

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19693

研究課題名(和文)ケロイド発生病態にHDAC阻害剤が及ぼす影響の検討

研究課題名(英文)Analysis on the influence of the HDAC inhibitor in the keloid formation

研究代表者

鎌塚 大(KUWATSUKA, Yutaka)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：90437864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：HDAC阻害剤がケロイド細胞において細胞外マトリックスや転写因子の遺伝子発現にどのような影響を及ぼすか検討を行った。以前の検討でケロイド組織中のHDAC2が高発現していることを見出したため、HDAC阻害剤として、SAHAに加えMocetinostat、Apicidinを選択した。その結果、いずれのHDAC阻害剤もCOL1A2抑制し得たが、Apicidinが抑制効果に優れていた。また、ApicidinはHIF-1を抑制することを見出した。以上よりApicidinは局所の低酸素を改善し、線維化を抑制する可能性が示唆された。今後検討数を増やし、さらなるメカニズムの解明が望まれる。

研究成果の概要(英文)：We examined the gene expressions of extracellular matrix and transcription factors in keloid cells with HDAC inhibitor in vitro. Previously, we found HDAC2 was upregulated in the keloid tissue, therefore, we choose Mocetinostat and Apicidin in addition to SAHA as HDAC inhibitors. As a result, any HDAC inhibitors could inhibit the COL1A2 mRNA expressions, especially apicidin could inhibit COL1A2 greater extent. Moreover, lower gene expressions were detected in the apicidin. These suggests apicidin improve the hypoxic stress and fibrosis in the keloid. More number of the studies and further mechanism examination would be needed.

研究分野：皮膚科学

キーワード：ケロイド HDAC阻害剤 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

ケロイドは細胞外マトリックスの過剰な沈着が生じており、外見からのストレスに加え機能障害を引き起こす難治性疾患である。現在のところ、放射線照射を併用した外科手術が再発率を30%程度までに抑制するとされているが、確実な治療法は乏しいのが現状である。一方、遺伝子発現の調節機構としてエピジェネティクスに注目が集まっている。特にヒストン蛋白構造を調節するヒストンジアセチラーゼ(HDAC)は、核内ではヒストン構造を調節し種々の遺伝子の発現を制御する。一方で HDAC は細胞質においても転写因子のアセチル化を行い、数々の遺伝子の転写を制御している。HDAC 阻害剤は近年種々の悪性腫瘍への有効性が示されており、新たな分子標的薬として注目されている。皮膚線維化に関しては、全身性強皮症の線維芽細胞において HDAC7 の抑制がコラーゲン I、III の産生を低下させ (Arthritis Rheum, 2009)、HDAC 阻害剤の一つであるトリコスタチン A (Trichostatin A; TSA)は皮膚線維芽細胞の増殖や細胞外マトリックス産生を抑制したとの報告がある (Matrix Biology, 2010)。そこで我々は以前、マイクロアレイを用いてケロイド組織とその近傍の正常皮膚組織から線維芽細胞を培養し遺伝子発現を解析比較した。HDAC に着目した所、HDAC2 がケロイド組織で高発現していることを見出した。

2. 研究の目的

以上から過剰な線維化が生じているケロイド病態の抑制に HDACが関与する可能性を考慮した。まずTSAを *in vitro*でケロイド細胞に添加し、細胞外マトリックスや転写因子のmRNA発現の変動をRT-PCR法で検討した。その結果、TSA投与によりCOL1A2やVersicanのmRNA発現が低下することを見出した(図1)。一方、TSAを添加したケロイド細胞と正常真皮線維芽細胞を培養し、採取したmRNAを用いてマイクロアレイを行った。そのデータを解析した所、TSAの投与によりTGF- β 1などのサイトカインに加え、WntやHIF-1

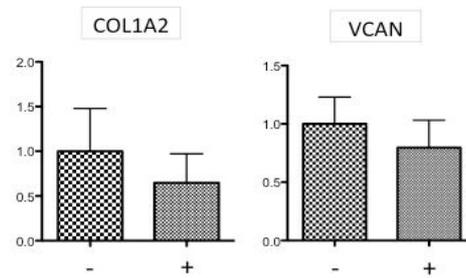


図1:ケロイド細胞における TSA 投与前後の mRNA 発現レベル。+は投与群、-は非投与群

どの転写因子がケロイド細胞特異的に変動している可能性を見出した。そこで、今回我々は様々なHDAC阻害剤を選択し、線維化に関する細胞外マトリックスや転写因子を中心にケロイドにどのような影響を及ぼすのかを検証することとした。

3. 研究の方法

- (1) HDAC 阻 害 剤 と し て、TSA の 他、Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)に加え、HDAC 2,3を選択的に阻害しうるMocetinostatとHDAC1,2を阻害するApicidinを選択した。
- (2) ケロイド組織由来(KL)と正常真皮由来の線維芽細胞(NF)をサンプルとし、MTS アッセイを行い細胞毒性の確認を行った。
- (3) 前述した細胞外マトリックスや転写因子を中心に HDAC 阻 害 剤 投 与 後 の mRNA 発 現 を RT-PCRで検証した。

4. 研究成果

- (1) MTSアッセイ: KLならびにNFを4サンプルずつ培養し、HDAC阻害剤の濃度と反応時間を振り分けた。その後、CellTiter 96AQueousOne Solution Cell Proliferation Assay (Promega社)のプロトコールに従い、各 wellの490nm 吸光度を測定し、生細胞数のカウントを行った。その結果、TSAは0.6uM、24時間、SAHAは1.2uM、24時間がそれぞれ至適濃度、反応時間と判断した。MocetinostatとApicidinについては1.0uM、24時間が至適濃度と反応時間と判断した。
- (2) 細胞外マトリックスを中心にSAHA投与後の

遺伝子発現を検証： RT-PCR COL1A2 や Versican などケロイドで増加している遺伝子を中心に細胞外マトリックスの変動にHDAC阻害剤がどのような影響をおよぼすのかを検討した。KL、NFいずれもサンプル数を4サンプルとし培養後、SAHA 投与群と TSA 非投与群を設けRNAを採取し、RT-PCRを行った。各遺伝子についてSAHA非投与群の遺伝子発現を 1.0 とし、SAHA投与群の遺伝子発現を相対的に評価した。その結果、ケロイドで発現が増加しているとされるCOL1A2はSAHAの投与によりKL特異的に発現が低下することがわかった。だが、Versicanについては発現の変動がなく、MMP1やMMP3についてはSAHAの投与により発現が減少することがわかった。(図2)

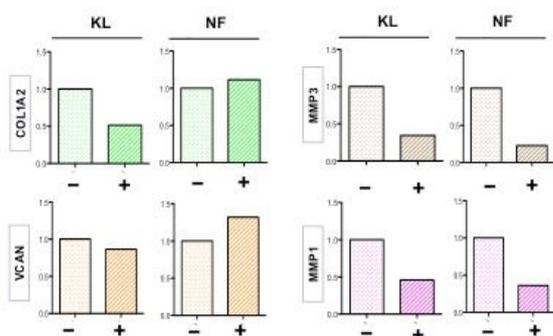


図2： SAHA 投与後の各遺伝子 mRNA 発現レベル。+ は投与群、- は非投与群

(3) 細胞外マトリックスを中心にMocetinostat, Apicidin投与後の遺伝子発現を検証： RT-PCR 同様に HDAC2 を選択的に阻害するMocetinostatとApicidinを用いてCOL1A2やVersicanなどのmRNA発現を検討した。その結果、ApicidinについてはNF,KLいずれにおいてもCOL1A2とVersicanのmRNA発現が低下していた。一方、MocetinostaについてはApicidinと比較するとCOL1A2、VersicanいずれもmRNA発現の低下がやや弱かったが、KL特異的にCOL1A2を抑制し得た。(図3)

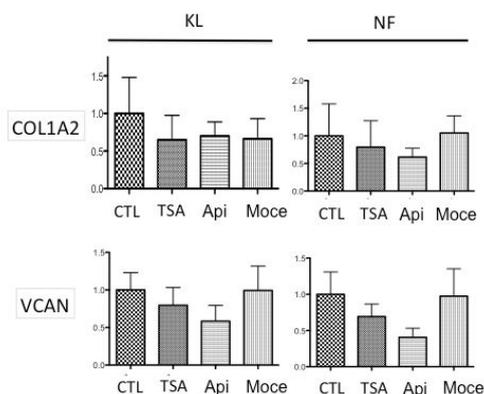


図3： Apicidin, Mocetinostat 投与後のCOL1A2とVersicanのmRNA発現レベル。Api; Apicidin, Moce; Mocetinostat

次に、MMP1、MMP3、HIF1 について検討を加えた。その結果、ApicidinについてはNF,KLいずれにおいてもMMP-1,3の低下がみられ、HIF1の低下がみられた。一方、MocetinostaについてはMMP1,3は軽度上昇し、HIF1についてはほぼ変動がみられなかった。(図4)

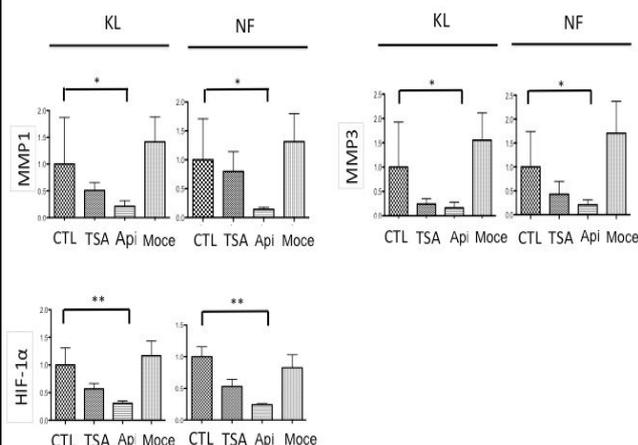


図4： Apicidin, Mocetinostat 投与後の各遺伝子 mRNA 発現レベル。Api; Apicidin, Moce; Mocetinostat

考察

今回種々のHDAC阻害剤の投与によりRT-PCRを用いた検討で、COL1A2やVersicanのmRNA発現が抑制されることが示唆された。とりわけ、Apicidinについては、MMP1とMMP3の発現

が増加していることから、これらの発現を介して細胞外マトリックスの増加を抑える可能性がある。しかし KL 特異的ではなかった。一方 SAHA や Mocetinostat に関しては、COL1A2 の抑制傾向はみられたものの、Versican の抑制効果は弱く、また MMP1,3 への影響も乏しかった。今後濃度の検討に加え、サンプル数を増やし、追加の検討が必要と思われる。最終的にはケロイド発生の抑制に役立てることを目指してゆきたい。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 10 件)

- 1) Iwanaga A, Okubo Y, Yozaki M, Koike Y, Kuwatsuka Y, Tomimura S, Yamamoto Y, Tamura H, Ikeda S, Maemura K, Tsuiki E, Kitaoka T, Endo Y, Mishima H, Yoshiura K I, Ogi T, Tanizaki H, Wataya-Kaneda M, Hattori T, Utani A: Analysis of clinical symptoms and *ABCC6* mutations in 76 Japanese patients with pseudoxanthoma elasticum. *J Dermatol* 査読有 in press, 2017. DOI: 10.1111/1346-8138.13727
- 2) 田崎典子, 鋤塚 大, 東 美智子, 鋤塚さやか, 鈴木貴久, 波多智子, 宇谷厚志: 再発性多発軟骨炎と骨髄異形成症候群を合併した Sweet 病. *西日本皮膚科* 査読有 79(1): 19-23, 2017. <http://doi.org/10.2336/nishinohonhifu.79.19>
- 3) 鋤塚さやか, 鋤塚 大, 富村沙織, 山岡俊文, 岩田洋平, 武石恵美子, 小川文秀, 土居剛士, 廣瀬寮二, 宇谷厚志: 長崎大学病院皮膚科における 10 年間の乳房外 Paget 病 33 例の統計. *長崎医学会雑誌* 査読有 91(1): 7-13, 2016.
- 4) 福地麗雅, 鋤塚 大, 富村沙織, 武石恵美子, 山岡俊文, 穠山雄一郎, 小川文秀, 土居剛士, 廣瀬寮二, 宇谷厚志: 長崎大学病院皮膚科における悪性黒色腫 72 症例(2001~2010 年)の統計的検討. *長崎医学会雑誌* 査読有 91(2): 95-101, 2016.
- 5) 鋤塚 大, 池原 進, 宇谷厚志, 吉見公佑, 松尾朋博, 大場康司郎, 酒井英樹: 陰茎包皮から発生した陰茎癌の 1 例. *日本皮膚外科学会誌* 査読有 20(2): 140-141, 2016.
- 6) 佐藤之恵, 原 肇秀, 大久保佑美, 鋤塚 大, 宇谷厚志: 【鑑別に苦慮した皮膚病(2)】 <臨床例>弾性線維性仮性黄色腫との鑑別を要した腋窩の多発性丘疹の 2 例. *皮膚病診療* 査読有 38(6): 595-598, 2016.
- 7) Kuwatsuka S, Kuwatsuka Y, Takenaka M, Utani A: Case of photosensitivity caused by fenofibrate after photosensitization to ketoprofen. *J Dermatol* 査読有 43: 224-225, 2016. DOI: 10.1111/1346-8138.13168
- 8) 池原進, 鋤塚大, 小川文秀, 牧山純也, 新野大介, 大島孝一, 宇谷厚志: 化学療法と 2 度の骨髄移植により長期寛解を維持している芽球形形質細胞様樹状細胞腫の 1 例. *皮膚科の臨床* 査読有 58(2): 271-274, 165-166, 2016.
- 9) Okada K, Endo Y, Miyachi Y, Koike Y, Kuwatsuka Y, Utani A: Glycosaminoglycan and versican deposits in taxane-induced sclerosis. *Br J Dermatol* 査読有 173: 1054-1058, 2015. DOI: 10.1111/bjd.13899
- 10) Sakamoto N, Kakugawa T, Hara A, Nakashima S, Yura H, Harada T, Ishimoto H, Yatera K, Kuwatsuka Y, Hara T, Ichinose K, Obase Y, Ishimatsu Y, Kohno S, Mukae H: Association of elevated alpha-defensin levels with interstitial pneumonia in patients with systemic sclerosis. *Respir Res* 査読有 16: 148, 2015. DOI: 10.1186/s12931-015-0308-1

[学会発表] (計 21 件)

- 1) 神尾芳幸、岩永 聰、富村沙織、鍬塚 大、宇谷厚志: 長崎大学で経験したダーモスコピー5 症例の検討. 日本皮膚科学会第 331 回長崎地方会例会, 2017/4/9,長崎大学医学部第一講義室(長崎県・長崎市)
- 2) 大久保佑美、増山律子、岩永 聰、小池雄太、鍬塚 大、荻 朋男、山本洋介、遠藤雄一郎、田村 寛、宇谷厚志: GGCX 症候群患者皮膚線維芽細胞でみられた骨分化マーカー上昇を伴う石灰化. 日本皮膚科学会第 331 回長崎地方会例会, 2017/4/9, 長崎大学医学部第一講義室(長崎県・長崎市)
- 3) 樋口真帆、鍬塚 大、宇谷厚志、佐藤真也、宮崎泰司、新野大介: Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL)の再燃時に皮膚に AL 型アミロイドーシスを発症した1例. 第 80 回日本皮膚科学会東部支部学術大会, 2016/10/29 ~ 10/30,アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)
- 4) 鍬塚 大、鍬塚さやか、宇谷厚志: 皮下石灰沈着症に対しトレパン打ち抜き法で加療した2例. 第 31 回日本皮膚外科学会総会・学術集会, 2016/9/10 ~ 9/11,ふじのくに千本松フォーラム(静岡県・沼津市)
- 5) 岩永 聰、大久保佑美、与崎マリ子、小池雄太、鍬塚 大、富村沙織、山本洋介、田村 寛、荻 朋男、宇谷厚志: 日本人 PXE 患者 76 人における臨床症状と ABCC6 遺伝子変異. 第 48 回日本結合組織学会学術大会, 2016/6/24 ~ 6/25,長崎大学医学部良順会館・記念講堂(長崎県・長崎市)
- 6) 本多 舞、浅井 幸、大久保佑美、神尾芳幸、小池雄太、鍬塚 大、櫻山和也、大石正雄、田中克己、宇谷厚志: マイクロアレイ分析によるケロイド組織で発現増強する分子の同定. 第 48 回日本結合組織学会学術大会, 2016/6/24 ~ 6/25,長崎大学医学部良順会館・記念講堂(長崎県・長崎市)
- 7) 鍬塚 大、与崎マリ子、鍬塚さやか、大久保佑美、白井 文、小池雄太、宇谷厚志: 各種の HDAC 阻害剤がケロイド細胞に及ぼす遺伝子発現の検討. 第 48 回日本結合組織学会学術大会, 2016/6/24 ~ 6/25, 長崎大学医学部良順会館・記念講堂(長崎県・長崎市)
- 8) 岡田佳代、遠藤雄一郎、椋島健治、宮地良樹、小池雄太、鍬塚 大、宇谷厚志: タキサンによる浮腫・硬化早期病変でのコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(パーシカン)増加. 第 115 回日本皮膚科学会総会, 2016/6/3 ~ 6/5,国立京都国際会館(京都府・京都市)
- 9) 大久保 澪、鍬塚 大、浅井 幸、岩永 聰、中村太祐、山崎拓也、宇谷厚志: ベムラフェニブ内服中に生じた重度放射線皮膚炎の一例. 第 32 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会, 2016/5/27 ~ 5/28,かごしま県民交流センター(鹿児島県・鹿児島市)
- 10) 富村沙織、鍬塚 大、大久保佑美、宇谷厚志: 油症患者血清における CD27 の検討. 長崎県油症対策委員会・長崎油症研究班会議, 2016/5/26,ベストウェスタンプレミアホテル長崎(長崎県・長崎市)
- 11) 村山直也、鍬塚 大、岩永 聰、神尾芳幸、池原 進、鍬塚さやか、富村沙織、宇谷厚志: 当科の悪性黒色腫に対する免疫チェックポイント阻害剤の使用状況. 日本皮膚科学会第 328 回長崎地方会例会, 2016/4/10,長崎大学医学部第 1 講義室(長崎県・長崎市)
- 12) 村山直也、鍬塚 大、岩永 聰、神尾芳幸、池原 進、鍬塚さやか、富村沙織、宇谷厚志: 当科の悪性黒色腫に対する分子標的治療薬の使用状況. 日本皮膚科学会第 328 回長崎地方会例会, 2016/4/10,長崎大学医学部第 1 講義室(長崎県・長崎市)
- 13) 岩永 聰、大久保佑美、与崎マリ子、小池雄太、鍬塚 大、富村沙織、山本洋介、池

- 田聡司、前村浩二、築城英子、北岡隆、田村 寛、遠藤雄一郎、三嶋博之、吉浦孝一郎、荻 朋男、谷崎英明、金田眞理、服部友保、宇谷厚志：本邦における弾性線維性仮性黄色腫 76 人の解析。日本皮膚科学会第 328 回長崎地方会例会，2016/4/10，長崎大学医学部第 1 講義室(長崎県・長崎市)
- 14) 芦田美輪、鏝塚 大、宇谷厚志：抗カルジオリピン抗体陽性 SLE 患者に見られた皮膚萎縮症。第 39 回皮膚脈管・膠原病研究会，2016/1/22～1/23，高知市文化プラザ(高知県・高知市)
- 15) 森寄仁美、富村紗織、村山直也、福地麗雅、池原 進、鏝塚 大、宇谷厚志(長崎大)、一ノ宮 愛(長崎掖済会)：ダウン症候群に合併した腱鞘巨細胞腫の一例。日本皮膚科学会長崎地方会第 327 回例会，2015/12/5，長崎大学病院第四講義室(長崎県・長崎市)
- 16) 福地麗雅、鏝塚 大、富村紗織、武石恵美子、山岡俊文、穠山雄一郎、小川文秀、土居剛士、廣瀬寮二、宇谷厚志：当院における悪性黒色腫 10 年間の統計。日本皮膚科学会長崎地方会第 327 回例会，2015/12/5，長崎大学病院第四講義室(長崎県・長崎市)
- 17) 鏝塚さやか、鏝塚 大、富村紗織、山岡俊文、穠山雄一郎、岩田洋平、武石恵美子、小川文秀、土居剛士、廣瀬寮二、宇谷厚志：長崎大学病院皮膚科における 10 年間の乳房外 Paget 病の統計。日本皮膚科学会長崎地方会第 327 回例会，2015/12/5，長崎大学病院第四講義室(長崎県・長崎市)
- 18) 鏝塚 大、與崎マリ子、鏝塚さやか、大久保佑美、臼井文、小池雄太、宇谷厚志：トリコスタンチン A と Creb-binding protein がケロイド細胞に及ぼす遺伝子発現の検討。第 47 回日本結合組織学会学術大会、2015/5/15～5/16，コクヨホール(東京都・港区)
- 19) 小池雄太、八木洋輔、與崎マリ子、吉見公佑、大久保佑美、鏝塚 大、宇谷厚志：EMT 誘導による創傷治癒過程の表皮角化細胞遊走促進。第 47 回日本結合組織学会学術大会、2015/5/15～5/16，コクヨホール(東京都・港区)
- 20) 大久保佑美、臼井 文、與崎マリ子、吉見公佑、小池雄太、鏝塚 大、宇谷厚志：弾性線維性仮性黄色腫様症状を呈した GGCX 症候群。第 47 回日本結合組織学会学術大会、2015/5/15～5/16，コクヨホール(東京都・港区)
- 21) 岩永 聡、與崎マリ子、大久保佑美、小池雄太、鏝塚 大、山本洋介、荻 朋男、宇谷厚志：弾性線維性仮性黄色腫患者における ABCC6 遺伝子変異の同定。第 47 回日本結合組織学会学術大会、2015/5/15～5/16，コクヨホール(東京都・港区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鏝塚 大 (KUWATSUKA, Yutaka)
 長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教
 研究者番号: 90437864