

Original Article

培養皮膚線維芽細胞による VEGF 産生に対する Lipo-PG-E₁(アルプロスタジル)の作用 —薬剤学的血管新生療法の可能性—

井上 肇¹⁾, 下川雅信^{1,2)}, 富岡みゆき¹⁾, 松井達弥¹⁾, 熊谷憲夫¹⁾¹⁾聖マリアンナ医科大学形成外科学教室, ²⁾大阪ハイテクノロジー専門学校*The regulation of the VEGF production in normal human cultured dermal fibroblasts by Lipo-PGE₁ (alprostadi): The possibility of the pharmaceutical angiogenesis therapy*

It is well known that prostanoids preparation is efficient for refractory dermal ulcer and arteriosclerosis obliterans (ASO). Recently, although it has been also shown that one prostanoid has a promotive action on angiogenesis, the mechanism of action is not cleared. The efficacy of an alprostadi (Lipo-PG-E₁, Palux) as DDS preparation for the VEGF production by dermal fibroblasts under stimulation with the preparation was investigated in cultured fibroblasts derived from healthy skin in the present study. The dermal fibroblasts produced VEGF protein dose-dependently by addition of alprostadi. The fibroblasts stimulated IL-1 also enhanced VEGF production but the production was inhibited by COX inhibitors (indomethacin and NS-398). VEGF produced by dermal fibroblasts were regulated by prostanoids. Furthermore, it was suggested that the endogenous prostanoids by dermal fibroblasts influenced the production of VEGF. These results may be able to apply alprostadi preparation (Lipo-PG-E₁) to as an effective device of angiogenesis therapy by using the technique of pharmacological-pharmaceutical regenerative medicine.

Rec.2/12/2004, Acc.8/3/2004, pp656-660

Hajime Inoue¹⁾, Masanobu Shimokawa^{1, 2)}, Miyuki Tomioka¹⁾, Tatsuya Matsui¹⁾ and Norio Kumagai¹⁾¹⁾ Department of Plastic and Reconstructive Surgery, St. Marianna University School of Medicine²⁾ Division of Biosciences, Osaka College of High Technology

Key words vascular endothelial growth factor, angiogenesis, dermal fibroblasts, Lipo-PGE₁, tissue engineering

緒 言

インターロイキン-1をはじめとする各種の炎症性サイトカインは, 各種のエイコサノイド産生を促進し, 炎症増悪に関与すると言われている¹⁾. 一方で, エイコサノイドの中で一部のプロスタノイドは 血管拡張作用に由来する血行改善作用や, 血小板機能調節作用を有し, この作用が難治性皮膚潰瘍や閉塞性動脈硬化症に対し有効と言われている^{2,3)}. 事実プロスタノイド誘導体は, プロスタグランジン E₁ 製剤 (アルプロスタジル) として既に製剤化されてい

る. しかし, 難治性皮膚潰瘍や閉塞性動脈硬化症等に対するこれら製剤の有効性は 血管拡張作用や血小板機能調節だけでは説明することはできない. 1995 年に内田ら⁴⁾は, 炎症巣創部で産生されたプロスタノイドが 血管新生促進作用を有することを認め, エイコサノイドは複合的に潰瘍部や硬化動脈巣に影響していることを推察している. また, Majima ら⁵⁾もエイコサノイドには血管新生促進作用があることを報告している.

FGF(fibroblast growth factor), HGF(hepatocyte growth

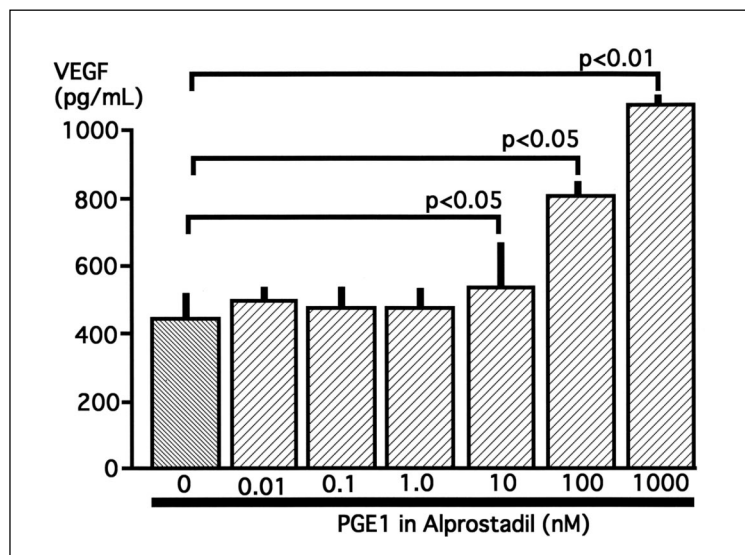


図1 Effects of alprostadil on VEGF production by normal human cultured fibroblasts

Fibroblasts were cultured with alprostadil for 24 hours at 37 degree and 5% CO₂. a) Each column represents mean $\pm$ SD (n=4), b) $p < 0.05$ and $p < 0.01$: as compared to the value obtained without alprostadil.

factor)およびVEGF(vascular endothelial growth factor)は、この血管新生のカギを握る重要な増殖因子として知られている⁶⁻⁸⁾。特にVEGFは当初下垂体からのみ産生されと考えられていたが⁹⁾、実際には各種の細胞から産生されることも明らかとなり、関節滑膜細胞などによるVEGF産生は、エイコサノイドによって一部調節されていることも報告され始めている¹⁰⁾。

皮膚線維芽細胞の遊走、増殖そして結合組織成分の合成・分泌による肉芽の増生は、創傷治癒過程において必須の事象である。この時同時に創部に血管が新生されるが、その中心的な血管新生因子として作用するであろうVEGFの供給源は明らかにはされていない。また、炎症期に産生される各種のプロスタノイドが血管新生を促す可能性が考えられても、その標的細胞は明確ではない。しかも、市販製剤のような治療量においてVEGF産生の亢進が認められるかについては明らかではない。そこで、創部におけるプロスタノイド誘導性のVEGFの由来を明らかにすること、ならびにこのVEGF産生亢進作用が製剤化されている市販PGE₁製剤においても認められるかについて、培養皮膚線維芽細胞を用いて基礎的に検討した。

方 法

1) 線維芽細胞培養

ICを得た患者より、形成外科領域で余剰となった皮膚組織を用いた。得られた皮膚は、2mm程度に細切した後、2分間ポビドンヨードで消毒後、PBSで3回洗浄した。この消毒洗浄済みの皮膚を培養シャーレ底面に張り付け、カバーガラスを用いて固定した。その後、10%ウシ胎児血清含有DME培地を用いて、37℃、5%CO₂条件下、遊走培

養した。10日から14日間培養後、増殖が確認された後は、同様の新鮮培地を2日に一度の割合で交換し、コンフルエントになるまで培養した。得られた線維芽細胞は、常法に従って6-12穴プレートに継代培養し、さらにコンフルエントに到達後、以後の実験に用いた。

2) Lipo-PGE₁ (アルプロスタジル) の性質

本実験に用いたアルプロスタジルは、大豆油および卵黄レシチンを主成分とする脂質マイクロ小胞内にPGE₁を封入した製剤で(リピッドマイクロスフェア)あり、本乳化剤1mL中に5μg相当のPGE₁を含む。本製剤は、内皮損傷部では脂質親和性が高いという特徴を利用し、脂質マイクロ小胞が損傷内皮周囲に比較的特異的に集積することを利用したDDS製剤である。本製剤5μg/mLはPGE₁として14μMに相当する。

3) VEGF産生実験

コンフルエントに到達した培養線維芽細胞に被検薬物を含有する10%FBS含有DME培地を添加し、一定時間37℃、5%CO₂条件下で培養した。得られた培地を氷冷下速やかに採取し-85℃で保存した。アルプロスタジルとして終濃度1000nMになるように線維芽細胞培養用の培地を用いて希釈した。これを最高濃度としてその後0.01nMまで、同様の培地を用いて10倍希釈し実験に用いた。インドメタシン(IM)は終濃度10μM、NS-398は同様に7μMになるように調整して実験に用いた。さらにIL-1は、終濃度0.1U/mLに調整し培地に添加した。

4) VEGF測定

培地中のVEGFは、VEGF測定用EIAキット(R&D Co.)を用いて測定した。

5) 統計処理

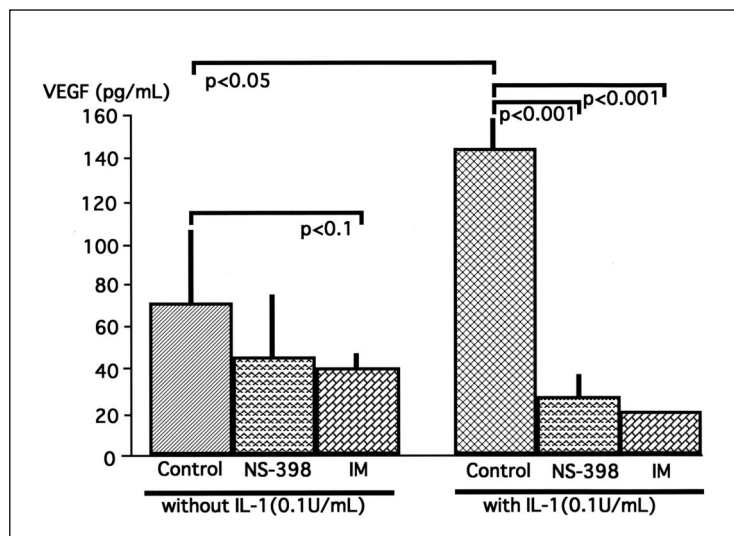


図2 Influences of cyclooxygenase inhibitors on IL-1 induced VEGF production by normal human cultured fibroblasts.

Fibroblasts were cultured with 0.1U/mL IL-1 and/or 10uM indomethacin or 7uM NS-398 for 24 hours at 37 degree and 5% CO₂. a) Each column represents mean $\pm$ SD (n=4), b) $p < 0.05$ and $p < 0.001$: as compared to the value obtained control, c) $p < 0.1$: decrease tendency as compared to control, d) IL-1; interleukin-1, IM; indomethacin

得られた結果は, mean $\pm$ -SDで示した. ANOVA検定後, 必要に応じてDunnet's multiple range testを用いて, $p < 0.05$ 以下を有意差ありと判定した.

結果

1) 線維芽細胞による VEGF 産生に対するアルプロスタジルの作用

各種濃度のアルプロスタジル存在下で線維芽細胞を 24 時間培養すると, 用量依存的に VEGF 産生が増加し, 10nM 以上の添加濃度で有意に増加した (図 1). また, 最高濃度である 1 μ M 添加において細胞の剥離や死滅などの細胞毒性は何ら認めなかった.

2) 培養線維芽細胞による VEGF 産生に対する IL-1 および COX 阻害薬の作用

同一条件下で, 線維芽細胞を 0.1U/mL IL-1 で刺激すると, VEGF 産生は有意に増加した (図 2). 0.1U/mL IL-1 に 10 μ M インドメタシンと 7 μ M NS-398 を共存させると, IL-1 による VEGF 産生亢進作用は有意に阻害された (図 2). しかし, IL-1 非存在下の VEGF 産生に対しては 10 μ M インドメタシンと 7 μ M NS-398 は有意な抑制を示さなかった.

3) COX 阻害薬が VEGF 産生に及ぼす影響

一方, 7 μ M NS-398 あるいは 10 μ M IM とアルプロスタジル共存下で培養すると, これら COX 阻害薬によって抑制される VEGF 産生はアルプロスタジル濃度に依存して亢進した (図 3).

考察

血管新生は, 創傷治癒過程において, 良好な肉芽の増生, 創の収縮, 上皮の進展と増殖に伴う創閉鎖を左右する重要な過程である. 新生血管の形成不良は, 良好な肉芽の

増生を悪くするばかりか, 逆に不良肉芽の増生を来し, 創治癒を遅延させる. 血管新生は, 通常の生理反応であるが, 各種の増殖因子で調節を受けており, その最も有名な増殖因子として VEGF, HGF, FGF 等が挙げられる⁶⁻⁸⁾.

創部の短期的炎症は, 創傷治癒過程で不可欠なステップであるが, この際創周囲に放出される各種起炎物質は, 炎症の五大主徴と呼ばれる症状を媒介する. エイコサノイドは, この炎症増強過程に中心的役割を演じており, 組織で誘導されたシクロキシゲナーゼ-2(COX-2)に由来していることが証明されている¹¹⁾. 一方, このプロスタノイドの中で PG-E₂ は血管新生にまで関与することが判明し, 宿主の炎症を増悪するばかりでなく, 創治癒にも関与していることが判明してきている¹²⁾.

閉塞性動脈硬化症や難治性皮膚潰瘍などへのプロスタノイド製剤の有効性は, 古くから知られている²⁾. その作用機序の本体は, 投与後に創傷部の発赤を来すことから, 血管拡張に依存するものと考えられ, 同時に血小板凝集阻害などもその作用機序と考えられてきた. しかしながら, 内田ら⁴⁾によるアルプロスタジルの血管増生作用に対する報告や, プロスタノイドによる血管新生作用が証明された⁵⁾ことなどから, アルプロスタジルも血管新生に関わって有効性を発揮している可能性もある.

一方, PG の血管新生促進作用が, VEGF 誘導を介することは報告されているが¹³⁾, 創治癒過程において, 創部で誘導される VEGF の産生細胞すなわち標的細胞までは解明されていない. そこで今回, 培養線維芽細胞を用いて, アルプロスタジル存在下で培養したときに血管新生促進作用のキーサブスタンスである VEGF の産生が如何に影響されるかを検討した.

その結果, 培養線維芽細胞による VEGF 産生はアルプロ

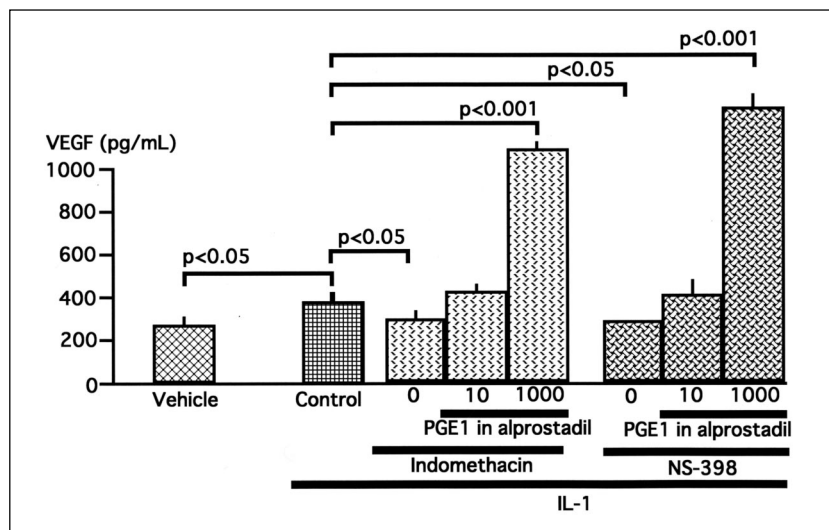


図3 Effects of alprostadil on VEGF production by cyclooxygenase treated cultured fibroblasts.

The dosage of IM and NS-398 is same as in Fig. 2. Each 10 and 1000 nM of the PGE1 in alprostadil is added in medium as final concentration. a) Each column represents mean $\pm$ SD (n=4), b) $p < 0.05$ and $p < 0.001$: as compared to the value obtained control, c) $p < 0.1$: decrease tendency as compared to control, d) IL-1; interleukin-1, IM; indomethacin

スタジルの濃度に依存して亢進することが明らかになった (図1)。また、この時 VEGF mRNA レベルが上昇することも RT-PCR によって確認された (結果未収載)。したがって、アルプロスタジルは、血小板凝集抑制や血管を拡張させるだけでなく、閉塞性動脈硬化症や難治性皮膚潰瘍の潰瘍部周囲の皮膚構成細胞にまで作用して VEGF 産生を促し、血管新生に関わっている可能性が示唆された。

プロスタノイドはほとんどの体細胞によって産生されることが分かっている。線維芽細胞も例外ではなく、炎症性サイトカイン、特に IL-1 で COX-2 が誘導され多量のプロスタグランジンを産生する。本実験においても、IL-1 刺激により線維芽細胞の VEGF 産生が促進されること、インドメタシンや NS-398 などの COX 阻害薬で VEGF 産生が抑制されることから、少なくとも線維芽細胞においては、VEGF 産生に内因性のプロスタノイドが autocrine あるいは paracrine 的に作用していると考えられる。したがって、COX-2 阻害薬を投与することによって創傷治癒が遅延する可能性も考えられる¹¹⁾。事実、胃潰瘍の治癒過程に潰瘍部位に COX-2 が発現しており、この活性を抑えると、潰瘍治癒が遅延すると言われている^{14,15)}。したがって、NSAIDs は臨床の場において使用するタイミングに注意する必要がある。しかし、線維芽細胞の培養系において COX を阻害してプロスタグランジンの産生を阻害しても、アルプロスタジルを添加すると、VEGF 産生は濃度依存的に亢進した。したがって、全身投与であれ局所投与であれ、アルプロスタジルは細胞毒性が低いこともあり、薬剤学的な血管新生再生医療の一つとして今後積極的に投与が試みられるべき方法と考えられる。一方、現存する PG 軟膏などは、血管新生を期待する創傷治癒の比較的初期には積極的に用いることが重要であろう。

培養ヒト線維芽細胞において、VEGF 産生誘導に関わるプロスタグランジンの受容体については、どの受容体が関与しているかは今後解明される必要がある。Narumiya¹⁶⁾ は、E 型プロスタグランジンが、EP3 受容体を介して血管新生に関わることを動物実験で報告している。今後、受容体を介していかなるシグナル伝達により VEGF 産生が誘導されるかについても解明する必要がある。現在、アルプロスタジルの血管新生への影響について、マウス阻血モデルを用いて検討中である。

文 献

- 1) Inoue H, Ohshima H, Kono H, Yamanaka M, Kubota T, Aihara M, Hiroi T, Yago N, Ishida H: Suppressive effects of tranilast on the expression of inducible cyclooxygenase (COX2) in interleukin-1 β stimulated fibroblasts. *Biochem Pharmacol*, 53(12): 1941-1944, 1997.
- 2) Makita S, Nakamura M, Ohhira A, Itoh S, Hiramori K: Effects of prostaglandin E1 infusion on limb hemodynamics and vasodilatory response in patients with arteriosclerosis obliterans. *Cardiovasc Drug Ther*, 11(3): 441-448, 1997.
- 3) Toyota T, Hirata Y, Ikeda Y, Matsuoka K, Sakuma A, Mizushima Y: Lipo-PGE1, a new lipid-encapsulated preparation of prostaglandin E1: Placebo- and prostaglandin E1-controlled multicenter trials in patients with diabetic neuropathy and leg ulcers. *Prostaglandins*, 46(5): 453-468, 1993.
- 4) Uchida T, Akira T, Yamanaga K, Hayashi K, Kubo Y, Shintome Y, Watanabe M: Study of lipo PGE1 in diabetic ulcer healing. *Clinical Rep*, 29(4): 899-905, 1995.
- 5) Majima M, Isono M, Ikeda Y, Hayashi I, Hatanaka K,

- Harada Y, Katsumata O, Yamanashina S, Katori M, Yamamoto S: Significant roles of inducible cyclooxygenase (COX)-2 in angiogenesis in rat sponge implants. *Jpn J Pharmacol*, 75: 105-114, 1997.
- 6) Morishita R, Nakamura S, Hayashi S, Taniyama Y, Moriguchi A, Nagano T, Taiji M, Noguchi H, Takeshita S, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T: Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocytes growth factor in rabbit hind limb ischemia model as cytokine supplement therapy. *Hypertension*, 33(6): 1379-1384, 1999.
- 7) Rakue H, Nakajima H, Katoh T, Usui M, Amemiya T, Miyagi M, Hara T, Tamura K, Sasame A, Naito Y, Nagai Y, Ibukiyama C: Low-dose basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor for angiogenesis in canine acute hindlimb insufficiency. *Jpn Circulat J*, 62 (12): 933-939, 1998.
- 8) Ferrara N, Davis-Smyth T: The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 18: 4, 1997.
- 9) 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.
- 10) Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T: Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1. *FEBS Lett*, 372: 83-87, 1995.
- 11) Kujubu DA, Herschman HR: Dexamethasone inhibits mitogen induction of the TIS 10 prostaglandin synthase cyclooxygenase gene. *J Biol Chem*, 267: 7991-7994, 1992.
- 12) Futagami A, Ishizaki M, Fukuda Y, Kawana S, Yamanaka N: Wound healing involves induction of cyclooxygenase-2 expression in rat skin. *Lab Invest*, 82(11): 1503-1513, 2002.
- 13) Majima M, Hayashi I, Muramatsu M, Katada J, Yamashita S, Katori M: Cyclooxygenase-2 enhances basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis through the induction of vascular endothelial growth factor in rat sponge implants. *Br J Pharmacol*, 130: 641-649, 2000.
- 14) Guo JS, Cho CH, Lam Liu ES, Choy HT, Wang JY, Leung Koo MW: Antiangiogenic effect of a highly selective cyclooxygenase-2 inhibitor on gastric ulcer healing in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 183(1): 41-45, 2002.
- 15) Peskar BM, Maricic N, Gretzera B, Schuligoi R, Schmassmann A: Role of cyclooxygenase-2 in gastric mucosal defense. *Life Sci*, 69(25-26): 2993-3003, 2001.
- 16) Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F: Prostanoid receptors: structures properties, and functions. *Physiol Rev*, 79: 1193-1226, 1999.