

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15750

研究課題名(和文) レックリングハウゼン病の機械刺激受容システム解明とケロイド治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of mechanotransduction system in neurofibromatosis type I and application to the treatment of abnormal scars

研究代表者

久保 盾貴 (KUBO, Tateki)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00362707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：Neurofibrominの機能的異常を来しているNF-1においては、LIMKおよびその下流のCofilinが過剰にリン酸化された状態、その結果アクチン重合亢進状態にあるため、伸展刺激によるアクチン重合促進という反応が生じにくく、過剰な瘢痕が形成されにくい可能性が考えられた。このことから、機械的刺激によるアクチン重合・脱重合サイクルの亢進という反応をコントロールすることができれば、ケロイド・肥厚性瘢痕のような過剰な瘢痕形成を抑制できる可能性が示唆され、今後さらなる研究により臨床への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Our findings have suggested that neurofibromin was involved in the differentiation of fibroblasts to myofibroblasts in response to mechanical stimulation. When neurofibromin was dysfunctional or suppressed, the unresponsiveness to mechanical stimulation in the actin polymerization occurred, which might lead to the unchanging expression of α -SMA. Furthermore, actin stabilizer also did not promote α -SMA expression in normal HDFs in response to mechanical stimulation. We believe that this molecular pathway can be a potential therapeutic target to treat abnormal scars.

研究分野：形成外科学

キーワード：レックリングハウゼン病 RhoA Neurofibromin 筋線維芽細胞 機械的伸展刺激

1. 研究開始当初の背景

(1) 皮膚創傷治癒において線維芽細胞は中核となる細胞であり、様々な研究がなされてきたが、ケロイド・肥厚性瘢痕の形成機構は現在もなお十分に解明されていない。一方、われわれ形成外科医は、臨床現場においてロックリングハウゼン病(神経線維腫症 I 型、neurofibromatosis type 1、以下 NF-1 と略す)患者では瘢痕形成が非常に少ないことをよく経験する。ということは、NF-1 患者の皮膚線維芽細胞は、瘢痕形成に対して抑制的に働く何らかの機構を有する可能性があり、筋線維芽細胞への分化抑制や、あるいは分化してもアポトーシスを誘導するような機構が備わっている等がその理由として推測される。

(2) NF-1 は神経線維腫などの腫瘍を発生するため、腫瘍形成の点からの研究が主としてなされ、neurofibromin タンパクの異常が原因であることが分かっている。neurofibromin は、癌遺伝子である Ras の機能を抑制している。しかし、NF-1 ではこのタンパクの異常のため、Ras が亢進し、腫瘍形成を生じる。そして近年、Ras 以外の経路として、細胞骨格制御因子である RhoA/Rho キナーゼ (ROCK)、その下流の因子である LIM kinase 1/2/cofilin を制御するタンパク、以下 LIMK1/2) や cofilin (アクチン脱重合を行うタンパク) 経路も抑制することが報告されている。

(3) 一方、ケロイド・肥厚性瘢痕は肩や前胸部など機械的伸展刺激を生じる場所に発生しやすい。細胞内における機械的刺激のシグナル伝達経路として多くの報告があるが、その重要な 1 つとして、RhoA/ROCK/LIMK/cofilin/actin pathway がある。すなわち、機械的刺激が加わるとこの経路が活性化され actin 重合が促進することにより、筋線維芽細胞への分化が促進されるなど、さまざまな線維化亢進反応が生じることが、ケロイド・肥厚性瘢痕形成の一因と考えられている。

2. 研究の目的

ヒトの皮膚は一旦創を生じると必ず傷跡が残る。傷跡を残さないようにできれば (scarless wound healing) 人類の生活の質は大きく向上する。一方、NF-1 という全身の皮膚と神経を中心に神経線維腫を多発する疾患を治療する機会があるが、手術後の傷跡が非常にきれいになることが知られている。とういことは、NF-1 の創傷治癒を研究し、その瘢痕形成のメカニズムを明らかにすれば、scarless wound healing に応用できる可能性がある。今回われわれは NF-1 の患者より採取した皮膚線維芽細胞を、機械的伸展刺激受容の観点から解析して、scarless wound healing に向けた新治療開発を目的に研究を行った。

3. 研究の方法

NF-1 由来皮膚線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞に機械的伸展刺激を加えた時の反応として、筋線維芽細胞への分化や RhoA/ROCK/LIMK/cofilin/actin pathway に違いがあるかを調べた。

また、その違いが neurofibromin の異常によるものであることを確認するため、正常皮膚線維芽細胞に NF-1 siRNA を導入し neurofibromin をノックダウンした細胞を control siRNA 導入細胞と比較する実験も同時に行った。

(1) 使用細胞

正常皮膚線維芽細胞は汎用性初代ヒト皮膚線維芽細胞を市販購入した。NF-1 由来皮膚線維芽細胞は、施設倫理委員会による許可を受けたプロトコールに則り、同意の得られた NF-1 患者から手術における余剰皮膚を提供いただき、腫瘍ではない部分の皮膚から線維芽細胞を初代培養した。いずれも、通常の培養細胞実験系で培養・継代を行い、継代数 3~8 の細胞を実験に用いた。

(2) 機械的伸展刺激の方法

細胞への機械的刺激にはストレックス社製の培養細胞伸展システムを用いた。タイプコラーゲンにてコーティングした専用シリコンチャンバー上に培養し伸展刺激を加えた。伸展条件は、ヒトの呼吸回数を想定して 1 分間に 10 往復、伸展率 15% という設定で継続的に行った。

(3) 筋線維芽細胞への分化や Rho とその下流を中心したシグナル伝達の解析

筋線維芽細胞への分化については、そのマーカーである α -SMA の発現変化をウエスタンブロットングにて解析した。RhoA 活性の変化については、pull-down assay を行った。RhoA の下流にある、LIMK や cofilin の活性についてはそのリン酸化タンパク質の割合を western blotting にて測定した。そして、cofilin の結合パートナーであるアクチンは、重合体 (F-actin) と単量体 (G-actin) が存在するのだが、それらの比 (F/G 比) を調べ、アクチンの重合度を測定した。

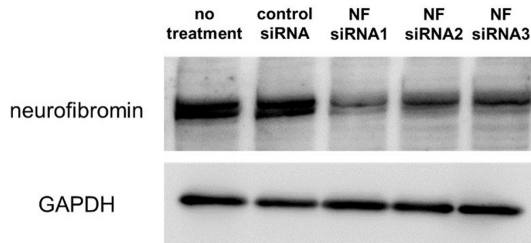
(4) Jasplakinolide を用いたアクチン重合促進状態における機械的伸展刺激への反応解析

臨床応用を見据えた場合、シグナル伝達のより下流で作用させる方が望ましい。例えば、RhoA のように比較的上流で阻害や促進をすると、アクチンだけでなく、それ以外のさまざまな生命現象にも影響を及ぼす恐れがある。そこで、Jasplakinolide というアクチン脱重合阻害 (重合促進) 剤を正常線維芽細胞に投与して、本研究ターゲットの最下流であるアクチン重合を促進させた状態における機械的伸展刺激への反応 (筋線維芽細胞への分化) についても解析を行った。

4. 研究成果

(1) NF-1 siRNA による neurofibromin ノックダウン

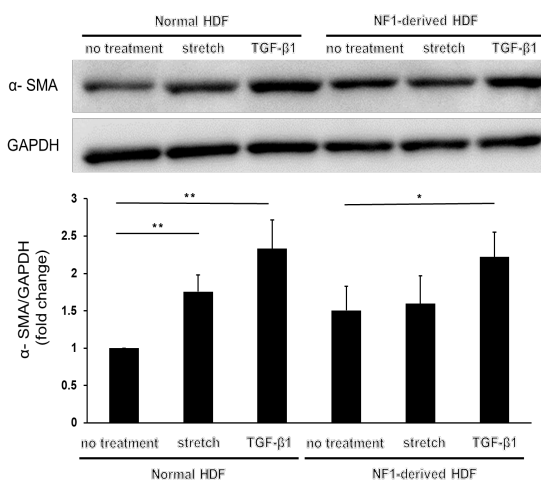
正常皮膚線維芽細胞に 3 種の NF-1 siRNA をトランスフェクションし、いずれにおいても neurofibromin がノックダウンされることを確認した。



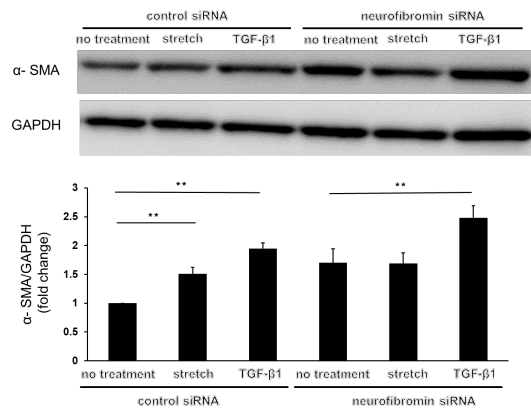
(2) 筋線維芽細胞への分化 (α -SMA) について

正常皮膚線維芽細胞ならびに NF-1 由来皮膚線維芽細胞をそれぞれコラーゲンコーティングした専用シリコンチャンバー上に培養し、FBS starve 処理後、機械的伸展刺激を 24 時間加えた後に細胞タンパク質を回収し、ウエスタンブロットイングによる解析を行った。ポジティブコントロールとして TGF- β を用いた。

その結果、正常線維芽細胞でも伸展刺激により α -SMA の発現は有意に増加するのに対し、NF-1 由来皮膚線維芽細胞では伸展前から正常線維芽細胞よりも α -SMA の発現が高い傾向にあり、伸展刺激を加えてもその発現はほとんど変化していないことが判明した。ポジティブコントロールとして TGF- β ではいずれの細胞においても α -SMA の発現が増加していた。



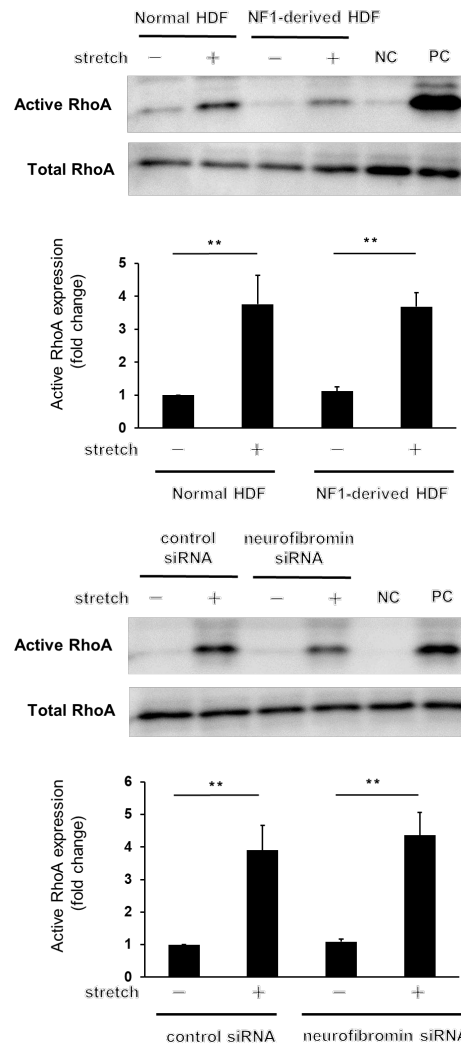
control siRNA ならびに NF-1 siRNA 導入細胞についても同様に、control siRNA 導入細胞では伸展刺激により α -SMA の発現は有意に増加するのに対し、NF-1 siRNA 導入細胞では伸展刺激を加えてもその発現はほとんど変化していないことが確認された。



(3) RhoA の変化について

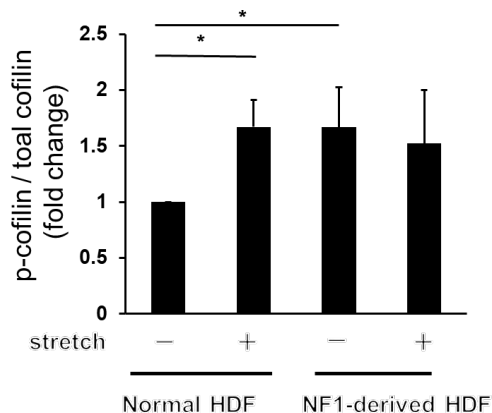
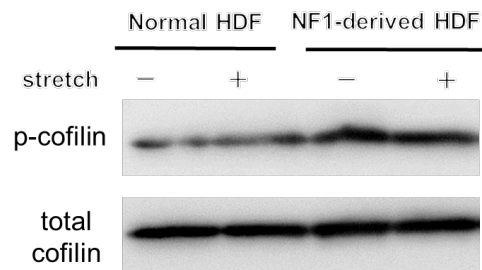
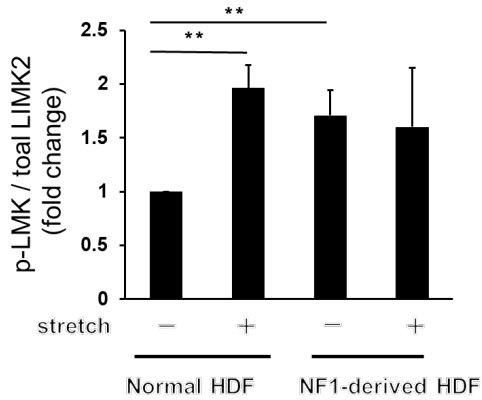
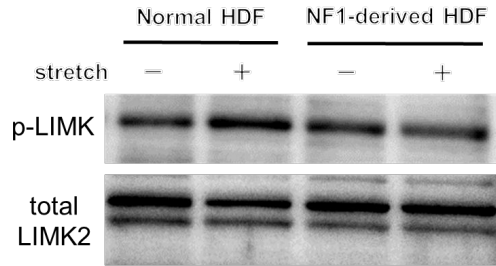
正常皮膚線維芽細胞ならびに NF-1 由来皮膚線維芽細胞を FBS starve 処理後、機械的伸展刺激を加えて 10 分後にそれぞれの細胞タンパク質を回収し、プルダウンアッセイを行った。

その結果、NF-1 由来皮膚線維芽細胞においても伸展刺激前では RhoA 活性は正常と変わらず、またいずれも伸展刺激により RhoA は活性化されるということが確認された。また、siRNA を用いた実験でも同様の結果であった。

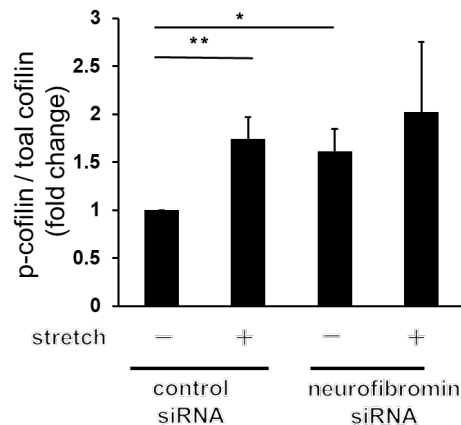
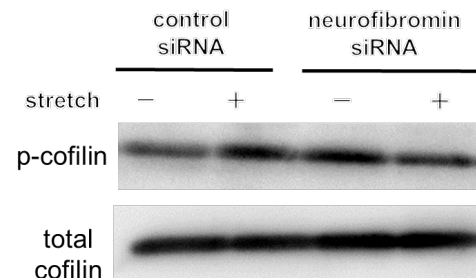
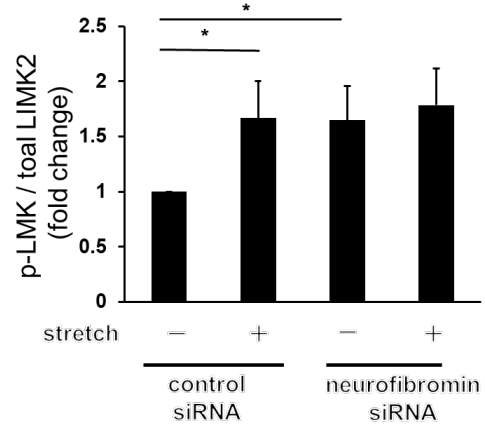
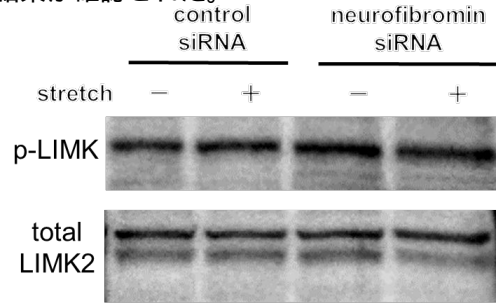


(4) LIMK、Cofilin の変化について

正常皮膚線維芽細胞ならびに NF-1 由来皮膚線維芽細胞を FBS starve 処理後、機械的伸展刺激を 24 時間加えた後に細胞タンパク質を回収し、ウエスタンブロッティングによりそれらのリン酸化について解析を行った。その結果、正常皮膚線維芽細胞においては、伸展刺激が加わることで LIMK、Cofilin とともにリン酸化タンパク質の割合が増加するが、NF-1 由来皮膚線維芽細胞においては、伸展前からリン酸化タンパク質の割合が高く、伸展刺激を加えてもほとんど変化が認められなかった。



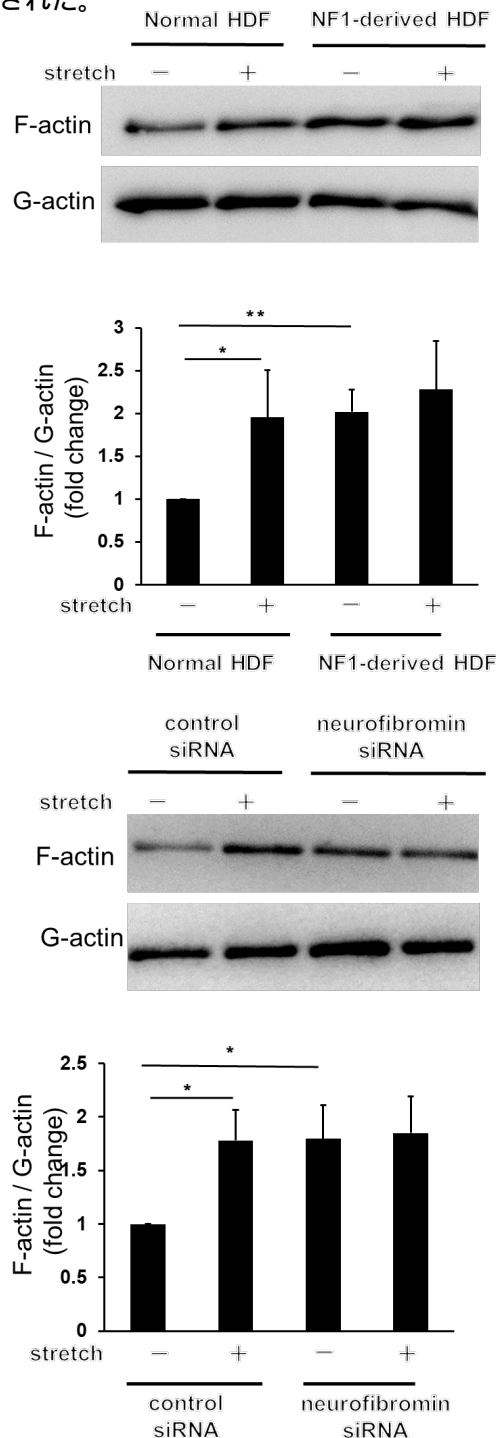
また、LIMK、Cofilin におけるこれらの反応性の違いは、siRNA を用いた実験でも同様の結果が確認された。



(5) アクチン重合の変化について

FBS starve 処理、機械的伸展刺激を加えた後、細胞タンパク質を回収し、G-actin / F-actin In Vivo Assay Kit (Cytoskeleton) の添付マニュアルに従って重合体アクチン (F-actin) と単量体アクチン (G-actin) を測定し、それらの比 (F/G 比) を解析した。

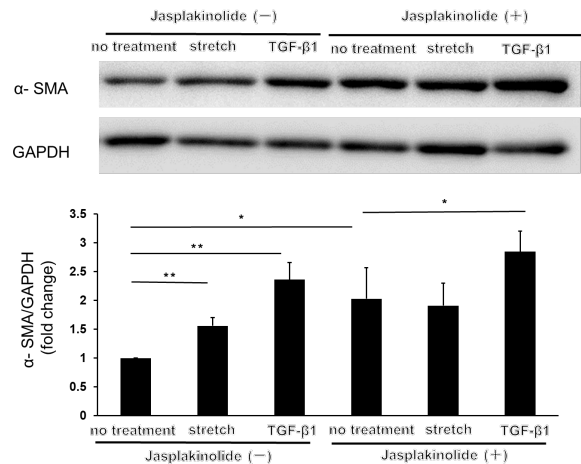
その結果、正常皮膚線維芽細胞においては、伸展刺激が加わることでアクチン重合が促進される (F/G 比が増加する) のに対し、NF-1 由来皮膚線維芽細胞においては、伸展前から重合体アクチンの割合が高く、伸展刺激を加えてもほとんど変化が認められなかった。si RNA を用いた実験でも同様の結果が確認された。



(5) アクチン重合促進状態における機械的刺激への反応解析について

正常皮膚線維芽細胞に Jasplakinolide を投与しアクチン重合が亢進した細胞 (NF-1 由来線維芽細胞の近似状態) に伸展刺激を加えた時の α -SMA の発現変化をウエスタンブロットティングにて解析した。

その結果、Jasplakinolide 前処置細胞においてはコントロール細胞と比較し、伸展前から α -SMA の発現が上昇しており、伸展刺激を加えても α -SMA の発現は変化していなかった。



以上の研究結果から、Neurofibromin の機能的異常を来している NF-1 においては、LIMK およびその下流の Cofilin が過剰にリン酸化された状態、その結果アクチン重合亢進状態にあるため、伸展刺激によるアクチン重合促進という反応が生じにくく、過剰な癒痕が形成されにくい可能性が考えられた。

このことから、機械的刺激によるアクチン重合・脱重合サイクルの亢進という反応をコントロールすることができれば、ケロイド・肥厚性癒痕のような過剰な癒痕形成を抑制できる可能性が示唆され、今後さらなる研究により臨床への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

木矢孝一郎、前田大介、久保盾貴、細川互 創傷治癒への新しいアプローチ ~ レックリングハウゼン病に着目して ~ 平成 29 年 10 月 19 ~ 20 日 第 26 回日本形成外科学会基礎学術集会 ナレッジキャピタル コングレコンベンションセンター、大阪府

〔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 特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

久保 盾貴 (KUBO, Tateki)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00362707

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()