

平成 23 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2006～2010
課題番号：18390477
研究課題名（和文） ケロイド幹細胞：分離・同定とその発生病理学的意義

研究課題名（英文） Isolation of multipotent stem cells from keloids

研究代表者

鈴木 茂彦 (SUZUKI SHIGEHICO)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：30187728

研究成果の概要（和文）：ケロイド組織より多能性をもつ幹細胞を採取した。また、その細胞に特徴的な発現を示す遺伝子 B を同定し、検討したところ、ケロイドにおけるコラーゲンの過剰発現に関与していることが判明した。この幹細胞および遺伝子 B はケロイド形成に重要な役割を担う可能性が高く、治療ターゲットとしても有望であることが示された。

研究成果の概要（英文）：We obtained multipotent precursor cells derived from keloid tissues. We found that gene B over-expressed in keloid derived precursor cells, plays a crucial role in keloid pathogenesis, because this gene is closely concerned with up-regulation of collagen gene expression. We propose that both of keloid derived precursor cells and gene B may be a good target for a novel therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2007年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：ケロイド、創傷治癒、幹細胞

1. 研究開始当初の背景

ケロイドは、日常疾患でよく遭遇する疾患でありながら、その病因解明はほとんど進ん

でいない。その理由のひとつは、ケロイドがヒト特有の疾患であり、モデル動物が存在しないことにある。さらに、現行の in vitro 実験

系は、生体内での病態を反映するか疑問が残る。適切な *in vitro* 実験系の整備やモデル動物の作製は、ケロイド研究において必要不可欠である。近年、成体の各組織にも幹細胞が存在することが証明されているが (Weissman *et al. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17: 387-403, 2001.)、真皮にも sphere を形成する幹細胞が存在することが示された (Toma *et al. Nat. Cell. Biol.* 3: 778-784, 2001.)。創傷治癒過程では、この組織幹細胞が主役を担っていると考えられる。申請者らは、ケロイド患者検体を対象に、マイクロアレイ法をはじめとする詳細な解析を実施し、ケロイド組織では、軟骨・骨発生過程に特徴的な遺伝子が発現していることを報告した (Naitoh, Suzuki. *et al. Genes Cells.* 10:1081-91, 2005)。このことは、正常皮膚には存在しないはずの細胞が、ケロイド病変部で多数存在することを意味する。すなわち、ケロイドは、異常組織幹細胞により形成される、との概念を構築するに至った。以上の点から、申請者らは、ケロイドが、ケロイド特有の異常幹細胞、すなわち「ケロイド幹細胞」により形成されるとの考えに至り、本研究を計画した。

2. 研究の目的

申請者らは、ケロイドの本態を、「本来の分化系統から逸脱した異常な組織幹細胞が増殖したもの」、と捉えることを提唱した (Naitoh, Suzuki *et al. Genes Cells.* 10:1081-91, 2005)。この新しい疾患概念に基づき、本研究では、まず、この異常幹細胞、すなわちケロイド幹細胞を単離、同定し、ケロイド幹細胞の特徴を明らかにすることを目的とした。次に、ケロイド幹細胞を免疫不全動物に移植し、ケロイドモデルを作製し、これらの解析を通じて、ケロイドの病態形成にかかわるメカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) ケロイド組織を細切し、各種酵素 (コラゲナーゼ、トリプシン、デイパーゼ等) で処理後、細胞を採取し、幹細胞培地にて培養した。その際、細切の程度 (大きさ)、酵素濃度、反応時間について、細胞採取効率が最適となるように検討する。

(2) (1) で得られた幹細胞を神経誘導培地、骨誘導培地、脂肪誘導培地にて培養し、分化能について検討した。

(3) (1) で得られた幹細胞より total RNA を採取し、マイクロアレイ解析にて、遺伝子発現プロファイルを検討した。

(4) (3) で得られた特徴的な遺伝子についてノックダウンを行い、その影響を検討した。

(5) (1) で得られた細胞をコラーゲンスポンジ、コラーゲンゲル、マトリゲルを担体として免疫不全マウスの背部皮下に移植し、ケロイド様組織が形成されるかを観察した。

4. 研究成果

これまでに、ケロイド組織より、神経、骨、脂肪に分化可能な多能性幹細胞を単離ことに成功し、その細胞を未分化状態を維持しつつ培養継代することに成功した (図 1)。此の幹細胞の分子発現パターンを解析した結果、マーカー候補の遺伝子 A, B を同定した。このマーカー候補遺伝子が病態形成においてどのような機能をもつかということを検討した。同遺伝子をケロイド細胞においてノックダウンし (図 2)、ケロイドにおいて発現が亢進しているコラーゲン発現量の変化を real time PCR にて検討した結果、遺伝子 B のノックアウトによりコラーゲン発現量の低下を観察した (図 3-A, B)。また、MTT アッセイにて、細胞増殖の低下をみた (図 4)。これより、遺伝子 B は、ケロイド病態を形成する遺伝子として重要な因子のひとつであり、治療ターゲットとして有力であることが判明した。このことより、マーカー遺伝子の候補として、遺伝子 B に着目して検討を進めることとした。単離したケロイド由来幹細胞を移植する方法を検討し、担体の種類ならびに移植位置について条件の最適化を行ったが、いずれにおいても、ヒトケロイド組織に特徴的な組織像は得られなかった。この点は、今後の課題として検討を進めていくべきと考える。しかし、遺伝子 B がケロイド病態を形成する遺伝子として重要な因子のひとつであることが判明した点は、本研究がケロイドの新規治療薬、新規治療法の開発に貢献する意義があるといえる。

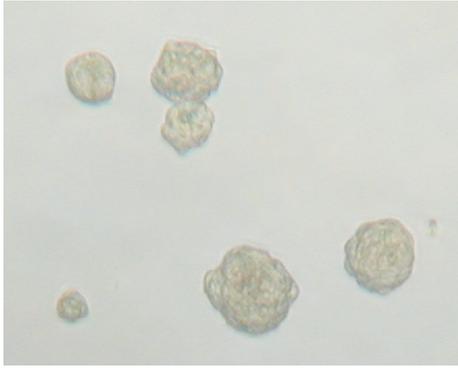


図 1

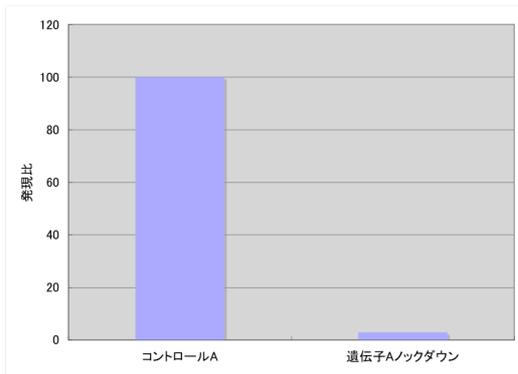


図 2-A

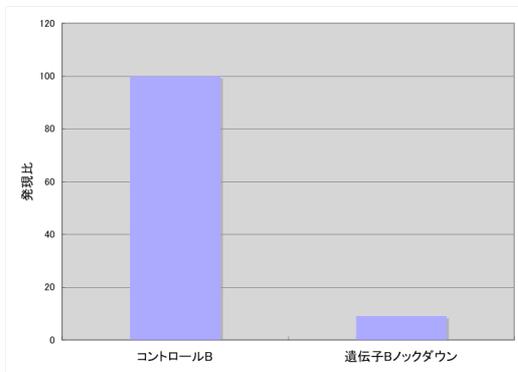


図 2-B

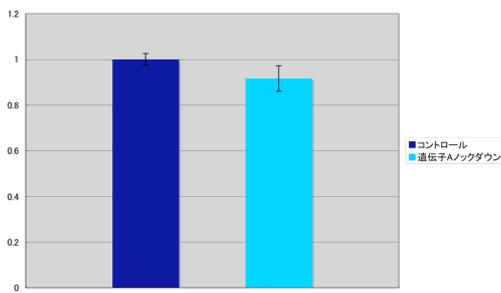


図 3-A

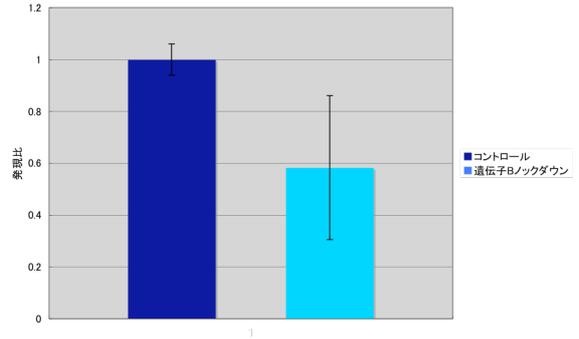


図 3-B

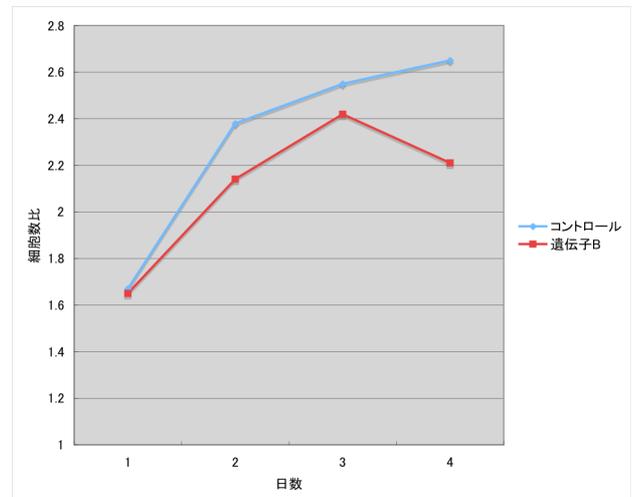


図 4

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5件)

- ① Gan Muneuchi, Shigehiko Suzuki 他、Long-term outcome of the intralesional injection of triamcinolone acetonide for the treatment of keloids in Orientals、Surg. Hand. Surg.、査読有、Vol.40 No.2、2006、pp.111-776
- ② 鈴木茂彦、「皮膚・軟部組織の再生」治療、査読無、89巻、2007、pp.2681-2687
- ③ 山脇聖子、鈴木茂彦 他、「非典型的部位に生じたケロイドに対する切除と放射線治療の結果について、瘢痕・ケロイド治療ジャーナル、査読無、2巻、2008、pp.84-87

- ④ 鈴木茂彦、森本尚樹、内藤素子、幹細胞の基礎研究と臨床の進歩 臨床応用 再生医療の実際-皮膚、日本臨床、査読無、66巻 5号、2008、pp. 961-965
- ⑤ Yamawaki S, Suzuki S 他、Keloids can be forced into remission with surgical excision and radiation followed by adjuvant therapy、Ann Plast Surg、査読有、in press 2011

〔学会発表〕(計6件)

- ① Shigehiko Suzuki、Management of scar and scar contracture using local flaps、2nd Shanghai International plastic Surgery Conference、2007.4.17. Shanghai
- ② 山脇聖子 内藤素子 石河利広 吉川勝宇 鈴木茂彦、ケロイド術後成績評価の点数化への試み、第3回癬痕・ケロイド治療研究会、2008年8月30日、長崎
- ③ 吉川勝宇、鈴木茂彦、Adult Human Skin-derived Precursor Cellsの採取部位による差異の検討、第17回日本形成外科学会基礎学術集会、2009年10月2日、東京
- ④ 吉川勝宇、鈴木茂彦 他、Adult Human Skin-derived Precursor Cellsの採取部位による相違点、第18回日本形成外科学会基礎学術集会、2010年9月16日、横浜
- ⑤ 北岡志保、鈴木茂彦 他、Differentiation of induced pluripotent stem cells from ALS patients generates motor neurons)、日本神経科学学会 2010年9月2日、神戸
- ⑥ 北岡志保、鈴木茂彦 他、変異SOD1を有するALS患者由来iPS細胞の樹立と脊髄運動ニューロンへの分化、日本神経科学学会 2010年5月20日、東京

〔図書〕(計1件)

- ① 鈴木茂彦、全日本病院出版会、「すぐに役立つ日常皮膚診療における私の工夫：肥厚性癬痕・ケロイド」、2007年、総ページ数309

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 茂彦 (SUZUKI SHIGEHICO)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：30187728

(2) 研究分担者

宇谷 厚志 (UTANI ATSUSHI)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：10292707
内藤 素子 (NAITOH MOTOKO)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：30378723