が 10 ng/ml になるように調整している。ES の濃度別の *Vegf* の発現を評価した系以外は、本田らの報告[30]に基づき、ES の蛋白濃度は 0.05 $\mu\text{g/mL}$ に調整することとした。

各々の条件での刺激が終了後、TRI reagent (Molecular Research Center)により細胞の全 RNA を抽出し、1 本鎖 cDNA を後述の方法で合成し、細胞内の mRNA の定量化を行った。lysate はその後さらに 24 時間 37°Cの湿潤環境下の CO₂ インキュベーター(5% (v/v)CO₂)内で培養したのちに後述の方法で抽出し、これを用いて細胞内の蛋白の定量化を行った。各々の実験系は同一条件で 2-4 回行い、その結果を解析した。

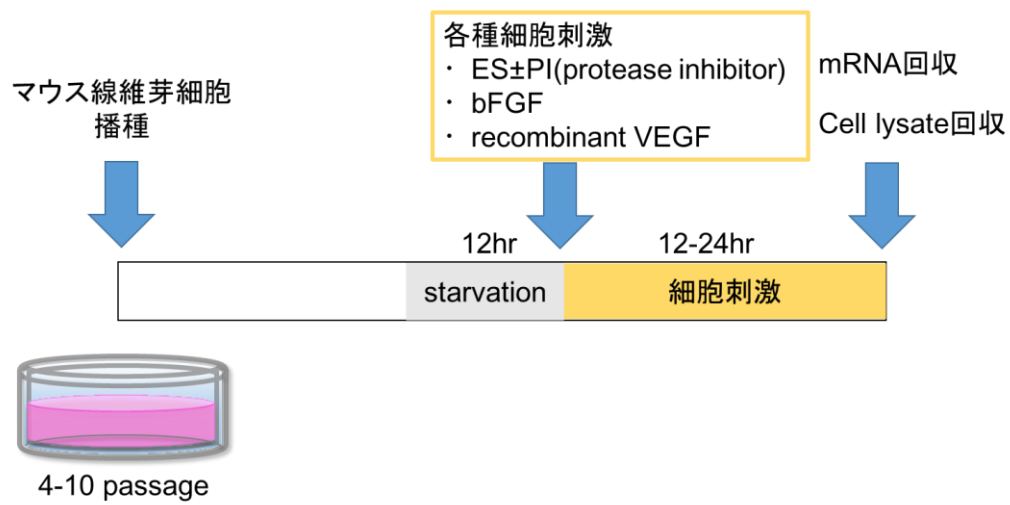


図5 マウス線維芽細胞を用いた刺激実験の time course

マウス線維芽細胞の増殖・遊走実験

マウス線維芽細胞を、fibronectin でコーティングしたカバーガラスを内部に置いた 10 cm dish に播き、37°Cの湿潤環境下の CO₂ インキュベーター(5%(v/v)CO₂) の内で培養した。カバーガラスに細胞が接着していることを確認した後に、カバーガラスを新たな 10 cm dish に置き、前述の新たな培養液内で培養を行った。培養液に 0.05 µg/mL になるように調整した ES (もしくは同量の PBS)と ES + Protease Inhibitor Cocktail (PI cocktail)を加え、0 時間後、24 時間後、48 時間後の状態を顕微鏡下で観察することによりマウス線維芽細胞の遊走能の評価を行った。

RNA 抽出と real-time PCR

マウス線維芽細胞から TRI reagent (Molecular Research Center)を用いてフェノール・クロロホルム抽出法により全 RNA を抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Kit (東洋紡)を用いてプロトコール通りに cDNA を合成し、SYBR green system (SYBR green I PCR Master Mix; Applied BioSystems)を用いて real-time quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR)を行った。すべての遺伝子の発現量は β actin を内部標準として相対定量を行った値として記した。Q-PCR に用いた primer sequence は表 4 に示す通りである。

表 4 Q-PCR primer sequences

target gene	primer sequence
<i>VEGF</i>	5'-GCACTGGACCTGGCTTTA-3'
	5'-CACCTTCATGGGACTTCTGCT-3'
β actin	5'- CGCACCCTGGCATTGTCAT-3'
	5'- TTCTCCTTGATGTCACGCAC-3'
<i>IGF-1</i>	5'-AGACAGGCATTGTGGATGAG -3'
	5'- TGAGTCTTGGGCATGTCAGT -3'
<i>TGFβ</i>	5'- TTGCCCTCTACAACCAACACAA -3'
	5'- GGCTTGCGACCCACGTAGTA -3'

cMet-siRNA の Transfection による knockdown 実験

マウス大腸菌細胞株の系で VEGF の発現は cMet レセプターを介する PI3K/Akt、MAPK、STAT3 で制御されている[71]と報告されており、HGF の下流に存在する cMet を knockdown することにより医療用ウジ療法における ES による HGF と VEGF の crosstalk について評価を行った。前述の実験と同様、マウス線維芽細胞を用いた。Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen)を用い、Stealth RNAi Negative Control Med GC (Invitrogen)または cMet-siRNA を transfection させた。cMet-siRNA は表 5 に示す 3 種類を用いた。

cMet の knockdown 効率を Q-PCR で確認した後に、前述の細胞刺激実験と同様に ES(もしくは同量の PBS)と ES + Protease Inhibitor Cocktail (PI cocktail)を 12 時間加えて *Vegf* および *Hgf* の発現を Q-PCR を用いて定量化を行った。投与した ES・PI の濃度は細胞刺激実験の系と同様とした。

表 5 siRNA sequences

target gene		primer sequence
<i>cMet</i>	siRNA1	5'-AGGCAUGAAAUAUCUUGCCAGCAAA-3'
		5'-UUUGCUGGCAAGAUUUUCAUGCCU-3'
<i>cMet</i>	siRNA2	5'-ACAACGUGAGAUGUCUCCAGCAUUU-3'
		5'-AAAUGCUGGAGACAUCUCACGUUGU-3'
<i>cMet</i>	siRNA3	5'-UGAACGCUACUUAUGUGAAUGUAAA-3'
		5'-UUUACAUUCACAUAAGUAGCGUUCA-3'

リコンビナント VEGF の切断実験

Human recombinant VEGF₁₈₉ (R&D Systems)に ES もしくは同量の PBS を加え、protein digestion buffer と共に 1.5 mL tube 内で 37°C で培養した。なお、protein digestion buffer は 50 mM Tris-HCl、40 mM NaCl、0.01%(v/v) Tween 20、pH 8.8 で作成した[50]。反応の停止は 4°C on ice 下に行うことで行った。蛋白の切断の評価は SDS-polyacrylamide gel を用いた Western blot 解析で行った。

Western blot 解析

マウス線維芽細胞の培養を行った 6 well plate に 0.5% Triton X-100、50 mM Tris、pH 7.5、150 mM sodium chloride、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、1 mM sodium orthovanadate、10 mM sodium fluoride、1 µg/mL leupeptin、1 µg/mL aprotinin を含む RIPA buffer により氷上で溶解し、cell lysate を得た。この cell lysate を遠心分離し、その上清を 100°C で 5 分間培養し、sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel を使用して電気泳動を行った。Gel から PVDF 膜に転写した後、5% skim milk によりブロッキング反応を行った。後述する一次抗体を Can Get Signal 1 (東洋紡)で希釈し、PVDF 膜を室温で 1 時間または 4°C で一晩反応させた。さらに、一次抗体に対応した二次抗体を Can Get Signal 2 (東洋紡)により希釈し、室温で 1 時

間反応させた。Chemiluminescent signal として ECL Plus (Amersham Pharmacia Biotech)を用い、CCD camera system (LAS-4000mini; Fuji Photo Film)で検出した。

In Cell Western 解析

マウス線維芽細胞の培養を行った 96 well plate の培養液を吸引除去し、PBS で洗浄した後に、3.7%ホルムアルデヒドを 20 分間、続いて冷メタノールを 10 分間加え固定した。各 well に 0.1% Triton X を 5 分間×5 回加えて透過処理を行った。Odyssey Blocking Buffer により室温で一時間半反応させ、ブロッキング反応を行った。下記に示す一次抗体を Odyssey Blocking Buffer に溶解し、室温で一晩ゆっくり振盪させつつ反応させた。蓋の周囲はシーリングを行うことにより蒸発に注意した。一次抗体を捨て、0.1% Tween 入り PBS で 5 分間×5 回洗浄した後、各一次抗体に対応した二次抗体 (LI-COR)を室温で一時間遮光下においてゆっくり振盪させつつ反応させた。反応後、抗体反応液を除去し、0.1% Tween 入り PBS で遮光下に室温でゆっくり振盪しながら 5 分間×5 回洗浄を行った。最後の洗浄の後、洗浄液を捨てて、液を完全に取り除き、可及的速やかに ODYSSEY CLx Infrared Imaging System (LI-COR)により観察を行った。

一次抗体

Western blot 解析および In Cell Western 解析における一次抗体には VEGF (Santa Cruz Biotechnology)、VEGFR2 (Cell Signaling Technology)、pVEGFR2 (Cell Signaling Technology)、Erk (Cell Signaling Technology)、pErk (Cell Signaling Technology)を用いた。

マウス線維芽細胞の cell lysate からの Vegf 測定

ES を投与した時間別の細胞刺激実験で用いたマウス線維芽細胞から前述の方法で cell lysate を得た。この cell lysate を 10 分間 10,000g で遠心分離を行い、その上清を用いた。上清中の Vegf の測定は Mouse VEGF Assay Kit (IBL)を用いて行った。

各種生化学測定

ES 中の蛋白定量、培養細胞の lysate 中の蛋白定量には Bio-Rad protein assay (Bio-Rad)を用いて Bradford 色素結合法[51]で測定を行った。

Alamer Blue Assay

Protein digestion buffer 内で ES もしくは同量の PBS を作用させ切断処理した Human recombinant VEGF₁₆₅、Human recombinant VEGF₁₈₉ (R&D Systems)を、5 ng/mL、50 ng/mL、500 ng/mL の最終濃度になるよう調整して培養液をそれぞれ作成した。96 well plate に播いたマウス線維芽細胞を、これらを用いて刺激・培養し、Alamer Blue Assay による細胞内代謝の評価を行った。Alamer Blue を細胞培養液に加え、37°Cの湿潤環境下の CO₂ インキュベーター (5% (v/v)CO₂)内で培養し、570 nm および 600 nm の吸光度をプレートリーダーで測定した。2 時間、4 時間、12 時間、24 時間の各時点において、5 ng/mL の群を基準とした細胞内代謝による蛍光量の変化を評価した。

Zymogram

ES を SDS バッファーに混和し変性させ、Tris-Glycine SDS ランニングバッファーを使用して 4-16% Zymogram Protein Gels (Blue Casein 入り、Novex) 上で泳動させた。電気泳動後、非イオン性界面活性剤を含むザイモグラム再生バッファー中でゲルを振盪して酵素を再生した。次に酵素活性に必要な 2 価金属イオンを添加するためザイモグラム展開バッファー中で平衡させ、protease の検出を行った。

Zymogram gel からの protease 抽出

上記の Zymogram gel から得られた各々のバンドから Protein Extraction Kit from Gel Slices (OBL)を用いて protease の抽出を行った。蛋白溶出バッファーには 0.1% Tween を用い、抽出粉末・ゲル断片・ゲル溶出液の混合したものを 4℃で一晩培養し、フィルターカートリッジを通して遠心分離を行うことにより各々のバンドからの抽出溶液を得た。

統計解析

結果はすべて平均±標準誤差で記載し、2 群間の比較には Student's *t*-test を用いた。3 群間以上の比較には ANOVA 検定、多重比較には Bonferroni 法を用いた。いずれも $p < 0.05$ を統計学的有意差があるとした。

結果

細胞刺激実験

ES をマウス線維芽細胞に作用させると、図 6・7 に示すように、ES の投与時間による *Vegf* の発現の変化は 12 時間後に前値の約 6.06 倍まで増加し、24 時間後には減少したが ($p < 0.05$)、cell lysate 中の *Vegf* の発現は 4 時間後、12 時間後で有意差を認めないものの、24 時間後に有意に増加した ($p < 0.01$)。また、図 8 に示すように、0.025-0.5 $\mu\text{g/mL}$ の蛋白濃度の範囲では ES 投与 12 時間後において濃度依存性に *Vegf* の発現上昇を認めていた ($p < 0.05$)。また、細胞の形態および密度はこの蛋白濃度の範囲内で明らかな細胞毒性は認めなかった。

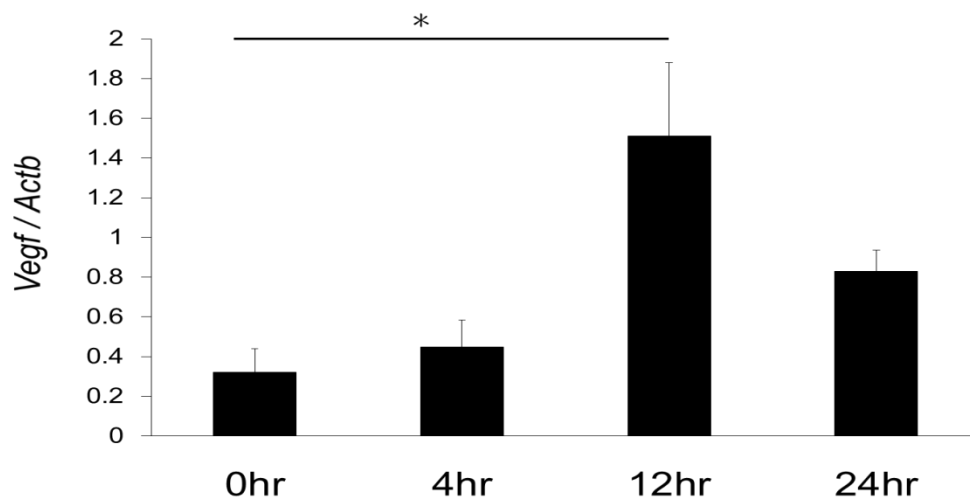


図 6 ES 添加後の *Vegf* の発現の経時的変化 (* $p < 0.05$, $n=8$ in each group)

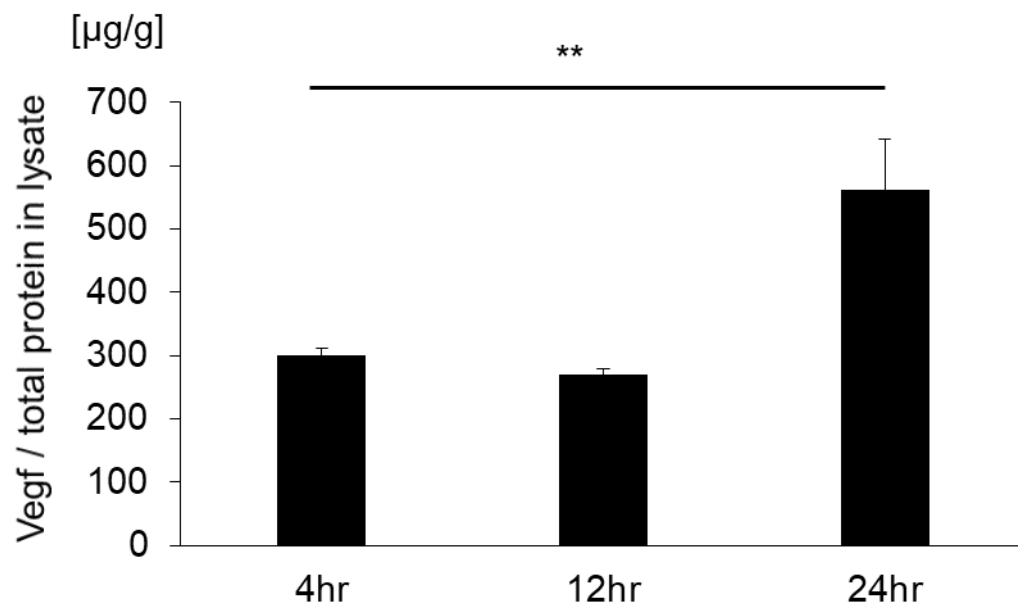


図7 ES 添加後の lysate 中の Vegf の発現の経時的変化 (** $p < 0.01$, $n = 8$ in each group)

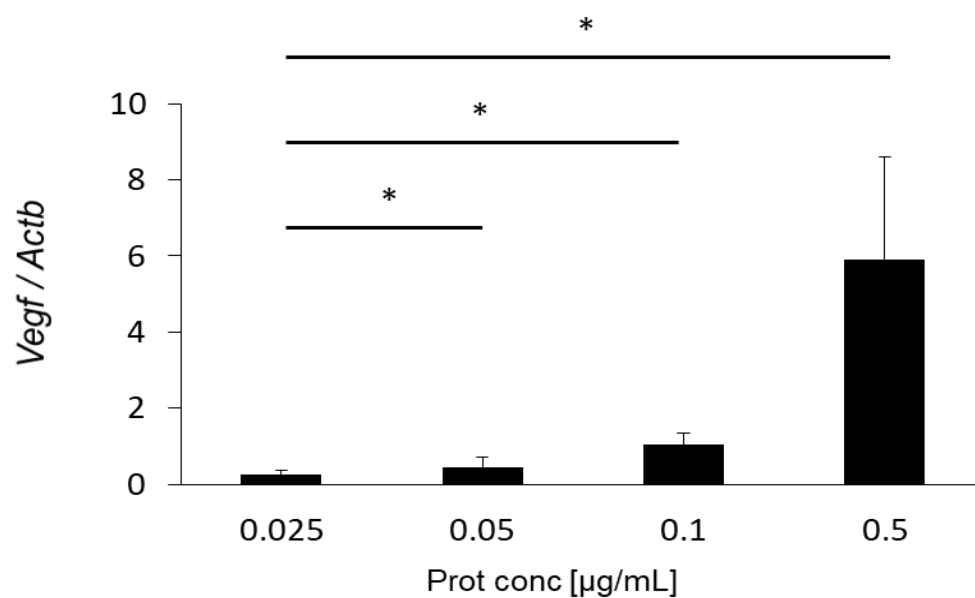


図8 ES 添加 12 時間後における ES 濃度別の Vegf の発現 (* $p < 0.05$, $n = 8$ in each group)

前項までで ES を添加することによる経時的、濃度依存性の *Vegf* および *Vegf* の発現上昇を示した。図 9 に示すように、ES 添加 12 時間後における *Vegf* 発現の上昇は、PI を ES とともに添加することにより有意に抑制された ($p<0.05$)。

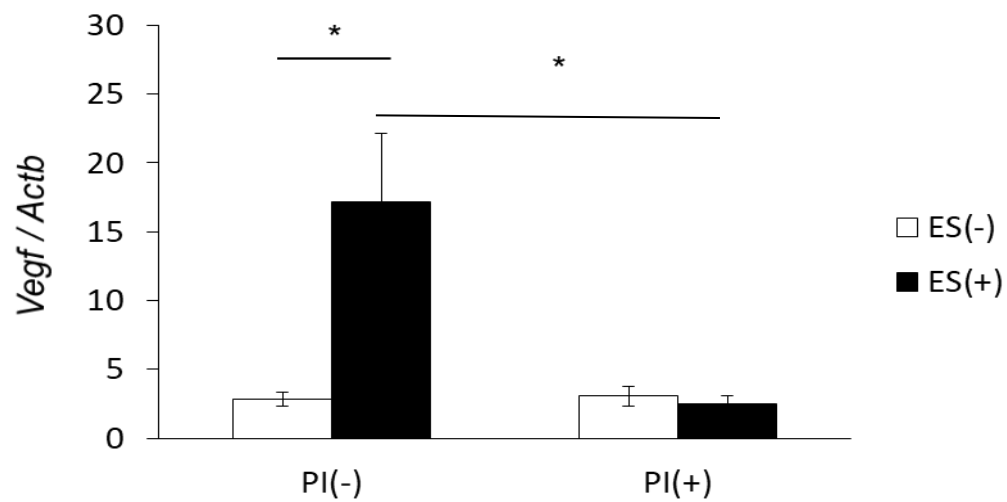


図 9 ES、PI 添加 12 時間後の *Vegf* の発現 (* $p<0.05$, $n=8$ in each group)

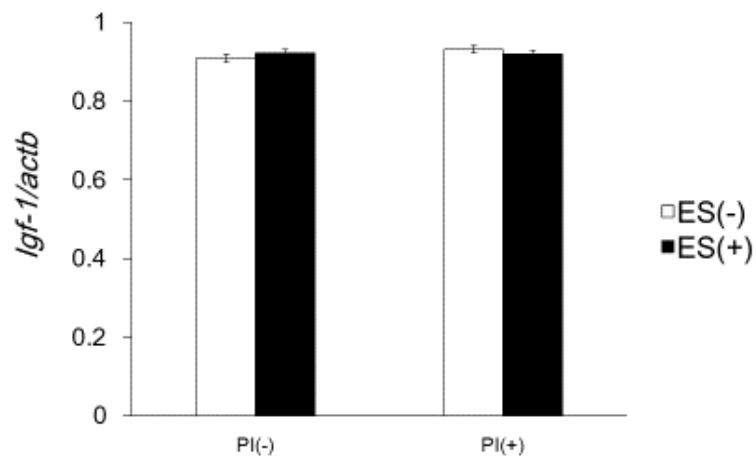


図 10 ES、PI 添加 12 時間後の *Igf-1* の発現 (n=8 in each group)

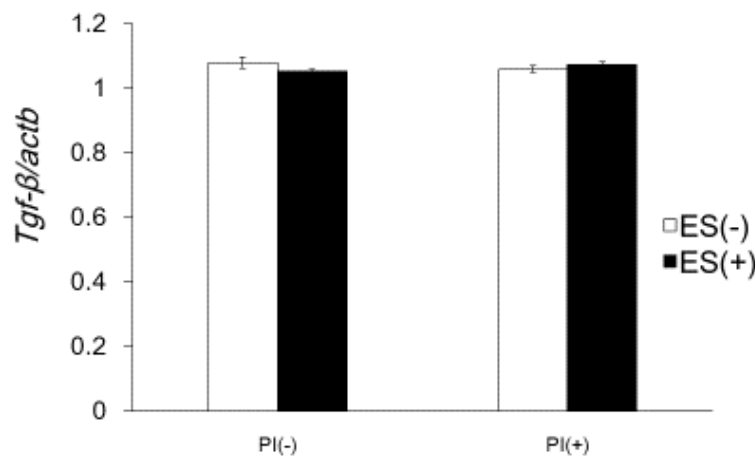


図 11 ES、PI 添加 12 時間後の *Tgf-β* の発現 (n=8 in each group)

図 10・11 に示す通り、*Igf-1*、*Tgf-β* の発現は ES 添加後も上昇を認めなかった。

また、PI 添加に伴う変化も認めなかった。

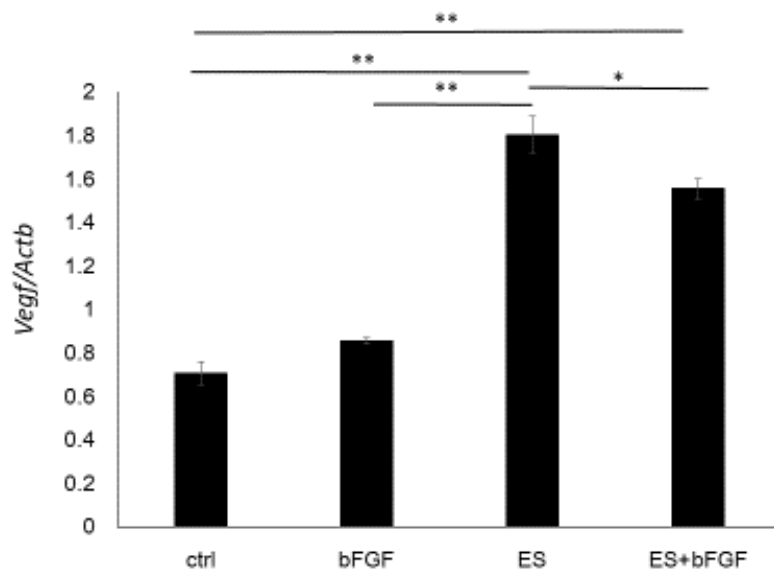


図 12 ES、bFGF 添加 12 時間後の *Vegf* の発現(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n=8$ in each group)

図 12 に示すように、添加 12 時間後において、Control 群と比較して ES 群 ($p < 0.01$)、ES+bFGF 群 ($p < 0.01$)のいずれも有意に *Vegf* の発現が上昇していた。また、ES 群では bFGF 群 ($p < 0.01$)、ES+bFGF 群 ($p < 0.05$)のいずれと比較しても有意な *Vegf* の発現上昇を認めていた。

細胞遊走実験

マウス線維芽細胞に ES を作用させ、作用 0 時間、24 時間後、48 時間後に遊走した細胞の結果を図 13 に示す。ES 群、PBS 群、ES+PI 群、PBS+PI 群でいずれも顕微鏡観察下では細胞の形態に変化を認めなかった。24 時間後の時点ではいずれの群においても、線維芽細胞の遊走を認めなかった。一方、48 時間後では ES 群においてのみ線維芽細胞の遊走を認めた。

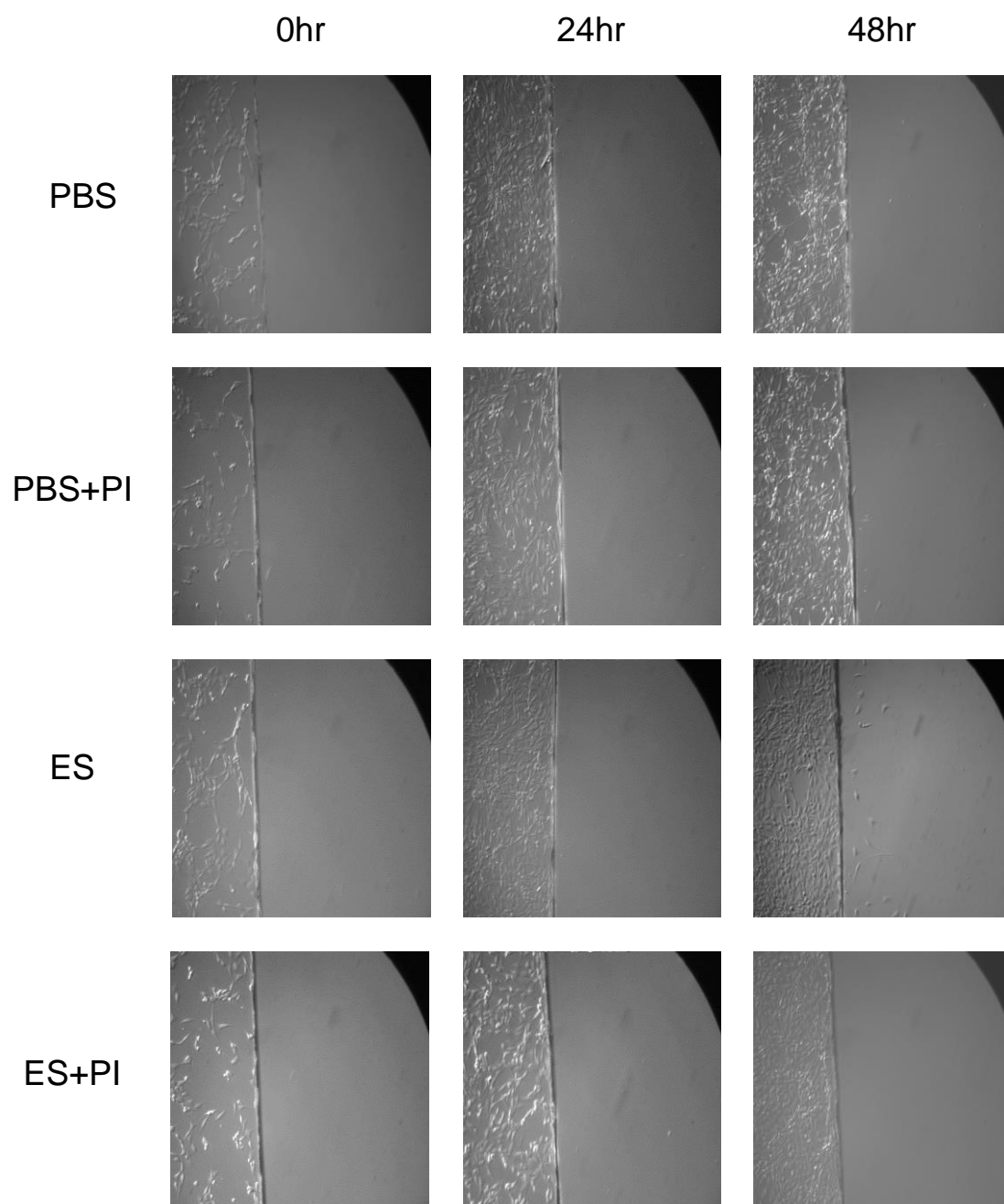


図 13 fibronectin-coated dish におけるマウス線維芽細胞の顕微鏡写真

マウス線維芽細胞に *cMet* siRNA を transfection し、*cMet* の発現を Q-PCR により評価した(n= 8 in each group)。図 14 に示すように、使用したすべての siRNA において *cMet* の有意な発現低下を認めていた ($p < 0.01$)。以降の実験では、最も強く *cMet* を抑制した siRNA3 を用いて knockdown を行った。

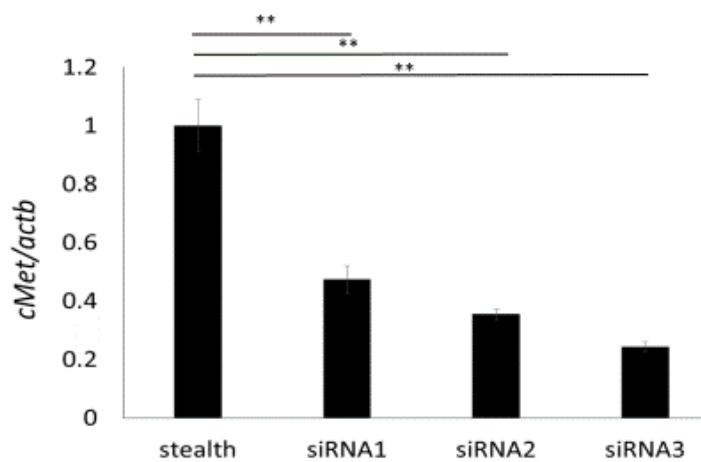
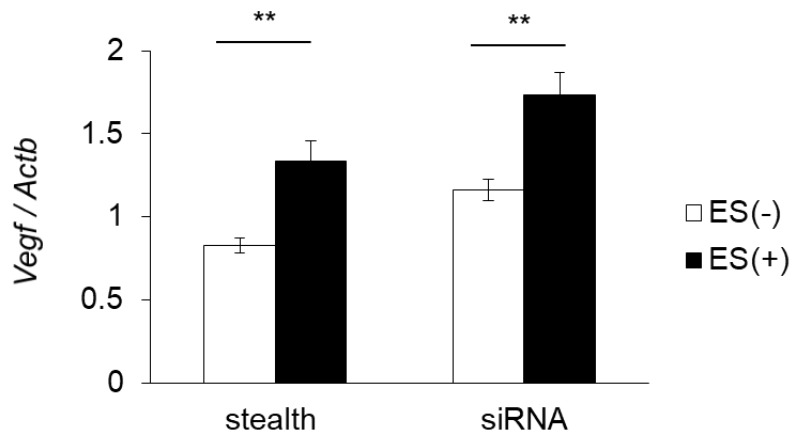


図 14 マウス線維芽細胞における *cMet* の knockdown (** $p < 0.01$, n= 8 in each group)

図 15(A) に示すように、*cMet* を knockdown した群においても control 群と同様に ES を加えることにより *Vegf* の発現上昇がみられた。図 15(B)に示すように *Hgf* は control 群にておいては ES を加えることにより有意な発現上昇を認めたが、その発現上昇は *cMet* を knockdown した群では見られなかった。

(A)



(B)

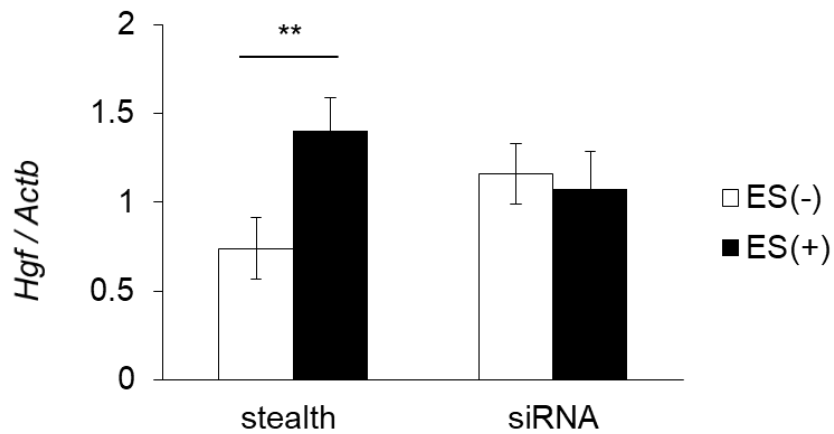
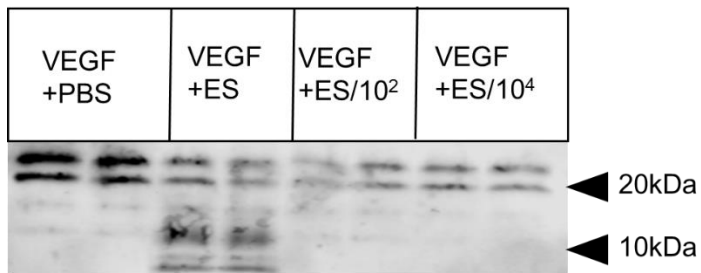
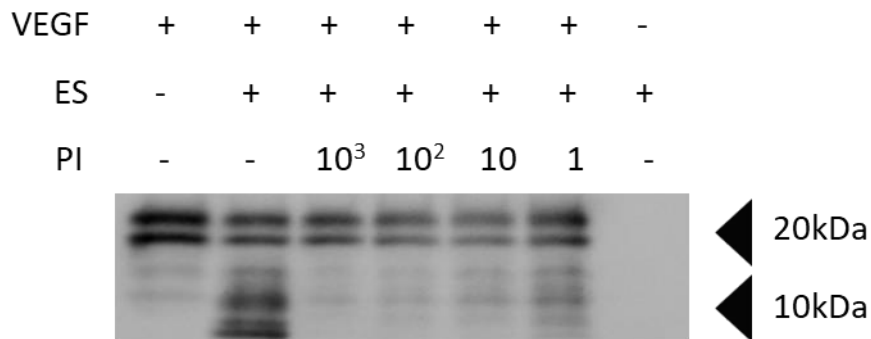


図 15 マウス線維芽細胞における *Vegf* (A)、*Hgf* (B) の発現量
cMet を knockdown させたマウスの線維芽細胞に ES を 12 時間作用させ、*Vegf*、*Hgf* の発現量を Q-PCR で評価した (** $p < 0.01$, $n = 8$ in each group)

(A)



(B)



(C)

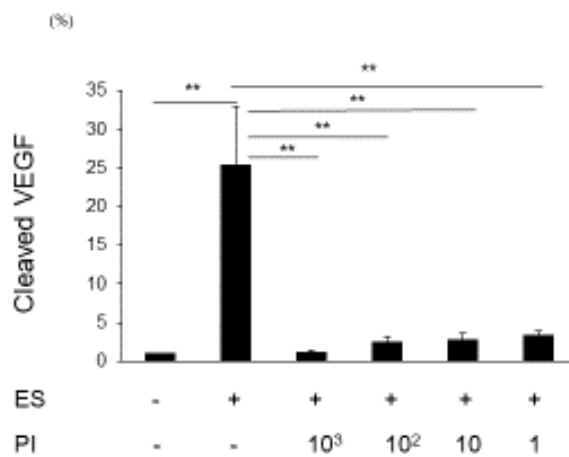


図 16 recombinant VEGF₁₈₉ の切断実験

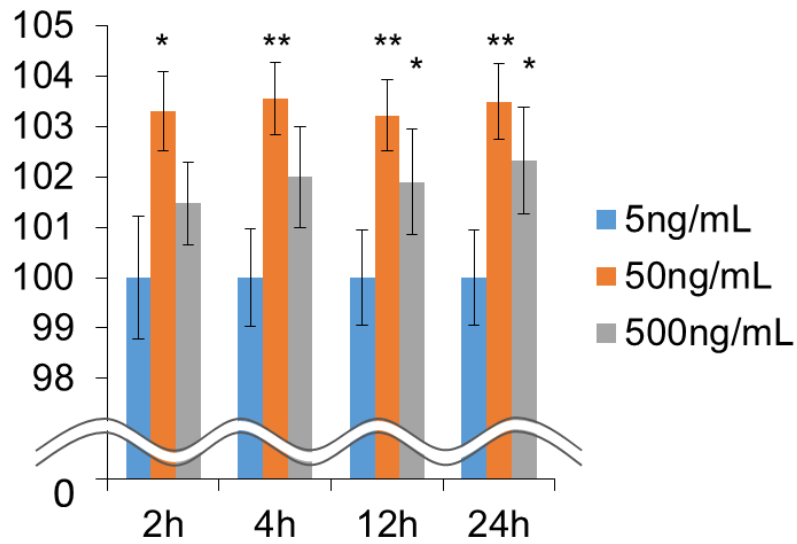
(A) さまざまな濃度での ES を作用させた recombinant VEGF₁₈₉ の切断を Western blot により検討した。(B) ES と濃度別の PI を添加した recombinant VEGF₁₈₉ の切断を Western blot により検討した。(C) (B)において切断後の主要なバンドについて定量評価した (** p<0.01, n=4 in each group)

VEGF に対する ES の作用を検討するため、一定量の recombinant VEGF₁₈₉ と原液または希釈した ES を反応させ、recombinant VEGF₁₈₉ の Fragmentation（すなわち活性化）の有無を調べた。recombinant VEGF₁₈₉ に ES（原液、10² 希釈、10⁴ 希釈）もしくは PBS を加え 37℃30 分間で反応させた後に Western blot 解析により評価すると、図 16(A)に示すように、PBS 群と比較して、VEGF+ES の群では約 14 kDa、10 kDa の fragment が確認できたが、ES の濃度が薄まるにつれてその fragment は確認されなくなった。また、図 16(B)・16(C)に示すように、recombinant VEGF と ES にさらに PI を加えて反応させるとその fragment の出現は抑制され、加えた PI の濃度が濃いほど fragment の出現がより強く抑制された。ES 単独で泳動したレーンでは VEGF の発現は認めなかった。

次に、図 17・18 に示すように、ES または PBS と反応させた recombinant VEGF と protein digestion buffer との混合液をマウス線維芽細胞の培養液中に投与した際の cell viability を Alamer blue assay を用いて評価した。各ウェル内の recombinant VEGF₁₈₉、recombinant VEGF₁₆₅ の最終濃度を 5、50、500 ng/mL とするよう調整した。50 ng/mL の濃度では 2-24 時間の範囲内で cell viability が有意に上昇していたが、より高濃度にするとその効果は消失・減弱した。また、ES と反応させた recombinant VEGF₁₆₅ においては線維芽細胞における cell viability の上昇は認めなかった。

(A)

Cell viability ratio



(B)

Cell viability ratio

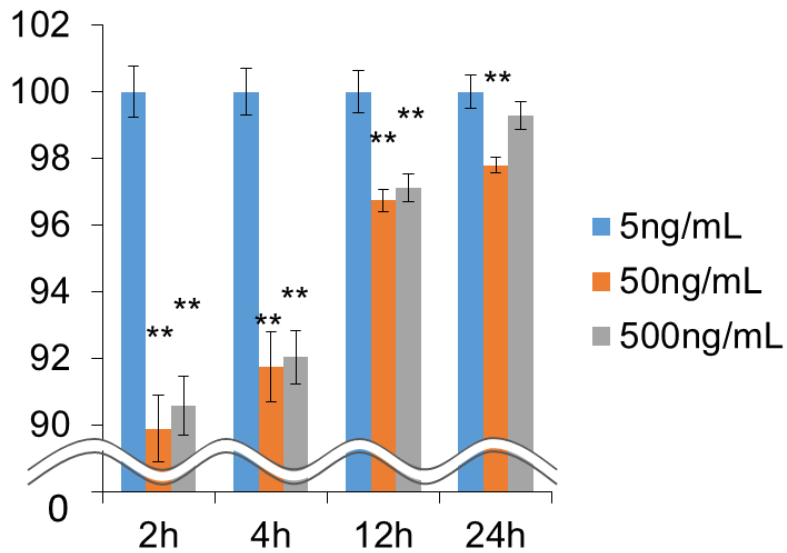
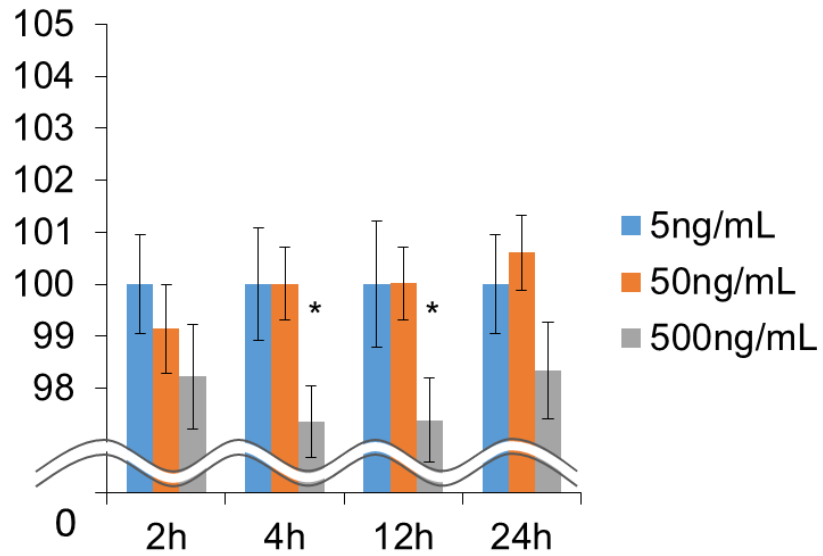


図 17 ES(A)もしくは PBS(B)と反応させた recombinant VEGF₁₈₉ を培地に添加したマウス線維芽細胞の cell viability の変化 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs 5 ng/mL; $n = 8$ in each group)

(A)

Cell viability ratio



(B)

Cell viability ratio

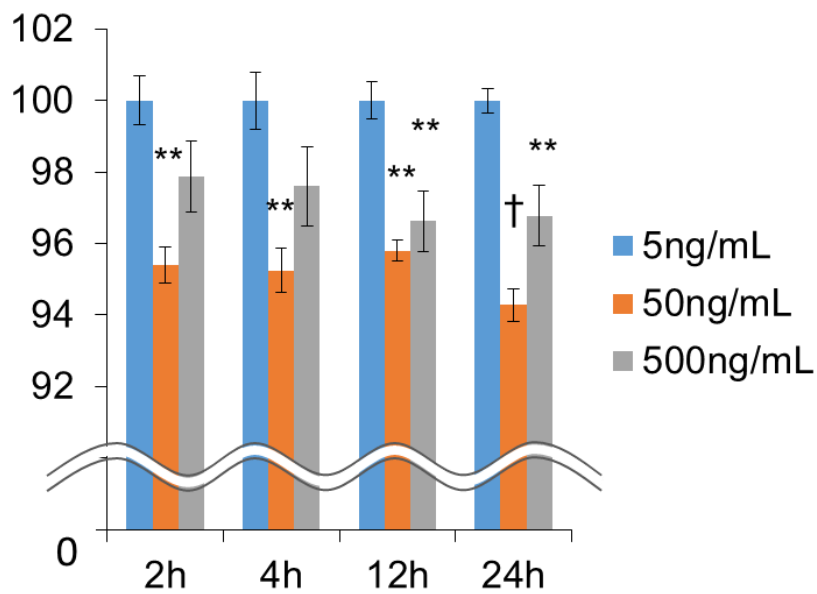


図 18 ES(A)もしくはPBS(B)を作用させた recombinant VEGF₁₆₅ を添加後のマウス線維芽細胞の cell viability の変化 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs 5 ng/mL; $n = 8$ in each group)

次に、ES もしくは PBS を作用させた recombinant VEGF₁₈₉ がどのようにマウス線維芽細胞における VEGFR2 のリン酸化を促進させるかについて、In cell Western 解析を用いて評価した[52]。図 19 に示す通り、ES 群では PBS 群と比較して ES 投与 10～30 分の範囲において有意に VEGFR2 のリン酸化が促進されていた。

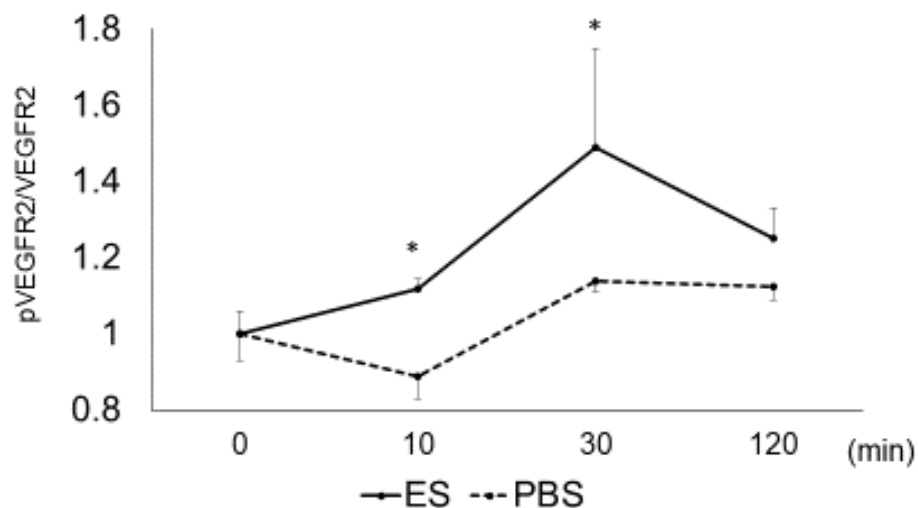


図 19 ES もしくは PBS を作用させた recombinant VEGF₁₈₉ を培養液中に添加した後の、マウス線維芽細胞における VEGF receptor2 のリン酸化の評価 (* p<0.05, n=12 in each group)

さらに、ES もしくは PBS を作用させた recombinant VEGF₁₈₉ がマウス線維芽細胞における Erk のリン酸化を促進させているかどうかについて、In cell Western 解析を用いて評価した[52]。図 20 に示す通り、ES と反応させた VEGF₁₈₉ を投与して 6 時間後に pErk/Erk は約 1.43 倍に上昇し、対照群と比較して有意にリン酸化が促進していた。24 時間後にはこのリン酸化は消失傾向にあった。

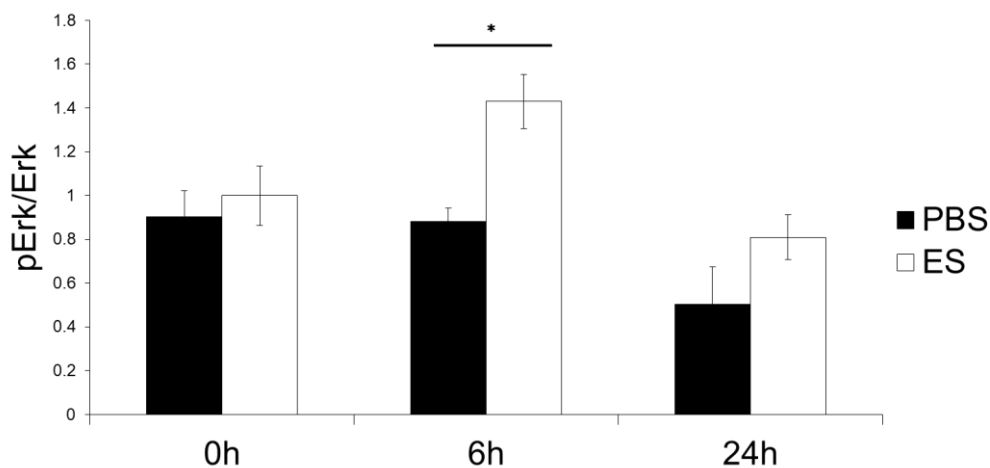


図 20 ES もしくは PBS を作用させた recombinant VEGF₁₈₉ を培養液中に添加した後の、マウス線維芽細胞における Erk リン酸化の評価(* $p < 0.05$, $n = 8$ in each group)

図 21 に示すように Zymogram を用いて、ES 中の protease の検出を行った。ES を Zymogram gel で泳動すると、40 kDa、34 kDa、30 kDa の位置にバンドを確認することができた。3 本のバンドのうち 40 kDa のバンドが最も強い活性を有していた。

次に、Zymogram で検出された ES 中の protease 活性を示す 3 箇所のバンドについて protein extraction kit from gels と 0.1% Tween を用いて抽出を試みた。バンドから抽出・精製した溶液が、元の ES と同様に recombinant VEGF を切断し得るのかについて Western blot 解析を用いて評価した。結果は、図 22 に示す通り、各々のバンドから抽出した溶液における VEGF₁₈₉ の切断は認めなかった。

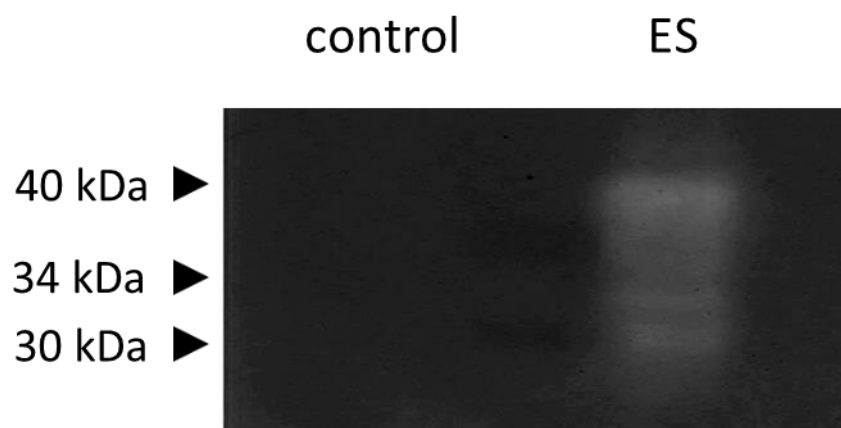


図 21 Zymogram の結果

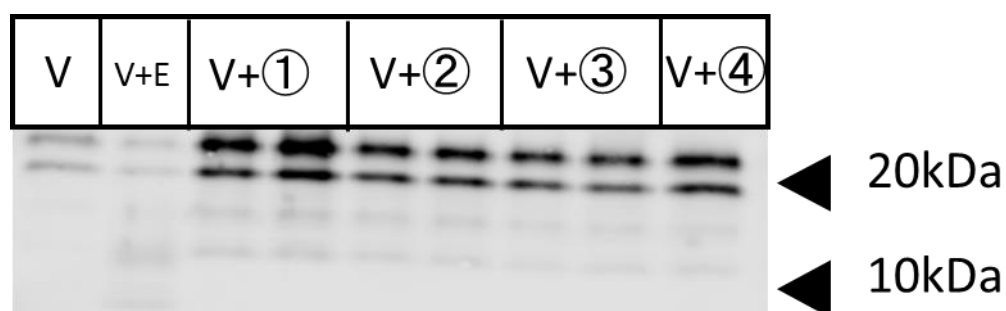


図 22 Zymogram で認めたバンドからの抽出溶液を用いた recombinant VEGF の切断実験

V: VEGF, E: ES

- ① 40 kDa からの抽出溶液
- ② 34 kDa からの抽出溶液
- ③ 30 kDa からの抽出溶液
- ④ 蒸留水を流したゲルからの抽出溶液

考察

創傷治癒における血管新生は、上皮細胞、線維芽細胞、マクロファージ、細胞外マトリックス等の相互作用の上に成り立つ複雑な過程を要する。マクロファージ、線維芽細胞等が血管新生を刺激する成長因子を産生し[53]、また細胞外マトリックスも上皮細胞の遊走に必要とされる *protease* を放出している[54]。創傷治癒における *proliferative phase* においては肉芽が形成される時期であり、肉芽組織は主に炎症細胞、線維芽細胞、新生血管から構成されるが[55]、中でも VEGF は創傷治癒において極めて重要な役割を担っている。また、VEGF 遺伝子療法は PAD のみならず虚血性心疾患などにおいても治療効果発現が報告されており、創傷部位局所の VEGF の発現上昇が治療効果発現に重要な役割を果たしていると考えられる。

Zhang らは、マウスの皮膚切除モデルの創部に、乾燥した *L. sericata* の幼虫をすり潰したのから採取した脂肪酸を塗布した群と、ワセリンを塗布した群を比較し、創部に脂肪酸を塗布した群において、より早期の創収縮・肉芽組織の形成を認めていることを報告した[56]。さらに、投与 3 日後において病理組織学的に高い密度の毛細血管の新生に加え、創部の VEGF の発現上昇を認めており、*L. sericata* から採取した脂肪酸がもたらす VEGF 発現上昇に伴う血管新生が医療用ウジ療法における創傷治癒に関与しているとした。しかし、臨床的には医療

用ウジ療法において *L. sericata* 幼虫自体が死滅することは少ないことから、その虫体を構成する蛋白が直接的に創部に作用するというよりはESが創部に生理的作用をもたらしていると考えの方がより正しいと考えられる。すなわち、ES内のどの構成成分がどのような過程を経て創傷治癒を促進していくのかということが、医療用ウジ療法の創傷治癒メカニズムを解明し、管理の必要な生物を要しない新たな治療の開発や創薬につながると期待される。本検討においては、より実臨床に近い形での治療効果発現メカニズム同定のために *L. sericata* 幼虫から収集したESを用いて、VEGFの産生、および構造変化について評価を行った。

マウスの線維芽細胞における細胞刺激実験の結果からは、ESを投与することによる局所の濃度依存性の *Vegf* の発現上昇、加えて投与12時間後を peak とした経時的な *Vegf* の発現上昇、cell lysate 中の *Vegf* の発現上昇を認めていた。医療用ウジ療法の前後で患肢大腿静脈血中の VEGF は上昇する傾向にあったという事実を踏まえると、本研究は線維芽細胞の豊富な創傷部位における VEGF の発現上昇が示唆される結果であった。ここでみられた *Vegf* の発現上昇はPIを加えることにより約0.15倍にまで抑制されており、ES中のproteaseが *Vegf* 産生を導く生理活性物質の一つであることが示された。VEGFの遺伝子発現に関与するものとして、HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1)に代表される低酸素刺激[57,58]に加

え、IGF-1[59]、TGF- β [60]などの成長因子が報告されている。このため、*Igf-1*、*Tgf- β* についても同様に ES・PI を添加した際の発現の検討を行ったが、こちらはES添加、PI添加どちらの後にもいずれも変化を認めていなかった。すなわち、ES 中に含まれる protease は IGF-1 や TGF- β といった他の成長因子を介さず直接的に VEGF の発現上昇に寄与しているということが明らかとなった。

近藤らは、線維芽細胞に対し 0.05～5.0 ng/ml の範囲内の bFGF を投与することによる *Vegf* の発現の上昇と、高血糖下での *Vegf* の発現上昇の鈍化を報告している[61]。本検討での糖濃度は 450 mg/dL と比較的高濃度であり、control 群と比較した際の bFGF 群の *Vegf* 発現上昇は明らかではなかったと考えられた。実際の治療現場においては、潰瘍部位については医療用ウジ療法を行い、創部辺縁の比較的良好な肉芽が見られる部位にはフィブラストスプレー® (bFGF 製剤)を噴霧することが少なくないが、併用のタイミングなどについては一定の見解がなかった。また、医療用ウジを除去した後の ES の効能が残っているのか、言い換えればいつ虫体除去後に生食洗浄をすればよいのかについてもこれまで一定の見解がなかった。ES 単独投与では ES+bFGF 群と比較して有意な *Vegf* 発現上昇を認めていることを考慮すると、フィブラストスプレー® (bFGF 製剤)との併用については、医療用ウジを創傷部位に置いて治療している期間は医療用ウジ療法単独で行い、創傷部位から医療用ウジを除去したのち、12-24 時間頃よりフィ

ブラストスプレー® (bFGF 製剤)を再開することが効果的である可能性が示唆された。また、創部の洗浄については、Vegf の発現上昇、VEGFR2/ERK の経路の活性化の経時的変化を考慮すると、単回の医療用ウジ療法において創部の *L. sericata* 幼虫の虫体除去後、12-24 時間以降に創部の洗浄を行うことが VEGF を介した経路においては効果的と考えられた。

医療用ウジ療法は複数の報告において臨床的な治療効果を認めており[62-64]、その機序として創部の壊死組織のデブリードメント、その後の良好な肉芽の増生の促進が考えられている。強い虚血下の慢性皮膚潰瘍においても創部の改善を認める場合があることから、肉芽組織の主要な構成細胞である線維芽細胞の遊走・増殖能を評価することが、治療メカニズムの解明につながると考えられる。本研究における細胞遊走実験において、ES を培養液中に添加した群で fibronectin coated dish においてマウス線維芽細胞の遊走を認めているが、ほかの 3 群においては線維芽細胞の遊走は観察されなかった。過去の報告において、ES の内の protease は、fibronectin を含む細胞外マトリックスを構成するたんぱく質を分解する作用があると報告されている[65,66]。また、コーティングに使用している fibronectin の濃度[67,68]や構造[69]によって線維芽細胞の接着能は変化し、細胞の接着能の強さによって線維芽細胞の運動性、遊走の速さが決まると考えられている[70]。Horobin らは、ES ないしは ES+protease inhibitor と fibronectin

混和して 12-48 時間培養を行い、fibronectin の切断の有無を Western blot 解析を用いて評価している[71]。ES 群においては少なくとも 12 時間経過した時点から fibronectin の切断は認めており、その後 48 時間経過するまで切断された fibronectin の分子に変化を認めなかった。一方で ES+protease inhibitor の群においては 48 時間後においてもほんのわずかしかな fibronectin の切断バンドは認めておらず、ごく一部のみしか fibronectin の切断は認めていなかった。本検討において、48 時間の時点で ES 群においては線維芽細胞の遊走像が観察できたのに対し、ES+PI 群においては観察時間すべてにおいて細胞の遊走像は確認できなかったことは上記の検討と合致していると考えられる。細胞遊走が確認されるまでの時間に報告と差があることに関しては、本検討においては細胞が接着しているスライドガラスと、そのスライドガラスを置いた 10 cm dish の間にわずかな段差があることから生じている可能性も考えられた。

次に図 15 に示すように、cMet の siRNA を transfection した系においても、VEGF は control 群と同様に ES 添加による *Vegf* の発現上昇を認めていた。マウス大腸菌細胞株の系で VEGF の発現は cMet レセプターを介する PI3K/Akt、MAPK、STAT3 で制御されている[72]と報告されているが、図 15 の結果より ES を加えることによる *Vegf* の発現上昇は cMet の downstream としての発現上昇ではなく、ES の線維芽細胞への直接刺激による *Vegf* 発現上昇であることが示唆された。ま

た、同じ系において、*Hgf* では control 群において有意な発現上昇を認めたものの、その発現上昇は transfection 群においてはみられなかった。*cMet* の下流に存在する *c-Src*・*STAT3* が *HGF* の発現を上昇させるという報告[73]にもあるように、このことは *Hgf* の *cMet* レセプター/*Stat3* を介する positive feedback 機構の存在を示唆する結果であると考えられる。

各種 growth factor の分子内切断がその分子の活性化、生物活性の転換、分解などに関与していることが報告されている。中でも VEGF ファミリーの中ではリンパ脈管新生に関与するとされる VEGF-C、VEGF-D では、プラスミンによる細胞外での切断がその活性化に必要であると報告されている[74]。VEGF-A に関しては、Houck らの報告では、protease 等による蛋白分解による活性化は見られないが、VEGF-A₁₈₉、VEGF-A₂₀₆ などのよりアミノ酸数が多い isoform においては分泌されたままの状態では、VEGF receptor の活性化、その後の VEGF receptor の downstream の活性化が妨げられており、VEGF の作用する血管内皮細胞などの上皮細胞の増殖のためには VEGF の切断が必要であるとされている[75]。

図 17・18 に示すように、recombinant VEGF₁₈₉、recombinant VEGF₁₆₅ に ES ないしは PBS を反応させたものと protein digestion buffer の混合液を、マウス線維芽細胞の培養液に添加した際の cell viability の評価においては、recombinant VEGF₁₆₅ を添加した際には線維芽細胞の cell viability に影響を与えなかったのに

対し、recombinant VEGF₁₈₉ 50 ng/mL を培養液中に添加すると 2-24 時間の範囲内で cell viability が有意に増加していた。しかし、より高濃度の群においてはその cell viability の増加は見られなくなっていた。この結果の解釈では ES ないしは PBS と反応させた recombinant VEGF による効果だけでなく、protein digestion buffer の内容物による影響も考慮する必要がある。眼科領域の報告において、VEGF₁₆₅ では線維芽細胞の増殖能を認めないのに対し、VEGF₁₈₉ は線維芽細胞の細胞増殖を促すことが過去に報告されている[76]。今回の cell viability の検討において PBS 群では投与した recombinant VEGF の濃度依存性に細胞生存率の低下傾向が見られていたが、これは VEGF 切断に使用した protein digestion buffer が pH 8.8 とアルカリ性であり、buffer 中の tris hydroxymethyl aminomethane が intracellular alkalosis を起こして細胞毒性を生じさせたことが影響していた[77]可能性がある。すなわち、図 17(B)の意味するところとしては、PBS を作用させた recombinant VEGF₁₈₉ では、tris hydroxymethyl aminomethane の持ち込みが多くなる recombinant VEGF 50 ng/mL および 500 ng/mL の 2 群では低濃度の 5 ng/mL よりも細胞の生存率は低下していると考えられた。また、図 17(A)については、ES を作用させた recombinant VEGF₁₈₉ において 50 ng/mL では細胞増殖効果が強くなるが、500 ng/mL になると増殖効果よりもやや毒性が上回る結果であると考えられた。

L. sericata 由来の protease についてはあまり知られていないが、他の生物種における protease の多面的な効果については報告がなされている。その効果は血管新生や、免疫学的作用など多岐にわたる。*Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*、日本名:ショウジョウバエ)の自然免疫では、5 種類の serine protease が Toll 経路の活性化を制御することに貢献していると報告されている[78]。また、*Drosophila* 由来の serine protease はグラム陽性菌や、真菌に対する抗菌作用があると報告されている[79]。一方で、*L. sericata* 由来の ES の抗菌作用についても、グラム陰性菌に比べて MRSA を含むグラム陽性菌に対する作用がより強いと報告されている[80-82]。*D. melanogaster* と *L. sericata* において同様の抗菌作用を有していることから、*L. sericata* を用いた医療用ウジ療法においても serine protease が免疫学的に重要な役割を果たしていると考えられた。

図 21 に示すように、ES 内の protease 活性の有無を確認する目的で行った Zymogram では、30 kDa、34 kDa、40 kDa の分子量の部位に protease 活性を示すバンドの存在を認めた。各々のバンドの中では 40 kDa の分子量のバンドが一番強い protease 活性を有していた。ここで得られた 3 本のバンド各々からの抽出物を用いて、ES 中の protease のどの分画が強い VEGF の切断活性を有しているのかを評価・同定する目的で、再び recombinant human VEGF₁₈₉ を用いて VEGF の切断の評価を Western blot 解析を用いて行った。しかし、各々のバンドから得ら

れた抽出物で切断活性の比較を行うことは困難であった。原因としては下記の 2 つが考えられる。第一に、Zymogram を行う際に添加した ES 量が 0.84 $\mu\text{g}/\text{well}$ と非常に少量であったために、ゲルから得た抽出バッファー中に十分な量の protease が含まれなかった可能性が考えられる。第二に、図 22 に示すように、蒸留水を泳動したレーンから採取した抽出物と、protease 活性を示すバンドから採取した抽出物とで同様の結果を示していることから、Zymogram gel での基質との反応あるいはその後の電気泳動中に、protease の変性ないしは protease 活性が失活してしまっている可能性が考えられる。温度変化による protease の変性あるいはその失活をゲルからの抽出の過程で抑えるために、より低温で抽出時間を長くする条件も検討し、Western blot 解析を行ったが、高温の条件と同様 protease は抽出できなかった。

創傷におけるESの作用

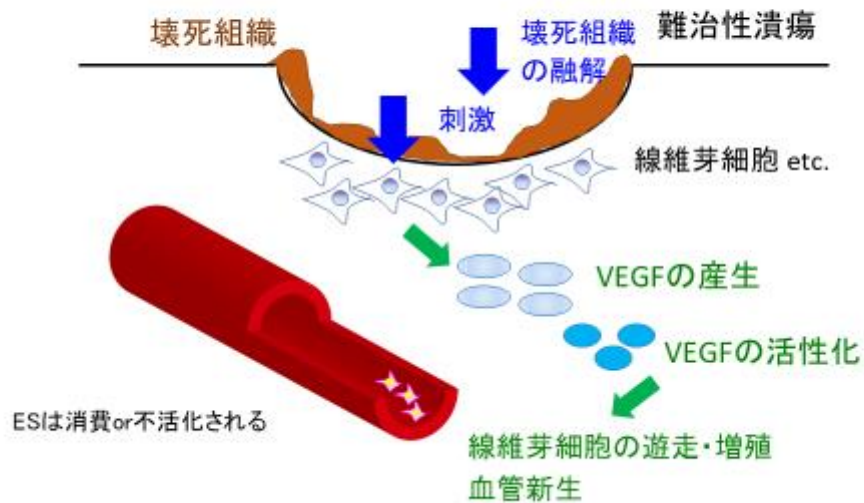


図 23 創傷部位における ES の VEGF を介した作用機序

上記をまとめると、図 23・24 に示すように、*L. 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 による線維芽細胞による局所の濃度依存性・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、VEGFR2/ERK の系を介した血管新生・肉芽増生を促進することにより、創傷治癒に関与していると考えられた。

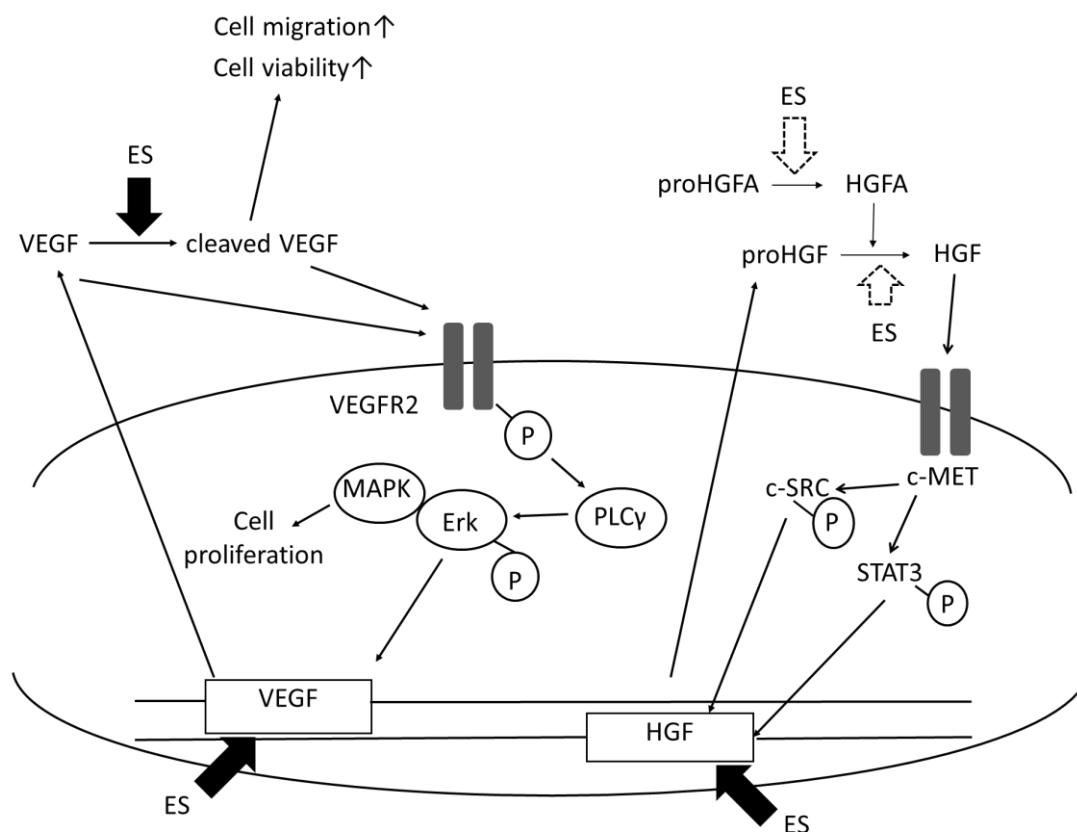


図 24 ES を介した創傷治癒の分子メカニズム
ES により VEGF・HGF の発現上昇、VEGF の切断、VEGFR/MAPK/ERK の活性化、cell viability の上昇、遊走能の向上をきたす

本研究の限界としては、第一に *L. sericata* 由来の serine protease が創傷治癒メカニズムに関与していると想定されるが、より詳細なプロファイルを突き止めることができなかったことである。今後、アミノ酸分析などを含む成分解析の手法も用いて protease の解析を行うことにより、生物由来の protease を用いた今後の創薬に関与していくことを検討している。第二に、低酸素条件下等における *in vitro* の検討を行えていないことがあげられる。医療用ウジ療法は糖尿病性壊疽や静脈潰瘍等の非虚血性疾患における有用性のみならず、PAD などの虚血

性疾患での有用性が報告されており、低酸素条件下等での検討を行うことで、
虚血性疾患・非虚血性疾患における医療用ウジ療法の治療メカニズムの違いを
見出すことができる可能性がある。第三に、*in vivo* の検討を行えていないこと
があげられる。今後、創傷モデルマウス等を用いて、ES 投与における創部の修
復・肉芽形成、また組織における局所の新生血管の密度の評価、*paracrine* 機構
における血管内皮細胞における VEGF/VEGFR2/ERK の系の活性化の評価を行い、
今回の *in vitro* の系で得られた結果の再評価を行いたいと考えている。

結論

L. sericata の幼虫から得た ES を、マウス線維芽細胞を用いた検討を行うことにより、ES 中の protease による線維芽細胞からの局所の VEGF 発現上昇、線維芽細胞の遊走能向上に加えて、創傷部位における VEGF の切断にともなう VEGF/VEGFR/ERK の系の活性化を確認した。これらが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。今後 *L. 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創傷治癒を促進する治療薬の開発の一助になることが期待される。

引用文献

- 1 Nugent R: Chronic diseases in developing countries: health and economic burdens. *Ann N Y Acad Sci*; **1136**: 70–79; 2008
- 2 2014 年度合同研究班報告. 末梢閉塞性動脈疾患の治療ガイドライン(2015 年改訂版). http://www.j-circ.or.jp/guideline/pdf/JCS2015_miyata_h.pdf
- 3 Ferket BS, Spronk S, Colkesen EB and Hunink MG: Systematic review of guidelines on peripheral artery disease screening. *Am J Med*; **125**: 198-208; 2012
- 4 Fowkes FG, Rudan D, Rudan I, Aboyans V, Denenberg JO, McDermott MM, Norman PE, Sampson UK, Williams LJ, Mensah GA and Criqui MH: Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet*; **382**: 1329-40; 2013
- 5 Aboyans V, Criqui MH, Abraham P, Allison MA, Creager MA, Diehm C, Fowkes FG, Hiatt WR, Jönsson B, Lacroix P, Marin B, McDermott MM, Norgren L, Pande RL, Preux PM, Stoffers HE, Treat-Jacobson D; American Heart Association Council on Peripheral Vascular Disease; Council on Epidemiology and Prevention; Council on Clinical Cardiology; Council on Cardiovascular Nursing; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, and Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia: Measurement and interpretation of the ankle-brachial index: a scientific statement from

the American Heart Association. *Circulation*; **126**: 2890-909; 2012

6 Usui T, Ninomiya T, Nagata M, Doi Y, Hata J, Fukuhara M and Kiyohara Y: Albuminuria as a risk factor for peripheral arterial disease in a general population: the Hisayama study. *J Atheroscler Thromb*; **18**:705-12; 2011

7 Ohnishi H, Sawayama Y, Furusyo N, Maeda S, Tokunaga S and Hayashi J: Risk factors for and the prevalence of peripheral arterial disease and its relationship to carotid atherosclerosis: the Kyushu and Okinawa Population Study (KOPS). *J Atheroscler Thromb*; **17**: 751-8; 2010

8 Fujiwara T, Saitoh S, Takagi S, Ohnishi H, Ohata J, Takeuchi H, Isobe T, Chiba Y, Katoh N, Akasaka H and Shimamoto K: Prevalence of asymptomatic arteriosclerosis obliterans and its relationship with risk factors in inhabitants of rural communities in Japan: Tanno-Sobetsu study. *Atherosclerosis*; **177**: 83-8; 2004

9 Bhatt DL, Steg PG, Ohman EM, Hirsch AT, Ikeda Y, Mas JL, Goto S, Liao CS, Richard AJ, Röther J, Wilson PW; REACH Registry Investigators: International prevalence, recognition, and treatment of cardiovascular risk factors in outpatients with atherothrombosis. *JAMA*; **295**: 180-9; 2006

10 Steg PG, Bhatt DL, Wilson PW, D'Agostino R Sr, Ohman EM, Röther J, Liao CS, Hirsch AT, Mas JL, Ikeda Y, Pencina MJ, Goto S; REACH Registry Investigators:

One-year cardiovascular event rates in outpatients with atherothrombosis. *JAMA*; **297**: 1197-206; 2007

11 Tsurumi-Ikeya Y, Tamura K, Azuma K, Mitsuhashi H, Wakui H, Nakazawa I, Sugano T, Mochida Y, Ebina T, Hirawa N, Toya Y, Uchino K and Umemura S: Sustained inhibition of oxidized low-density lipoprotein is involved in the long-term therapeutic effects of apheresis in dialysis patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; **30**: 1058-65; 2010

12 Kranke P, Bennett M, Roeckl-Wiedmann I and Debus S: Hyperbaric oxygen therapy for chronic wounds. *Cochrane Database Syst Rev*; **2**: CD004123; 2004

13 Ubbink DT, Vermeulen H. Spinal cord stimulation for non-reconstructable chronic critical leg ischaemia. *Cochrane Database Syst Rev*; **2**: CD004001; 2013

14 Mitsuyoshi Takahara: Critical Limb Ischemia in Japan: Clinical Impact of Diabetes Mellitus, Dialysis, and Subclinical Limb Ischemia. *J Jpn Coll Angiol*; **57**: 139-144; 2017

15 Azuma N, Uchida H, Kokubo T, Koya A, Akasaka N, and Sasajima T: Factors influencing wound healing of critical ischaemic foot after bypass surgery: is the angiosome important in selecting bypass target artery? *Eur J Vasc Endovasc Surg*; **43**: 322-328; 2012

- 16 Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG; TASC II Working Group: Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg*; **45** Suppl S:S5-67; 2007
- 17 Sherman RA, Hall MJ and Thomas S: Medicinal maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions. *Annu Rev Entomol*; **5**: 55-81; 2000
- 18 Baer WS: The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the blowfly). *J Bone Joint Surg*; **13**: 438; 1931
- 19 Nigam Y, Bexfield A, Thomas S and Ratcliffe NA. Maggot Therapy: the science and implication for CAM Part1 - History and bacterial resistance. *Evid Based Complement Alternat Med*; **3**: 223-7; 2006
- 20 Mitsui H, Kawabata T, Ugaki S, Ohsawa S, Fujii Y and Sano S: Successful Treatment of severe ischemic foot ulcer with sterile maggots: the first case in this country. *Jpn J Vasc Surg*; **14**: 653-657; 2005
- 21 医療技術評価分科会における評価の対象となる技術（案） .
<http://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-12404000-Hokenkyoku-Iryouka/0000181875.pdf>
- 22 Bowling FL, Salgami EV and Boulton AJ: Larval therapy: a novel treatment in eliminating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from diabetic foot ulcers.

Diabetes Care; **30**: 370-371; 2007

23 藤本啓志, 宮本正章, 高木 元, 山下照代, 水野博司, 小池幸子, 高野照夫:
医療用ウジを用いた多剤耐性緑膿菌 (MDRP) 感染糖尿病性壊疽の治療. *糖尿病*
49: 517-521; 2006

24 Sherman RA: Maggot therapy for treating diabetic foot ulcers unresponsive to
conventional therapy. *Diabetes care*; **26**: 446-451; 2003

25 Sherman RA: Maggot versus conservative debridement therapy for the treatment
of pressure ulcers. *Wound Repair Regen*; **10**: 208-214; 2002

26 Dumville JC, Worthy G, Bland JM, Cullum N, Dowson C, Iglesias C, Mitchell JL,
Nelson EA, Soares MO, Torgerson DJ; VenUS II team (2009) Larval therapy for leg
ulcers (VenUS II): randomised controlled trial. *BMJ*; **338**: b773 doi:10.1136bmj.b773

27 Kerridge A, Lappin-Scott H and Stevens JR: Antibacterial properties of larval
secretions of the blowfly, *Lucilia sericata*. *Medical and Veterinary Entomology*; **19**:
333-337; 2005

28 Bexfield A, Nigam Y, Thomas S and Ratcliffe NA: Detection and partial
characterisation of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the
medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant
Staphylococcus aureus(MRSA). *Microbes Infect*; **6**: 1297-1304; 2004

- 29 Prete PE: Growth effects of *Phaenicia sericata* larval extracts on fibroblasts : mechanism for wound healing by maggot therapy. *Life Sciences*; **60**: 505-510; 1997
- 30 Honda K, Okamoto K, Mochida Y, Ishioka K, Oka M, Maesato K, Ikee R, Moriya H, Hidaka S, Ohtake T, Doi K, Fujita T, Kobayashi S, and Noiri E : A novel mechanism in maggot debridement therapy: protease in excretion/secretion promotes hepatocyte growth factor production. *Am J Cell Physiol*; **301**: 1423-1430; 2011.
- 31 Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G: Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med*; **133**: 275–288; 1971
- 32 Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS and Dvorak HF: Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*; **219**: 983-985; 1983
- 33 Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J and Connolly DT: Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*; **246**: 1309-1312; 1989
- 34 Schultz GS, Sibbald RG, Falanga V, Ayello EA, Dowsett C, Harding K, Romanelli M, Stacey MC, Teot L and Vanscheidt W: Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound Repair regen*; **11**: S1-28; 2003
- 35 Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B and Leung DW: The vascular

endothelial growth factor family: Identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol*; **5**: 1806-1814; 1991

36 Park JE, Keller GA and Ferrara N: The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* ;**4**: 1317-26; 1993

37 Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C and Alitalo K: Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol*; **5**: 74-80; 2004

38 Fong GH, Rossant J, Gertsentein M, Breitman ML. Role of the Flt- 1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*; **376**: 66-70; 1995

39 Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML and Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk- 1 -deficient mice. *Nature*; **376**: 62-66; 1995

40 Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt- 1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*; **95**: 9349-54; 1998

- 41 Millauer B, Wизigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NPH, Risau W and Ullrich A: High affinity VEGF binding and developmental expression suggest flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*; **72**: 835-846; 1993
- 42 Imoukhuede PI, Popel AS: Expression of VEGF receptors on endothelial cells in mouse skeletal muscle. *PLoS One*; **7**: e44791; 2012
- 43 Takahashi T and Shibuya M: The 230 kDa mature form of KDR/Flk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene*; **14**: 2079-89; 1997
- 44 Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, Rosenfield K, Razvi S, Walsh K and Symes JF: Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet*; **348**:370-374; 1996
- 45 Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K and Isner JM: Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation*; **97**: 1114-23; 1998
- 46 Isner JM, Baumgartner I, Rauh G, Schainfeld R, Blair R, Manor O, Razvi S and Symes JF. Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger' s disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor : preliminary clinical results . *J Vasc*

Surg; **28**: 964-75; 1998

47 Satoshi Shintani and Toyooki Murohara: Angiogenic Cytokine: VEGF. *J Jpn Coll Angiol*; **46**: 289-295; 2006

48 Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, Ashare AB, Lathi K and Isner JM: Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation*; **98**: 2800–2804; 1998

49 Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, Sanborn TA, Parikh M, Bergman GW, Hachamovitch R, Szulc M, Kligfield PD, Okin PM, Hahn RT, Devereux RB, Post MR, Hackett NR, Foster T, Grasso TM, Lesser ML, Isom OW and Crystal RG: Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation*; **100**: 468-74; 1999

50 Plouët J, Moro F, Bertagnolli S, Coldeboeuf N, Mazarguil H, Clamens S and Bayard F: Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect. *J Biol Chem*; **272**: 13390-6; 1997

51 Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*; **72**: 248-54;1976

52 Hector N. Aguilar, Barbara Zielnik, Curtis N. Tracey, Bryan F. Mitchell: Quantification of Rapid Myosin Regulatory Light Chain Phosphorylation Using High-Throughput In-Cell Western Assays: Comparison to Western Immunoblots. *PLoS One*; **5**: e9965; 2010

53 Tonnesen MG, Feng X and Clark RA: Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc*; **5**: 40-46; 2000

54 Kajdaniuk D, Marek B, Borgiel-Marek H and Kos-Kudła B: Vascular endothelial growth factor (VEGF)—part 1: in physiology and pathophysiology. *Endokrynol Pol*; **62**: 444–455; 2011

55 Favia G, Mariggio MA, Maiorano F, Cassano A, Capodiferro S and Ribatti D: Accelerated wound healing of oral soft tissues and angiogenic effect induced by a pool of aminoacids combined to sodium hyaluronate (AMINOGAM). *J Biol Regul Homeost Agents*; **22**: 109-116; 2008

56 Zhang Z, Wang S, Diao Y, Zhang J and Lv D: Fatty acid extracts from *Lucilia sericata* larvae promote murine cutaneous wound healing by angiogenic activity. *Lipids Health Dis*; **9**: 24; 2010

- 57 Dachs GU and Tozer GM: Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *Eur J Cancer*; **36**: 1649-60; 2000
- 58 Tsuzuki Y, Fukumura D, Oosthuyse B, Koike C, Carmeliet P and Jain RK: Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1alpha hypoxia response element VEGF cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors. *Cancer Res*; **60**: 6248-52; 2000
- 59 Akagi Y, Liu W, Zebrowski B, Xie K and Ellis LM: Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by insulin-like growth factor-I. *Cancer Res*; **58**: 4008-14; 1998
- 60 Young VJ, Ahmad SF, Brown JK, Duncan WC and Horne AW: Peritoneal VEGF-A expression is regulated by TGF- β 1 through an ID1 pathway in women with endometriosis. *Sci Rep*; **5**: 16859; 2015
- 61 Noriko Kondo, Hajime Inoue, Kyoichi Matsuzaki, Masaki Aihara, and Norio Kumagai: Effects of Hyperglycemic Conditions on Growth of Fibroblasts and Secretion of Growth Factors. *St. Marianna Med J*; **30**: 447–453; 2002
- 62 Bonn D: Maggot therapy: an alternative for wound infection. *Lancet*; **356**: 1174; 2000
- 63 Mumcuoglu KY: Clininacl applications for maggots in wound care. *Am J Clin*

Dermatol; **2**: 219-27; 2001

64 Parnes A, Lagan KM: Larval therapy in wound management: a review. *Int J Clin Pract*; **61**: 88-93; 2007

65 Horobin AJ, Shakesheff KM, Woodrow S, Robinson C, Pritchard DI: Maggots and wound healing: an investigation of the effects of secretions from *Lucilia sericata* larvae upon interactions between human dermal fibroblasts and extracellular matrix components. *Br J Dermatol*; **148**: 923-33; 2003

66 Chambers L, Woodrow S, Brown AP, Harris PD, Phillips D, Hall M, Church JC, Pritchard DI: Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds. *Br J Dermatol*; **148**: 14-23; 2003

67 Wang N, Ingber DE: Control of cytoskeletal mechanics by extracellular matrix, cell shape, and mechanical tension. *Biophys J*; **66**: 2181-9; 1994

68 Püschel HU, Chang J, Müller PK, Brinckmann J: Attachment of intrinsically and extrinsically aged fibroblasts on collagen and fibronectin. *J Photochem Photobiol B*; **27**: 39-46; 1995

69 Pierschbacher MD, Ruoslahti E: Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*; **309**: 30-3; 1984

- 70 Pierschbacher MD, Hayman EG, Ruoslahti E: The cell attachment determinant in fibronectin. *J Cell Biochem*; **28**: 115-26; 1985
- 71 Horobin AJ, Shakesheff KM, Pritchard DI: Maggots and wound healing: an investigation of the effects of secretions from *Lucilia sericata* larvae upon the migration of human dermal fibroblasts over a fibronectin-coated surface. *Wound Repair Regen*; **13**: 422-33; 2005
- 72 Matsumura A, Kubota T, Taiyoh H, Fujiwara H, Okamoto K, Ichikawa D, Shiozaki A, Komatsu S, Nakanishi M, Kuriu Y, Murayama Y, Ikoma H, Ochiai T, Kokuba Y, Nakamura T, Matsumoto K, and Otsuji E : HGF regulates VEGF expression via the c-Met receptor downstream pathways, PI3K/Akt, MAPK and STAT3, in CT26 murine cells. *Int J Oncol*; **42**: 535-42; 2013
- 73 Hung W and Elliott B: Co-operative effect of c-Src tyrosine kinase and Stat3 in activation of hepatocyte growth factor expression in mammary carcinoma cells. *J Biol Chem*; **276**: 12395-403; 2001
- 74 McColl BK, Baldwin ME, Roufail S, Freeman C, Moritz RL, Simpson RJ, Alitalo K , Stacker SA and Achen MG: Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D. *J Exp Med*; **198**: 863-8; 2003
- 75 Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B and Leung DW: The vascular

endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol*; **5**: 1806-14; 1991

76 Van Bergen T, Vandewalle E, Van de Veire S, Dewerchin M, Stassen JM, Moons L and Stalmans I: The role of different VEGF isoforms in scar formation after glaucoma filtration surgery. *Exp Eye Res*; **93**: 689-99; 2011

77 Brasch H, Iven H and Körner J: Significance of acid base status, respiration, Na⁺-and K⁺-concentrations and plasma glucose for acute toxicity of TRIS (hydroxymethyl-)aminomethane in rats. *Archives of Toxicology*; **51**: 139-49; 1982

78 Zakaria Kambris, Sylvain Brun, In-Hwan Jang, Hyuck-Jin Nam, Yves Romeo, Kuniaki Takahashi, Won-Jae Lee, Ryu Ueda, and Bruno Lemaitre: *Drosophila* Immunity: A Large-Scale In Vivo RNAi Screen Identifies Five Serine Proteases Required for Toll Activation. *Current Biology*; **16**: 808–813; 2006

79 Dominique Ferrandon, Jean-Luc Imler and Jules A. Hoffmann: Sensing infection in *Drosophila*: Toll and beyond. *Seminars in Immunology*; **16**: 43–53; 2004

80 Andersen AS, Sandvabg D, Schnorr KM, Kruse T, Neve S, Joergensen B, Karlsmark T and Kroghfelt KA. A novel approach to the antimicrobial activity of maggot debridement therapy. *J Antimicrob Chemother*; **65**: 1646-54; 2010

81 Jaklic D, Lapanje A, Zupancic K, Smrke D and Gunde-Cimerman N: Selective

antimicrobial activity of maggots against pathogenic bacteria. *J Med Microbiol*; **57**:
617-25; 2008

82 Steenvoorde P, Jukema GN: The antimicrobial activity of maggots: in-vivo results.
J Tissue Viability; **14**: 97-101; 2004

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導をいただいた先端腎疾患病態研究グループ
野入英世先生、土井研人講師、浜崎敬文講師、本田謙次郎助教、腎臓・内分泌
内科 南学正臣教授に心より感謝申し上げます。

また、本研究を進めるにあたり、ご助言・ご助力いただいた先端腎疾患病態
研究グループ各位に心より感謝の意を表明します。