

- 神戸
3. Moro T, Nakao S, Higashiyama R, Mikami K, Fukumitsu H, Ueda Y, Inagaki Y: A quantification system for fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis by using transgenic collagen promoter/luciferase reporter mouse. 8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium: Workshop I-A, 2009. 6. 5, Yokosuka, Japan
  4. Ueda Y, Moro T, Higashiyama R, Nakao S, Mikami K, Fukumitsu H, Inagaki Y: Cell-cell contacts differently regulate  $\alpha$ -smooth muscle actin expression and collagen production in hepatic stellate cells. 8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium, 2009. 6. 6, Yokosuka, Japan
  5. Nakao S, Moro T, Higashiyama R, Mikami K, Fukumitsu H, Ueda Y, Inagaki Y: Little contribution of epithelial-to-mesenchymal transition of biliary epithelial cells to the progression of experimental biliary fibrosis. 8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium, 2009. 6. 6, Yokosuka, Japan
  6. 稲垣豊: TGF- $\beta$ /Smad シグナルを標的とした肝線維症の治療戦略. 第4回癥痕・ケロイド治療研究会、パネルディスカッション2「臓器別線維化疾患の治療戦略—線維化疾患という観点からケロイドを考える—」、2009年8月30日、東京
  7. Inagaki Y, Nakao S, Moro T, Higashiyama R, Mikami K, Fukumitsu H, Ueda Y, Okazaki I: A comprehensive analysis of collagen production and degradation by using transgenic dual reporter mice. 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2009. 11. 2, Boston, MA
  8. 稲垣豊: 肝星細胞と線維化病態. 第6回可視化技術ワークショップ「肝臓の星細胞のイメージング」、2009年11月14日、東京
  9. Inagaki Y: Antifibrotic therapy: Molecular targets. UEGW/WCOG GASTRO 2009: Liver fibrosis: Diagnostic and therapeutic challenges, 2009. 11. 24, London, UK.
  10. 三上健一郎、中尾祥絵、東山礼一、福光寛、茂呂忠、上田佳孝、岡崎勲、稲垣豊: Notch シグナルを介した肝線維化と再生の病態連繋. 第23回肝類洞壁細胞研究会、2009年12月12日、大阪
  11. 東山礼一、茂呂忠、中尾祥絵、三上健一郎、服部典子、岡田保典、岡崎勲、稲垣豊: 骨髄細胞由来 Matrix metalloproteinases (MMPs) による肝線維化改善機序の解明. 第9回日本再生医療学会総会、2010年3月18日、広島
- H. 知的財産権の出願・登録状況**  
なし

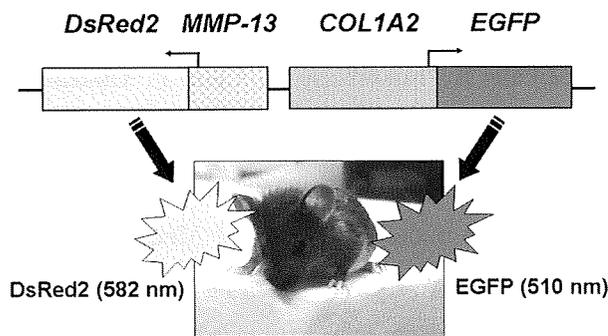


図1：COL1A2/MMP-13 dual reporter mouse の作製  
I型コラーゲン  $\alpha 2$  鎖遺伝子 (COL1A2) プロモーターをEGFPに、またMMP-13遺伝子のプロモーターをDsRed2に連結して、両融合遺伝子を保持したDual reporter mouseを作製した。このマウスは、コラーゲン合成が高まるとEGFP蛍光を発し、MMP-13発現によりコラーゲン分解系が活性化されるとDsRed2蛍光を発する。

図2：四塩化炭素投与によるCOL1A2プロモーターの活性化  
COL1A2/MMP-13 dual reporter mouse に四塩化炭素を単回投与した72時間後に肝組織を採取して共焦点レーザー顕微鏡観察を行うと、中心静脈周囲の壊死部にEGFP陽性細胞、すなわちCOL1A2プロモーターが活性化した細胞を多数認めた。

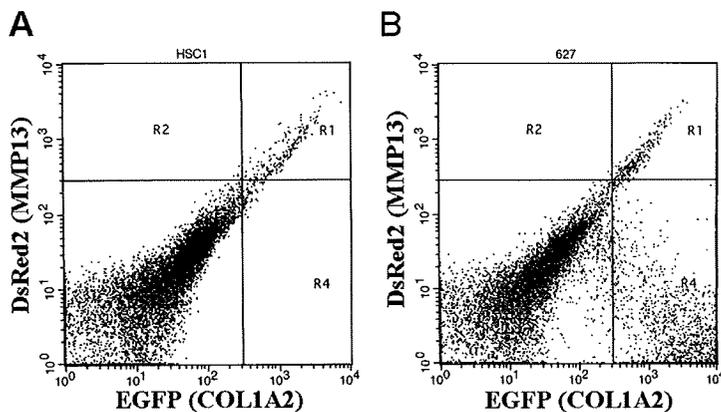
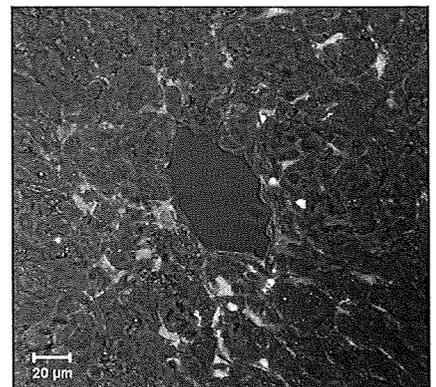
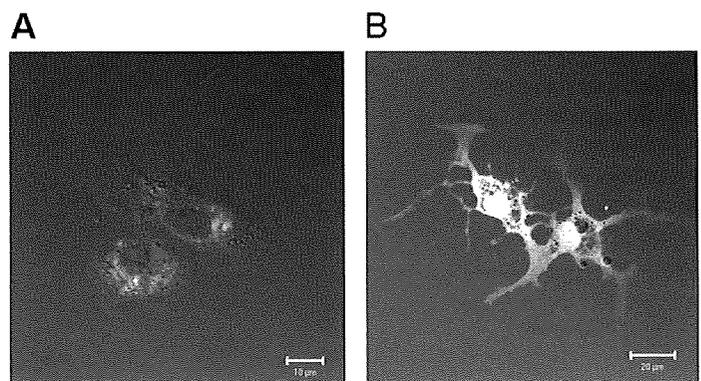


図3：星細胞分画におけるCOL1A2プロモーターの活性化  
四塩化炭素を投与していない正常肝(A)あるいは四塩化炭素単回投与後の障害肝(B)から星細胞分画を採取してFACS解析を行うと、後者の約30%においてEGFP陽性所見、すなわちCOL1A2プロモーターの活性化が認められた。

図4：星細胞の培養過程におけるMMP-13ならびにCOL1A2プロモーターの活性化  
四塩化炭素非投与の正常肝から星細胞を分離して初代培養を行うと、培養2日目の静止期星細胞(A)ではDsRed2蛍光が、また培養後1週間を経過した活性化星細胞(B)ではEGFP発現が認められ、培養に伴う星細胞の活性化過程においてMMP-13からCOL1A2プロモーター活性化へシグナル転換が証明された。



## 強皮症の病態におけるアクチビンの関与

研究分担者	川口鎮司	東京女子医大附属膠原病リウマチ痛風センター
協力者	高木香恵	東京女子医大附属膠原病リウマチ痛風センター
協力者	深澤千賀子	東京女子医大附属膠原病リウマチ痛風センター
協力者	栃本明子	東京女子医大附属膠原病リウマチ痛風センター
協力者	大田ゆう子	東京女子医大附属膠原病リウマチ痛風センター

### 研究要旨

強皮症における線維化の病態形成には、浸潤した単核球や傷害をうけた血管内皮細胞からのサイトカインや成長因子の誘導が重要な働きを担っている。病変局所における TGF $\beta$ 、PDGF 経路の活性化や CTGF の産生の亢進が、線維化を形成されることが想定されているが<sup>1)</sup>、詳細は依然として不明である。我々は卵胞刺激ホルモン (FSH) の合成や胚の発生に関わるペプチドであるアクチビン (activin) が、線維化病態に関与している可能性を見出した。今回の研究で強皮症における activin-ALK-smad2/3-CTGF 経路の役割を解析し、その病態を明らかにすることで、新規治療法の開発を検討する。

### A. 研究目的

強皮症は皮膚をはじめとした諸臓器の線維化と末梢循環不全を特徴とする疾患である。病因については未だ不明な点が多く、このため有効な治療法が確立されていない。肺や消化管、腎など諸臓器の過剰な線維化は機能障害をきたし、また末梢循環不全はレイノー現象、肺高血圧症、腎クリーゼ、皮膚潰瘍などの原因となる。さらに末梢循環不全により虚血となった組織では傷害をうけた血管内皮細胞からサイトカインが産生され、結果免疫学的活性化がみられ、血管障害や線維化の進行を促進する。強皮症の線維化病態における線維芽細胞の増殖と細胞外マトリックス (ECM) 産生亢進については様々な研究がなされており、最近では特に TGF $\beta$ 、PDGF や

CTGF 等との関連性が報告されている<sup>2)</sup>。しかしそれぞれのサイトカイン、およびその受容体は線維化以外にもさまざまな生理的機能をなしており、関節リウマチにおける抗 TNF $\alpha$  モノクローナル抗体のように治療のターゲットになり難く、強皮症における有効な治療が未だ確立されていない原因の一つであると考えられる。

TGF $\beta$  スーパーファミリーの1つである Activin は分子量 25KDa の2量体で、 $\beta$  鎖のホモダイマーである。 $\beta$  鎖には A、B の2種類があり、この組み合わせによって Activin A、Activin AB、Activin B がある。一方2量体の他方の鎖が  $\alpha$  鎖であるヘテロダイマーはインヒビン inhibin と呼ばれ、 $\beta$  鎖には A、B の2種類の組み合わせによって Inhibin A、In-

hibin B となり activin に阻害的に働く。Activin はもともと卵巣や精巣といった生殖器官から分泌され、脳下垂体前葉から出される FSH 合成分泌を促進するペプチドとして知られていた。男性では精子の形成に重要な役割を持つとされる。最近他にも、細胞分化やアポトーシス誘導、創傷治癒、免疫調節作用などさまざまな機能があることが明らかとなってきた<sup>3)</sup>。なかでもアクチビンが TGF $\beta$  スーパーファミリーに属するその構造的な特性から TGF $\beta$  と機能的な重複が想定されている。activin-ACVR1B (ALK4) 経路の活性化は smad2/3 のリン酸化を引き起こし、I 型コラーゲンなど TGF $\beta$  と同様の下流因子を誘導する<sup>4)</sup>。

近年一卵性双体に発症した強皮症の発現 cDNA array の解析が行われ、強皮症患者で ACVR1B (activin A receptor, type1B) の発現が亢進していることが報告された<sup>5)</sup>。ACVR1B は ALK4 (activin receptor like kinase-4) ともいわれ TGF スーパーファミリーの一つで、TGF 経路と同様に Smad を活性化することが知られている。肝細胞において Activin は Smad2/3 のシグナルを活性化することで CTGF 活性を上昇させることが報告されている。このことから強皮症患者線維芽細胞における Activin、ACVR1B (ALK4) は CTGF を介し線維化に関わっていることが予測された。以上これらの報告を参考とし、Activin-強皮症線維芽細胞経路がどのように強皮症の病態にかかわっているか検討した。

## B. 研究方法

1. 健常者、強皮症患者の皮膚線維芽細胞中の activin receptor (ACVR1B) mRNA の発現の有無を RT-PCR 法で確認した。
2. 健常者、強皮症患者の皮膚切片および皮膚線維芽

細胞中の ACVR1B の発現を免疫染色法で確認した。

3. 健常者、強皮症患者の皮膚切片および皮膚線維芽細胞中の activin の発現を免疫染色法で確認した。
4. 健常者、強皮症患者の血清中の activin 値を ELISA 法で確認した。
5. Recombinant activin を添加後 smad2/3 のリン酸化を western blot 法で確認した。
6. Activin の皮膚線維芽細胞の collagen 産生への影響を確認するために皮膚線維芽細胞に activin を添加後 procollagen type 1 C peptide (PIP) 量を ELISA 法で測定した。
7. 皮膚線維芽細胞に activin antagonist である follistatin と smad2/3 inhibitor である SB 431542 を添加し activin の活性化を抑制した後、皮膚線維芽細胞の産生する PIP 量を ELISA 法で測定した。

## C. 研究結果

ACVR1B (ALK4) が強皮症線維芽細胞で高発現しているか検討した。結果、強皮症線維芽細胞、正常線維芽細胞はともに ACVR1B (ALK4) の蛋白、mRNA を発現し、さらに強皮症患者で発現量が高い傾向にあった (図 1)。また強皮症患者における血清中 activin 値は健常人に比して高値であった (図 2)。さらに限局皮膚硬化型強皮症 (l-SSc) と比べ、びまん性皮膚硬化型強皮症 (d-SSc) の血清中 activin 値はより高値であった。正常線維芽細胞を recombinant activin (r-Activin) で刺激すると smad2/3 のリン酸化に引き続き CTGF の発現がみられた (図 3)。また r-Activin を添加後 COL1 $\alpha$ mRNA は増加し、pro collagen 量は r-Activin の濃度、時間に比例し増加した (図 4)。強皮症線維芽細胞、正常線維芽細胞をともに r-Activin で刺激後 smad2/3 のリン酸化が起こり、正常線維芽細胞に比して強皮症線維芽細胞のほ

うがリン酸化は強かった。さらに smad2/3 のリン酸化に引き続き CTGF の発現がみられ、正常線維芽細胞に比して強皮症線維芽細胞のほうがよりその発現量は多かった。

健常人皮膚線維芽細胞、強皮症患者線維芽細胞に activin antagonist である follistatin と smad2/3 inhibitor である SB 431542 にて activin の活性化を抑制した結果、collagen 産生が抑制された (図5)。

#### D. 考 察

今回の我々の研究で、activin が、強皮症の線維化には関与している可能性が推測された。これまで activin の線維化に対する報告は肝細胞における線維化の報告があるのみで強皮症における関与に関する報告は少ない。

強皮症および健常人皮膚、および皮膚線維芽細胞にて mRNA、蛋白レベルともに activin receptor が発現していた。また activin は強皮症患者、健常人ともに皮膚、皮膚線維芽細胞に存在が確認され、さらに健常人、強皮症患者の血清中の activin 濃度を測定したところ有意に強皮症患者において高値であった。これらの結果は activin が皮膚線維芽細胞に恒常的に発現している activin receptor を介して強皮症の皮膚硬化に関与していることが推測された。また activin 値が強皮症患者で健常人より有意に、また慢性皮膚型強皮症が限局皮膚型強皮症の比してより高かったことから、activin 値は皮膚硬化の程度を反映していると考えられた。

さらに皮膚線維芽細胞における activin の collagen 産生に対する影響を確認するため、皮膚線維芽細胞に activin を添加した後、皮膚線維芽細胞が産生する procollagen type1 (PIP) 量を測定した。結果 PIP 量は activin の時間濃度依存的に有意に上昇

した。このことより activin は皮膚線維芽細胞における collagen 産生を促進させていることが確認された。activin は TGF $\beta$  スーパーファミリーに属し TGF $\beta$  と同じ Smad pathway によりリン酸化され細胞内シグナルを伝達する。そこで皮膚線維芽細胞においても同様に Smad pathway によりリン酸化されるかどうか Western blot 法で確認した。さらに肝細胞における報告で activin は Smad2/3 のシグナルを活性化することで CTGF 活性を上昇させることが知られているが<sup>7)</sup>、同様に Western blot 法で確認した結果、皮膚線維芽細胞においても activin を添加した後 CTGF 活性が上昇した。以上の結果より activin は直接的にまたは、CTGF を介して、皮膚線維芽細胞に働き collagen 産生を増加させ、皮膚の線維化に関与していると考えられた。

このため我々はさらに皮膚線維芽細胞に activin antagonist である follistatin と smad2/3 inhibitor である SB 431542 を添加し activin の活性化を抑制した結果皮膚線維芽細胞の collagen 産生は抑制された。この結果からこれらの activin antagonist である follistatin と smad2/3 inhibitor である SB 431542 は皮膚線維化を抑制することが確認され、今後の強皮症における新しい治療薬としての可能性を示した。

#### E. 結 論

activin は強皮症の線維化病態に強く関与していることが判明し、さらに activin antagonist であるフォリスタチンや ALK4/5 inhibitor である SB431542 で activin を抑制することで線維化の改善が期待されることが予測された。これらの薬剤が新しい強皮症の治療薬として期待される。

## F. 文 献

1. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007; 117 (3): 557-67.
2. Pannu J, Gardner H, Shearstone JR, Smith E, Trojanowska M. Increased levels of transforming growth factor beta receptor type I and up-regulation of matrix gene program: A model of scleroderma. *Arthritis Rheum* 2006; 54 (9): 3011-21.
3. Werner S, Alzheimer C. Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17 (3): 157-71.
4. Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells*

2002;7 (12): 1191-204.

5. Zhou X, Tan FK, Xiong M, Arnett FC, Feghali-Bostwick CA. Monozygotic twins clinically discordant for scleroderma show concordance for fibroblast gene expression profiles. *Arthritis Rheum* 2005; 52 (10): 3305-14.

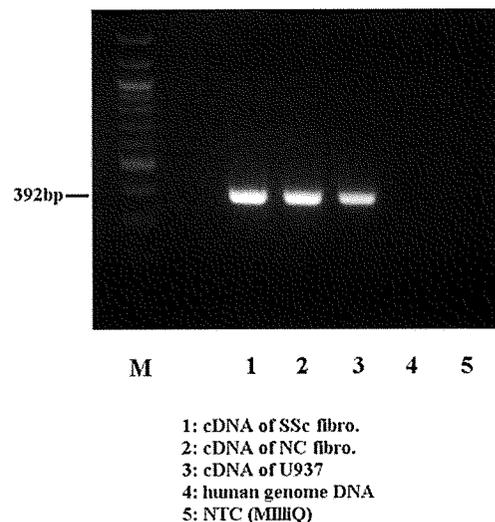
## G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
1. American college of rheumatology, annual scientific meeting in Philadelphia, October 17-21, 2009, program number-1806

## H. 知的財産権の出題・登録状況

なし

### 皮膚繊維芽細胞の activin A receptor mRNA の発現



SSc;systemic sclerosis  
Hc:healthy control

図1：強皮症線維芽細胞、正常線維芽細胞中の ACVR1B (ALK4) の mRNA の発現していた。

### 健康人および強皮症患者の血清中 activin 値

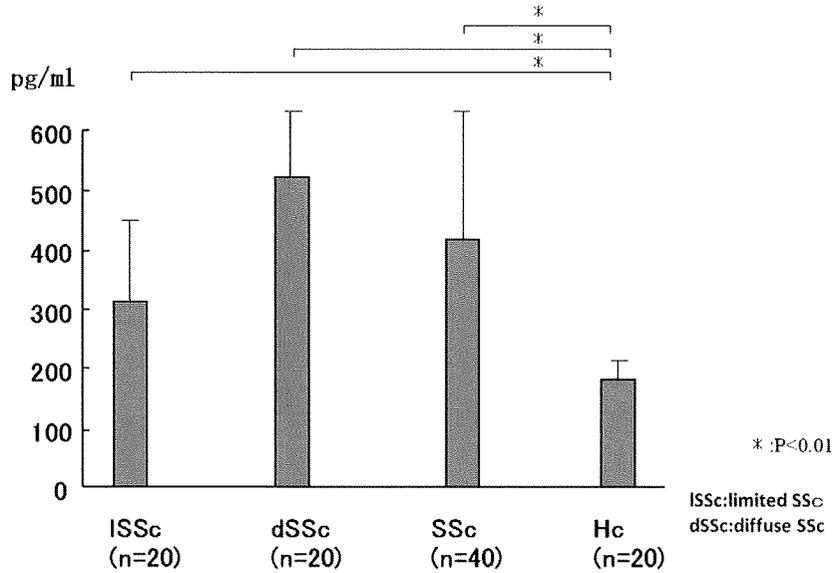


図 2：強皮症患者における血清中 activin 値は健康人に比して高値であった。限局皮膚硬化型強皮症 (l-SSc) と比べ、びまん性皮膚硬化型強皮症 (d-SSc) の血清中 activin 値はより高値であった。

### Activin の皮膚繊維芽細胞内シグナル伝達

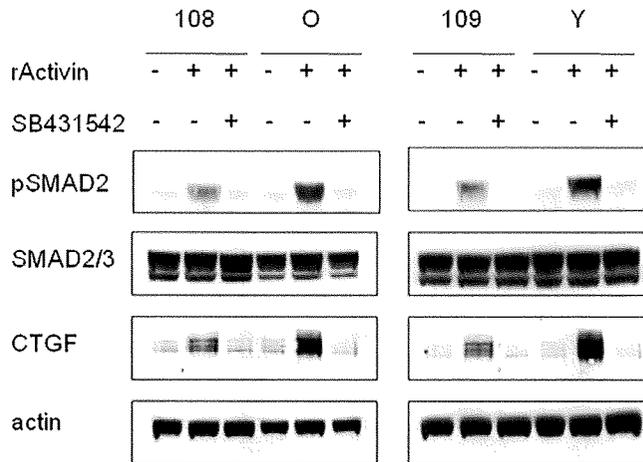


図 3：正常線維芽細胞を recombinant activin (r-Activin) で刺激後 smad2/3 のリン酸化に引き続き CTGF の発現がみられた。さらに強皮症線維芽細胞、正常線維芽細胞をともに r-Activin で刺激後 smad2/3 のリン酸化がおり、正常線維芽細胞に比して強皮症線維芽細胞のほうがリン酸化は強かった。さらに smad2/3 のリン酸化に引き続き CTGF の発現がみられ、正常線維芽細胞に比して強皮症線維芽細胞のほうがよりその発現量は多かった。

### 皮膚繊維芽細胞の collagen 産生に対する activin の影響

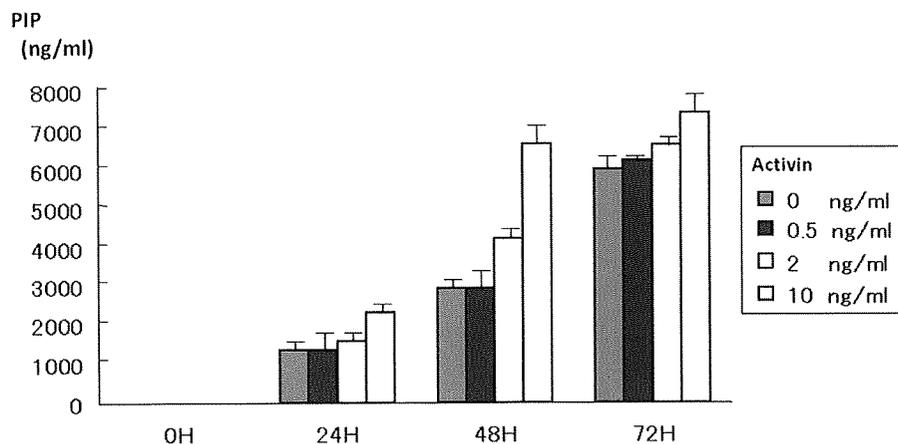


図 4 : r-Activin を添加後 pro collagen 量は r-Activin の濃度、時間に比例し増加した。

### 皮膚繊維芽細胞の collagen 産生に対する activin 拮抗薬と ALK4/5 阻害薬の影響

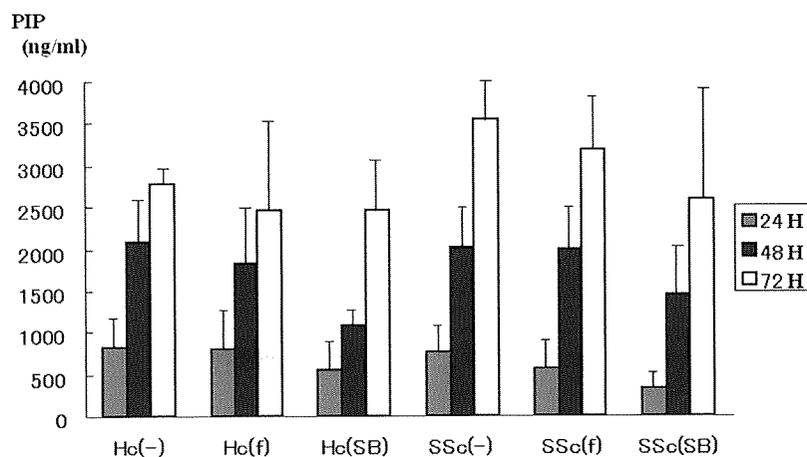


図 5 : 健常人皮膚線維芽細胞、強皮症患者線維芽細胞に activin antagonist である follistatin と smad2/3 inhibitor である SB 431542 にて activin の活性化を抑制した結果、collagen 産生が抑制された。

## Basic fibroblast growth factor による 培養ヒト皮膚線維芽細胞増殖刺激作用に関するシグナル経路の検討

研究分担者	尹 浩信	熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 教授
協力者	牧野貴充	熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 大学院生
協力者	神人正寿	熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 講師
協力者	伊方勝敏	熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 大学院生
協力者	藤澤明彦	熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 大学院生
協力者	Faith Muchemwa	熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 研究員
協力者	井上雄二	熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 講師

### 研究要旨

Basic fibroblast growth factor (bFGF、FGF-2) は線維芽細胞、表皮細胞、血管内皮細胞のほか多種の細胞における細胞増殖のみならず分化誘導、細胞外基質の合成、細胞接着や細胞の走化性、遊走に関する多機能なサイトカインである。創傷治癒において肉芽形成、血管新生、再上皮化など重要な役割を担っている。2001年遺伝子組み換えヒト bFGF が皮膚潰瘍治療薬として保険適応され、現在、皮膚潰瘍の治療において幅広く使用されている。また強皮症に伴う難治性の指尖潰瘍、皮膚潰瘍でも非常に有用である。今回我々は *in vitro* で bFGF によるヒト皮膚線維芽細胞の増殖刺激作用の機序について検討を行った。bFGF は高い細胞増殖刺激活性を示し、Mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) 特異的阻害剤 (PD98059, U0126) および c-Jun N-terminal kinase (JNK) 阻害剤 (SP600125) によって細胞増殖刺激は阻害された。また免疫ブロット法を用いて細胞内シグナル伝達経路である Extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 および JNK1 の活性化を認めた。以上の結果より bFGF による培養ヒト皮膚線維芽細胞の増殖刺激に ERK、JNK の情報伝達経路が重要な役割を担っていることが明らかとなった。また、ERK、JNK 経路を制御することで創傷治癒を促進し、難治性の皮膚潰瘍の新しい治療戦略となりえる可能性が示唆された。

### A. 研究目的

Fibroblast growth factors (FGFs) は生体内で多臓器の細胞に分布するポリペプチドの増殖因子の一群を総称する。1974年、Gospodarowicz によってウシ下垂体より抽出され、マウス Balb/c 3T3 細胞株の増殖因子として同定された<sup>1)</sup>。現在、ヒトでは構

造、生化学的特長、分布より7種類のサブファミリーに分類され、22種類のFGFs (FGF1-14、16-23) が同定されている<sup>2)</sup>。

bFGF の機能は、線維芽細胞、表皮細胞、血管内皮細胞のほか多種の細胞における細胞増殖のみならず分化誘導、細胞外基質の合成、細胞接着や細胞の

走化性、遊走に關与する形態形成因子、組織修復因子、代謝調節因子として多機能に及ぶ。

1986年にbFGFのヒト型cDNAがクローニングされ<sup>3)</sup>、日本では2001年に遺伝子組み換えヒトbFGF(トラフェルミン<sup>®</sup>、フィブラストスプレー<sup>®</sup>)が厚生労働省より皮膚潰瘍治療薬として保険適応され、すでに幅広く臨床使用されており、さらに、骨組織再生、歯槽骨再生などの分野においても応用が期待されている。

bFGFの線維芽細胞増殖活性は以前より広く認識されているが、その詳細なメカニズムは生物種、また細胞種によって相違点が多く、不明な点が多い。今回、我々はin vitroでヒト皮膚線維芽細胞を用いてbFGFの細胞増殖刺激の機序を細胞内情報伝達経路について検討した。

## B. 研究方法

### 1) 試薬

遺伝子組換えbFGFは科研製薬株式会社より供与いただいた。特異的MEK阻害剤であるPD98059とU0126はそれぞれSanta Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, U.S.A.)、A.G. Scientific (San Diego, CA, U.S.A.)より購入した。特異的JNK阻害剤であるSP600125はBiomol International (Plymouth Meeting, PA, U.S.A.)より、特異的p38 MAPK阻害剤であるSB203580はCalbiochem (Darmstadt, Germany)より購入した。

また免疫プロット法で用いた抗phospho-p44/42 MAPK抗体、抗p44/42 MAPK抗体、抗phospho-SAPK/JNK抗体、抗SAPK/JNK抗体はCell Signaling Technology (Beverly, MA, U.S.A.)より購入し、抗ERK2抗体、抗JNK1抗体、抗Actin抗体はSanta Cruz Biotechnologyより購入した。

### 2) 細胞培養

ヒト皮膚線維芽細胞は成人健常者3名の非露光部の体幹より皮膚生検にて得た。熊本大学大学院医学薬学研究部倫理委員会より承諾された文書にて説明し同意、署名を得た。初代培養は10%ウシ血清、抗生剤、抗真菌剤 (Anti-Anti<sup>®</sup>; Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.)を加えたEagle培養液 (MEM; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, U.S.A.)で37°C、95%の空気、5%のCO<sub>2</sub>濃度で培養器内で個別にシャーレ上で培養を行った<sup>4,5)</sup>。フラスコ内で単層培養にて維持し、3-7継代目の細胞を用いた。細胞の生存判別はtrypan blue (Sigma-Aldrich)染色法を用いて確認した。3系統の培養細胞は同様の結果を示し、代表的な結果を提示する。

### 3) 細胞数測定法

ヒト皮膚線維芽細胞を24穴プレート中で $2 \times 10^4$ /wellの密度で播種し、10%ウシ血清含有Eagle培養液で48時間培養し、培養液を無血清Eagle培養液に変え24時間培養し、細胞を静止状態にした。その後各種特異的阻害剤で前反応を1時間行い、1%ウシ血清含有Eagle培養液中に一度のみbFGFを添加し一定時間培養(48から240時間)し、細胞をトリプシン-EDTA(免疫生物研究所、群馬、日本)で剥離した後、細胞数をCoulter<sup>®</sup> Particle Counter (Beckman Coulter, Fullerton, CA, U.S.A.)で測定した。

### 4) 免疫プロット法

ヒト皮膚線維芽細胞を6穴プレート中で $4 \times 10^5$ /wellの密度で培養した。培養液を無血清Eagle培養液に替え24時間培養し、細胞を静止状態にした後、各種阻害剤で前反応を1時間行い、1度のみbFGFで刺激し一定時間(15分間-4時間)反応させた。PBSで2回洗浄後、Denaturing Cell Extraction Buffer<sup>®</sup>

(Biosource International, Camarillo, CA, U.S.A.), Protease Inhibitor Cocktail<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich)、Phenylmethylsulfonyl fluoride (Alexis Biochemicals, Lausen, Switzerland) を加え、氷上にて 30 分間反応、攪拌、4℃、15 分間遠心分離を行い、細胞から抽出液を精製した。SDS、2-mercaptoethanol を加え、8% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE スラブゲル) で 20 mA/gel、90 分間、電気泳動を行った。泳動後、PVDF 膜に 2 mA/cm、1 時間、転写し、Blocking One P buffer (ナカライテスク、京都、日本) にて 1 時間ブロッキング後、室温、1 時間もしくは 4℃、1 晩、一次抗体を反応させた。Tris-buffered saline (TBS) に 0.1% Tween 20 を加え、洗浄後、室温、1 時間、Horseradish peroxidase (HRP) 標識二次抗体を反応させ、再度洗浄した。PVDF 膜に結合した抗体の化学発光検出には Chemi-Lumi One<sup>®</sup> (ナカライテスク) を用いた。同じ PVDF 膜を用いて、抗体を除去し再度 Actin を反応させて、タンパク量の基準とした<sup>6)</sup>。

#### 5) RNA 干渉法

多種の細胞での遺伝子発現抑制効果が証明されているデザイン済の siRNA である、SignalSilence<sup>®</sup> p44 MAPK siRNA (Human Specific)、SignalSilence<sup>®</sup> Pool p42 MAPK siRNA を Cell Signaling Technology より購入した。また JNK1 siRNA と生体内の mRNA と相同性がない control siRNA-A を陰性コントロールとして Santa Cruz Biotechnology より購入した。導入試薬に Lipofectamine RNAi max<sup>®</sup> (Invitrogen) を用い、最大の導入効率を得るために、指示書に従い p44 MAPK siRNA and p42 MAPK siRNA では forward 法で、また JNK1 siRNA は reverse 法で RNA 導入を行った。forward 法は、まず皮膚線維芽細胞を 6 穴プレートもしくは 24 穴プ

レートに播種し、10%ウシ血清含有し、抗生剤抗真菌剤を含まない Eagle 培養液で 24 時間培養後に、p44 MAPK siRNA、p42 MAPK siRNA、control siRNA を導入試薬と混合し導入した。また reverse 法は、皮膚線維芽細胞を 10%ウシ血清含有し、抗生剤抗真菌剤を含まない Eagle 培養液で播種すると同時に JNK1 siRNA、control siRNA を導入試薬と混合し導入した。siRNA を導入 48 時間後に無血清 Eagle 培養液に替え 24 時間培養し、bFGF を添加し細胞数測定法、免疫プロット法で評価を行った。

#### 6) 統計解析法

グラフは 4 回の実験結果を総合し、中間値 ± 標準偏差を提示した。

Mann-Whitney U 検定を行い、順位和より 2 群間の比較を解析した。P < 0.05 の場合を有意の差と判定した。

### C. 研究結果

#### 1) bFGF は濃度依存性に線維芽細胞の増殖を刺激した (図 1)

培養ヒト皮膚線維芽細胞を用いて、細胞数測定を行った。1%ウシ血清含有 Eagle 培養液を陰性コントロールとし、bFGF の濃度を 10、20、50、100、200、500 ng/ml と変化させ、1 回のみ培養液に添加した。bFGF 添加 144 時間後に細胞数を測定した。結果は濃度依存性に線維芽細胞数の増加を認め、bFGF 500 ng/ml では増殖活性が減弱するいわゆる“ベル型”の反応を呈し、最大の増殖活性が得られた bFGF 200 ng/ml の濃度ではコントロールと比較し 2.31 倍の細胞増殖活性を認めた。

#### 2) bFGF は時間依存性に線維芽細胞の増殖を刺激した (図 2)

同様に bFGF の時間依存的効果を検証した。1%

ウシ血清含有 MEM 培養液中に bFGF 50 ng/ml を添加し 96 時間から 240 時間まで培養時間を変化させ、細胞数測定を行った。結果は時間依存性に線維芽細胞数の増加を認めた。最大の増殖活性が得られた 144 時間の培養では bFGF 非添加群コントロールと比較し 1.98 倍の細胞増殖活性を認めた。

bFGF の濃度を 50 ng/ml、添加後の培養時間を 144 時間に設定した。

### 3) MEK 阻害剤、JNK 阻害剤は bFGF による細胞増殖活性を抑制した (図 3)

次に、bFGF による増殖刺激に関与する情報伝達経路を同定するために、培養ヒト皮膚線維芽細胞を様々な MAPK 特異的阻害剤で 1 時間、前反応後に、bFGF 50 ng/ml を添加し 144 時間培養後に細胞数測定を行った。

MEK 特異的阻害剤である 2 種類の PD98059、U0126 のそれぞれにおいて濃度依存性に細胞増殖活性を抑制した。同様に JNK 阻害剤である SP600125 においても濃度依存性に細胞増殖を抑制した。特に U0126 を 30  $\mu\text{mol/L}$ 、また SP600125 を 10  $\mu\text{mol/L}$  の濃度で反応させた群では完全に bFGF の増殖活性を抑制した。一方、p38MAPK 阻害剤である SB203580 は bFGF の細胞増殖活性を抑制しなかった。これらの MAPK 阻害剤は bFGF を添加しない場合でもわずかに細胞数を減少させるが、統計学的有意差は認めなかった。これらの結果から、bFGF による皮膚線維芽細胞の増殖刺激に MEK 経路と JNK 経路が関与しているという仮説を立てた。

### 4) bFGF は線維芽細胞において ERK1/2、JNK 経路をリン酸化、活性化した (図 4a-d)

bFGF と MEK-ERK1/2 および JNK 経路との関連性を検証するために、bFGF 50 ng/ml を添加後、全細胞抽出物を用いて免疫プロット法を行った。結

果は bFGF を添加し 15 分後より 2 時間後まで強力な ERK1/2 のリン酸化を認め、徐々に減弱しながら bFGF 添加 4 時間後まで ERK1/2 のリン酸化は持続した (図 4a)。加えて、JNK 経路においても bFGF を添加し 15 分後より 1 時間後まで強力な JNK1 のリン酸化を認め、以後徐々に減弱した (図 4b)。次に MEK 阻害剤である PD98059 を 30  $\mu\text{mol/L}$ 、U0126 を 30  $\mu\text{mol/L}$  の濃度にて前処理し 1 時間後に、bFGF 50 ng/ml を添加し 15 分後に免疫プロット法を行った。結果は PD98059 によって部分的に ERK のリン酸化は阻害され、U0126 によってより強力に ERK のリン酸化は阻害された (図 4c)。この MEK 阻害剤での活性型 ERK1/2 の抑制効果は図 3 の MEK 阻害剤による細胞数抑制効果と密接に関連した。すなわち、bFGF による細胞増殖刺激は PD98059 によって部分的に細胞増殖は抑制され、U0126 によってより強力に細胞増殖が抑制された。また、JNK 阻害剤である SP600125 は 10  $\mu\text{mol/L}$  の濃度において JNK のリン酸化を抑制した (図 4d)。以上の結果をまとめると、bFGF は ERK1/2 経路と JNK 経路の双方を活性化し、さらに特異的阻害剤である PD98059/U0126 によって ERK1/2 の活性化や SP600125 によって JNK の活性化がそれぞれ抑制され、同様に bFGF による皮膚線維芽細胞の増殖刺激も抑制された。

### 5) ERK1、ERK2、JNK1 の siRNA にて ERK1/2、JNK の合成は抑制され、細胞増殖活性は抑制された (図 5)

bFGF による皮膚線維芽細胞の増殖刺激に MEK-ERK1/2 経路と JNK 経路が関与しているという先述の仮説をより詳細に検証するために、RNA 干渉法を行った。ERK1/2 と JNK 経路をより特異的に抑制するため、ERK1、ERK2、JNK1 のそれぞれの

mRNA に相補的な siRNA を用いて、タンパク合成の抑制効果を control siRNA と比較し免疫ブロット法で評価した。

まず、ERK1 の siRNA (図 5 a lane 3) を導入すると control siRNA (lane 2) と比較し、ERK1 タンパクの合成が抑制された。同様に ERK2 の siRNA を導入すると、ERK2 タンパクが抑制され (lane 4)、ERK1 と ERK2 の両方の siRNA を同時に導入すると、ERK1、ERK2 の両方のタンパクが抑制された (lane 5)。また、ERK1、ERK2 の siRNA 導入によって ERK1、ERK2 のリン酸化も抑制された。

次に、ERK1、ERK2、ERK1+ERK2 の siRNA を導入後、bFGF 50 ng/ml を添加し 144 時間培養し細胞数測定を行った (図 5 b)。ERK1、ERK2 の siRNA を導入した群で control siRNA 導入群と比較し、それぞれ有意な細胞増殖の抑制を認めた。さらに、ERK1 と ERK2 の両方の siRNA を同時に導入した群ではより効果的な細胞増殖の抑制を認めた。この結果より bFGF による増殖刺激には ERK1、ERK2 の両方の関与が示唆された。

一方、JNK1 の siRNA 導入によって、control siRNA (図 5 c lane 2) と比較し JNK1 のタンパク合成が抑制され (lane 3)、細胞数測定でも JNK1 の siRNA 導入によって、control siRNA と比較し有意な細胞増殖の抑制を認めた (図 5 d)。この結果は JNK 阻害剤である SP600125 による細胞数抑制効果を支持し、bFGF による増殖刺激には JNK 経路の関与が示唆された。

#### D. 考案

MAPK はセリン/スレオニンキナーゼの 1 種で下流での生化学反応を制御している<sup>7)</sup>。MAPK ファミリーは主に MEK/ERK、JNK、p38MAPK 経路よ

り構成される。MEK/ERK 経路は最も古典的な MAPK であり、詳細に検討され、細胞増殖や分化誘導、腫瘍細胞の増殖、進展など多くの機能に関与することが明らかにされてきた<sup>8)</sup>。もう 1 つの MAPK である JNK 経路は、最初 p54 microtubule-associated protein kinase として同定され、熱刺激や浸透圧、サイトカイン、抗酸化物、紫外線照射、DNA 障害物質などストレス暴露時の活性化経路として報告されている<sup>9)</sup>。

今回の in vitro の実験系において、bFGF は皮膚線維芽細胞の増殖を濃度依存的、時間依存的に刺激し、bFGF は線維芽細胞内の古典的 ERK1/2 と同様に JNK1 も活性化した。以上より bFGF による細胞増殖刺激作用に ERK1/2、JNK の経路が関与していることが示された (図 6)。

bFGF による細胞増殖刺激は多種の細胞株で証明され、それぞれ細胞種の違いによって異なる反応経路を持つことが明らかとなっている<sup>7)</sup>。様々な情報伝達経路の中でも、ERK1/2 は精力的に調査され、多くの細胞での一般的な増殖活性化経路となっている。

通常、bFGF は FGFR と結合、リン酸化し、Grb2/SOS と結合、Ras の活性化を誘導する。その後、Raf から MEK1/2 の経路の活性化、ERK1/2 の Thr183/Tyr185 部位のリン酸化へと進んでいく<sup>10)</sup>。ラットの眼球水晶体上皮細胞では bFGF は濃度依存性に ERK1/2 を活性化し<sup>11)</sup>、またマウスの肝細胞<sup>12)</sup> やヒト間葉幹細胞<sup>13)</sup> では、bFGF の細胞増殖には ERK1 ではなく ERK2 が重要な因子であると報告されている。しかしながら、ヒト皮膚線維芽細胞では bFGF による細胞増殖刺激に重要な情報伝達経路を決定する報告はなされていない。今回の実験結果からは ERK1 と ERK2 の両方が線維芽細胞の増殖に必要であることが示された。

また、一般的には ERK が細胞増殖に関与するとされる一方で、JNK は一般的に炎症やストレス反応に関連していると考えられている<sup>14)</sup>。ストレスやサイトカインに対する JNK の役割は不明な点が多く、JNK の活性化経路は細胞種によって異なっている<sup>7)</sup>。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞では bFGF は JNK 経路を介して細胞の増殖や移動を促進させ、p38MAPK を介して分化誘導を促進させる<sup>15)</sup>。また神経芽細胞腫の JK-GMS 細胞では bFGF は ERK、JNK を活性化し、細胞増殖の抑制、分化、アポトーシスを誘導する<sup>16)</sup>。今回の実験結果では、bFGF は明らかに JNK1 を活性化し、JNK2/3 よりも JNK1 が増殖刺激に重要であることが示された。

bFGF は創傷治癒において重要な役割を担っている。一般的に、皮膚の創傷治癒は炎症期、組織増殖期、組織再構築期の3期に分けられる<sup>17)</sup>。bFGF は創傷治癒の3期すべてにおいて重要な働きを担っている。まず、炎症期には組織障害により好中球やマクロファージなどの血球の漏出、血液成分や化学伝達物質の滲出が生じる。bFGF、PDGF や VEGF などのサイトカインも創傷組織中へ滲出する。次に、組織増殖期には bFGF は線維芽細胞の増殖を刺激し、肉芽組織の増生、血管新生を誘導する<sup>18)</sup>。さらに、組織再構築期には増殖した線維芽細胞が bFGF に反応し、細胞外基質（コラーゲンやフィブロネクチンなど）やタンパク分解酵素を産生することが重要である<sup>19)</sup>。以上のことから、皮膚の創傷治癒における bFGF の主要な役割は、線維芽細胞の増殖刺激である<sup>20,21)</sup>。この bFGF による細胞増殖刺激活性は表皮細胞<sup>20)</sup>、未分化な骨芽細胞<sup>22)</sup>、筋芽細胞<sup>10)</sup>、血管内皮細胞<sup>23)</sup> などの多種の細胞でも認められる。

これまでいくつかの bFGF の臨床試験が行われている。慢性の圧迫性皮膚潰瘍における臨床試験で

は、bFGF 外用群で皮膚潰瘍面積がより縮小し、70%以上の潰瘍縮小患者数が多かった<sup>24)</sup>。しかし、糖尿病患者の慢性の神経因性足部潰瘍では bFGF 外用群はプラセボ群と比較し治癒に有意差はなかったという報告もある<sup>25)</sup>。ゆえに、bFGF の臨床使用における有効性を検証するためにも、bFGF の詳細な作用機序は解明されるべきである。今回の実験結果から、ERK1/2 や JNK 経路を制御することで皮膚潰瘍治療における新しい標的になりえる可能性がある。しかし、ERK1/2 や JNK 経路は細胞種によって異なる反応を示すことはよく知られており、皮膚線維芽細胞に特異的な反応であるかは今後さらなる検討を要する。

今回の実験結果はいくつかの制限がある。はじめに、bFGF による線維芽細胞の増殖刺激に、ERK1/2 経路と JNK 経路が依存的もしくは独立的に関与しているのか特定できなかった。これまで ERK 経路と JNK 経路にクロストークや相互作用があると報告されている<sup>26)</sup>。しかし、今回の結果では bFGF は ERK1/2 と JNK 経路の両方を活性化し、ERK1 siRNA や ERK2 siRNA は JNK の活性化には影響を及ぼさなかった。同様に JNK1 siRNA は ERK1/2 の活性化に影響を及ぼさなかった。ゆえに、ERK1/2 と JNK 経路は独立して活性化しているようだが、ERK や JNK の上流もしくは下流でのクロストークは存在するかもしれない。次に今回の実験では bFGF による細胞増殖刺激作用はかなり長時間の培養後での評価であるため、bFGF 添加後、短時間の ERK1/2 と JNK1 の活性化は細胞増殖に間接的に関与している可能性も考えられる。これらの知見を確認するにはさらなる検討が必要である。

## E. 結 論

bFGFによる培養ヒト皮膚線維芽細胞の増殖刺激作用にERK1/2とJNKの経路が重要な役割を担っていることが明らかになった。また、皮膚創傷治療において炎症期と組織増殖期にERK1/2とJNKの経路が必要不可欠であると考えられ、これらの情報伝達経路を制御することが慢性、難治性皮膚潰瘍の新しい治療戦略となりえる可能性が示唆された。

## F. 文 献

1. Gospodarowicz, D. 1974. Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* 249: 123-127.
2. Itoh, N., and D. Ornitz. 2004. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet* 20: 563-569.
3. Abraham, J., J. Whang, A. Tumolo, A. Mergia, J. Friedman, D. Gospodarowicz, and J. Fiddes. 1986. Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. *EMBO J* 5: 2523-2528.
4. Ihn, H., K. Ohnishi, T. Tamaki, E. LeRoy, and M. Trojanowska. 1996. Transcriptional regulation of the human  $\alpha 2$  (I) collagen gene. Combined action of upstream stimulatory and inhibitory cis-acting elements. *J Biol Chem* 271: 26717-26723.
5. Ihn, H., K. Yamane, and K. Tamaki. 2005. Increased phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase p38 in scleroderma fibroblasts. *J Invest Dermatol* 125: 247-255.
6. Jinnin, M., H. Ihn, Y. Asano, K. Yamane, M. Trojanowska, and K. Tamaki. 2004. Tenascin-C up-regulation by transforming growth factor- $\beta$  in human dermal fibroblasts involves Smad3, Sp1, and Ets1. *Oncogene* 23: 1656-1667.
7. Dailey, L., D. Ambrosetti, A. Mansukhani, and C. Basilico. 2005. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 233-247.
8. Johnson, G., and R. Lapadat. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911-1912.
9. Kyriakis, J., and J. Avruch. 1990. pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J Biol Chem* 265: 17355-17363.
10. Tortorella, L., D. Milasincic, and P. Pilch. 2001. Critical proliferation-independent window for basic fibroblast growth factor repression of myogenesis via the p42/p44 MAPK signaling pathway. *J Biol Chem* 276: 13709-13717.
11. Lovicu, F., and J. McAvoy. 2001. FGF-induced lens cell proliferation and differentiation is dependent on MAPK (ERK1/2) signalling. *Development* 128: 5075-5084.
12. Frémin, C., F. Ezan, P. Boisselier, A. Bessard, G. Pagès, J. Pouysségur, and G. Baffet. 2007. ERK2 but not ERK1 plays a key role in hepatocyte replication: an RNAi-mediated ERK2 knock-down approach in wild-type and ERK1 null hepatocytes. *Hepatology* 45: 1035-1045.
13. Cárcamo-Orive, I., N. Tejedós, J. Delgado, A.

- Gaztelumendi, D. Otaegui, V. Lang, and C. Trigueros. 2008. ERK2 protein regulates the proliferation of human mesenchymal stem cells without affecting their mobilization and differentiation potential. *Exp Cell Res* 314: 1777-1788.
14. Robinson, M., and M. Cobb. 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9: 180-186.
  15. Wu, J., H. Yan, W. Chen, W. Chen, C. Wang, Y. Chi, and W. Kao. 2008. JNK signaling pathway is required for bFGF-mediated surface cadherin downregulation on HUVEC. *Exp Cell Res* 314: 421-429.
  16. Kim, M., C. Kim, H. Jung, M. Seo, Y. Juhn, H. Shin, H. Ahn, C. Thiele, and J. Chi. 2004. Fibroblast growth factor 2 induces differentiation and apoptosis of Askin tumour cells. *J Pathol* 202: 103-112.
  17. Singer, A., and R. Clark. 1999. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341: 738-746.
  18. Tsuboi, R., and D. Rifkin. 1990. Recombinant basic fibroblast growth factor stimulates wound healing in healing-impaired db/db mice. *J Exp Med* 172: 245-251.
  19. Xie, J., H. Bian, S. Qi, Y. Xu, J. Tang, T. Li, and X. Liu. 2008. Effects of basic fibroblast growth factor on the expression of extracellular matrix and matrix metalloproteinase-1 in wound healing. *Clin Exp Dermatol* 33: 176-182.
  20. Shipley, G., W. Keeble, J. Hendrickson, R. J. Coffey, and M. Pittelkow. 1989. Growth of normal human keratinocytes and fibroblasts in serum-free medium is stimulated by acidic and basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* 138: 511-518.
  21. Imaizumi, T., F. Jean-Louis, M. Dubertret, C. Bailly, L. Cicurel, J. Petchot-Bacqué, and L. Dubertret. 1996. Effect of human basic fibroblast growth factor on fibroblast proliferation, cell volume, collagen lattice contraction: in comparison with acidic type. *J Dermatol Sci* 11: 134-141.
  22. Chaudhary, L., and K. Hruska. 2001. The cell survival signal Akt is differentially activated by PDGF-BB, EGF, and FGF-2 in osteoblastic cells. *J Cell Biochem* 81: 304-311.
  23. Sulpice, E., M. Bryckaert, J. Lacour, J. Contreres, and G. Tobelem. 2002. Platelet factor 4 inhibits FGF2-induced endothelial cell proliferation via the extracellular signal-regulated kinase pathway but not by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Blood* 100: 3087-3094.
  24. Robson, M., L. Phillips, W. Lawrence, J. Bishop, J. Youngerman, P. Hayward, L. Broemeling, and J. Heggors. 1992. The safety and effect of topically applied recombinant basic fibroblast growth factor on the healing of chronic pressure sores. *Ann Surg* 216: 401-406; discussion 406-408.
  25. Richard, J., C. Parer-Richard, J. Daures, S. Clouet, D. Vannereau, J. Bringer, M. Rodier, C. Jacob, and M. Comte-Bardonnet. 1995. Effect of topical basic fibroblast growth factor on the healing of chronic diabetic neuropathic ulcer of the foot. A pilot, randomized, double-blind, pla-

cebo-controlled study. Diabetes Care 18: 64-69.

26. Arany, P., S. Rane, and A. Roberts. 2008. Smad3 deficiency inhibits v-ras-induced transformation by suppression of JNK MAPK signaling and increased farnesyl transferase inhibition. Oncogene 27: 2507-2512.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. T. Makino, M. Jinnin, F. C. Muchemwa, S. Fukushima, H. Kogushi-Nishi, C. Moriya, T. Igata, A. Fujisawa, T. Johno, H. Ihn: Basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation of human dermal fibroblasts via the ERK1/2 and

JNK pathways. British Journal of Dermatology; in press

### 2. 学会発表

1. Takamitsu Makino, Masatoshi Jinnin, Hironobu Ihn: Basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation of human dermal fibroblasts via the ERK1/2 and JNK pathways. The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (Fukuoka) . 2009. 12

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

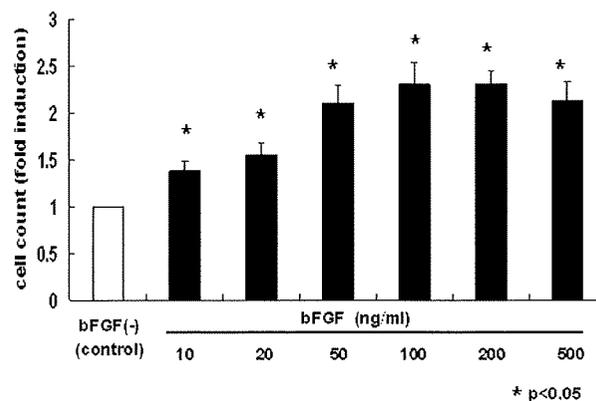


図1: bFGFによる濃度依存的細胞増殖刺激効果

ヒト皮膚線維芽細胞を24穴プレートに $2 \times 10^4$ /wellの密度で播種し、10%ウシ血清含有Eagle培養液で48時間培養し、培養液を無血清Eagle培養液に変え24時間培養し、細胞を静止状態にした。1%ウシ血清含有Eagle培養液を陰性コントロールとし、bFGFの濃度をbFGF 10、20、50、100、200、500 ng/ml、と変化させ、1度のみ培養液に添加した。bFGF添加後144時間培養後、細胞をトリプシン-EDTAで剥離した後、細胞数をCoulter<sup>®</sup> Particle Counter (Beckman Coulter)で測定した。グラフは4回の実験結果を総合し、中間値±標準偏差を提示した。Mann-Whitney U検定を行い、\*p<0.05はbFGF非添加群の陰性コントロール(白棒)と比較した。

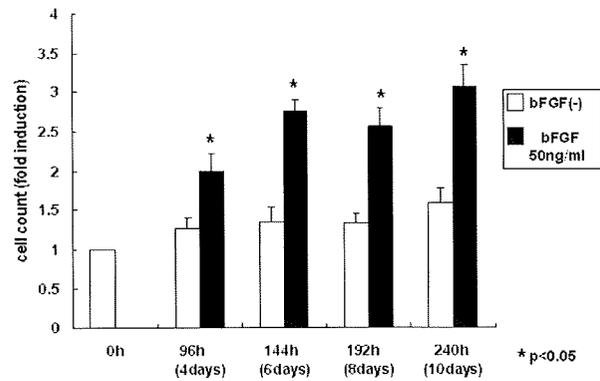


図2：bFGFによる時間依存的細胞増殖刺激効果

ヒト皮膚線維芽細胞を同様に播種し、細胞を静止状態にした後、1%ウシ血清含有 Eagle 培養液を陰性コントロールとし、1度のみ bFGF 50 ng/ml 添加し 96、144、192、240 時間まで培養時間を变化させ培養後に、細胞をトリプシン-EDTA で剥離した後、細胞数を Coulter<sup>®</sup> Particle Counter (Beckman Coulter) で測定した。

グラフは4回の実験結果を総合し、中間値±標準偏差を提示した。Mann-Whitney U 検定を行い、\*p<0.05 は培養時間毎の bFGF 非添加群の陰性コントロール（白棒）と比較した。

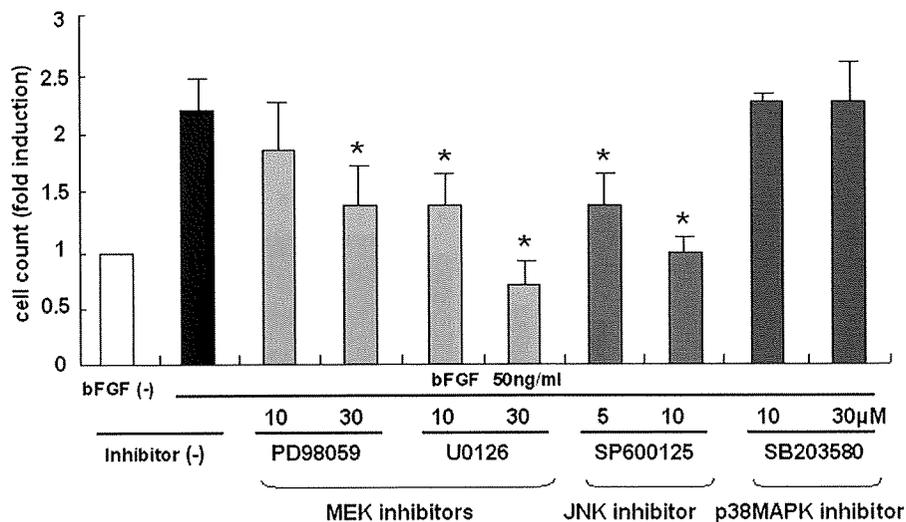


図3：MEK 阻害剤、JNK 阻害剤による細胞増殖刺激の抑制

ヒト皮膚線維芽細胞を24穴プレート中で $2 \times 10^4$ /wellの密度で播種し、10%ウシ血清含有 Eagle 培養液で48時間培養し、培養液を無血清 Eagle 培養液に変え24時間培養し、細胞を静止状態にした。その後、MEK 阻害剤である PD98059 (10、30 μmol/L) と U0126 (10、30 μmol/L)、JNK 阻害剤である SP600125 (5、10 μmol/L)、p38MAPK 阻害剤である SB203580 (10、30 μmol/L) を添加し前反応を1時間行い、1%ウシ血清含有 Eagle 培養液中に1度のみ bFGF 50 ng/ml 添加後、144時間培養し、細胞をトリプシン-EDTA で剥離した後、細胞数を Coulter<sup>®</sup> Particle Counter (Beckman Coulter) で測定した。グラフは4回の実験結果を総合し、中間値±標準偏差を提示した。Mann-Whitney U 検定を行い、\*p<0.05 は阻害剤非添加群（黒棒）と比較した。

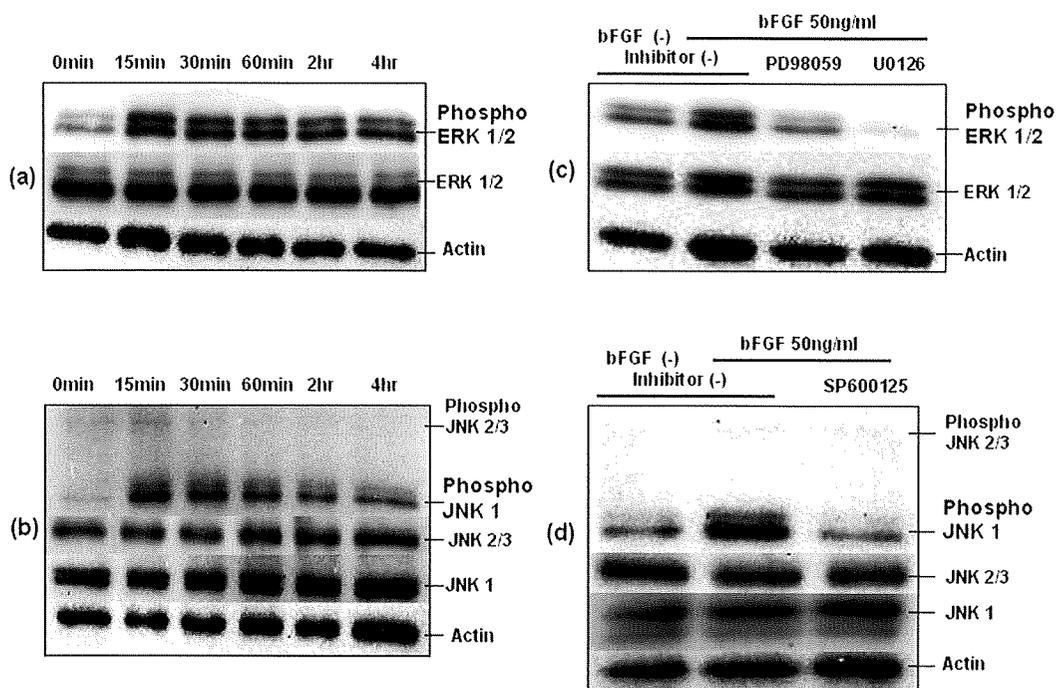


図4：bFGFによるERK1/2とJNK1の活性化

(a, b) ヒト皮膚線維芽細胞を6穴プレート中で $4 \times 10^5$ /wellの密度で培養した。培養液を無血清Eagle培養液に変え24時間培養し、細胞を静止状態にした後、1度のみbFGF 50 ng/mlで刺激し一定時間(15分間-4時間)反応させた。全細胞抽出物を用いて免疫ブロット法を行った。免疫染色を行い、phospho-ERK1/2、ERK1/2 (a)、phospho-JNK、JNK (b)、コントロールとしてActinを検出した。(c, d) ヒト皮膚線維芽細胞を同様に播種し、細胞を静止状態にした後、MEK阻害(PD98059; 30  $\mu$ mol/L、U0126; 30  $\mu$ mol/L) (c)、JNK阻害剤(SP600125; 10  $\mu$ mol/L) (d)で前反応を1時間行い、1度のみbFGF 50 ng/mlで刺激し15分間反応させた。全細胞抽出物を用いて免疫ブロット法を行った。免疫染色を行い、phospho-ERK1/2、ERK1/2 (c)、phospho-JNK、JNK (d)、コントロールとしてActinを検出した。

