

---

ホスホエノールピルビン酸の細胞賦活作用を利用した  
難治性皮膚潰瘍の治癒促進

---

17590472

平成 17 年度～平成 18 年度科学研究費補助金  
(基盤研究 (C)) 研究成果報告書

平成 19 年 5 月

研究代表者 入江 徹美  
熊本大学大学院医学薬学研究部教授

## 研究組織

研究代表者：入江 徹美 (熊本大学・大学院医学薬学研究部教授)  
研究分担者：森内 宏志 (崇城大学・薬学部助教授)  
研究分担者：井上 雄二 (熊本大学・医学部附属病院講師)  
研究分担者：濱崎 直孝 (長崎国際大学・薬学部教授)

## 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 17 年度	2,700,000	0	2,700,000
平成 18 年度	900,000	0	900,000
総 計	3,600,000	0	3,600,000

## 研究発表

### (2)口頭発表

福田 早紀子, 山川 枝里子, 喜多岡 洋樹, 井上 雄二, 森内 宏志, 入倉 充, 入江 徹美, 糖尿病性皮膚潰瘍に対するホスホエノールピルビン酸の創傷治癒促進効果, 第 22 回日本薬学会九州支部大会, 2005 年 12 月 10 日

入江 徹美, 福田 早紀子, 山川 枝里子, 喜多岡 洋樹, 井上 雄二, 森内 宏志, 入倉 充, 糖尿病性皮膚潰瘍に対するホスホエノールピルビン酸の治癒促進効果, 第 20 回熊本県産学官技術交流会, 2006 年 1 月 24 日

石塚 洋一, 福田 早紀子, 山川 枝里子, 喜多岡 洋樹, 井上 雄二, 森内 宏志, 入倉 充, 入江 徹美, 糖尿病性皮膚潰瘍に対するホスホエノールピルビン酸の治癒促進効果, 日本薬剤学会第 21 年会, 2006 年 3 月 16 日

## 研究治験の概略

本研究は、生体内リン酸化合物の中で最も高いエネルギーを有し、唯一細胞膜を透過できるホスホエノールピルビン酸（PEP）の細胞賦活作用により、糖尿病性皮膚潰瘍の治癒促進を企図したものであり、以下の知見を得た。

- 1) 遺伝的糖尿病マウスを用いた検討において、PEP 水溶液の噴霧投与は、軟膏剤投与や腹腔内投与に比べて顕著な創傷面積縮小効果を示し、その効果は basic fibroblast growth factor (bFGF)製剤と同程度であった。さらに、病理組織学的検討において、PEP 噴霧投与は bFGF 製剤よりも創傷後早期から肉芽組織や表皮および血管の形成促進を示した。
- 2) PEP は、マウスマクロファージ系細胞（RAW264）における皮膚潰瘍治癒促進因子である vascular endothelial growth factor (VEGF)の発現を増加させ、また PEP の代謝産物ピルビン酸は VEGF および bFGF の発現を増加させた。
- 3) PEP は、遺伝的糖尿病マウスから初代培養した線維芽細胞の増殖およびコラーゲン産生を抑制した。一方、ヒト皮膚由来線維芽細胞（TIG 109）の増殖に対し、bFGF は増殖を促進したのに対し PEP はほとんど影響を及ぼさなかった。
- 4) PEP は、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）の増殖、細胞遊走および脈管形成を強力に促進し、また VEGF および bFGF の発現を促進した。PEP の脈管形成作用は、VEGF 中和抗体により阻害された。
- 5) PEP はヒト表皮角化細胞株 HaCaT 細胞の増殖に対し促進効果を示した。

本研究より、PEP 水溶液噴霧投与は、bFGF 製剤と比し同等以上の皮膚創傷治癒促進効果を示した。この PEP の創傷治癒促進作用は、創傷治癒に重要役割を果たす血管内皮細胞、マクロファージおよび表皮角化細胞を賦活化し、細胞増殖や治癒促進因子産生が関与することが示唆された。本研究で得られた知見は、新規な作用機序を有する難治性皮膚潰瘍治療薬としての PEP の可能性を示唆している。

## 第1章 緒論

社会環境や生活習慣の変化に伴い生じる疾患，すなわち生活習慣病は，欧米諸国をはじめとする先進国において増加の一途をたどっている．この生活習慣病の代表例である糖尿病は，急速に増加しており，世界保健機構の報告によると，<sup>1)</sup> 世界全体での糖尿病罹患者数は，現在，約1億9400万人存在し，10年後には3億3500万人に到達することが予測されている．<sup>2)</sup> 日本においても例外ではなく，糖尿病罹患者ならびに糖尿病予備群の総数は，約1700万人と推測されており，<sup>1)</sup> 罹患者の増加が重大な問題となっている．

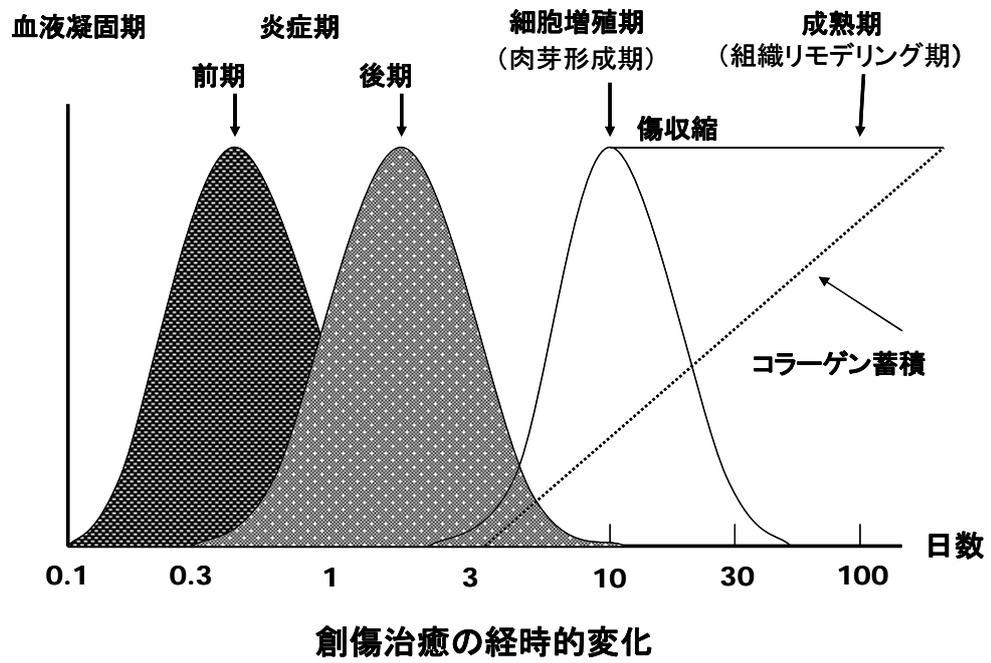
糖尿病に罹患し，長期にわたり生体が高血糖に暴露されると，諸臓器の機能は障害され，腎症，網膜症，神経障害などの“合併症”を発症する．糖尿病患者にとって合併症の発症予防は血糖コントロールとともにきわめて重要である．“糖尿病の足（diabetic foot）”と言われる糖尿病性足病変は糖尿病合併症の一つであり，神経障害や血管障害が原因で生じる糖尿病性皮膚潰瘍である．糖尿病皮膚潰瘍，特に足部病変では知覚鈍麻や感染を伴う場合が多く，重症例では下肢切断が必要となる．<sup>3)</sup> したがって，このような重症化を防ぐため，早期段階からの治療が必要となる．

糖尿病性皮膚潰瘍の治療は，血糖コントロールを基本とし，潰瘍面に対して外科的デブリドマンを繰り返し実施し，壊死部分を完全に除去することが重要である．壊死部分を完全に除去した後に，あるいは完全に除去された場合は，局所療法として抗菌作用のある白糖・ボビドンヨード製剤（ユーパスタコーワ<sup>®</sup>），肉芽組織を増加させるブクラデシン（アルデシン<sup>®</sup>）軟膏，トレチノイントコフェリル（オルセノン<sup>®</sup>）軟膏，アルプロスタジル（プロスタンディン<sup>®</sup>）軟膏などが使用されている．<sup>4)</sup> しかし，これら薬剤は著効を示さないため，糖尿病性皮膚潰瘍の薬物療法は，症状を悪化させないための保存的療法と位置づけられ

完治させることは困難である。したがって、創傷治癒過程の早い段階から効果を示し、症状悪化を予防できる有用な予防・治療薬の開発が強く望まれている。

皮膚潰瘍の創傷治癒過程は、血液凝固期、炎症期（前期、後期）、細胞増殖期（肉芽形成期）、成熟期（組織再構築期）の四段階に分類される。まず、血液凝固期は、皮膚創傷発生後、血管壁の損傷、血管内皮細胞の破壊により出血が起こり、血小板によりフィブリン凝固塊を形成される。炎症期前期ではマクロファージなどの貪食細胞などによる異物や細菌の除去、炎症期後期では炎症性細胞が上昇し、細胞を遊走する。細胞増殖期では、線維芽細胞および血管内皮細胞から産生されるサイトカインや細胞増殖因子により細胞増殖および肉芽組織・血管形成が行われ、成熟期では創収縮及び細胞外マトリックスの成熟が起こる。これらの創傷治癒過程が一部オーバーラップしながら進行する (Fig. 1)。

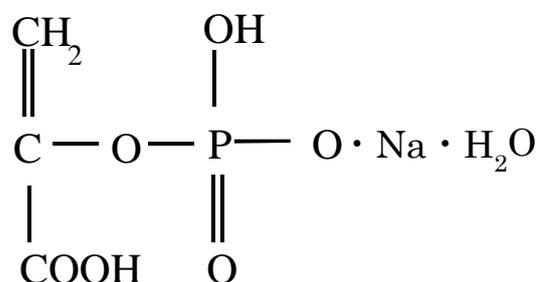
5) 糖尿病患者ではこの創傷治癒機構に障害が起こることが知られており、特に、創傷治癒に不可欠な細胞増殖因子などを産生するマクロファージの遊走・活性化能の低下、<sup>6)</sup> また、肉芽組織形成などの細胞増殖期で重要な役割を果たしている線維芽細胞や血管内皮細胞の機能低下がその創傷治癒遅延に影響している。<sup>7-12)</sup> したがって、これらの創傷治癒遅延の原因となる細胞機能障害を改善することは、創傷治癒促進につながると考えられる。



(「難治性皮膚潰瘍を治すスキル」より改変引用)

Fig. 1. Time course of wound healing<sup>5)</sup>

Phosphoenolpyruvate (PEP) は、解糖系の中間代謝産物であり(Fig. 2), 生体内で最も高いエネルギーを有するリン酸化合物である( $\Delta G = -14.8 \text{ kcal/mol}$ ). PEP は, adenosine triphosphate (ATP) など他の高エネルギーリン酸化合物とは異なり, 陰イオン交換輸送タンパク (anion exchanger:AE) を介し細胞膜を通過できる, 唯一のエネルギーリン酸化合物であり, <sup>13,14)</sup> この特性を応用して, 脆弱した細胞を活性化させる“細胞賦活剤”として近年注目されるようになってきた. したがって, PEP は, 従来の皮膚潰瘍治療薬と異なる作用機序により虚血や酸素不足に陥り脆弱した創傷部位の種々の細胞を賦活化し, 創傷治癒を促進する治療薬となりうることが期待される.



Elements :  $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_6\text{P} \cdot \text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$

Molecular mass : 208.04

pKa : 1.5, 3.5, and 6.38

**Fig. 2. Chemical structure of PEP used in this study**

当研究室における従来 of 検討により, 遺传的糖尿病マウス(C57 BL/Crj-db/db) に実験的皮膚欠損創傷を作成した糖尿病性皮膚潰瘍モデルを用いた検討により, PEP は創傷治癒促進作用を有することが明らかになっている. また, *in vitro* 細胞培養系を用いた検討において, PEP はマウスマクロファージ系細胞の RAW264 から, 創傷治癒過程において重要な段階である血管形成を促進させる血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor : VEGF)の産生を亢進することや, ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell : HUVEC) の遊走能促進や脈管形成を促進することを確認している. これらの作用を介して, PEP は糖尿病により機能が低下した免疫系細胞や血管内皮細胞を賦活化し, 創傷治癒を促進していると思われるが, その詳細な機序は明らかになっていない.

そこで, 本研究では, PEP の糖尿病性皮膚潰瘍治療薬としての臨床応用に向けた基礎検討として, 創傷・潰瘍部に対する PEP の至適投与方法について検討し, さらに強力な細胞増殖・血管形成促進作用を期待して褥瘡・皮膚潰瘍治療薬として臨床使用されている塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor : bFGF) 製剤のトラフェルミン (フィブラスト<sup>®</sup>スプレー)と PEP の創傷治癒促進作用の比較を, 糖尿病マウスの皮膚潰瘍モデルを用いた *in vivo* 実験系において主に病理組織学的観点から検討した. さらに, PEP の創傷治癒促進効果の機序解明を目的とし, 皮膚線維芽細胞の細胞増殖能に及ぼす影響や, PEP により促進される脈管形成に及ぼす VEGF の関与について着目し, *in vitro* 細胞培養系を用いた検討を加えた.

以下に, 本研究で得られた知見を詳述する.

## 第2章 糖尿病マウス皮膚創傷における PEP 含有外用剤の治癒促進効果

### 第1節 序

これまでの当研究室の検討により、遺伝的糖尿病マウス(C57 BL/Crj-db/db)に実験的皮膚欠損創傷を作成した糖尿病性皮膚潰瘍モデルを用いた検討により、PEP は創傷治癒促進作用を有することが明らかになっている。また、PEP の製剤化を企図し、PEP 含有プラスチックベース軟膏や PEP 水溶液剤の安定性・皮膚刺激性に関する検討を行ってきた。

今後、PEP を糖尿病性皮膚潰瘍治療薬として臨床応用する際に、どのような剤形・投与法が適しているかを明らかにする必要がある。また、既存の皮膚潰瘍治療薬と PEP の効果を比較し、PEP の有用性を検証しなければならない。

そこで、本章では、遺伝的糖尿病マウス皮膚潰瘍モデルを用いて、PEP の投与形態の違いによる治癒促進効果を比較検討した。さらに、強力な細胞増殖・血管形成促進作用を期待して褥瘡・皮膚潰瘍治療薬として臨床使用されている塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor : bFGF)製剤のトラフェルミン（フィブラスト<sup>®</sup>スプレー：0.01% bFGF 水溶液）の創傷治癒促進効果との比較を行った。

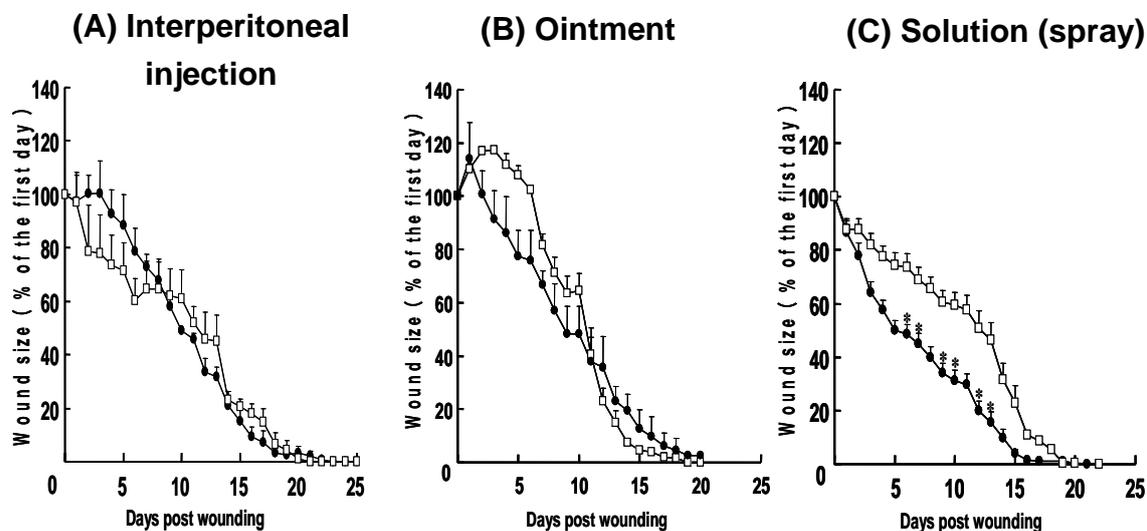
### 2-1-1 投与方法の違いによる PEP の創傷治癒促進効果

PEP の全身投与を目的として腹腔内投与, 皮膚への局所投与を目的として軟膏剤投与および水溶液噴霧投与した際の皮膚創傷治癒に及ぼす影響を遺伝的糖尿病マウス皮膚欠損創モデルを用いて創傷面積縮小率を比較検討した.

腹腔内投与では, PEP の生理食塩水溶液 (40 mg/mL) を調製し, マウスに PEP として 400 mg/kg を投与した. 軟膏剤および水溶液の PEP の濃度は, これまでの当研究室の検討により化学的に最も安定な 3% とした.

軟膏剤では, プラスチベースを基剤として調製した 3% PEP 含有軟膏剤 ( PEP として 90 mg), 3% PEP 水溶液 (等張, pH 7.4 ) 200  $\mu$  L をそれぞれ 1 日 1 回投与した.

その結果, 腹腔内投与および軟膏剤塗布において, PEP による顕著な創傷面積縮小効果は認められなかった (Fig. 3-A and 3-B). 一方, PEP 水溶液を創傷部位に噴霧投与すると, 生理食塩水投与群と比較して有意な創傷面積縮小効果がみられた (Fig. 3-C).

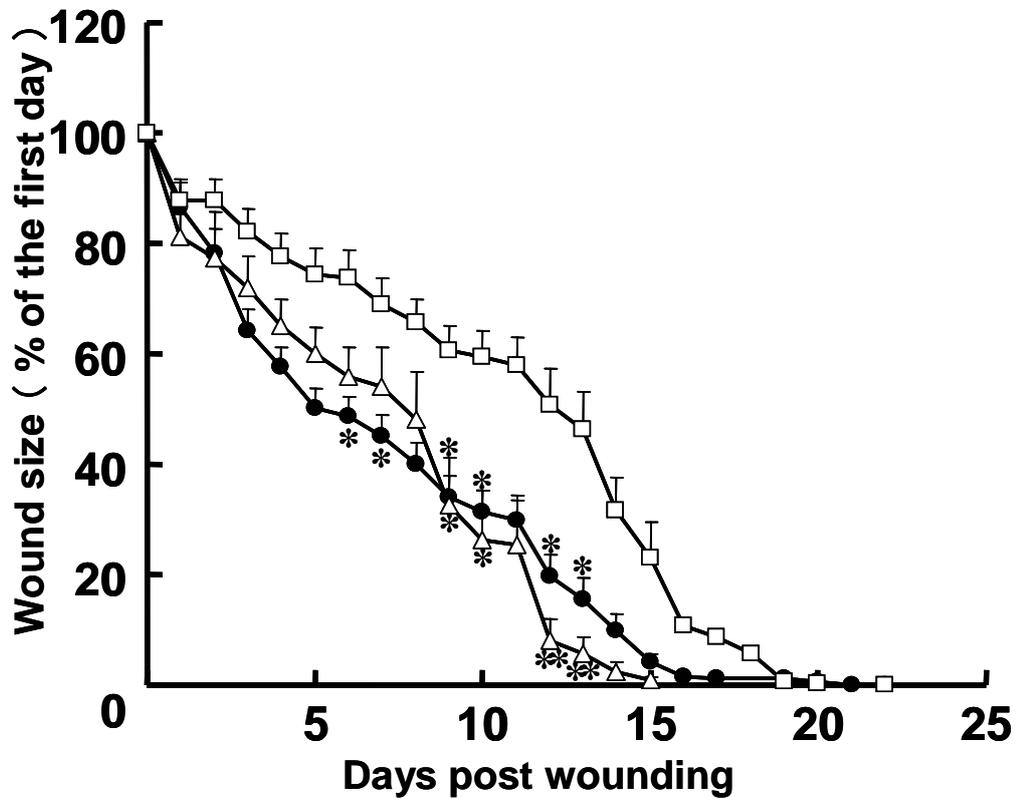


**Fig. 3. Effects of PEP at various formulations on skin wound healing in genetically diabetic mice**

Ten-weeks-old C57BL/Crj-db/db mice were anesthetized and wounds were made on the backs. After the wounding, each formation of PEP was administered once a day. ● ; PEP, □ ; control  
 Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of 3-10 mice. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 compared with the saline control group.

### 2-1-2 PEP およびヒト線維芽細胞増殖因子の創傷治癒に及ぼす影響

3% PEP 噴霧投与と皮膚潰瘍治療に臨床応用されている bFGF 製剤のトラフェルミン (フィブラスト<sup>®</sup>スプレー : 0.01% bFGF 水溶液) との創傷治癒促進効果を比較した。その結果, 0.01% bFGF および 3% PEP の噴霧投与の両群で, 創傷後 3 日目から創傷面積の縮小傾向がみられた (Fig. 4)。また, 生理食塩水投与群では受傷後 14 日において創傷治癒の妨げとなる痂皮が脱落したのに対し, 3% PEP 投与群および 0.01% bFGF 投与群では受傷後 10 日目と早期に痂皮が脱落し (Fig. 5), 有意に治癒日数を短縮した (Table 1)。

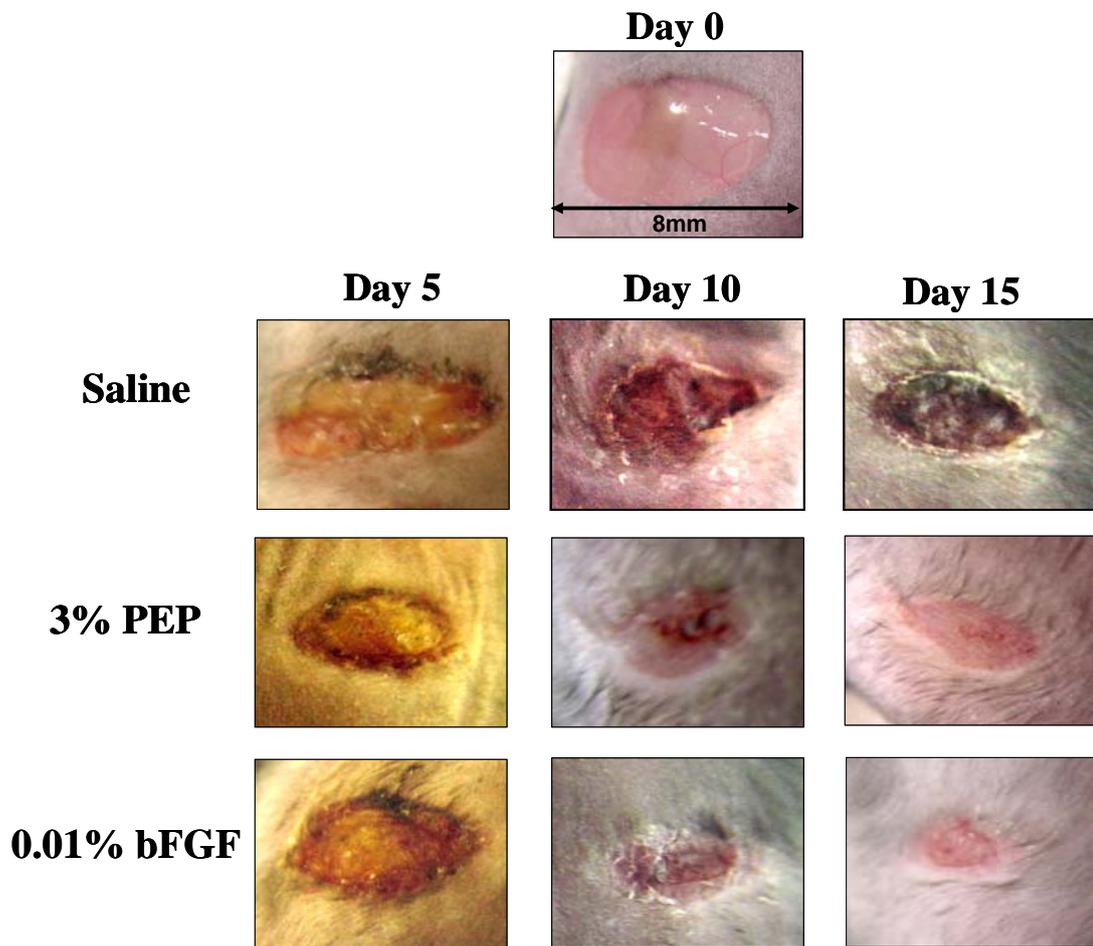


**Fig. 4. Effects of PEP and bFGF sprays on skin wound healing in genetically diabetic mice**

Ten-weeks-old C57BL/Crj-db/db mice were anesthetized and two 8mm diameter wounds were made on the backs symmetrically. After the wounding, saline, 3% PEP solution or 0.01% human recombinant basic fibroblast growth factor (bFGF) solutions were sprayed topically once a day.

●; 3% PEP, △; 0.01% bFGF solution, □; Saline control.

Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of 4-10 mice. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with the saline control group.



**Fig. 5. Macroscopic views of wounds treated with PEP or bFGF spray**

**Table 1. Days to require the wound healing**

<b>Groups</b>	<b>Days (mean ± S.E.)</b>
<b>Saline</b>	<b>20.45 ± 0.9</b>
<b>3% PEP</b>	<b>17.63 ± 0.7*</b>
<b>0.01% bFGF</b>	<b>17.63 ± 0.4*</b>

Each point represents the mean ± S.E.

\*p<0.05, compared with the saline control group.

## 第2節 病理組織学的検討

前節で、糖尿病性皮膚潰瘍マウスの皮膚欠損創に対して PEP 水溶液噴霧による創傷面積縮小効果が確認され、その効果は、臨床使用されている bFGF 製剤の効果とほぼ同程度であった。

本節では、創傷治癒過程のどの段階で PEP が作用して皮膚創傷治癒促進に影響を及ぼしているか検討するため、創傷作成後 5, 10, 15 日目の皮膚潰瘍部位の組織切片標本を作製し、欠損創に肉芽組織を充填する“肉芽形成”，傷口を覆う表皮の“再上皮化”および創傷部位への酸素や栄養供給として不可欠な“血管形成”の3項目について、PEP および bFGF の噴霧投与の影響を比較検討した。

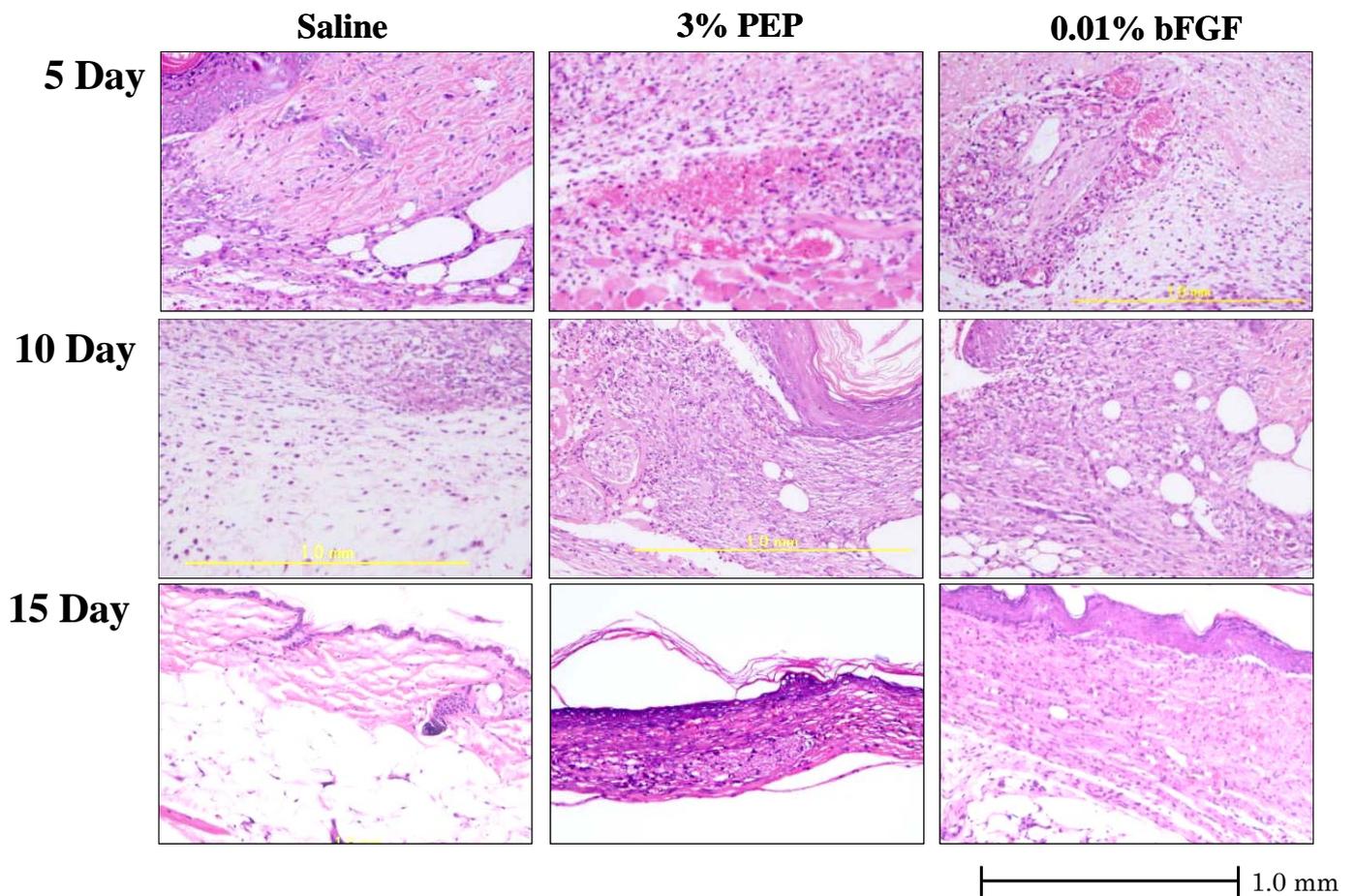
### 2-2-1 創傷治癒過程における肉芽組織および表皮形成に対する影響

創傷治癒過程において、欠損創に肉芽を充填する肉芽形成が起こるとともに、創傷の両端から表皮が伸び創傷部を覆う再上皮化がおこり創傷治癒が進行していくと言われている。本節では、肉芽形成と再上皮化を指標として創傷治癒過程における変化を検討するため、受傷後 5, 10, 15 日目の創傷皮膚組織切片を、hematoxylin and eosins (H&E)重染色し、光学顕微鏡下にて観察した。さらに、皮膚組織に形成された肉芽組織を肉芽組織面積で、再上皮化された表皮を潰瘍面に対する表皮の割合（表皮伸率）として定量的に評価した。

受傷後 5 日目において、生理食塩水投与群では隙間の空いたもろい肉芽組織が形成されているのに対し、3% PEP 投与群および 0.01% bFGF 投与群では肉厚で成熟した肉芽組織が観察された (Fig. 6)。また、創傷後 5, 10, 15 日目の肉芽組織面積を測定した結果、創傷後 5 日目において 3% PEP 投与群および 0.01% bFGF 投与群では、生理食塩水投与群に比較して有意な肉芽面積の増加が見られた。(Fig. 7-A)。0.01% bFGF 投与群では増加した肉芽組織面積は 15 日目までほぼ一定であったが、3% PEP 投与群では 10 日目をピークに肉芽面積の減少が

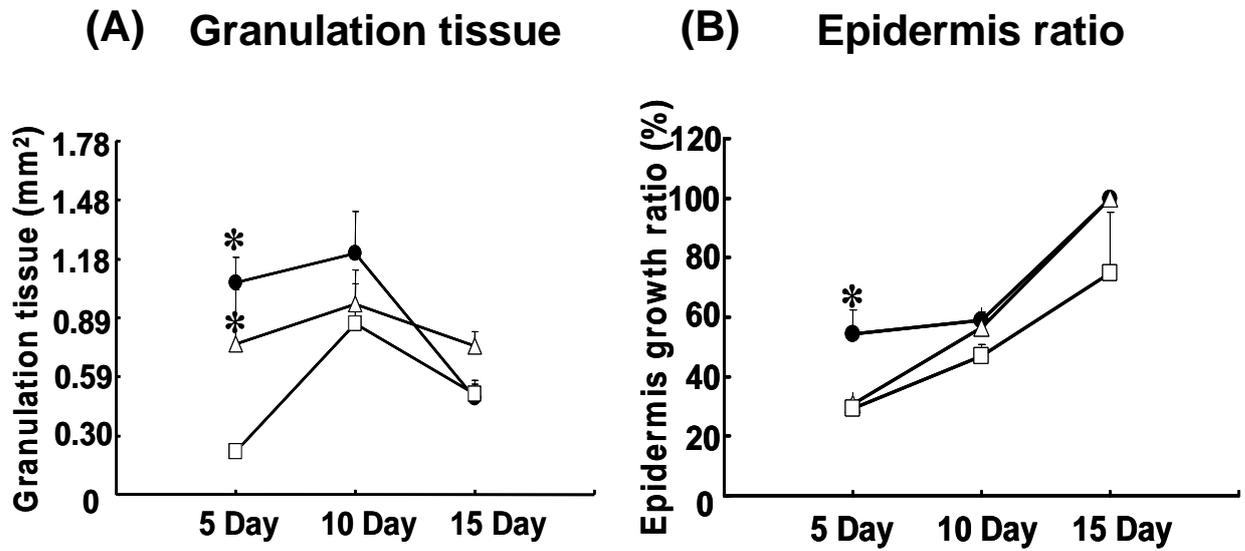
見られ 15 日目には有意に肉芽組織の衰退が認められた (Fig. 7-A).

再上皮化の指標である表皮伸率は、創傷後 5 日目において、生理食塩水および 0.01% bFGF 投与群と比較して 3% PEP 投与群で有意に高く、10 および 15 日目においては、PEP は bFGF 投与群とほぼ同等な表皮伸率を示した (Fig. 7-B).



**Fig. 6. Histological pictures of the wounds treated with PEP or bFGF in genetically diabetic mice**

The sections of wounds were treated with saline (A, D, G) or 3% PEP solution (B, E, H) or 0.01% bFGF solution (C, F, J) in ten-week-old C57BL/Crj-db/db mice. On the predetermined days, mice were killed and the wounds were dissected out. The dissected wounds were fixed and embedded in paraffin, and the 1.0 mm sections were stained with hematoxyline & eosin. Original magnifications were  $\times 100$ .



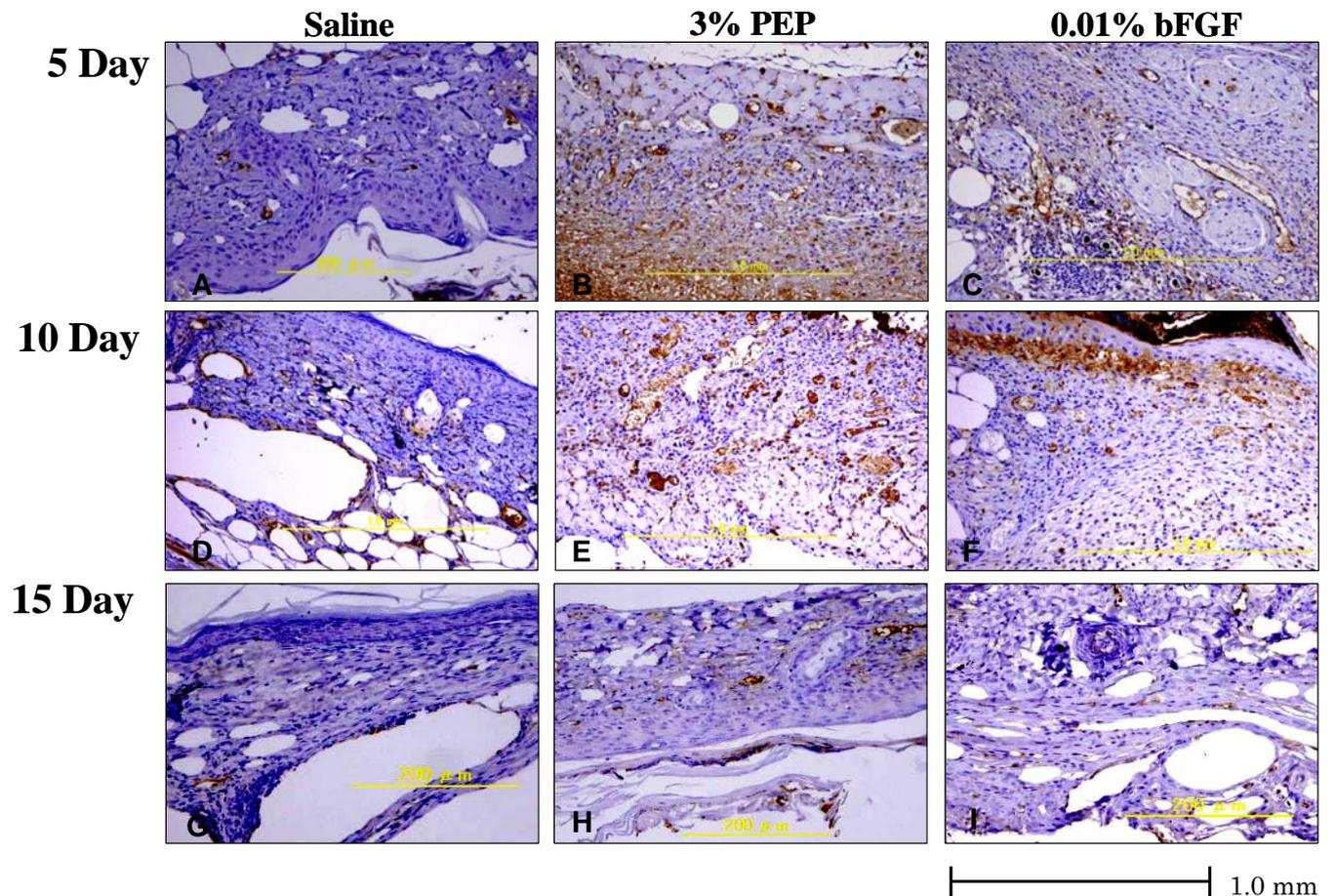
**Fig. 7. Granulation tissue formation and reepithelization in the wounds treated with PEP in genetically diabetic mice**

Ten-week-old C57BL/Crj-db/db mice were wounded. After the wounding, saline or 3% PEP or 0.01% bFGF was topically sprayed once a day. Each of day after wounding, mice were euthanized and skin was harvested. The harvested tissue was fixed with formalin and embedded in paraffin. Section were prepared using a microtome, then deparaffinized, hydrated, and stained with hematoxylin & eosin. Determination of granulation tissue and epidermis length were used planimeter after microscopic examination. Shows were harvested 5-15 days after wounding. ●; 3% PEP, △; 0.01% bFGF solution, □; Saline. \*p<0.05 compared with saline. Values represents the mean  $\pm$ S.E. of 4-6 mice.

### 2-2-2 創傷治癒過程における血管形成に対する影響

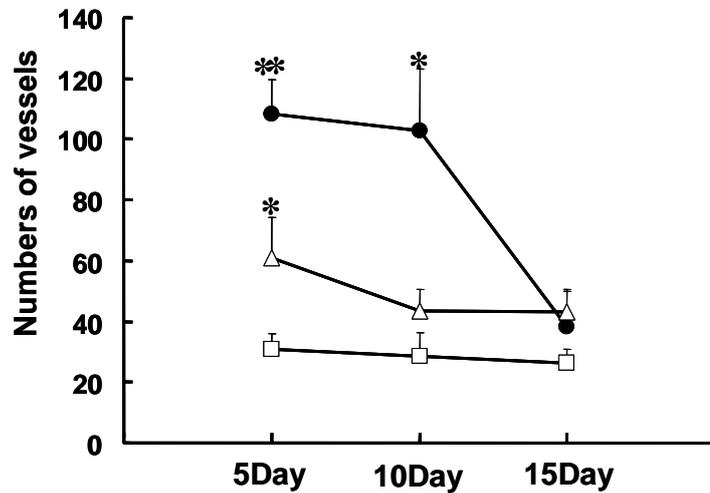
虚血状態にある創傷部位で肉芽形成や再上皮化が行われるにあたり、患部へ酸素や栄養を供給するために新しい血管が形成されることが必須である。当研究室での細胞培養系を用いた検討において、PEP はマウスマクロファージ系細胞 RAW264 からの血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor : VEGF)の産生を亢進することや、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell : HUVEC) の遊走能促進や脈管形成を促進することを明らかにしてきた。

そこで、PEP が *in vivo* 条件下でも創傷部の血管形成を促進するかを、創傷後 5, 10, 15 日目の組織切片標を血管マーカーである CD31 抗体を用いた免疫染色し検討した。その結果、創傷 5 日目および 10 日目において 3% PEP 投与群で茶色で染められた多くの血管が肉芽組織内に観察された (Fig. 8)。創傷部位における血管数は、受傷後 5 日目において PEP 投与群で最も多く、PEP および bFGF 両群において、生理食塩水投与群と比較して有意な血管数の上昇が見られた (Fig. 9)。



**Fig. 8. Immunohistological pictures using CD31 antibody of the wounds treated with PEP and bFGF in genetically diabetic mice**

Histological examination of saline (A,D,G) or 3% PEP (B,E,H) or 0.01% bFGF (C,F,I) treated wounds in ten-week-old C57BL/Crj-db/db mice. Wounds were formed on the backs of mice as described. On the predetermined day, mice were killed and the wounds dissected out. The dissected wounds were fixed, embedded in paraffin, and 1.0mm sections stained immunohistologically with a mouse CD31 antibody using standard techniques. Original magnifications were  $\times 100$ .



**Fig. 9. Numbers of vessels in the wound in genetically diabetic mice**

Ten-week-old C57BL/Crj-db/db mice were wounded. After the wounding, saline or 3% PEP or 0.01% bFGF was topically sprayed once a day. Wounds were formed on the backs of mice as described in Materials and Methods. On the predetermined day, mice were killed and the wounds were dissected out. The dissected wounds were fixed and embedded in paraffin, and the 1.0mm sections were stained immunohistologically with a mouse CD31 antibody using standard techniques. Section were prepared using a microtome. Then vessel counts in granulation tissue. ●; 3% PEP △ ; 0.01% bFGF solution ■ ; Saline. \*\*p<0.001,\*p<0.05 compared with saline. Values represents the mean ±S.E. 5-6 of mice.

### 第3節 考察

糖尿病マウス皮膚創傷に対する各種投与方法における検討において、PEP 腹腔投与で効果が見られなかった原因として、まず、腹腔に投与した PEP が糖尿病による血管障害により末梢血に移行しなかった可能性が考えられる。また、PEP の腹腔内投与量は、マウス腹腔内投与の急性毒性 LD50 の 1500 mg/kg の値の約 4 分の 1 の値 400 mg/kg としたが、今回の検討で、生理食塩水を投与した糖尿病マウスは全匹創傷が完治するまで生存していたのに対し PEP 腹腔投与群では 5 匹中 2 匹は投与途中で死亡した (data not shown)。このことより、遺伝的糖尿病マウスは通常の野生型のマウスよりも体力が弱く、連日の腹腔投与に対して負担が大きかったことも原因ではないかと考えられる。

PEP 含有軟膏剤の投与で治癒促進効果が見られなかった原因は、軟膏基剤としてプラスチックベースを用いたことにあると思われる。PEP 含有軟膏剤からの PEP 放出試験を行ったところ、24 時間後でも PEP のピークは検出限界以下 (0.001%) であったことから (data not shown)、プラスチックベース基剤から PEP が放出されず、効果を発揮できなかったと思われる。創傷治癒過程において分泌される創部浸出液は創傷部位を湿潤環境に保ち表皮細胞の遊走を円滑にする作用を持ち、また浸出液中には各種増殖因子が含まれていることから、<sup>15,16)</sup> この創部浸出液を保持することが治療上必要となる。<sup>17,18)</sup> 今回軟膏基剤として用いたプラスチックベースは浸出液を保持する作用があることから、<sup>15)</sup> コントロール群と比較して顕著な差がみられなかった可能性も考えられる。過去の当研究室での検討で、PEP の安定性などの製剤学的観点から PEP 軟膏調製に際してはプラスチックベース基剤が良いと考えてきたが、明確な効果は認められなかった。軟膏剤は基剤自身のもつ創傷被覆保護効果も期待できるので、PEP の作用を発揮できる軟膏剤開発が出来れば有用であると思われる。今後、水添精製ワセリンのような新しいタイプの軟膏

基剤を用い、PEPの基剤からの放出を高めるように製剤的工夫を施した軟膏を用いて、さらなる検討を行う必要があると思われる。

一方、同じく局所投与でも、PEP水溶液の噴霧投与では、顕著な創傷治癒促進効果を示した。その理由として、創傷部位に直接噴霧することより皮膚組織の中に効率よく吸収されその効果を発揮できるためと考えられる。過去の検討から、3% PEP水溶液の安定性は、4°Cで6週間安定であることが確認されており、またウサギ背部皮膚刺激性試験や健常成人における皮膚安全性試験から“刺激性が低く優れた製品”と判定される基準範囲内であり、安定性および安全性の観点からも3% PEP水溶液は優れていると考えられる。また、噴霧投与は皮膚創傷や褥瘡に対し簡便に投与出来る方法として臨床的にも有用であり、<sup>19)</sup> 近年発売されたbFGF製剤のフィブラスト<sup>®</sup>もスプレー剤として臨床使用されてことから、PEPの臨床応用に際しては水溶液噴霧投与が最も良いと思われる。

この3% PEP水溶液噴霧投与の効果を、実際、臨床で頻用されている0.01% bFGF製剤噴霧投与と比較すると、創傷面積縮小効果はほぼ同等であり、また、肉芽形成、再上皮化および血管形成においてはPEPの方が優れていた。腫瘍細胞増殖因子-β1(transforming growth factor-β1 : TGF-β1)、<sup>20)</sup> bFGF、<sup>21-23)</sup> VEGF<sup>24-26)</sup>などの細胞増殖因子の局所投与により肉芽形成や血管形成が促され創傷治癒が促進することが証明されている。当研究室の過去の検討において、PEPは*in vitro*細胞培養系でマクロファージ系細胞RAW264細胞やヒト臍帯静脈血管内皮細胞におけるVEGFやbFGFの産生を促進させることが明らかになっている。PEPは*in vivo*においても、これら細胞増殖因子の発現を介して治癒促進効果を発揮するものと推察される。

創傷治癒過程の成熟期では、欠損部位を充填するために増加した肉芽組織が、正常皮膚に戻る過程で表皮細胞が産生するTGF、上皮増殖因子(epithelial growth factor : EGF)および表皮角化細胞成長因子(keratinocyte growth factor : KGF)

などの作用により創収縮されて徐々に衰退していく。<sup>6)</sup> bFGF 製剤の使用により、主作用である肉芽形成促進が創傷後期に過剰になり再上皮化が遅延するという臨床報告がある。<sup>27)</sup> 今回の検討でも bFGF 投与群では、再上皮化の遅延は見られなかったものの、増加した肉芽組織の衰退は見られなかった。一方、PEP 投与群においては創傷 15 日目に肉芽面積の有意な減少が見られたことから、PEP は bFGF で問題となる肉芽過形成を起こさず、より自然な創傷治癒を促すのではないかと思われ、PEP を臨床応用する際の利点になり得ると考えられる。

糖尿病性皮膚潰瘍は、神経障害に加えて血流障害を基盤に生じる疾患であることから、炎症期での自己の壊死組織に対する炎症反応が滞るため、組織新生への移行が遅延するといわれている。<sup>28,29)</sup> 今回の実験では遺伝的糖尿病マウス (C57BL/6N Crj-db/db) は 10 週齢のマウスを用いたが、予備検討で 7 週齢のマウスを用いて検討したところ、対象群である治癒が比較的早いため 10 週齢のマウスで見られるほどの顕著な創傷治癒促進効果が得られなかった。このことから PEP は、血行障害が重篤化した糖尿病の難治性皮膚潰瘍に対して治癒促進効果を示すことが期待される。

本章で得られた知見から、糖尿病性皮膚潰瘍に対して、PEP の水溶液噴霧投与は現在臨床使用されている bFGF 製剤と同等もしくはそれ以上の効果が期待できる可能性が示唆された。

### 第3章 In vitro 細胞培養系における PEP の影響

#### 第1節 序

前章までの検討において、遺伝的糖尿病マウスの背部皮膚欠損創に対して、PEP 水溶液噴霧投与は肉芽組織、表皮および血管の形成を促進させることにより創傷治癒促進効果を示すことが明らかとなった。

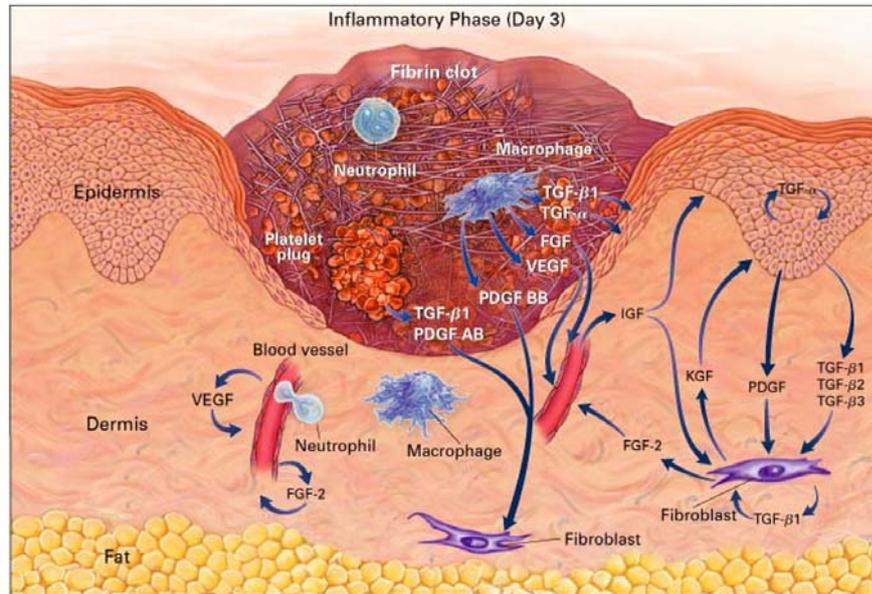
創傷治癒過程には、血液凝固期、炎症期、細胞増殖期および成熟期の4つの段階があり、マクロファージ、線維芽細胞および血管内皮細胞などから VEGF や bFGF などの細胞増殖因子が産生される炎症期を経て、創傷部位への肉芽、表皮および血管の形成などが起こる細胞増殖期に至る (Fig. 10).

6)

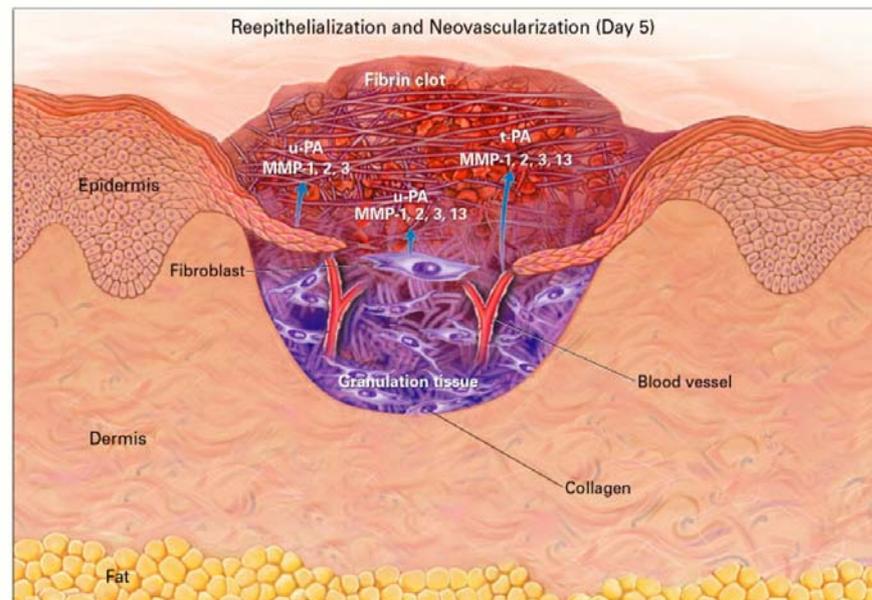
したがって、PEP は創傷治癒過程において、炎症期および細胞増殖期に何らかの影響を及ぼしているのではないかと考えられる。

本章では、PEP が炎症期および細胞増殖期にどのように作用しうるのかを明らかにするため、マクロファージや皮膚線維芽細胞および血管内皮細胞に対する PEP の影響を検討した。

(A)



(B)



**Fig. 10. A scheme of wound healing** <sup>6)</sup>

**(A) Inflammatory phase (Three days after injury)**

Growth factors thought to be necessary for cell movement into the wound are shown. TGF- $\beta$  1,  $\beta$  2 and  $\beta$  3, respectively. TGF $\alpha$ ; transforming growth factor  $\alpha$ ; FGF; Fibroblast growth factor, VEGF; vascular endothelial growth factor AB and BB, IGF; insulin-like growth factor, KGF; keratinocyte growth factor.

**(B) Proliferation phase (Five days after an injury)**

Blood vessels are seen sprouting into the fibrin clot as epidermal cell resurface the wound. Proteinase thought to be necessary for cell movement are shown. The abbreviation u-PA stand for urokinase-type plasminogen activator, MMP-1,2,3 and 13; matrix metalloproteinases 1,2,3 and 13 and t-PA; tissue plasminogen activator.

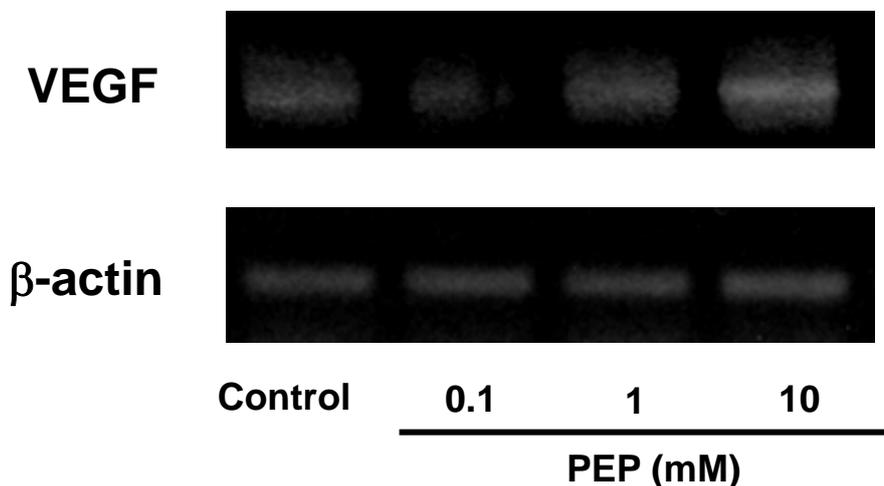
## 第2節 マクロファージおよび皮膚線維芽細胞に対する PEP の影響

線維芽細胞は、細胞増殖期において中心的な役割を担う細胞の一つであり、肉芽組織の成分となる細胞である。その役割は、創傷皮膚欠損部位の充填と細胞外マトリックスの合成である。組織が障害されると、血小板、マクロファージ、血管内皮細胞から分泌される各種細胞増殖因子やサイトカインの刺激や調節を受けて周辺から創傷部位に線維芽細胞が遊走し急速に増殖する。その後、線維芽細胞が産生するコラーゲンを成分とする細胞外マトリックスにより欠損部位の充填が行われると上皮化の土台となる肉芽組織が形成される。

本節では、まず初めに、炎症期で働くマクロファージから分泌される細胞増殖因子に及ぼす影響について検討した。次に、肉芽組織の主成分である線維芽細胞の増殖能や細胞内エネルギーである ATP 量について PEP の影響を検討した。線維芽細胞の増殖を促進するものの代表として、線維芽細胞増殖因子 (bFGF) があげられる。この bFGF は、前章で比較対象として用いた皮膚潰瘍治療薬フィブラスト<sup>®</sup>スプレーの成分でもあり、創傷部位の各細胞の FGF 受容体に結合し肉芽形成促進や血管新生作用を有すると報告されており<sup>30-33)</sup>、創傷治癒を促進する。前章の検討において、PEP 投与によりマウス皮膚創傷部位の肉芽形成、血管新生促進作用が認められた。したがって、PEP は bFGF を介して線維芽細胞を活性化している可能性が考えられるため、線維芽細胞からの bFGF 産生やコラーゲン量に対する PEP の影響を検討した。また、一般的に創傷部位は酸素運搬が途絶えた虚血、低酸素状態と考えられており、<sup>34-36)</sup> 培養条件を通常培養条件に加え、創傷モデルを仮定した低酸素 (1% O<sub>2</sub>) 培養条件における PEP の影響についても、それぞれ比較検討を行った。

### 3-2-1 マクロファージに対する PEP の影響

実際の創傷皮膚では、様々な細胞が混在しており、各種細胞増殖因子を分泌している。細胞増殖期の前段階である炎症期ではマクロファージから様々な増殖因子が分泌され遊走される (Fig. 11) <sup>6)</sup>。したがって、マクロファージからの増殖因子の影響を受けて線維芽細胞が活性化されている可能性が考えられる。当研究室の従来検討により、PEP によるマクロファージからの bFGF の発現は見られなかった。また、マウス皮膚創傷部位において血管の形成促進が認められことから血管内皮細胞に対して強力な血管新生作用を有する vascular endothelial growth factor (VEGF) に注目し、マクロファージに及ぼす影響を検討した。その結果、PEP 添加により濃度依存的にマクロファージによる VEGF の mRNA 発現が観察された (Fig. 11)。

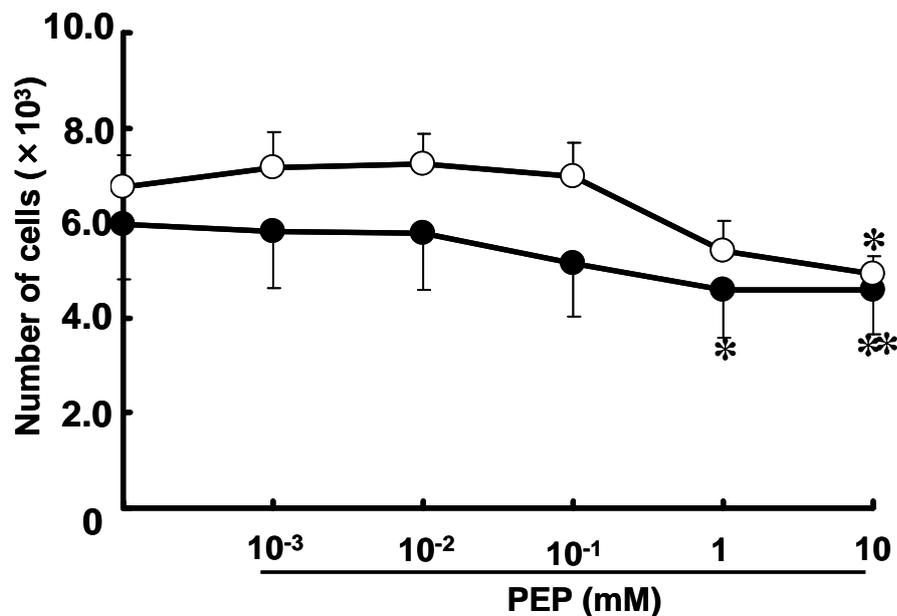


**Fig. 11. VEGF mRNA expression by macrophage in the presence of PEP**

Cells ( $2 \times 10^5$  cells/mL) were placed in 6 well plates and incubated for 24 hr. Then they were serum free starved for 24 hr and incubated with PEP (0.1-10 mM) for 24 hr in medium supplemented with 1% FBS for 24 hr. VEGF mRNA were determined by RT-PCR.

### 3-2-2 皮膚線維芽細胞の増殖に対する影響

欠損創を充填するために肉芽組織が形成される。肉芽組織形成に必要な細胞は皮膚線維芽細胞である。この線維芽細胞の増殖に対する影響を検討した結果、PEP 添加群では、通常培養条件下、低酸素（1% O<sub>2</sub>）培養条件下、いずれの条件においても細胞増殖効果は認められず、高濃度（10 mM）では、細胞増殖が抑制された（Fig. 12）。また、創傷モデルとして行った低酸素培養条件下における検討においても、通常培養条件と同様に PEP による線維芽細胞に対する増殖作用はみられなかった（Fig. 12）。

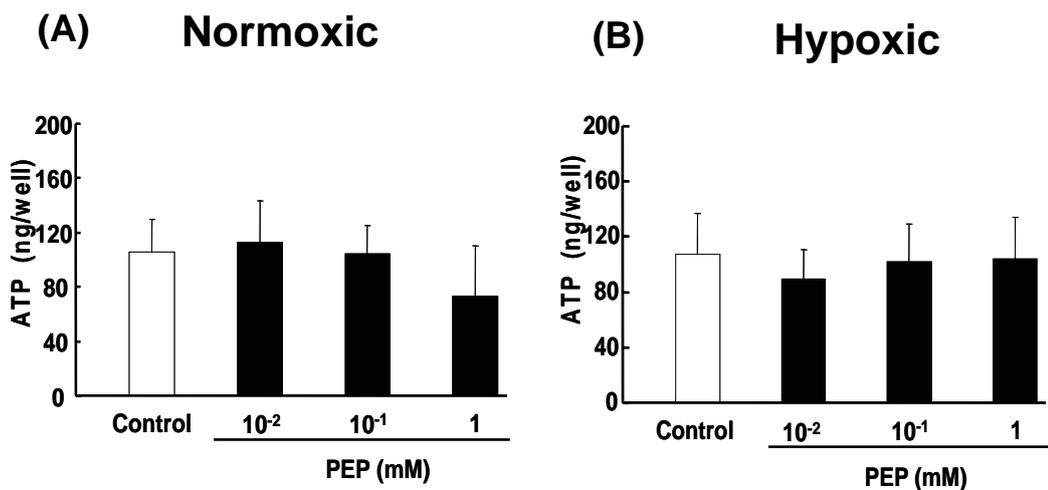


**Fig. 12. Effects of PEP on fibroblast proliferation under normoxic (●) and hypoxic (○) conditions**

Cells ( $5 \times 10^4$  cells/mL) were placed in 96 well plates and incubated for 24 hr and starved serum free for 24hr. Then those were incubated normoxia or hypoxia (1% O<sub>2</sub>) with PEP ( $10^{-3}$ -10 mM) in the media supplemented with 10% FBS for 24 hr. Number of cells were determined by WST-1 assay. Values represent the mean  $\pm$  S.E. of 3 experiments. \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ . Compared with control.

### 3-2-3 皮膚線維芽細胞内の ATP 量に対する影響

前節の結果より, PEP は, 線維芽細胞の増殖能に影響を及ぼさなかった. 背景で述べたように, PEP は, 細胞膜を透過でき, ATP を供給し細胞を賦活することが期待できる. 細胞増殖に対して ATP の関与も考えられているため, <sup>37-38)</sup> 線維芽細胞内 ATP を測定した. その結果, PEP は, 線維芽細胞に対して, 通常培養及び低酸素培養条件下においても線維芽細胞の ATP 量に影響を及ぼさなかった (Fig. 13).

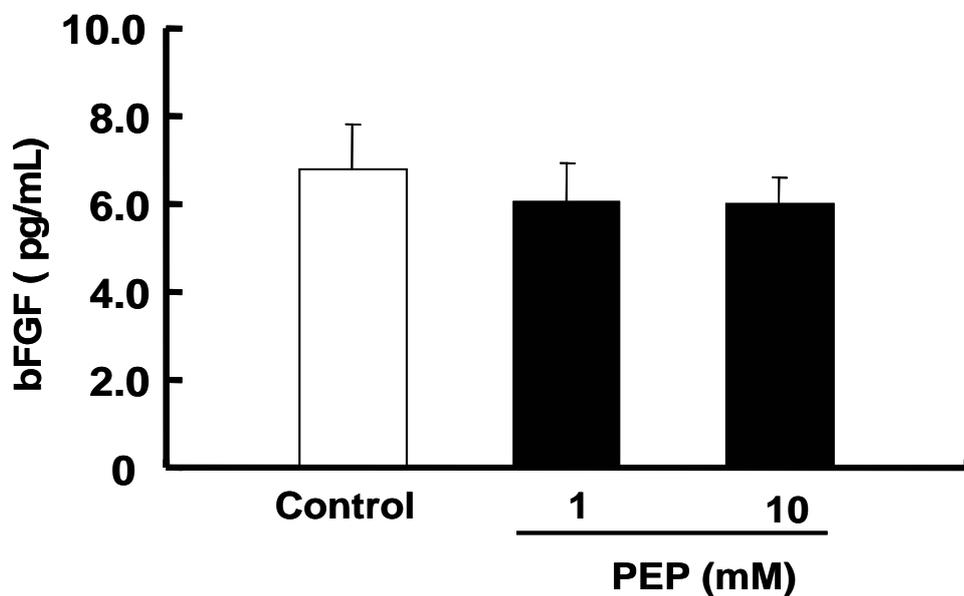


**Fig. 13. Effects of PEP on ATP level of fibroblast cells under normoxic (A) and hypoxic (B) conditions**

Cells ( $5 \times 10^4$  cells/mL) were placed in 96 well plates and incubated for 24 hr. Then those were serum free starved for 24 hr and incubated normoxia or hypoxia (1% O<sub>2</sub>) with PEP (10<sup>-2</sup>-1mM) in the media supplemented with 10% FBS for 24 hr. Intracellular ATP was determined by Luciferase assay. Values represent the mean  $\pm$ S.E. of 4 experiments.

### 3-2-4 塩基性線維芽細胞増殖因子の産生に対する影響

線維芽細胞の増殖因子の代表として、bFGF があげられる。bFGF は、線維芽細胞の増殖を促進する因子として肉芽形成に重要な役割を果たす。この bFGF に対する PEP の影響を検討した結果、細胞増殖と同様に bFGF の産生に影響を及ぼさなかった (Fig. 14)。



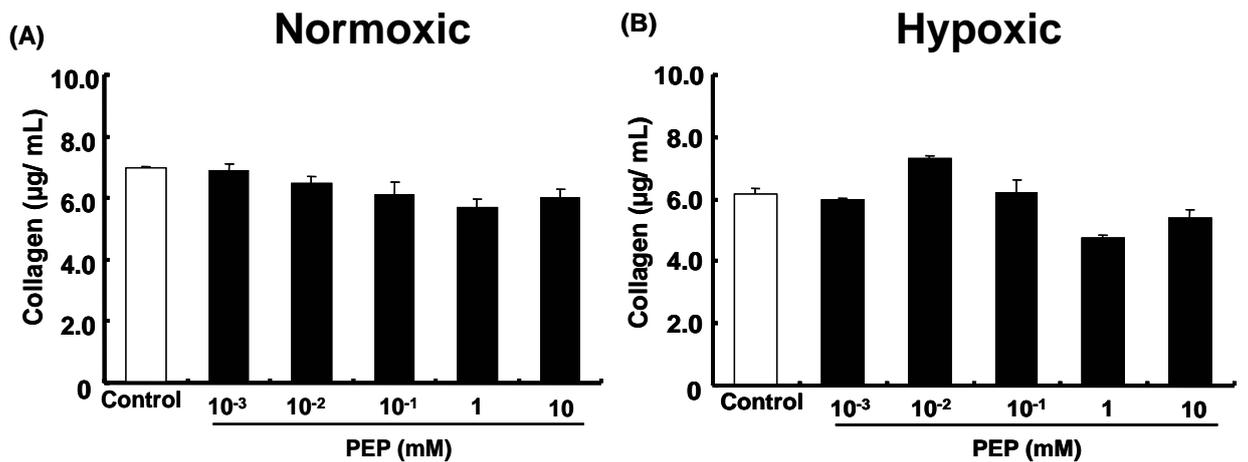
**Fig. 14. Effects of PEP on bFGF production**

Cells ( $5 \times 10^5$  cells/mL) were placed in 6 well plates and incubated for 24 hr and starved serum free for 24hr. Then, those were incubated with PEP (1-10mM) in the media supplemented with 1% FBS for 24hr. bFGF concentration in media were determined by human bFGF ELISA kit. Values represent the mean  $\pm$  S.E. of 4 experiments.

### 3-2-5 皮膚線維芽細胞のコラーゲン産生に対する影響

線維芽細胞が創傷部位へ増殖し、コラーゲンを成分とした細胞外マトリックスを形成することで、創傷部位の充填が起こり成熟し、組織の再構築が行われる。本実験では、線維芽細胞によるコラーゲン産生に対する PEP の影響について検討を行った。

その結果、PEP による線維芽細胞からのコラーゲン産生に対して変化は見られなかった (Fig. 15)。



**Fig. 15. Effects of PEP on Collagen production of fibroblasts under normoxic (A) and hypoxic (B) conditions**

Cells ( $5 \times 10^5$  cells/mL) were placed in 6 well plates and incubated for 24 hr. Then those were starved serum free for 24 hr and those were incubated normoxia or hypoxia (1% O<sub>2</sub>) with PEP (10<sup>-2</sup>-10 mM) in the media supplemented with 5% FBS for 24 hr. Collagen concentrations were determined by soluble collagen assay kit. Values represent the mean  $\pm$  S.E. of 4 experiments.

### 3-2-6 考察

本節では、皮膚由来線維芽細胞に対する影響について、細胞増殖、細胞内 ATP, bFGF 産生およびコラーゲン産生について評価したが、いずれにおいても PEP は影響を及ぼさなかった。このことは、in vivo における PEP の肉芽形成促進作用を期待する結果とは異なる結果を示した。

皮膚線維芽細胞膜上には、PEP 通過に必要な Anion exchanger (AE) が存在すると言われているが、<sup>39)</sup> PEP は、線維芽細胞に対して作用を示さなかった。一方、マクロファージからの増殖因子 VEGF の発現が確認された (Fig. 11)。VEGF は、マクロファージや血管内皮細胞から産生され (Fig. 10)、<sup>6)</sup> 創傷部位で、血管新生作用を示すだけでなく、肉芽形成を促進する bFGF やその他の細胞増殖因子発現を促すと言われている。<sup>6,11)</sup> このことより、前節で in vivo の結果で得られた肉芽形成促進作用は、炎症期に働くマクロファージからの VEGF 発現の影響を受けて 2 次的に線維芽細胞の増殖が起きているものと考えられる。血管内皮細胞に強い作用を認める VEGF により bFGF の産生が誘導されるという報告もある。<sup>11)</sup> また、過去の検討においても、PEP 含有培養液にてマクロファージを培養し、その上清を用いることで線維芽細胞の増殖が促進されたことから、マクロファージからの VEGF の影響を受けている可能性が高いものと思われる。

一般に、細胞増殖因子の作用は、細胞からのパラクリン (傍分泌作用) とオートクリン (自己分泌作用) の 2 種類に分類されと言われている。その作用は、細胞種や近傍細胞によって変化する。<sup>40)</sup> 最近では、成熟期に関わる表皮細胞が線維芽細胞に対して作用し、肉芽形成促進するという報告もあり、<sup>40)</sup> 線維芽細胞と表皮角化細胞との共培養においても相互作用が確認されている。<sup>41)</sup> このことから PEP による肉芽形成促進作用は、表皮細胞か

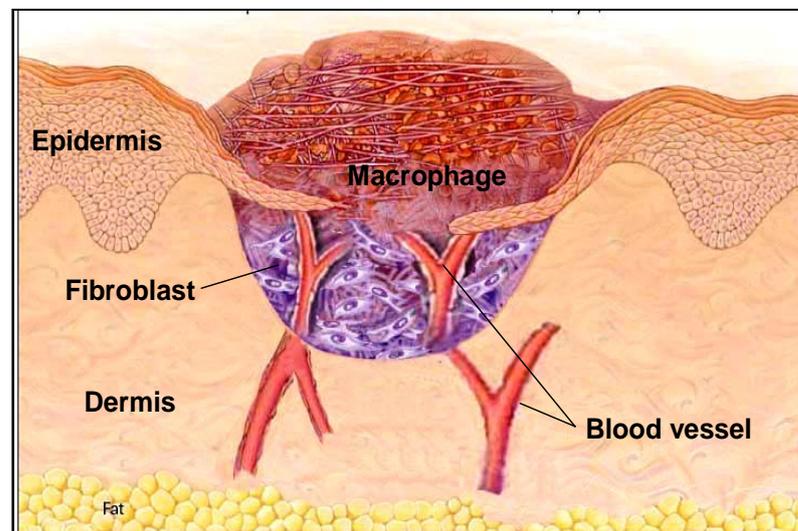
らのパラクリンの影響を受けている可能性も推察される。

本節における検討から，第 2 章で見られた PEP による肉芽組織形成は，直接的に線維芽細胞膜上の FGF 受容体に結合し線維芽細胞増殖作用を示す<sup>6,42)</sup> フィブラスト<sup>®</sup>スプレー (bFGF) とは異なり，炎症期で活発なマクロファージからの VEGF を介した 2 次的な作用により線維芽細胞や血管内皮細胞を増殖し肉芽組織や表皮の形成を促進した可能性が示唆された。

### 第3節 血管内皮細胞に対する PEP の影響

通常、創傷発生から 3 日程度経過すると、創部周辺の組織内血管に存在した血管内皮細胞あるいは前駆細胞から新しく生じた血管内皮細胞が創傷部位内に遊走し、マクロファージなどから分泌された様々な細胞増殖因子やサイトカインにより細胞の分化、増殖が調整され血管腔が形成される。脈管が形成されることで血液運搬が可能となり創部周辺の細胞に必要な酸素や栄養の供給が開始されると創傷治癒が進行する (Fig. 16).<sup>6)</sup> 創傷治癒過程での細胞増殖期では、肉芽組織を構成する線維芽細胞と共に、血管内皮細胞による血管新生が重要な役割を果たす。

前節までの検討において、PEP はマクロファージを介して線維芽細胞の増殖を促進することが示唆された。そこで本節では、主に肉芽組織への栄養供給源となる血管内皮細胞の増殖や脈管形成に及ぼすと PEP の影響を細胞増殖因子産生の視点から以下検討した。



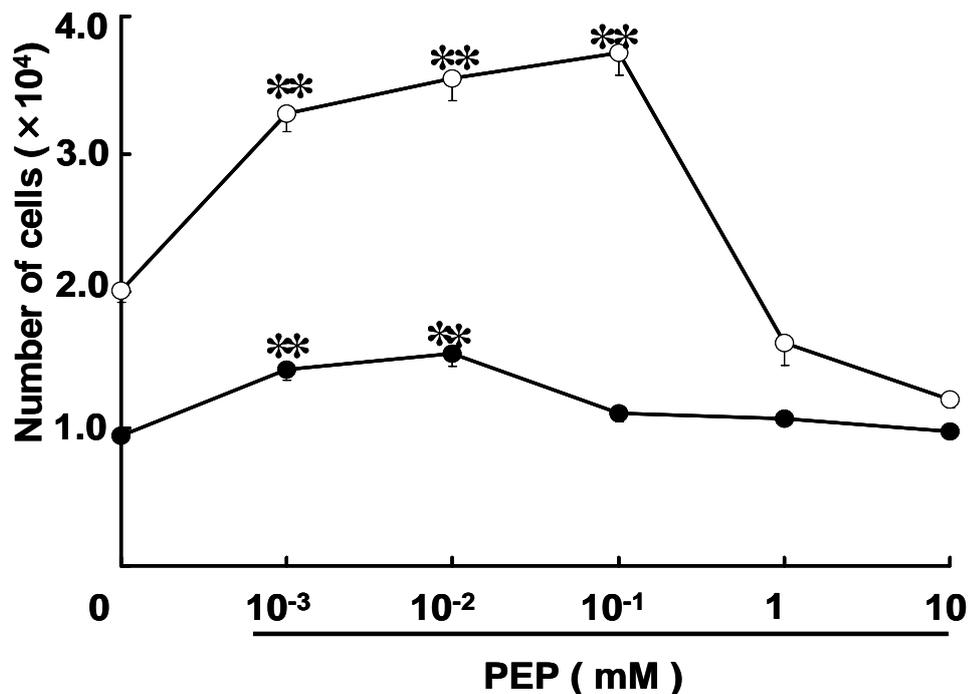
**Fig. 16. Numerous new capillaries endow the stroma with its granular appearance<sup>6)</sup>**

Macrophage, fibroblasts and blood vessels move into the wound space. The macrophages provide a continuing source of growth factors necessary to stimulate fibroplasia and angiogenesis. Fibroblasts produce the new extracellular matrix necessary to support cell in growth and blood vessels carry oxygen and nutrients necessary to sustain cell metabolism.

### 3-3-1 血管内皮細胞の増殖に対する影響

血管形成の第一段階として、血管内皮細胞の増殖に対する PEP の影響を、線維芽細胞の場合と同様に、通常培養条件下及び低酸素培養条件 (1% O<sub>2</sub>) 下にて検討した。

その結果、通常培養条件と比較して低酸素培養条件下において血管内皮細胞の増殖は、顕著であった。両条件下において、1 μM および 10 μM PEP 添加により有意な血管内皮細胞の増殖促進が見られた (Fig. 17)。さらに、PEP 添加濃度が増加すると、増殖抑制的な傾向がみられた。



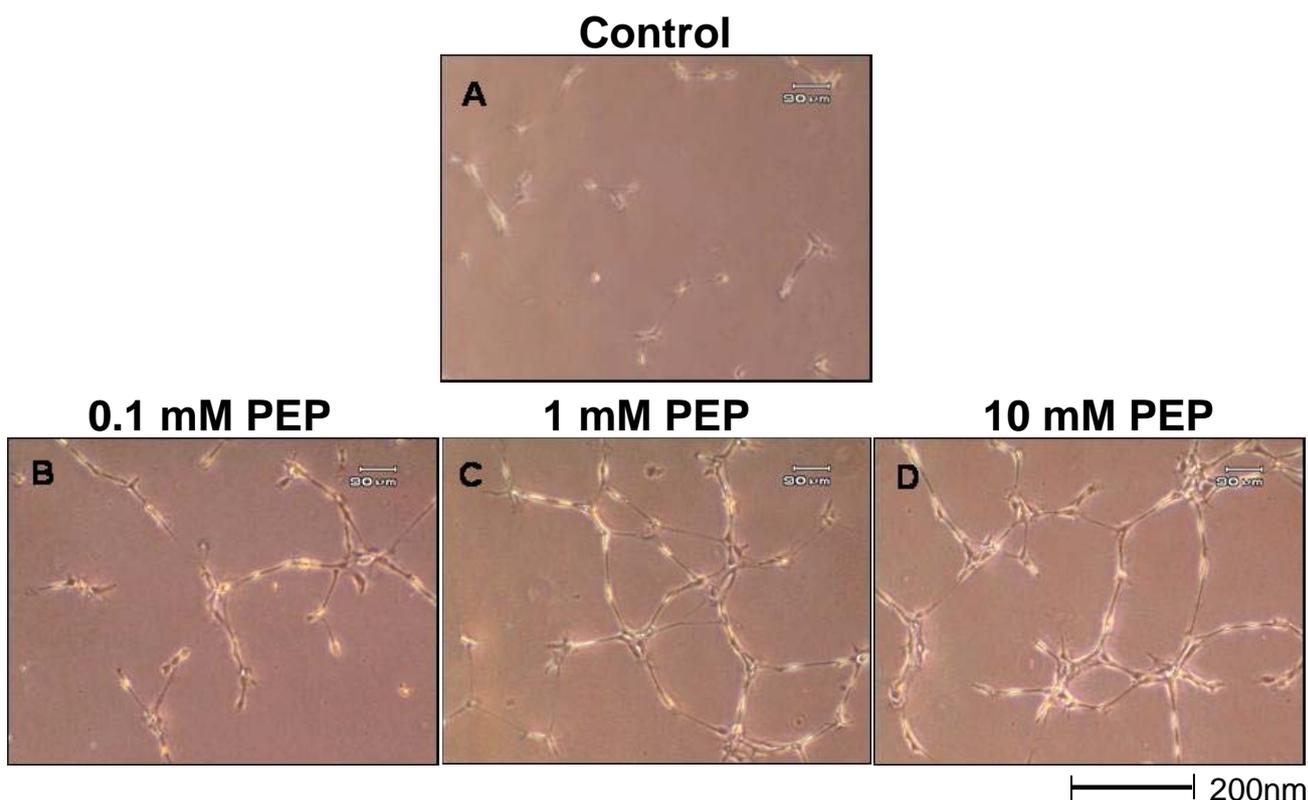
**Fig. 17. Effects of PEP on vascular endothelial cell proliferation under normoxic (●) and hypoxic (○) conditions**

Cells ( $5 \times 10^4$  cells/mL) were placed in 96 well plates and incubated for 24 hr. Then they were serum free starved for 24 hr. After 24hr, they were incubated normoxia condition or hypoxia (1% O<sub>2</sub>) condition with PEP ( $10^{-3}$ -10 mM) or without in media for 24 hr. Number of cells were determined by WST-1 assay. Values represent the mean  $\pm$  S.E. of 5-6 experiments. \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ . Compared with control (0 mM).

### 3-3-2 血管内皮細胞の脈管形成に対する影響

創傷治癒過程では、血管内皮細胞が増殖し、細胞外基質が消化され細胞が遊走し細胞が遊走して管腔が形成される。このように、機能的な血管が構築されると、創傷部位に酸素や栄養が供給される。前節において、PEP は血管内皮細胞の増殖を促進した。そこで、脈管形成に対する PEP の影響を明らかにするため、細胞外基質の成分であるコラーゲンゲル上で血管内皮細胞を通常条件下で培養し、形態を観察した。

その結果、Fig. 18 に示すように、PEP の添加濃度依存的に血管内皮細胞の脈管形成が観察された。



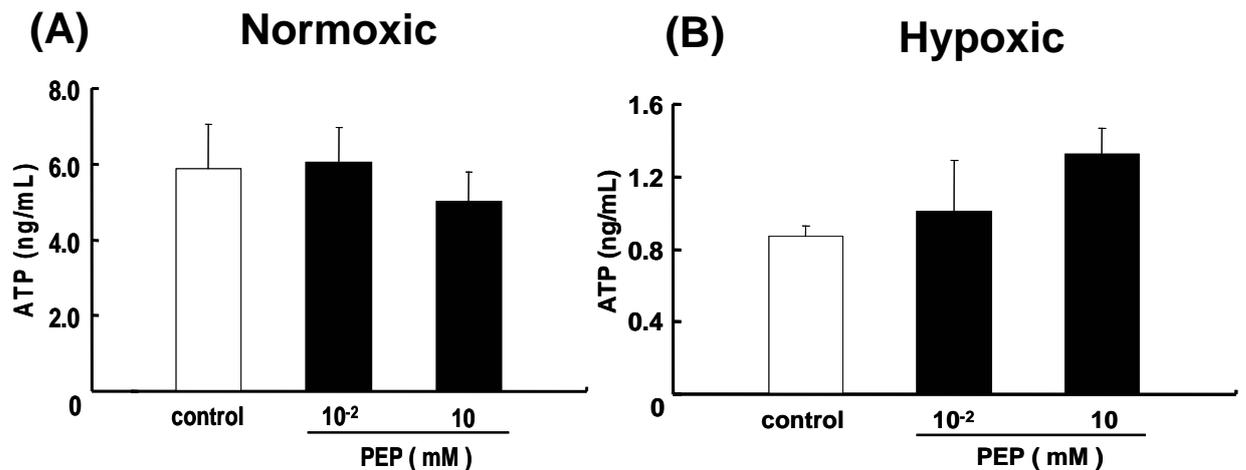
**Fig. 18. Effects of PEP at various concentrations on vascular endothelial tube formation**

Cells ( $1 \times 10^4$  cells/well) were seeded on a layer of previously polymerized Matrigel with PEP (0.1-10 mM) and incubated. After 6 hr incubation, cell morphology were observed through a phase contrast microscope ( $\times 40$ ). (A): control, (B): 0.1 mM PEP, (C): 1 mM PEP, (D): 10 mM PEP.

### 3-3-3 血管内皮細胞内の ATP 量に対する影響

前節において、PEP による血管内皮細胞の増殖作用および脈管形成作用が確認された。この血管新生に対する PEP の作用メカニズムを探るため、細胞のエネルギー源となる血管内皮細胞内 ATP 量を通常培養条件下および低酸素培養条件 (1% O<sub>2</sub>) 下で検討した。

その結果、通常条件に比べて、低酸素培養条件では血管内皮細胞内 ATP 量は 6分の1程度に低下したが、PEP 添加により ATP 量が増加する傾向がみられた。



**Fig. 19. Effects of PEP on ATP level of vascular endothelial cells under normoxic (A) and hypoxic (B) conditions**

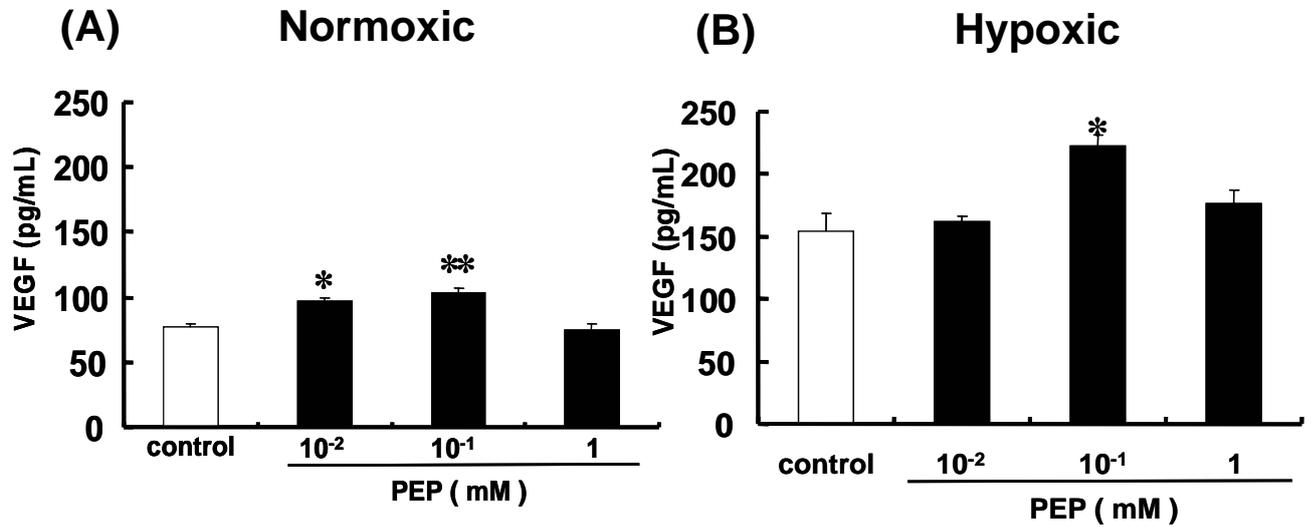
Cells ( $5 \times 10^4$  cells/mL) were placed in 96 well plates and incubated for 24 hr. Then they were serum free starved for 24hr and incubated normoxia or hypoxia (1% O<sub>2</sub>) with PEP (10<sup>-2</sup>, 10 mM) in media for 24 hr. Intracellular ATP was determined by Luciferase assay. Values represent the  $\pm$ S.E. of 5-6 experiments.

#### 3-3-4 血管内皮細胞増殖因子の産生に対する影響

創傷部位の皮膚組織には、様々なサイトカインや増殖因子が、<sup>43)</sup> 創傷治癒過程での血管新生に影響を及ぼしている。<sup>44)</sup> 中でも、主に血管内皮細胞で産生され、強力な血管新生および脈管形成作用を有するものとして、血管内皮細胞増殖因子 VEGF が知られている。<sup>45)</sup>

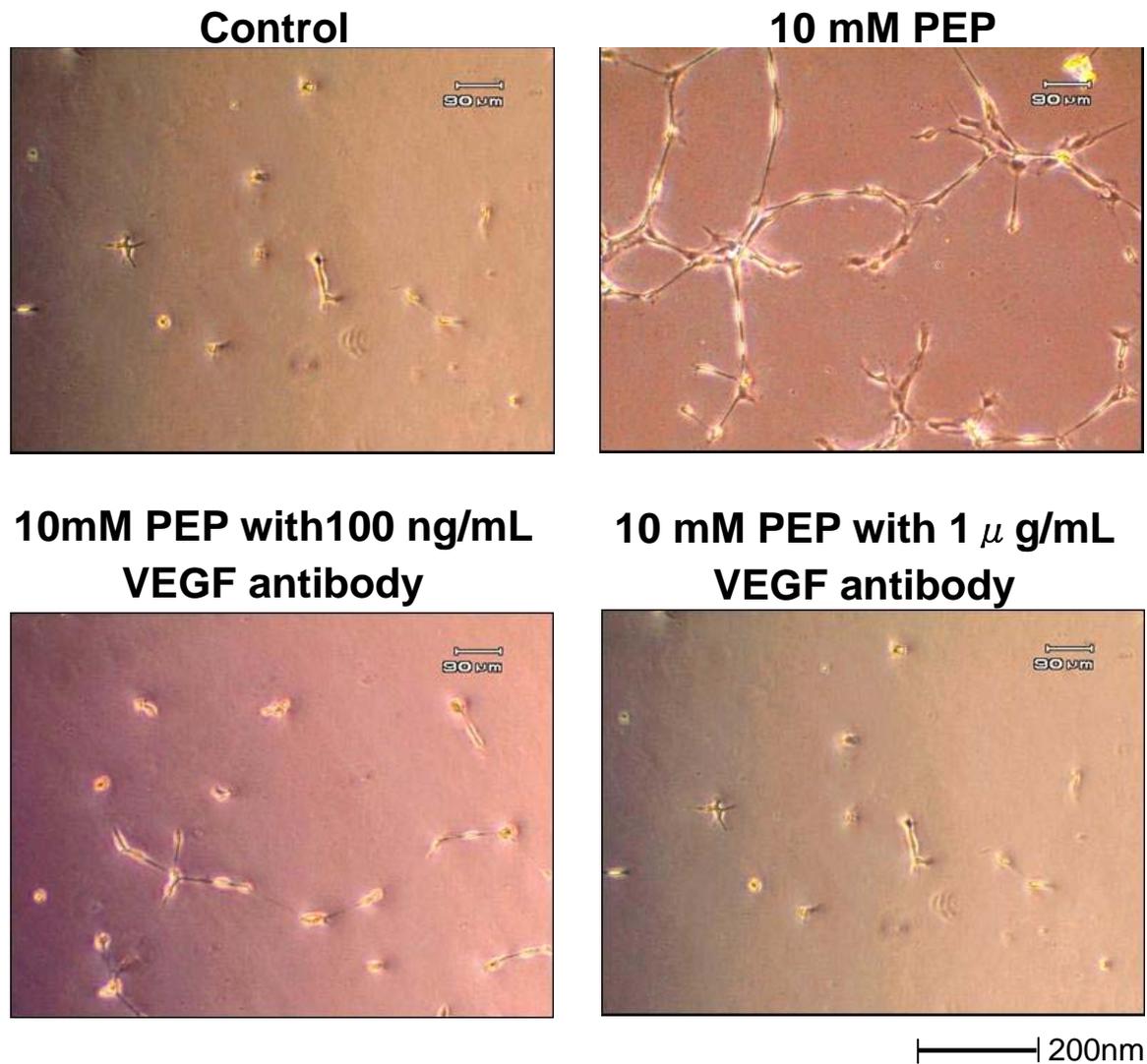
PEP による血管新生に VEGF が関与しているかを確認するために細胞上清中の VEGF 量を測定した結果、PEP により VEGF の上昇が認められた (Fig. 20)。

さらに、PEP による脈管形成作用に対する VEGF の関与を確認するため、VEGF 中和抗体を用いて、脈管形成を比較した。その結果、10 mM PEP 添加による脈管形成は、VEGF 中和抗体により濃度依存的に阻害された (Fig. 21)。



**Fig. 20. Effects of PEP on vascular endothelial growth factor production under normoxic (A) and hypoxic (B) conditions**

Cells ( $5 \times 10^4$  cells/well) were plated in 6 well plates and allowed to adhere for 24 hr. Then they were incubated with PEP ( $10^{-1}$ -1 mM) for 24 hr endothelial growth medium under normoxia or hypoxia (1% O<sub>2</sub>). Then, VEGF concentration in medium was determined by human ELISA kit. Values represent the mean  $\pm$  S.E. of 3 experiments. \* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$  compared with control.



**Fig. 21. Effects of VEGF antibody on PEP-induced tube formation of vascular endothelial cells**

Cells ( $1 \times 10^4$  cells/well) were seeded on a layer of previously polymerized Matrigel with each medium and incubated. After 6 hr incubation, cell morphology were observed through a phase contrast microscope ( $\times 40$ ).

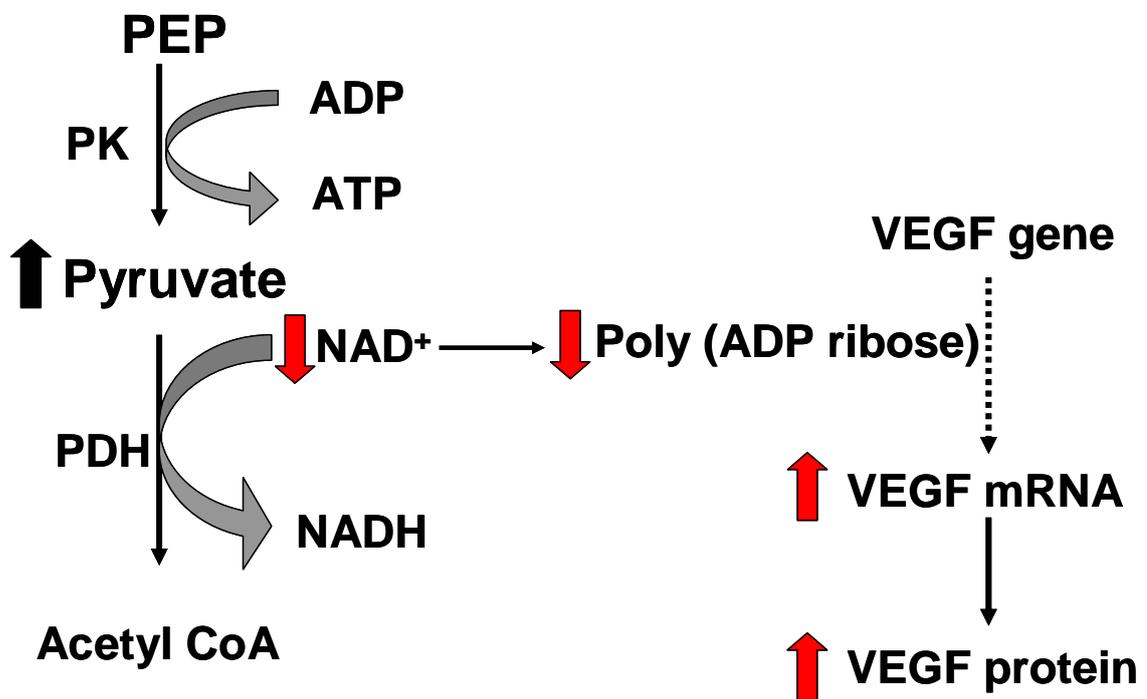
### 3-3-5 考察

PEP は、血管内皮細胞の細胞増殖能や脈管形成能を有することが確認され、前章の糖尿病マウスの皮膚創傷における血管新生作用が細胞培養系においても確認された。さらに、PEP の脈管形成作用は、VEGF 抗体により阻害されたことより VEGF が主に関与することが示唆された。

一般に、血管新生から脈管形成までの過程は、いくつかの段階を経て進行する。<sup>44)</sup> まず初めに、血管の構成細胞である血管内皮前駆細胞 (angioblast) や血管内皮細胞が増殖、遊走、分化を経て、様々な増殖因子やサイトカインが関与し、脈管が形成される。PEP は、この脈管形成の初段階である血管内皮細胞の増殖促進を促進した。この細胞増殖促進の理由として、PEP による細胞への ATP 供給を想定したが、対照と比べて有意な変化はみられなかった。仮に、PEP により細胞へ ATP が供給されたとしても、その後、細胞増殖のエネルギー源として消費されたとすると、PEP 添加後 24 時間後の ATP 量には差が見られなかった可能性も考えられる。

一方、細胞増殖因子である VEGF 産生については、PEP は顕著な効果を発揮し 100  $\mu$ M 添加において通常および低酸素の両培養条件において有意な効果が観察された。VEGF は、血管内皮細胞をはじめ、様々な種類の正常細胞や癌細胞および炎症細胞などで発現・分泌される。低酸素刺激は、VEGF 転写因子である hypoxia inducible factor (HIF) の安定化を経て、VEGF 発現を誘導することが知られている。<sup>46)</sup> 本実験条件下においても、通常培養条件と比較して低酸素培養条件下における VEGF 発現量が増大した。さらに、PEP 添加による低酸素培養条件下での発現上昇が見られたことから、低酸素培養条件に関与する VEGF 転写因子 HIF に PEP が何らかの機序で作用し、発現を上昇している可能性が示唆される。これまでの報告によると、PEP の分解産物であるピルビン

酸による VEGF の発現には、HIF 誘導との関与が示唆されている。47) PEP が分解し、このような作用を示した可能性も考えられる。また、PEP は、好氣的解糖系もしくは嫌氣的解糖系へそれぞれ代謝され、アセチル CoA や乳酸、オキザロ酢酸に分解する。この際、NAD<sup>+</sup>が消費されると、VEGF 発現抑制をしている poly (ADP ribose) を抑制することで、VEGF 発現を上昇する経路も考えられる (Fig. 22)。48)



**Fig. 22. A possible mechanism of VEGF up-regulation by PEP and pyruvate**

PEP ; phosphoenolpyruvate, ADP ; adenosine diphosphate, ATP ; adenosine triphosphate, NAD(H) ; nicotinamide adenosine dinucleotide, PK ; pyruvate kinase, PDH ; pyruvate dehydrogenase, VEGF ; vascular endothelial growth factor, mRNA ; messenger RNA.

いずれにしても、PEPによるVEGF発現機序の詳細は未だ不明であるが、創傷治癒において、創傷皮膚の血管にPEPの作用点が存在し創傷治癒を促進していることが示唆された。

実際、VEGFを糖尿病マウスの皮膚創傷に局所投与すると、血管新生や肉芽形成や表皮形成を促進し、結果的に創傷治癒を促進する。<sup>11)</sup> 一方、VEGF抗体を投与することで創傷治癒が遅延したとの報告があり、<sup>49)</sup> 糖尿病マウスの創傷治癒にVEGFが重要な役割を果たしていることが立証されている。今回観察されたPEPの作用は、VEGFによる創傷治癒促進効果に類似していることから、PEPによる血管形成作用は、VEGFを介したものであることが示唆される。さらに、VEGF投与した創傷皮膚からは、様々な増殖因子やサイトカインが分泌され、血小板由来成長因子(PDGF)や線維芽細胞増殖因子(bFGF)の発現が3倍に上昇することが確認されている。<sup>11)</sup> これら細胞増殖因子は、それぞれ産生細胞の増殖や遊走を促し、創傷部位の細胞を活性化することで間接的に肉芽形成やコラーゲン生成や上皮化へと創傷治癒進行を促進する。よって、PEPの血管内皮細胞とマクロファージからのVEGF産生促進作用を合わせて考えると、強力な脈管形成作用が期待でき、酸素や栄養供給を経て、さらに肉芽組織や表皮形成を促進し、結果的に創傷治癒促進しているものと推察する。

興味深いことに、フィブラスト<sup>®</sup>スプレーの成分であるbFGFを虚血モデルのウサギ皮膚創傷に投与した群では、肉芽組織形成や血管新生に対し顕著な効果を示さなかったのに対し、VEGFを投与した群では血管新生と肉芽組織形成を促し、治癒が促進されたという報告がある。<sup>50)</sup> この理由として、VEGFは、bFGFと異なり、先ほど述べたHIFとの関連があり、虚血、つまり低酸素状態に反応性が高いためではないかと考えられている。多くの糖尿病患者は、代謝異常が原因で、血管障害が原因で皮膚創傷部位では、VEGF活性が低下している。<sup>51)</sup>

そのため、末梢下肢での糖尿病皮膚潰瘍部位では、虚血や低酸素状態が続き、治癒遅延が生じている。<sup>52)</sup> 以上の結果や従来<sup>51)</sup>の報告を考え合わせると、創傷部位の低酸素条件下でその活性が上昇する VEGF を介した作用を有する PEP は、創傷治癒遅延の改善に有力であり、線維芽細胞に直接作用する bFGF とは異なり、新たな作用機序を持つ糖尿病性皮膚潰瘍薬として期待できるものと考えられる。

## 第4章 総括

本研究では、細胞膜を透過できるエネルギー運搬・供給体として、細胞賦活化作用を有する PEP の糖尿病性皮膚潰瘍治療薬としての有効性評価を目的として、既存の皮膚潰瘍治療薬との比較検討を行った。さらに、PEP の創傷治癒促進の機序解明を明らかにするため、創傷治癒に重要な役割を果たすマクロファージ、線維芽細胞、血管内皮細胞に及ぼす PEP の影響を検討した。以下に、本研究で得られた知見を総括する。

- 1) 遺伝的糖尿病マウス皮膚欠損創に対する創傷治癒促進効果は、PEP の腹腔内投与や軟膏剤投与では顕著な効果は認められなかった。一方、3% PEP 水溶液噴霧投与においては、現在臨床で使用されているフィブラスト<sup>®</sup>スプレー (bFGF 製剤) とほぼ同等の創傷面積縮小効果を示した。さらに、病理組織学的検討においてフィブラスト<sup>®</sup>スプレー (bFGF) と比較して創傷後早期から肉芽組織や表皮および血管形成の促進が認められた。
- 2) 通常培養条件下および低酸素培養条件 (1% O<sub>2</sub>) 下、ヒト皮膚由来正常線維芽細胞 (TIG 109) に及ぼす PEP の影響を検討した結果、PEP は線維芽細胞の増殖に対して直接的な影響を及ぼさなかった。一方、PEP は、炎症期に関与するマクロファージにおける血管内皮細胞増殖因子 VEGF の発現を上昇し、間接的に線維芽細胞を増殖する可能性が示唆された。
- 3) 正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に及ぼす PEP の影響を検討した結果、顕著な細胞増殖促進や脈管形成作用が確認された。さらに、PEP の脈

管形成作用は、VEGF 中和抗体により阻害されたことから VEGF の関与が示唆された。

以上の結果より、PEP 水溶液噴霧投与による創傷治癒促進効果は、現在臨床使用されている皮膚潰瘍治療薬と同等もしくはそれ以上であり、特に創傷治癒過程における炎症期から細胞増殖期に顕著な効果が確認された。また、その作用機序としてマクロファージや血管内皮細胞からの VEGF を介した細胞増殖、血管新生の促進が示唆された。

本研究で得られた知見は、細胞増殖因子の産生増大を介した新規の作用機序を有する PEP を局所適用すると、血管障害により治癒が遅延する糖尿病性皮膚潰瘍の症状悪化を早期から防止できる可能性を示唆している。今後の細胞増殖因子を利用した再生医療研究にも有効利用が期待される。

## 実験の部

### 1, 実験材料

#### 1.1 試料

ホスホエノールピルビン酸ナトリウム塩 1 水和物 (PEP·Na·H<sub>2</sub>O) は, 宇部興産から恵与されたものを用いた. Fetal bovine serum ( FBS ) は, Hyclone 社製のものを使用した. Minimum essential medium ( MEM ) は Sigma 社製を用いた. Endothelial Growth Medium-2 ( EGM-2 ) は, Cambrex 社製を用いた. WST-1 assay kit は (株) 同仁化学研究所製を使用した. BD バイオコート™ マトリゲル™ マトリックスコートプレートは, BD Bioscience 社製を使用した. アネロパック®・ケンキ for cell は三菱ガス化学 (株) 社製のものを使用した. その他の試薬及び溶媒は, 試薬特級品を用いた.

#### 1.2 動物実験

熊本大学動物実験指針及び NIH ガイドラインに準じて行った. 人工照明を 12 時間の明暗周期で管理し, 飼料及び水は不断給与できる環境とした.

動物実験には, 遺伝的糖尿病マウス ( C57BL/6N Crj-db/db 10 週齢雄性) を用い, 全て日本チャールズ・リバー株式会社より購入した SPF ( Specific pathogen free ) グレードを使用した.

### 1.3 細胞培養

ヒト皮膚正常線維芽細胞である TIG109 は, 10% FBS, 100 IU/ml penicillin, 100 IU/ml streptomycin 含有の MEM で培養を行った.

マウス由来マクロファージである RAW264 は, RIKEN BioResource Center (RCB0535) 社製のものを用いた. 培養には, 10%FBS (37°C 30 min 非働化したもの) を用い, 100 IU/ml penicillin, 100 IU/ml streptomycin 含有の MEM で培養を行った.

ヒト正常臍帯血管内皮静脈細胞 ( Human umbilical vein endothelial cell HUVEC ) は, タカラバイオ株式会社から購入した. 培養液には, EGM-2 を用いて培養を行った.

なお, それぞれの実験において用いた各濃度の PEP 溶液は, -30°C で凍結保存した 1M PEP 水溶液 (5N NaOH で pH 8 に調整) を溶解し, 使用した.

## 2, 実験方法

### 2.1 糖尿病マウスに対する PEP の治癒促進効果の検討

遺伝的糖尿病マウス (C57BL/6N Crj-db/db10 週齢雄性) の背部皮膚を pentobarbital ( 30 mg/kg ) 麻酔下にて除毛し, 側臥にて除毛部位に直径 13 mm の欠損創を 1 箇所作成した. 欠損創作成翌日より, 欠損創に各試薬をそれぞれの投与方法にて投与し, 欠損部位の長径および短径をノギスにより測定し, 求めた長短径から下式により面積比を算出し, 評価した.

$$\text{面積比} \quad (\%) = \frac{\text{各測定日における欠損創部の長径} \times \text{短径}}{\text{欠損創作成日における欠損創部の長径} \times \text{短径}} \times 100$$

### 2-1-1 腹腔内投与

遺伝的糖尿病マウス (C57BL/6N Crj-db/db10 週齢雄性)の背部皮膚を pentobarbital (30 mg/kg) 麻酔下にて除毛し, 側臥にて除毛部位に直径 13 mm の欠損創を 1 箇所作成した. 欠損創作成翌日より, 欠損創に PEP 投与量として, PEP の生理食塩水溶液 (40 mg/mL) を調製し, マウスに PEP として 400 mg/kg を 1 日 1 回腹腔投与した.

### 2-1-2 軟膏剤投与

遺伝的糖尿病マウス (C57BL/6N Crj-db/db10 週齢雄性)の背部皮膚を pentobarbital (30 mg/kg) 麻酔下にて除毛し, 側臥にて除毛部位に直径 13 mm の欠損創を 1 箇所作成した. 欠損創作成翌日より, 欠損創部全体に均一になるようにプラスチックベースを基剤とした 3%PEP 含有軟膏を, 1 日 1 回約 3 g (PEP として約 0.09 g) 塗布した.

### 2-1-3 水溶液噴霧投与

マウスの背部皮膚を pentobarbital (30 mg/kg) 麻酔下にて除毛し, 側臥にて除毛部位に直径 8 mm の欠損創を左右対称に 2 箇所作成した. 欠損創作成翌日より, 欠損創及びその周辺に, 各試験物質は, (生理食塩水, 3% PEP 水溶液, 0.01%bFGF 水溶液; フィブラスト<sup>®</sup>スプレー) を 1 日 1 回 200  $\mu$ L ずつ, 均一になるように噴霧投与した. 投与群分けについては, 各マウスの背部に左右それぞれ異なる試薬を順不同に割り当てて投与をおこなった.

なお, 用いた PEP 水溶液は, 5N NaOH により pH 7.4 に調整し, NaCl により浸透圧を等張としたものを用いた.

## 2.2 病理組織学検討

遺伝的糖尿病マウス（C57BL/6N Crj-db/db10 週齢雄性）を 1 群につき 5-6 匹 使用した。

上記と同様に直径 8 mm の欠損創を作成し，試験物質を 1 日 1 回噴霧投与した。欠損創作成後 5, 10, 15 日目に安楽死させたマウスより欠損創およびその周辺組織を摘出し，ホルマリン（10%）にて 24 時間固定した。その後，パラフィン包埋組織切片を作成し，マイクロトームにより皮膚欠損創の長径にそって薄切りした切片を作成し，Hematoxylin & Eosin 重染色を行い，検体とした。

肉芽組織面積，表皮伸率の評価には，これらの検体を顕微鏡下，画像処理し，プランメーター（PLANIX 10S 型，IMAI CORPOLATION 社製）にて，下式にて算出した。

$$\text{表皮伸率 (\%)} = \frac{\text{伸長表皮長の合計}}{\text{欠損創部表面の長径}} \times 100$$

血管数については，Hematoxylin & Eosin 重染色のマウス創傷皮膚検体を用いて，血管内皮に特異的に発現を認める Mouse CD31（PECAM-1）monoclonal antibody（NOVO CASTA™ 社製）にて免疫染色を行った。なお，免疫染色については，0.5%メタノールで 10 分間固定し，100 倍希釈した 1 次抗体を 4℃で 24 時間反応させた。また，2 次抗体については，1 時間反応させ，DAB 試薬にて発色させた。染色した標本を基に，光学顕微鏡下で，肉芽組織内の血管数について観察し，1 標本に対して，3 回カウントし，統計処理を行い，評価した。

### 2.3 線維芽細胞に対する PEP の影響

#### 1) マウス由来マクロファージ(RAW264)からの vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA 発現に対する影響

6 well plate に RAW264 を  $2 \times 10^4$  cells/well 播き，細胞が生着するために 24 時間培養した．その後，各濃度の PEP ( $10^{-2}$ -1 mM ) を添加後，通常条件 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) にて培養した後，TRIzol (TaKaRa 社製) を加えて，同試薬添付文書のプロトコールに従い，RNA 回収・精製を行った．得られた RNA (total RNA) を 260 nm における吸光度から求め，さらに 1  $\mu$ g/mL の RNA 水溶液を調整した．なお，用いた器具は，全て乾熱滅菌，オートクレーブおよび DEPC (RNase free water) で処理したものをを用いた．VEGF mRNA 発現については，TaKaRa RNA PCR kit (AMV) Ver. 2.1(タカラバイオ社製) を用いて，reverses transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)法を行った．各 RNA の cDNA 特異的 PCR プライマーの塩基配列は，以下の通りで， $\beta$ -actin は，内標準として測定した．

#### Mouse VEGF

Sense : 5' ACCCTGGCTTTACTGGTG3'

Antisense : 5' GGTCTGCATTCACATGG3'

#### Mouse $\beta$ -actin

Sense : 5' AGCCATGTACGTAGCCATCC 3'

Antisense : 5' TTTGATGTCACGCACGATTT3'

PCR は，サーマルサイクラー (TaKaRa 社製) を用いて，それぞれ以下の条件で行った．

## Mouse VEGF

(35 cycle at 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72 °C for 1 min)

## Mouse $\beta$ -actin

(18 cycle at 94°C for 1 min, 51°C for 1 min, 72 °C for 1 min)

PCR 後, 反応液を 1.5%アガロースで電気泳動した. いずれの cDNA も, 予想される base pair にバンドとして検出された. なお, 全てのサンプルにつき, RT 反応を行わずに PCR を行い, genomic DNA が混入されていないことを確認した.

## 2) 線維芽細胞の増殖に対する検討

96 well plate に TIG109 を  $5 \times 10^4$  cell/well で播き, 細胞が生着するために 24 時間培養した後, 血清を含まない培養液 (MEM) で 24 時間培養した. その後, 各濃度の PEP ( $10^{-3}$ -10 mM ) を添加後, 通常条件 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) と低酸素条件 (1% O<sub>2</sub>) にて培養し 24 時間後に WST-1 試薬 (Wako 社製) を添加し, 450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (Immuno mini NJ-2300 製) にて測定し, 生細胞数を求めた.

今回用いた WST-1 assay の測定原理は, 生細胞中の脱水素酵素により還元され黄色ホルマザンを生じ (Fig. 24), その吸光度と生細胞数の増加に直線的な相関があるため, 450 nm における黄色ホルマザンの吸光度を測定することで, 生細胞数を測定することができる分析法である.

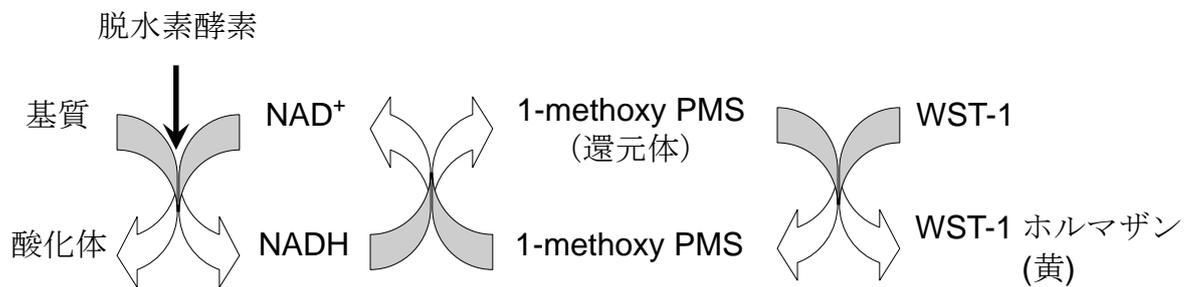


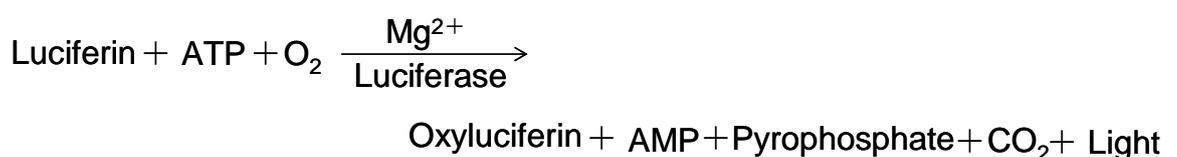
Fig.23. Reaction scheme of WST-1 assay

NAD(H) ; nicotinamide adenine dinucleotide, 1-methoxy PMS ; 1-methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate.

### 3) 線維芽細胞内 ATP の測定

ATP 測定は, ATP Assay Kit ( CALBIOCHEM® 社製) に準じた Luciferase Assay を用いた<sup>2)</sup>.

96 well plate TIG109 を  $5 \times 10^4$  cell/well で播き, 細胞が生着するために 24 時間培養した後, 血清を含まない培養液 (MEM) で 24 時間培養した. その後, 各濃度の PEP ( $10^{-3}$ -10 mM) を添加後, 通常条件 ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) と低酸素条件 (1%  $\text{O}_2$ ) にて培養した後, 上清を除去し, phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後, nucleotide releasing buffer を  $100 \mu\text{L}/\text{well}$  で添加後, ATP monitoring buffer ( Luciferase ) を  $10 \mu\text{L}/\text{well}$  で添加して Luminometer にて発光量を測定した. 測定原理は以下の通りである.



#### 4) 線維芽細胞増殖因子 fibroblast growth factor (bFGF) 産生に対する影響

6 well plate に TIG109 を  $5 \times 10^4$  cells/well 播き，細胞が生着するために 24 時間培養した．その後，各濃度の PEP (1-10 mM ) を添加後，通常条件 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) と低酸素条件 (1% O<sub>2</sub>) にて培養した後，上清を回収し，3000×g で 10 分間遠心分離し，上清中の bFGF 濃度を ELISA kit ( R&D systems 社製) を用いて測定した．

#### 5) 線維芽細胞のコラーゲン産生に対する影響

TIG109 を  $2 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup> で 6 well に播き，細胞が生着するまで 24 時間培養した後，血清を含まない培養液にて 24 時間培養した．各濃度の PEP (10<sup>-3</sup>-10 mM ) を含有した 5% 血清を含む培養液を添加後，通常培養条件 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) と低酸素培養条件 (37°C, 1% O<sub>2</sub>) にて培養し 24 時間後に培養上清を回収した．3000×g で 10 分間遠心し，上清を回収した．回収した培養液を用いて，上清中の可溶性コラーゲン濃度を Sircol™ Soluble Collagen Assay kit ( Biorad science 社製 ) を用いて 560 nm の吸光度にて測定した．

### 2.4 血管内皮細胞に対する PEP の影響

#### 1) 血管内皮細胞の増殖に対する影響

96 well plate に HUVEC を  $5 \times 10^4$  cell/mL で播き，細胞が生着するために 24 時間培養した後，血清を含まない培養液 (EBM) で 24 時間培養した．その後，各濃度の PEP (10<sup>-3</sup>-10 mM ) を添加後，通常条件 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) と低酸素条件 (37°C, 1% O<sub>2</sub>) にて培養し 24 時間後に WST-1 を添加し，450

nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (Immuno mini NJ-2300 製) にて測定し、生細胞数を求めた。

## 2) 血管内皮細胞の脈管形成に対する影響

BD バイオコート™ マトリゲル™ マトリックスコートプレート (12 well plate) を、37°C で 1 時間、インキュベーター内ゲル化させた後、 $1 \times 10^4$  cells/well で細胞を添加する。1 時間培養後、各濃度の PEP (0.1-10 mM) を含有した培養液を添加し、6 時間培養した後、顕微鏡にて観察した。

## 3) 血管内皮細胞内 ATP の測定

96 well plate に HUVEC を  $5 \times 10^4$  cells/well 播き、細胞が生着するために 24 時間培養した後、血清を含まない培養液で 24 時間培養した。その後、各濃度の PEP ( $10^{-2}$ -10 mM) を添加後、通常条件 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) と低酸素条件 (1% O<sub>2</sub>) にて培養した後、上清を除去し、phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後、nucleotide releasing buffer を 100  $\mu$  L/well で添加後、ATP monitoring buffer (Lusiferase) を 10  $\mu$  L/well で添加して Luminometer にて発光量を測定した。

## 4) VEGF の産生に対する影響

6 well plate に HUVEC を  $5 \times 10^4$  cells/well 播き、細胞が生着するために 24 時間培養した。その後、各濃度の PEP ( $10^{-2}$ -1 mM) を添加後、通常条件 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) と低酸素条件 (1% O<sub>2</sub>) にて培養した後、上清を回収し、3000 $\times$ g で 10 分間遠心分離し、上清中の VEGF 濃度を ELISA kit (R&D systems 社製) を用いて測定した。

## 5) VEGF 中和抗体を用いた脈管形成作用に対する影響

BD バイオコート™ マトリゲル™ マトリックスコートプレート (12well plate) を、37°Cで1時間、インキュベーター内ゲル化させた後、 $1 \times 10^4$  cells/well で細胞を添加した。1時間培養後、各濃度の 10 mM PEP を含有する培養液に Human VEGF 中和抗体を 100 ng/mL, 1  $\mu$ g/mL にて希釈し、マトリゲル上の細胞に添加し、6時間培養した後、顕微鏡にて脈管を観察した。ヒト VEGF 中和抗体については、R&D Systems 社製のものを用いた。

## 3 統計処理

実験結果は、平均値±標準誤差で示した。統計処理は、GraphPad Prism ver. 3.00 (Graph Pad Software 社製) を用いて行った。

2群間の比較は、F 検定により母集団の等分散性の検定を行い、等分散のときは、Student's *t* 検定を行い、不等分散のときは、Welch's *t* 検定を行った。

多重検定比較は、対応のある一元分散分析 (repeated measures ANOVA) を行った後、Dunnett の方法により検定を行い、いずれも危険率が 5%未満のときに有意であると判定した。

## 参考文献

- 1) 厚生労働省健康局総務課生活習慣病対策室：平成14年糖尿病実態調査(速報)，厚生労働省(2003)。
- 2) IDF：国際糖尿病連合 海外の糖尿病統計・調査(2003)。
- 3) Adler E.I., Boyko E.J., Ahroni J.H., Lower-extremity amputation in diabetes : the independent effects of peripheral vascular disease, sensory neuropathy, and foot ulcers, *Diab. Care.*, **22**, 1029-1035 (1999)。
- 4) 坪井良治，難治性皮膚潰瘍を治すスキル，*栄堂*，東京，140-144 (2003)。
- 5) Vincent F., Wound healing and its impairment in the diabetic foot, *Lancet*, **365**, 1736-1743 (2005)。
- 6) Singer A.J., Clark R.A., Cutaneous wound healing, *N. Engl. J. Med.*, **341**, 734-746 (1999)。
- 7) Loots M.A., Lumme E.N., Middelkoop E., Cultured fibroblasts from chronic diabetic wound on the lower extremity (non-insulin-dependent diabetic mellitus) show disturbed proliferation, *Arch. Dermatol. Res.*, **291**, 93-99 (1999)。
- 8) Oren Z.L., Rbert D.G., Mary A., Jamie P.L., Geoffrey C.G., Cellular Dysfunction in the Diabetic Fibroblast, *Am. J. Pathol.*, **162**, 303-312 (2003)。
- 9) Karin H., Anders H., High Glucose-Induced Growth Factor Resistance in Human Fibroblasts Can be Reversed by antioxidants

- and Protein Kinase C-Inhibitors, *Cell. Biochem. Funct.*, **15**, 197-201 (1997).
- 10) Brownlee M., Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications, *Nature.*, **414**, 813-820 (2001).
  - 11) Karin H., Jhan D.H., Kerstin B., Anders H., Inhibited proliferation of fibroblasts derived from chronic diabetic wounds and normal dermal fibroblasts treated with high glucose is associated with increased formation of L-lactate, *Wound Rep. Reg.*, **6**, 135-141 (1998).
  - 12) Karin H., Gunnar K., Anders H., Kerstin B., Fibroblasts derived from human chronic diabetic wounds have a decreased proliferation rate, which is recovered by the addition of heparin, *J. Dermatol. Sci.*, **16**, 144-151 (1998).
  - 13) Kay M.M., Tracey C.M., Goodman J.R., Cone J.C., Bassel P.S., Polypeptides immunologically related to band 3 are present in nucleated somatic cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **80**, 6882-6886 (1983).
  - 14) Dreckenhann D., Zinke K., Schauer U., Appell K.C., Low P.S., Identification of immunoreactive forms of human erythrocyte band 3 nonerythroid cell, *Eur. J. Cell. Biol.*, **34**, 144-150 (1984).
  - 15) Howdieshell T.R., Riegner C., Gupta V., Callaway D., Grembowicz K., Sythyanarayana P.L., Normoxic wound fluid high levels of vascular endothelial growth factor, *Ann. Surg.*, **228**, 707-715 (1998).
  - 16) Katz M.H., Alvarez A.F., Kirsner R.S., Eaglstein W.H., Falanga V.,

- Human wound fluid from acute wounds stimulates fibroblast and endothelial cell growth, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **25**, 1054-1058 (1991).
- 17) Winter G.D., Formation of the scab and the rate of superficial wounds in the skin of the young domestic pig, *Nature*, **193**, 293-294 (1962).
  - 18) Hinman S.D., Maibach H., Effect of air exposure and occlusion on experimental human skin wounds, *Nature*, **200**, 377-378 (1963).
  - 19) *医薬ジャーナル*, **39**, 2249-2255 (2003).
  - 20) Sophie C., Pui-Yan L., Leaf H., Intradermal injection of transforming growth factor- $\beta$  1 gene enhances wound healing in genetically diabetic mice, *Pharm. Res.*, **20**, 345-350 (2003).
  - 21) Tanaka E., Ase K., Okada T., Okumura M., Nogimori K., Mechanism of acceleration of wound healing by basic fibroblast growth factor in genetically diabetic mice, *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 1141-8 (1996).
  - 22) Makoto O., Toshiaki O., Tsutomu N., Motoyuki Y., Acceleration of wound healing in diabetic mice by basic fibroblast growth factor, *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 530-535 (1996).
  - 23) Gregory S.M., Jeffrey M.D., Anne B., Andreas S., Stephen C.W., Antonio M.A., Ronald B., Achilles A.D., Recombinant basic fibroblast growth factor accelerates wound healing, *J. Surg. Res.*, **45**, 145-153 (1988).
  - 24) Nicholas N.N., Peter J.P., Alisa E.K., Michard L.G., Luisa A.D., Vascular endothelial growth factor mediates angiogenetic activity

- during the proliferative phase of wound healing, *Am. J. Pathol.*, **152**, 1445-1452 (1998).
- 25) Zhang F., Lei M.P., Oswald T.M., Pang Y., Blain B., Cai Z.W., Lineaweaver W.C., The effect of vasucular endothelial growth factor on the healing of ischemic skin wounds, *The Bri. Assi. Plasc. Sur.*, **56**, 334-341 (2003).
- 26) Robert D.G., Oren M.T., Catherine R.P., Kirit A.B., Matthew C., Nicholas B., Stuart B., Hope G.S., Geoffre C.G., Topical vascular endothelial growth factor accelates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells, *Am. J. Pathol.*, **164**, 1935-1947 (2004).
- 27) 山田裕之, 中屋加奈子ら, トラフェルミンスプレーの使用により肉芽増殖作用と上皮化作用の不均衡を生じたと考えられる難治性褥瘡の 1 症例., *薬事新報* No.2364, 38 (2005).
- 28) Edmonds M.E., Progress in care of the diabetic foot, *Lancet*, **354**, 270-272 (1999).
- 29) Rissanen T.T., Vajanto I., and Yla-Herttuala S., Gene therapy for thrapeapeutic angiogenesis in critically is ischemic lower limb on the way to the clinic, *Eur. J. Clin. Invest.*, **31**, 651-666 (2001).
- 30) Makoto O., Toshiaki O., Tutomu N., Motoyuki Y., Accelerate of Wound Healing in Diabetic Mice by Basic Fibroblast Growth factor, *Bio. Pharm. Bull.*, **19**, 530-535 (1996).
- 31) Tanaka E., Ase K., Okuda T., Okumura M., Nogimori K., Mechanism of acceleration of wound healing by basic fibroblast

- growth factor in genetically diabetic mice, *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 1141-8 (1996).
- 32) David G., Katherine H., Sprugel J., PDGF and FGF Stimulate Wound Healing in Genetically Diabetic mouse, *Am. Jour. Pathol.*, **136**, 6, (1990).
- 33) 岸本三郎, 肉芽形成をどう盛り上げるか. *デルマ* **19**, 49-53 (1993).
- 34) William J., Jeffcoate P., Keith G., Glutathione metabolism and oxidative stress in neonatal rat tissues from streptozotocin-induced diabetic mothers, *Diab. Metab. Res. Rev.*, **20**, 78-89 (2004).
- 35) Brownlee M., Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications, *Nature*, **414**, 813-820 (2001).
- 36) Chang N., Goodson W.H., Gottrup F., Direct measurement of wound and tissue oxygen tension in postoperative patients, *Ann. Surg.*, **197**, 470-478 (1983).
- 37) Shuji M.D., Koji M.D., Kazuo M.D., Phosphoenolpyruvate Prevents the Decline in Hepatic ATP and Energy Charge after Ischemia and Reperfusion Injury in Rats, *Jour. Surg. Res.*, **73**, 59-65 (1997).
- 38) Daniel E., Georgia H., Fangping Z., Charalambos A., Craig B.T., ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation, *Oncogene*, **24**, 6314-6322 (2005).
- 39) Drenckhahn D., Zinke K., Identification of immunoreactive form of erythrocyte band 3 in nonerythroid cell, *Euro. J. Cell. Biol.*, **34**, 144-150 (1984).
- 40) Okada-Ban M., Jean P., Fibroblast growth factor-2, *The Inter. J. Bio.*

*and Cell biol.*, **32**, 263-267 (2000).

- 41) Nicole M., Akira S., Norbert E., Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via double paracrin mekanizm, *J. Cell. Sci.*, **112**, 1843-1853 (1999).
- 42) Graznl-Bilska A.T., Luthra G., Reynlds L.P., Effects of basic fibroblast growth factor (FGF-2) on proliferation of human skin fibroblasts in type II diabetes mellitus, *Exp. Clin. Endo. Diab.*, **110**, 176-181 (2002).
- 43) Naomi J., Trengove P., Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing chronic leg ulcers, *Wound . Rep. Reg.*, **8**, 13-25 (2000).
- 44) Werner R., Mechanisms of angiogenesis, *Nature*, **386**, 17 (1997).
- 45) Morhanraj R., Antonina K., Subroto C., Novel Role of Lactos ylceramide in Vascular Endothelial Groeth Factor Mediated Angiogenesis in Human Endothelial Cells, *Circ. Res.*, **97**, 796-804 (2005).
- 46) Christopher W., Peter J., Regulation of angiogenesis by hypoxia role of HIF system, *Nature. Medicine.*, **9**, 6 (2003).
- 47) Clifton L.D., Huasheng L.U., Endogenous 2-oxoacids differentially regulate expression of oxgen sensors, *Biochem. J.*, **380**, 419-424 (2004).
- 48) David D.Z., John J.F., Heinz S., Thomas K.H., Lactate stimulation of macrophage-derived angiogenic activity is associated with inhibition of Poly (ADP-ribose) synthesis, *Lab. Inves.*, **74**, 644-649 (1996).
- 49) Howdieshell T.R., Callaway D., Webb W.L., Gaines M.D., Procter

- C.D., Pollock J.S., Brock T.L., Antibody neutralization of vascular endothelial growth factor inhibits wound granulation tissue formation, *J. Surg. Res.*, **96**, 173-182 (2001).
- 50) Corral C.J., Siddiqui A., Wu L., Farrell C.L., Lyons D., Mustoe T.A., Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblastic growth factor during ischemic wound healing, *Arch. Surg.*, **134**, 200-205 (1999).
- 51) Lauer G., Sollberg S., Cole M., Flamme I., Sturzebecher J., Mann K., Krieg T., Eming S., Expression and proteolysis of vascular endothelial growth factor is increased in chronic wounds, *J. Invest. Dermatol.*, **115**, 12-18 (2001).
- 52) Wetzler C., Kampfer H., Stallmeyer B., Pfeilschifter J., Frank S., Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair, *J. Invest. Dermatol.*, **115**, 245-253 (2000).