

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19727

研究課題名(和文)皮膚創傷断端表皮細胞における上皮間葉移行の機序解明

研究課題名(英文)Epithelial mesenchymal transition in wound edge keratinocytes

研究代表者

小池 雄太(KOIKE, Yuta)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：10530412

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)：上皮間葉移行(Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT)とは、上皮細胞が間葉系細胞と類似した形態と運動能を獲得する過程を示す。近年、皮膚創傷治癒過程において、創傷断端部位の表皮細胞が運動能を獲得し遊走する現象にEMTが関与していると考えられているが、詳細な検討はなされていない。本研究では、マウス皮膚創傷を用いて、皮膚創傷断端表皮細胞の形態変化・運動能獲得における分子機構をEMTの観点から解析した。結果、通常の創傷と比較して、bFGF添加した創傷では創傷断端の表皮角化細胞のEMTが増強しており、EMTを誘導するサイトカイン、転写因子も発現していた。

研究成果の概要(英文)：During reepithelialization of the wound healing process, keratinocytes at leading edge of the wound edge are migrating in association with a transition into spindle cells and a reduction of cell-cell contact. These phenomena are thought to belong to epithelial mesenchymal transition (EMT). We examined bFGF effects on EMT at wound edge keratinocytes using mouse dorsal skin. As a result, EMT of keratinocytes at leading edge are enhanced with bFGF treatment and EMT inducer cytokines and transcriptional factors were also upregulated with bFGF.

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚再生学 上皮間葉移行 EMT FGF2

1. 研究開始当初の背景

(1) 創傷ではまず「創床」が形成され続いて周辺皮膚から表皮角化細胞が遊走し、創傷面を覆い再生が終了する。そのとき創傷断端の表皮角化細胞(Wound-Edge Keratinocytes)は、紡錘形に形を変え極性を失い遊走するため、Wound-Edge Keratinocytes が上皮間葉移行(epithelial mesenchymal transition: EMT)と類似の現象を起こしていると考えられている¹⁾。

(2) これまで EMT メカニズムは、がん細胞浸潤現象の分野で明らかにされてきている。最も有名な現象は、上皮系癌浸潤過程における vimentin をはじめとした間葉系中間径フィラメントの発現であり、上皮系癌の悪性度に密接に関わっている。がんにおける EMT シグナル解析について簡略に述べると、TGF- β などのシグナルを受けた上皮系癌細胞は、Snail, Slug, Twist などの EMT 関連転写因子を発現し、続いて E-cadherin 発現低下及び形態変化によって遊走性を獲得する²⁾。創傷治癒過程でも TGF- β は産生されているため、EMT が一定の関与をしていると推察される。Wound-Edge Keratinocytes はこれまで多種多様な検討が行われ、細胞形態の変化や遊走能獲得の他、cytokeratin, integrin, desmosome などといった細胞骨格・細胞間接着分子の変化から EMT の関与が推測されているが、現時点で複数の EMT 関連分子に焦点を当てた研究はほとんどなされていない。

2. 研究の目的

(1) 本研究では創傷治癒過程における表皮角化細胞遊走を EMT 視点から検討し、皮膚再生メカニズムの一端を解明する。

(2) 日本国内で保険適用とされ日常診療で皮膚潰瘍の創傷治癒促進剤としても使用される recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF: trafermin) が EMT に関与していると想定し、in vivo で bFGF 投与された創傷の EMT 誘導について検討する。

3. 研究の方法

(1) マウス創傷治癒過程のモデル
10-12 週齢の C57BL/6J マウス(雄)の背部皮

膚をバリカンで除毛し、左右 1 箇所ずつ 6mm トレパン (BP-L60K) で肉様膜に至る創傷を加えた。左側の創傷には recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF: trafermin, kaken) 1 ug/ml, 50 ul を連日添加した。右側の創傷には PBS を 50ul 連日添加しコントロール (CTL) とした。創傷は、透明粘着テープ (3MTM テガダーム TM) で保護した。肉眼的創閉鎖日は創が上皮化し、痂皮が全て除去された日とした。

(2) マウス皮膚組織の作成

マウス背部創傷部に対して、#11 メスを用いて創傷中央を中心とした 1 辺 10mm の正方形に切開し、骨上の深さで皮膚組織を採取した。採取組織を中央で 2 分割し、それぞれ 4% paraformaldehyde で 24 時間固定し、パラフィン包埋した。パラフィン切片作成し、hematoxylin eosin 染色で形態学的に観察した。創傷断端の最も肥厚した部分が構成する表皮角化細胞数は、核の 1/2 以上の成分が含まれているものをカウントした。

(3) 蛍光抗体法

前述の皮膚組織を用いて、Snail (cell signaling), Slug (cell signaling), Vimentin (cell signaling), E-cadherin (cell signaling), N-cadherin (cell signaling), Notch1 (abcam), β -catenin (cell signaling), Twist (abcam) に対する各種抗体を用いて、蛍光抗体法を行った。

(4) PCR array

創傷作成後 4 日目の組織から RNeasy[®] Mini Kit (QIAGEN) で mRNA を抽出、Ready-To-Go[™] RT-PCR Beads (GE Healthcare) で cDNA を作製した。EMT 関連分子 84 項目を RT² Profiler PCR Arrays (96-well Format), Mouse Epithelial to Mesenchymal Transition (QIAGEN) を用いて、realtime RT-PCR にてそれぞれ定量化し、fold change で比較した。

4. 研究成果

(1) bFGF を投与したマウス皮膚創傷の変化 CTL の創と、bFGF 投与した創を経時的に観察し、創閉鎖日を比較した。その結果、CTL 群では平均 9.8 日 (n=6)。bFGF 投与群では平均 7.8 日 (n=6) であり、bFGF 投与群で有意に創閉鎖までの日数が短縮した (p<0.05)。続

いて、創傷断端の表皮の構成を HE 染色された病理組織像で検討した。創傷治癒過程にある day 4 の創傷において、bFGF 投与した創では明らかな表皮断端の肥厚が見られた。表皮の最も厚い部位を構成している細胞数をカウントすると、CTL の創傷では 7.0 ± 1.5 個、bFGF 投与した創傷では 12.5 ± 2.5 個であり、有意差を持って bFGF 投与した創傷断端では表皮肥厚が見られた。

一方、Wound-edge keratinocytes がフィブリンクロットに接する面を観察すると、CTL の創は比較的なだらかであるのに対し、bFGF 投与した創は keratinocyte が紡錘形に形態変化して突出していた。また一部ではフィブリンクロット内への keratinocyte の泳動も見られ、それらは pan keratin 染色陽性だった。フィブリンクロット内への浸潤細胞数を比較したところ、CTL 群では 0.1 ± 0.3 個だったのに対し、bFGF 投与群では 2.2 ± 1.8 個であり、有意差をもって、bFGF 投与にて細胞の個別遊走を認めた。まとめると、bFGF 投与した創傷の Wound-Edge Keratinocytes は、紡錘形に形態変化し、一部の細胞では表皮の細胞間接着から離脱して遊走しているため、より強く EMT が誘導されていると推測した。

(2) Wound-Edge Keratinocytes における EMT 関連細胞構造蛋白の同定

EMT 誘導刺激を受けた上皮細胞が、間葉系細胞様に変化する際の主要なマーカーとして、細胞接着に密に関わる E-cadherin が減弱すること、間葉系細胞の中間系フィラメントである vimentin が発現してくることがよく知られている。前述のマウス皮膚創傷作成後 4 日目の bFGF 添加皮膚組織を用いて、E-cadherin, vimentin の発現について蛍光抗体法で確認した。結果、E-cadherin は、Wound-Edge Keratinocytes 及び、表皮から離れて遊走している keratinocyte で減弱していた。また、vimentin はそれらの細胞において発現しており、cytekeratin と混在していた。bFGF 投与した創傷組織の一部では、肥厚した創傷断端直下の肉芽組織表面に、単層で増殖し遊走する細胞が見られた。それらの細胞は cytekeratin に加え Vimentin を強く発現しており、E-cadherin は消失していた。これらの結果より、bFGF 投与された Wound-Edge Keratinocytes では、E-cadherin の減弱、vimentin の発現という EMT に典型的な細胞構造の変化を起こしていることが分かった。

(3) マウス皮膚創傷における EMT 関連分子の網羅的解析

マウス創傷作成後 4 日目の皮膚組織全体から mRNA を抽出し、EMT 関連分子約 84 項目を PCR array にて定量化し、網羅的に比較検討した。それぞれの分子を、「Up-regulated during EMT」、「Cell Growth and Proliferation」、「Cell migration and Motility」、「TGF/BMP Signaling」、「WNT Signaling」に分けたところ、いずれの区分においても、bFGF 投与した創傷にて 1.5 fold change 以上上昇している分子が多くみられた。EMT に強く関連する細胞内外シグナル・転写因子として、Snail, Slug, Twist, Notch1, Zeb1, TGF β 1, Smad2, β -catenin, Wnt5a を抽出し、CTL と bFGF 投与創傷とを比較した。結果、細胞外からの EMT の重要な促進因子である TGF β 1 は bFGF 投与創傷で上昇していた。また細胞内シグナルである Notch1, Smad2, β -catenin, Wnt5a も同様に上昇していた。EMT 関連転写因子である、Snail は bFGF 投与創傷で増加しており、Slug は軽度上昇していたが、Twist, Zeb1 は減少していた。以上より、bFGF 投与したマウス皮膚創傷組織では、全体の傾向として、EMT 関連分子、細胞増殖・遊走に関わる分子が活性化しており、組織中の TGF β 1 濃度が上昇し、一部の転写因子の活性化を経て EMT 誘導刺激を得ている可能性が示唆された。

(4) Wound-Edge Keratinocytes における EMT 関連転写因子の同定

続いて、Wound-Edge Keratinocytes における、EMT 関連転写因子の発現を正常皮膚、創傷作成 4 日目マウス CTL 皮膚、創傷作成 4 日目マウス bFGF 投与皮膚で比較検討した。Snail は bFGF 投与した創傷でのみ、Wound-Edge Keratinocytes で発現していた。Slug は正常皮膚では発現せず、CTL 創傷の Wound-Edge Keratinocytes の一部で陽性だった。一方、bFGF 投与創傷の Wound-Edge Keratinocytes では多くの細胞の核で発現が見られた。Twist は bFGF 投与創傷の細胞質で淡く発現が見られた。 β -catenin は正常皮膚・CTL 創傷では細胞膜に一致して発現していた。一方、蛍光抗体法にて bFGF 投与創傷の Wound-Edge Keratinocytes では、 β -catenin の細胞質内、核内移行が見られた。

< 引用文献 >

1. Valerie A, et al, Rise and Fall of Epithelial Phenotype CHAPTER 8, 2005

2. Jean P, et al, Cell 2009

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12件)

- 1) Koike Y, Yozaki M, Kuwatsuka Y, Utani A: Epithelial mesenchymal transition in a Bowen's disease when arising de novo and acquiring invasive capacity (共著)。J Dermatol, 査読有り。in press, 2018
- 2) 福地麗雅, 小池雄太, 富村沙織, 芦田美輪, 宇谷厚志: 難治性皮膚潰瘍に対する植皮後の固定にV.A.C.(R)システムを用いた2例(共著)。皮膚科の臨床。査読有り。in press, 2018
- 3) 小池雄太, 岩永 聡, 大久保佑美, 宮副治子: Pseudo-Pseudoxanthoma elasticum (図説) (共著)。西日本皮膚科。査読有り。in press, 2018
- 4) 村山直也, 小池雄太, 田崎典子, 鎌塚大, 富村沙織, 宇谷厚志: 下腿にdiffuse large B-cell lymphomaを生じ、epstein-barr virus再活性化の関与が疑われたメトトレキサート関連リンパ球増殖性疾患の1例(共著)。西日本皮膚科。査読有り。in press, 2018
- 5) Fukuchi R, Kuwatsuka Y, Koike Y, Sato Y, Nishimoto K, Utani A: Patients with axillary Paget's disease should be carefully screened for other sites affected by the disease(共著)。Eur J Dermatol。査読有り。28巻1号83頁~84頁。2018年02月
doi: 10.1684/ejd.2017.3140
- 6) Koike Y, Okubo M, Kiyohara T, Fukuchi R, Sato Y, Kuwatsuka S, Takeichi T, Akiyama M, Sugiura K, Utani A: Granulocyte and monocyte apheresis can control juvenile generalized pustular psoriasis with mutation of IL36RN(共著)。Br J Dermatol。査読有り。177巻6号1732頁~1736頁。2017年12月
doi: 10.1111/bjd.15509
- 7) Koike Y, Murayama N, Kuwatsuka Y, Utani A: A case of Merkel cell carcinoma development under treatment with a Janus kinase inhibitor(共著)。JAAD Case Rep。査読有り。3巻6号498頁~500頁。2017年11月,
doi: 10.1016/j.jdc.2017.06.028
- 8) 宇谷厚志, 岩永 聡, 小池雄太, 大久保佑美, 鎌塚大, 遠藤雄一郎, 谷崎英昭, 金田真理, 簀持 淳, 三長孝輔, 荻 朋男, 山本洋介, 池田聡司, 築城英子, 田村寛, 前村浩二, 北岡 隆, (「弾性線維性仮性黄色腫診療ガイドライン」策定委員会): 日本皮膚科学会ガイドライン 弾性線維性仮性黄色腫診療ガイドライン(2017年版)(共著)。日本皮膚科学会雑誌。査読有り。127巻11号2447頁~2454頁。2017年10月
<https://doi.org/10.14924/dermatol.127.2447>
- 9) 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, 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 (共著)。J Dermatol。査読有り。44巻6号644頁~650頁。2017年06月, doi: 10.1111/1346-8138.13727
- 10) Okubo Y, Masuyama R, Iwanaga A, Koike Y, Kuwatsuka Y, Ogi T, Yamamoto Y, Endo Y, Tamura H, Utani A: Calcification in dermal fibroblasts from a patient with GGXX syndrome accompanied by upregulation of osteogenic molecules (共著)。PLoS One。査読有り。12巻5号e0177375頁。2017年05月, doi: 10.1371/journal.pone.0177375
- 11) Murayama N, Koike Y, Ikehara S, Okubo Y, Tomimura S, Utani A: Is bevacizumab a culprit of intractable skin ulcers? (共著)。J Dermatol。査読有り。43巻8号972頁~974頁。2016年08月, doi: 10.1111/1346-8138.13325
- 12) Koike Y, Utani A: Generalized hyperkeratotic plaques in a baby with a milk allergy (共著)。Pediatr Dermatol。査読有り。33巻4号457頁~458頁。2016年07月, doi: 10.1111/pde.12843

〔学会発表〕(計18件)

- 1) 小池雄太、GMAを組み入れた膿疱性乾癬のマネジメント、第8回長崎消化器apheresis研究会、2018年01月
- 2) 小池雄太、長崎大学のこれまでと乾癬治療の未来(招待講演)、第179回日本皮膚科学会鹿児島地方会、2017年11月
- 3) 江原大輔、小池雄太、樋口真帆、福地麗雅、富村沙織、石井文人、橋本 隆、閉塞性細気管支炎を合併した腫瘍随伴性天疱瘡の1例、第69回日本皮膚科学会西部支部学術大会、2017年10月
- 4) 渡辺千秋、吉見公佑、清原龍士、福地麗雅、小池雄太、富村沙織、宇谷厚志、鍬塚大、Cetuximab併用放射線療法が有効であった有棘細胞癌の1例、第69回日本皮膚科学会西部支部学術大会、2017年10月
- 5) 小池雄太、樋口真帆、福地麗雅、鍬塚さやか、透析中のHBVキャリア乾癬患者に対するイキセキズマブの投与経験、第32回日本乾癬学会学術大会、2017年09月
- 6) 藤樹祐未、芦田美輪、鍬塚さやか、鍬塚大、小池雄太、原 肇秀、宇谷厚志、当科での膠原病に対するヒドロキシクロロキンの使用状況、日本皮膚科学会第332回長崎地方会例会、2017年07月
- 7) 小池雄太、全身性強皮症の臨床と自己抗体産生・線維化機構、第49回日本結合組織学会学術大会、2017年06月
- 8) 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年04月
- 9) 芦塚賢美、小池雄太、竹中 基、宇谷厚志、小川文秀、BCG接種後に腺病性苔癬を発症した2乳児例、日本皮膚科学会第331回長崎地方会例会、2017年04月
- 10) 芦塚賢美、小池雄太、森寄仁美、清原龍士、福地麗雅、神尾芳幸、宇谷厚志、紅皮症を呈した落葉状天疱瘡の一例、日本皮膚科学会第330回長崎地方会例会、2016年12月
- 11) 小池雄太、大久保 澗、清原龍士、福地麗雅、佐藤之恵、鍬塚さやか、武市拓也、秋山真志、杉浦一充、宇谷厚志、IL36RN遺伝子ホモ接合体変異を有する乾癬患者の臨床経過、第31回日本乾癬学会学術大会、2016年09月
- 12) 鍬塚さやか、浅井 幸、佐藤之恵、小池雄太、宇谷厚志、高木理博、抗HIV療法にて軽快したHIV関連乾癬の1例、第31回日本乾癬学会学術大会、2016年09月
- 13) 芦塚賢美、小池雄太、福地麗雅、鍬塚さやか、田崎典子、宇谷厚志、静脈血流うっ滞と動脈閉塞がみられた下腿潰瘍の一例、日本皮膚科学会第329回長崎地方会例会、2016年07月
- 14) 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年06月
- 15) 鍬塚大、與崎マリ子、鍬塚さやか、大久保佑美、臼井 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年06月
- 16) 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年06月
- 17) 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年06月
- 18) 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年04月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 雄太 (KOIKE, Yuta)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：10530412