

令和元年5月14日現在

機関番号：21601  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2017～2018  
 課題番号：17K17023  
 研究課題名(和文)ケロイドにおけるオートファジー現象の関与解析

研究課題名(英文) Experiment of autophagy in keloidal collagen

## 研究代表者

堀切 将 (Masaru, Horikiri)

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：80769464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,400,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーとは、自己の細胞成分をリソソームで分解する現象を指す。最近、ラット創傷治癒モデルの肉芽組織中の線維芽細胞においてオートファジー-リソソーム系が影響を受けていることが報告された。線維芽細胞の異常増殖が原因となる病態としてケロイドが挙げられる。研究者は、線維芽細胞におけるオートファジー現象の異常が、ケロイドを誘発する可能性を考慮し、哺乳類線維芽細胞におけるLC3陽性顆粒数の増加の原因を探り、かつ細胞増殖因子、分化因子のオートファジーへの関与を精査する目的で、ラット線維芽細胞由来のNRK細胞を用い、bFGFおよびTGF- $\beta$ の効果について解析した。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

bFGF投与によりLC3陽性顆粒数は増加せず、オートファジーによる分解も変化しなかった。TGF- $\beta$ 投与によりLC3陽性顆粒数は変化せず、オートファジーによる分解も変化しなかった。bFGF投与により隔離膜マーカーであるAtg16Lが増加するが、TGF- $\beta$ 投与72時間によりAtg16Lは減少した。以上より現時点で、bFGFやTGF- $\beta$ がオートファジー分解系のどの段階に影響を与えているかを示すことができなかった。これは、LC3ないしAtg16L以外の抗体を使用して、オートファジー分解系の初期あるいは後期段階での動向の調査が必要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The autophagy refers to a phenomenon to break down a cell ingredient of the self into in lysosome. It was reported recently that an autophagy-lysosomal system was affected in a fibroblast of the granulation tissues of the rat wound healing model. The condition of a patient caused by the fibroblastic abnormality increase includes a keloid. I used NRK cell derived from a rat fibroblast for the purpose of investigating sounding out and a cell growth factor, participation in autophagy of the differentiation factor thoroughly, and the researcher analyzed a cause of the increase of the number of the LC3-positive granules in the mammalian fibroblast about an effect of bFGF and transforming growth factor-beta in consideration of the possibility that abnormality of autophagy in the fibroblast caused a keloid.

研究分野：形成外科

キーワード：ケロイド オートファジー LC3 Atg16L bFGF TGF- $\beta$

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

オートファジーとは、自己の細胞成分をリソソームで分解する現象を指す。最近、ラット創傷治癒モデルの肉芽組織中の線維芽細胞においてオートファジー リソソーム系が影響を受けていることが報告された。また、線維芽細胞の異常増殖が原因となる病態としてケロイドが挙げられる。

### 2. 研究の目的

研究者は、線維芽細胞におけるオートファジー現症の異常が、ケロイドを誘発する可能性を考慮し、哺乳類線維芽細胞における LC3 陽性顆粒数の増加の原因を探り、かつ細胞増殖因子、分化因子のオートファジーへの関与を精査する目的で、ラット線維芽細胞由来の NRK 細胞を用い、bFGF および TGF- $\beta$  の効果について解析した。

### 3. 研究の方法

NRK-49F 細胞 (ラット腎由来線維芽細胞株) はヒューマンサイエンス研究資源バンク (大阪) から入手した。細胞は 10%ウシ胎仔血清を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM、ナカライテスク株式会社、京都、Code: 08458-16) をもちいて、37 $^{\circ}$ C、5%炭酸ガス環境下にて培養した。これら細胞に bFGF あるいは TGF- $\beta$  を反応させたのちに免疫染色を行い、傾向顕微鏡にて観察した。また、ウエスタンブロット法によるフラックスアッセイも行った。

カバースリップを入れた 24 ウェルの培養プレートに  $0.2 \times 10^6$  個播種し、24 時間培養した。リン酸緩衝生理食塩水 Phosphate buffered saline (PBS、Wako 社、Code: 14249-24 D-PBS[-]) で 3 回洗浄ののち、5 ng/ml bFGF (Wako 社) 存在下に 37 $^{\circ}$ C で 2 時間、あるいは 10 ng/ml TGF- $\beta$  存在下に 24、72 時間培養した。対照群には同量の溶媒、すなわち bFGF に対しては 0.1% BSA、TGF- $\beta$  に対しては 0.1% 滅菌水を添加した。また、一部のウェルにはマクロオートファジーを抑制するために 0.2  $\mu$ M ワートマニンおよび対照として 0.2% ジメチルスルホキシド (DMSO) を投与した。フラックスアッセイの際には、100  $\mu$ M パフィロマイシン A1 および対照として 0.1% DMSO を投与し、37 $^{\circ}$ C、2 時間で培養した。

細胞を 4% パラホルムアルデヒド (PFA) / 0.1 M PB で室温 15 分固定し、さらに 4 15 分固定を継続した。0.1% Triton X-100 と 0.4% BSA を含む PBS により膜透過処理と非特異的反応部位のブロックを室温、20 分間行った。一次抗体としてウサギ抗 Atg16L 抗体 (MBL 社、Code : PM040、Lot:011、2000 倍希釈) とウサギ抗 LC3 抗体 (MBL 社、Code : PM036、Lot : 21、5000 倍希釈) を使用し、室温で、1 時間反応させた。PBS で洗浄後、二次抗体として Alexa 488 標識ロバ抗ウサギ抗体 (Jackson Immuno Research 社、800 倍希釈) ならびに Alexa 594 ロバ抗マウス抗体 (Invitrogen 社、800 倍) を使用し、室温で遮光した状態で 25 分間反応させた。核染色には Hoechst33342 (Invitrogen, ThermoFisher 社、USA、10000 倍) を用いた。水溶性封入剤 (Fluoromount : Diagnostic Bio Systems、USA) で封入後、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000 : Olympus、Japan) で観察、写真撮影を行った。

CCD カメラ (DP71 : Olympus、Japan) を装着した蛍光顕微鏡 (BX51 : Olympus、Japan) を用い、対物 60 倍 (PLAPON 60XO : Olympus、Japan) で撮影した。3 回の実験を行い、1 枚のカバースリップについて、任意の細胞を 50 個選択し、細胞当たりの点状構造をカウントした。ただし、SMA 陽性細胞のみカバースリップ内の全細胞をカウントした。LC3 は各実験の平均値を出して比較し、Atg16L はカウントした各細胞内の点状構造数を比較した。統計学的解析は、LC3 では Student's t 検定を、Atg16L では Games-Howell 検定を用い、 $p < 0.05$  を有意差ありと判定した。

細胞を 6 ウェルの培養プレートに播種し、各種実験を行った。細胞を 4 の PBS にて 3 回洗浄後、タンパク分解酵素阻害剤 (complete EDTA free Protease inhibitor cocktail tablets : Roche Diagnostics、USA) およびホスファターゼ阻害剤 (Phosphatase inhibitor Cocktail 2/3 : SIGMA-ALDRICH、Japan) および 1% Triton X-100 を含む PBS を 200ul 添加して 4 5 分氷上で溶解した。細胞溶解液を 15,000 rpm、4 で 10 分遠心後、上清について BCA Protein Assay kit (Pierce $^{\circ}$  : Thermo Scientific、USA) を用いてタンパク濃度を測定した。1 レーン

あたり約 10 µg のタンパク質となるように電気泳動サンプル用緩衝液 (5% グリセロール、10% SDS、20% 2-メルカプトエタノール、0.1% BPB を含む 0.5 M Tris-HCl 緩衝液[pH6.8]) で希釈し、90、5 分間加熱処理した。このサンプルを、4-20%グラジエントゲル(Wako 社、Japan) を用いた SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で展開し、PVDF (ポリフッ化ビニリデン polyvinylidene difluoride) 膜 (Immobilon®- P : EMD Milipore Corporation、USA) に転写した。10%スキムミルクと 0.1% Tween-20 を含む PBS で 30 分間、室温でブロッキング後、一次抗体として同ブロッキング液で希釈したウサギ抗 Atg16L 抗体 (MBL 社、Code : PM040、Lot:011、1000 倍希釈)とウサギ抗 LC3 抗体(Cell Signaling 社、Code : #12741、1000 倍希釈)を使用し、室温で 1 時間反応させた。を室温で 1 時間反応させ、さらに抗 HRP 標識二次抗体を室温で 30 分間反応させた。化学発光試薬 (ECL Prime、GE Healthcare、Japan) を用いて約 4 分間室温で発光反応を行い、Image Quant LAS4000 mini (GE Healthcare、Japan) で検出した。内部コントロールとしてマウス抗 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 抗体 (Santa Cruz 社、USA、2000 倍) を用いた。

各実験について、まず対照サンプルの GAPDH のバンドの値を 1 とした時の、それ以外の GAPDH の値を比として算出した。各タンパクの計測値をこれら GAPDH の値で割って補正値を算出した。さらに、対照サンプルにおけるこの補正値を 1 として、その他のサンプルの値を標準化した。統計学的解析は Student's t 検定を用い、 $p < 0.05$  を有意差ありと判定した。

#### 4 . 研究成果

bFGF 投与により LC3 陽性顆粒数は増加せず、オートファジーによる分解も変化しなかった。TGF- 投与により LC3 陽性顆粒数は変化せず、オートファジーによる分解も変化しなかった。bFGF 投与により隔離膜マーカーである Atg16L が増加するが、TGF- 投与 72 時間により Atg16L は減少した。以上より現時点で、bFGF や TGF- がオートファジー分解系のどの段階に影響を与えているかを示すことができなかった。これは、LC3 ないし Atg16L 以外の抗体を使用して、オートファジー分解系の初期あるいは後期段階での動向の調査が必要であると考えられる。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：和栗 聡

ローマ字氏名：Waguri Satoshi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。