

平成 31 年 3 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05003

研究課題名(和文) HtrA1阻害剤と新規ケロイド組織培養法を用いたケロイド治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of a new therapy for keloids with inhibition of HtrA1 and a new keloid organ culture system

研究代表者

内藤 素子(Naitoh, Motoko)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・客員研究員

研究者番号：30378723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,700,000円

研究成果の概要(和文)：当初計画していたケロイド組織培養系の確立は、条件検討を試みるも目標とする結果を得られなかったが、研究計画を変更し、ケロイド組織片を免疫不全マウスに移植し、移植動物種と移植法を検討することにより、新規ケロイドモデルを作成することに成功した。HtrA1をノックダウンすることにより細胞増殖は抑制され、この効果は正常皮膚由来線維芽細胞よりケロイド由来細胞で顕著に認められることが判明した。この結果を本モデルで検証を試みるも研究期間内に完遂できなかったが、新規ケロイドモデルの開発は今後のケロイド研究の発展に大いに貢献するものと期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HtrA1は、ケロイドが拡大していく辺縁部に特に強く発現しており、ケロイド由来細胞を増殖させることが示された。HtrA1の働きを阻害するとケロイド由来細胞の増殖が抑制されることから、ケロイド治療ターゲットとして期待できる。本研究では、この効果を検証するための新規ケロイドモデルの作成も試みた。その結果、免疫不全マウスにケロイド組織を移植固定する技法を開発し、従来より病態を反映する新規ケロイドモデル作成に成功した。ケロイド組織の特徴を維持するケロイドモデルが作成できたことは、ケロイドの病態解明や治療薬開発に大いに貢献するものと期待できる。

研究成果の概要(英文)：Although we could not establish a keloid organ culture system, we developed a novel keloid model using an unique nude mice and thechnique to implant keloid tissues into mice. Keloid fibroblasts treated with HtrA1 siRNA exhibited a proliferation rate significantly slower. This effect with silencing HtrA1 was also observed in normal fibroblasts, but the inhibition effect was not as pronounced. We could not confirmed this effect on our novel keloid model. However, our results could contribute to investigation of keloid pathogenesis and new treatments.

研究分野：形成外科

キーワード：ケロイド 創傷治癒 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

ケロイドは難治性疾患として知られ、いまだ発症のメカニズムは解明されていない。そのため、根治が極めて困難で、臨床現場では治療に難渋するのが現状である。病態解明ならびに治療法開発が遅れている大きな要因としては、ケロイドがヒト特有の疾患で、動物モデルが乏しいことが挙げられる。申請者らはこれまで、ケロイド発症機構を解明するため、ケロイド組織と正常皮膚組織からそれぞれ抽出した mRNA を用いてマイクロアレイ解析を行い、ケロイド発症に関連する遺伝子の網羅的解析を行った。その結果、皮膚組織では通常発現が認められないもしくは非常に発現が少ない 32 個の遺伝子発現が、強く誘導されていることを発見し、この中で特に HtrA1 という分子に注目して研究を進めてきた。

2. 研究の目的

本研究では、HtrA1 機能阻害阻剤 (以下、HtrA1 阻害剤) を用いて、HtrA1 の機能阻害によりケロイドの病態が改善できるかどうかを、in vitro および、新規ケロイド Organ Culture 法を用いて検討することを目的とした。

3. 研究の方法

まずケロイドのモデルの構築を行うことを目的に、新規ケロイド Organ Culture 法の確立を目指した。インフォームドコンセントを得た患者で、ケロイド切除術時に得られたケロイド病変部から直径 3mm 高さ 5mm となるケロイド組織円柱を作成し、培養皿底面にメピオールジェルを用いて固定したコラーゲン スポンジの上に設置した。WE 培地 (William's E medium) で培養。経時的に円柱組織をサンプリングし、凍結切片用ブロックとパラフィンブロックを作成、一部より蛋白、RNA を回収した。これらを用いて、ケロイドで発現が上昇している蛋白や遺伝子の解析を行い、培養組織がケロイド組織の特徴を維持しているか解析した後、適切なモデルが構築できていると確認できたら、それを用いて HtrA1 阻害剤の効果を検討する計画であった。

4. 研究成果

新規ケロイド Organ Culture 法の確立の段階で、当初の計画どおりの条件では、早期に組織壊死がみとめられ、移植組織の大きさや採取方法について条件検討を重ねたが、期待する結果が得られなかったため、当初の計画を変更し、in vivo モデルを作成することを目指した。具体的には、免疫不全マウス背部にケロイド組織を移植することにより、in vivo ケロイドモデルを作成することとし、免疫不全マウスの種類ならびに背部への移植法の検討を実施した。その結果、免疫不全マウス A の背部皮膚にポケットにケロイド組織全層を 5-0 ナイロン糸で固定することにより、

良好なケロイドモデルを作成することに成功した。図 1 に示すように (HE 染色)、移植組織は生着し、ケロイドに特徴的な irregular、dense でヒアリン化したコラーゲン束の蓄積が移植後 12 週という長期に渡り観察された。

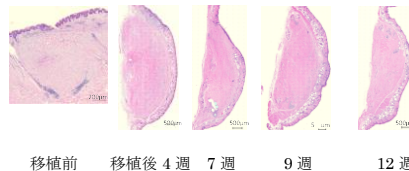


図 1

また、図 2a. b に示すように、移植後 4~12 週において、移植組織内でのヒト細胞の割合について検討した。組織切片を作成し、1 組織内から 4 か所ランダムにピックアップし、さらに各 1 か所につき 10 か所の 100 μm² の範囲でマウス、ヒト各細胞数をカウントしたところ、移植組織内のマウス細胞率は 5% 以下で、移植組織内でヒト細胞が生着し、組織が維持されていることを確認した。

また、HSP47 は、コラーゲン特異的シャペロンで、申請者らのこれまでの研究によりケロイド組織において発現量が高いことを報告しているが (Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001;280(5):1316-22.)、図 3 に示すように、移植組織に対する抗 HSP47 抗体による免疫組織化学的染色結果では、移植ケロイド組織でも、正常皮膚と比較し、HSP47 の発現量が高く維持されていることが観察できた。以上のことから、本移植組織は、ケロイド組織の特徴の一部を維持できしており、ケロイドモデルとして使用できる可能性が示唆された。

ケロイド移植組織 (移植後 9 週) 免疫組織染色
Red: 抗ビメンチン抗体 Green: 抗ヒトミトコンドリア抗体

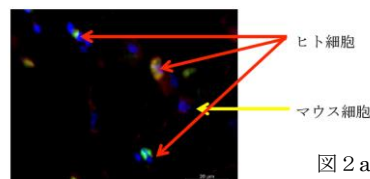


図 2a

	ヒト細胞	マウス細胞	unclassified	マウス細胞率
移植後 4w	39.5	2.08	1	4.91%
移植後 7w	30.6	1.1	0.75	3.47%
移植後 9w	30.8	1.5	0.6	4.64%
移植後 12w	21.7	0.1	0	0.46%

図 2b

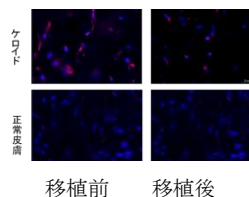


図 3

抗 HSP47 抗体による免疫組織化学的染色

さらに、ケロイド由来線維芽細胞と正常皮膚由来線維芽細胞に対してHtrA1のノックダウンを実施した（siRNAをLipofectamine RNAiMAX Reagentでtransfection）を用いて行くと、図4に示すように、ケロイド線維芽細胞において細胞増殖が優位に抑制された。

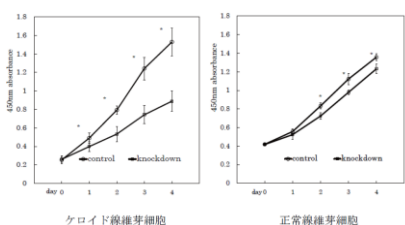


図4

リコンビナントHtrA1をケロイド由来線維芽細胞と正常皮膚由来線維芽細胞に投与したところ、ケロイド由来細胞において増殖促進効果が確認された（論文1）。この効果を、先に構築した新規ケロイドモデルで検証しようと試みたが、研究期間内に実施することができなかった。研究期間内に研究代表者が所属機関を異動することとなり、ケロイド検体の採取数が減少したことも要因と考えられる。しかしながら、本研究成果により、9週という長期に渡りin vivoでケロイド組織の特徴を維持するケロイドモデルが作成できたことは、ケロイド研究の発展に大いに貢献することが期待できる。今後さらに本モデルを改良し、ケロイド治療薬の開発やケロイドの病態解明につなげることを目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 4 件）

1. Yamawaki S, Naitoh M, Kubota H, Aya R, Katayama Y, Ishiko, T, Tamura T, Yoshikawa K, Enoshiri T, Ikeda M, Suzuki S.

HtrA1 Is Specifically Up-Regulated in Active Keloid Lesions and Stimulates Keloid Development. *Int J Mol Sci.* 2018, 19(5)E1275. 10.3390/ijms19051275. 査読あり

2. Enoshiri T, Naitoh M, Yamawaki S, Kawaguchi A, Aya R, Noda K, Katayama Y, Doi T, Kawaji T, Suzuki S.

β -Adrenergic Receptor Blockers Reduce the Occurrence of Keloids and Hypertrophic Scars after Cardiac Device Implantation: A Single-Institution Case-Control Study. *Plast Reconstr Surg.* 2017, 139:1248-1256

10. 1097/PRS. 0000000000003239 査読あり

3. 綾梨乃, 山脇聖子, 内藤素子, 鈴木茂彦 ケロイド・肥厚性瘢痕の保存的治療とエコーによる評価 PEPARS

2016年117巻8-12 査読なし

4. The Shear Wave Velocity on Elastography Correlates with the Clinical Symptoms and Histopathological Features of Keloids.

Aya R, Yamawaki S, Yoshikawa K, Katayama Y, Enoshiri T, Naitoh M, Suzuki S.

Plast Reconstr Surg Glob Open. 2015, 3(7) e464 10.1097/GOX.0000000000000445. 査読あり

〔学会発表〕（計 8 件）

1. 松添晴加・池田実香・内藤素子・片岡和哉・セ也・豊島公栄・辻孝

ケロイド・肥厚性瘢痕に置ける神経の局在
第12回瘢痕・ケロイド治療研究会 2017年11月27日～28日 メルパルク京都（京都）

2. 内藤素子、山脇聖子、片山泰博、綾梨乃、石河利広、池田美香、江野尻竜樹、片岡和哉、鈴木茂彦

コンドロイチナーゼに着目した新規ケロイド治療薬の開発
第47回日本創傷治癒学会 2017年11月27日～28日 メルパルク京都（京都）

3. 池田実香・松添晴加・内藤素子・片岡和哉・セ也・豊島公栄・辻孝

ケロイド移植モデルの構築（第一報） 第26回日本形成外科学会基礎学術集会 2017年10月18日～20日ナレッジキャピタルコングレンベンションセンター（大阪）

4. 松添晴加・池田実香・内藤素子・片岡和哉・セ也・豊島公栄・辻孝

ケロイド・肥厚性瘢痕に置ける神経の局在

第 26 回日本形成外科学会基礎学術集会 2017
年 10 月 18 日～20 日 ナレッジキャピタルコ
ングレコンベンションセンター (大阪)

5. 山脇聖子、内藤素子、綾梨乃、片山康博、
江野尻竜樹、齊藤晋、鈴木茂彦

超音波診断機器を用いたケロイド・癬痕の評
価 第 9 回創傷外科学会 2017 年 7 月 6
- 7 日 長良川国際会議場 (愛知)

6. Yamawaki S, Naitoh M, Ishiko T, Yoshikawa
K, Enoshiri T, Aya R, Katayama Y, Suzuki S.
Up-regulation of HtrA1 in keloid tissues.

The 5th World Congress of the World Union
of Wound Healing Societies

2016年09月25日～2016年09月29日

Fortezza da Basso, Florence, Italy

7. Yamawaki S, Naitoh M, Katayama Y, Aya R,
Enoshiri T, Noda K, Suzuki S

Our strategy for the keloid treatments

The 13th Japan-Korea Congress of Plastic
and Reconstructive Surgery (国際学会)

2016年05月15日～2016年05月17日ANAクラウ
ンプラザホテル金沢 (石川)

8. Yamawaki S, Naitoh M, Aya R, Katayama Y,
Enoshiri T, Saitoh S, Suzuki

Quantitative assessment of scar stiffness
using ultrasonography

7th joint meeting of European Tissue
Repair Society

and the Wound Healing Society

2015年10月21日～2015年10月23日Copenhagen,
Denmark

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 素子 (NAITOH Motoko)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞シ
ステム形成研究センター・客員研究員
研究者番号：30378723

(2) 研究分担者

山脇 聖子 (YAMAWAKI Satoko)

京都大学・医学研究科・医学研究科客員研
究員
研究者番号：70378777

吉川勝宇 (YOSHIKAWA Katsuhiko)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：10583156

(平成 28 年 3 月 31 日まで)

江野尻 竜樹 (ENOSHIRI Tatsuki)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：00748270

(3) 連携研究者

久保田 広志 (KUBOTA Hiroshi)

秋田大学・工学資源学部・教授

研究者番号：80332724

鈴木 茂彦 (SUZUKI Shigehiko)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：30187728