

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08271

研究課題名(和文) エピジェネティクス(特にHDAC)がケロイド発生病態に及ぼす効果の検討

研究課題名(英文) Analysis of the epigenetic influence especially HDAC in keloid formation

研究代表者

鎌塚 大 (KUWATSUKA, Yutaka)

長崎大学・病院(医学系)・講師

研究者番号：90437864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000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した。以前の検討でケロイド組織中のHDAC2が高発現したことから、今回HDAC阻害剤として、より選択的にHDAC2を阻害するMocetinostat、Apicidin、CAY10683を選択した。結果、いずれのHDAC阻害剤もCOL1A2抑制し得たが、MocetinostatはTGF- β 1を抑制し、MMP-1,3の発現を上昇させることがわかった。Mocetinostatは種々の転写因子を調整し、線維化を抑制する可能性が示された。今後検討数を増やし、更にメカニズムの解明を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の検討により、HDAC2を選択的に阻害する薬剤は、ケロイドの過剰な膠原線維産生などを抑制する可能性が見いだされた。今回検討した、ApicidinやMocetinostatなどは既に他疾患領域で内服薬として治験が行われており、安全性や使用法などが確立されつつある。さらなる検証を加え、より安全かつ低侵襲な治療法に応用可能な薬剤の開発に寄与してゆきたい。

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, Apicidin and CAY10683 which are selective HDAC2 inhibitor. As a result, any HDAC inhibitors could inhibit the COL1A2 mRNA expressions, especially mocetinostat could inhibit TGF- β 1 greater extent. Moreover, higher gene expressions were detected in the MMP-1,3. These suggests mocetinostat control several transcriptional factors and improve keloid 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

肥厚性瘢痕やケロイドでは、細胞外マトリックスの過剰沈着が生じている。放射線照射を併用した外科的切除により再発率が 30% にまで抑制するとされているが、胸部正中の病変を中心に依然として難治性症例が存在する。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 1 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。そこで申請者はケロイド細胞と正常真皮線維芽細胞に HDAC 阻害剤 TSA を投与し、mRNA を採取後マイクロアレイで遺伝子発現の変動を検討した。次に変動した遺伝子を元に上流の転写因子を探索する遺伝子カスケード解析を行った。その結果、ケロイド細胞で特異的に IGF1, TGFβ1, Wnt, BDKRB1, HIF1α, SOX2 などの転写因子が変動することを見出した。

2. 研究の目的

我々は以前、ケロイド細胞と正常真皮線維芽細胞に HDAC 阻害剤 TSA を投与し、mRNA を採取後マイクロアレイで遺伝子発現の変動を検討した。次に変動した遺伝子を元に上流の転写因子を探索する遺伝子カスケード解析を行った。その結果、ケロイド細胞で特異的に IGF1, TGFβ1, Wnt, BDKRB1, HIF1α, SOX2 などの転写因子が変動することを見出した。ついで、ケロイド細胞で増加している細胞外マトリックスの COL1A2 に加え、線維化で重要な役割を果たす TGF-β1 について検討をおこなった。その結果、TSA の投与により、COL1A2, TGF-β1 の低下傾向がみられた。本研究では、HDAC2 をより選択的に阻害する HDAC 阻害剤に着目し、ケロイド発生過程における遺伝子転写制御機構の役割を解析し、その制御機構を利用した新規治療法の開発を目指すこととした。

3. 研究の方法

- (1) HDAC2 を阻害する HDAC 阻害剤として、まずは HDAC2,3 を選択的に阻害する Mocetinostat と HDAC1,2 を阻害する Apicidin を選択した。また、HDAC2 をより選択的に阻害する薬剤として CAY10683 を選択した。また、mTOR 阻害剤の Rapamycin、ステロイドの dexamethazone についてもケロイド抑制効果の検証を行うこととした。まず、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。
- (2) MTT アッセイを用いて、各種 HDAC 阻害剤による細胞死の検証を行い、細胞死が生じないと判断される適正濃度と適正反応時間の検証を行った。
- (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) HDAC 阻害剤投与後のタンパク量発現を確認するため、Western blot 法を行い検証した。
- (5) HDAC 阻害剤投与後のマトリックスメタプロテアーゼの活性化を検討するため、ザイモグラフィを行った。

4. 研究成果

(1) まず、HDAC2 をより選択的に阻害する Mocetinostat, Apicidin について、ケロイドに及ぼす効果を検討した。mRNA を培養細胞から回収し、RT-PCR 法を用いて解析した結果、両薬剤ともに COL1A2 の抑制傾向が見

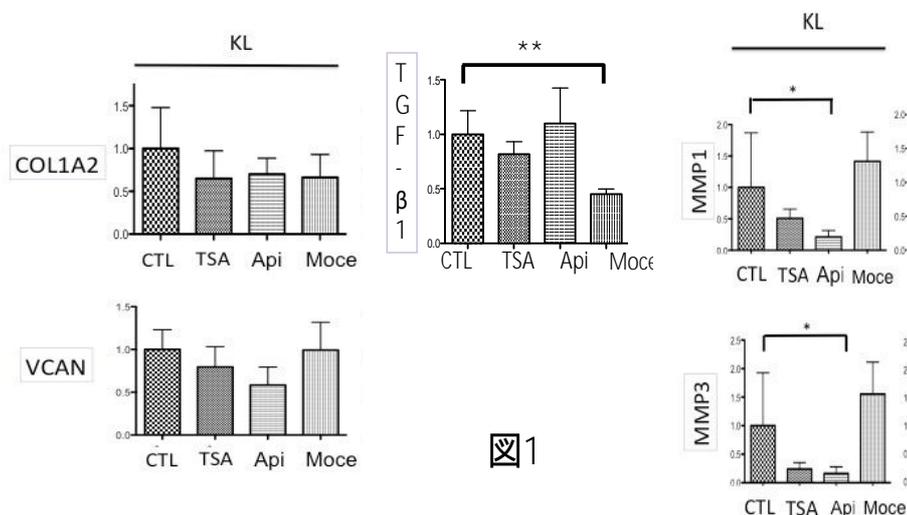


図1

られた(図1)。注目すべきことに Mocetinostat では TGF- β 産生を抑制し、MMP-1,3 の産生が亢進されており、抗線維化作用がより疑われる結果となった。一方、Apicidin については MMP-1,3 の上昇はみられなかった。

(2) 続いて、他の HDAC2 選択的阻害剤である CAY10683 に加え、過去の報告でケロイド病態抑制効果が報告されている Dexamethazon と Rapamycin に関して、in vitro でのケロイドに対する効果について検討した。図2に示すように、RT-PCR 法で、Mocetinosta は COL1A2, Versican とともに抑制傾向が見

られた。しかし、CAY10683、Rapamycin では抑制傾向がみられなかった。Dexamethazone については、Versican の抑制効果は示したものの COL1A2 では抑制効果が乏しかった。次に、MMP-1,3 について、mocetinostat は有意に発現が上昇した一方、他の薬剤については発現の上昇はみられなかった。以上の検討から、mocetinostat はケロイドの病態に対して抑制的にはたらく、MMP1,3 の産生を上昇させる可能性があることを見出した。

(3) 次に、タン

パクレベルの発現を確認するため、western blot 法を行った。しかし、COL1A2, Versican などいずれにおいても薬剤投与群と非投与群で有意差がえられなかった。

(4) MMP-1,3 については活性化を検討するために、ザイモグラフィを行った。その結果、mocetinostat 投与群では、コントロール群と比較してバンドが濃くみられ、より活性化していることが伺われた。

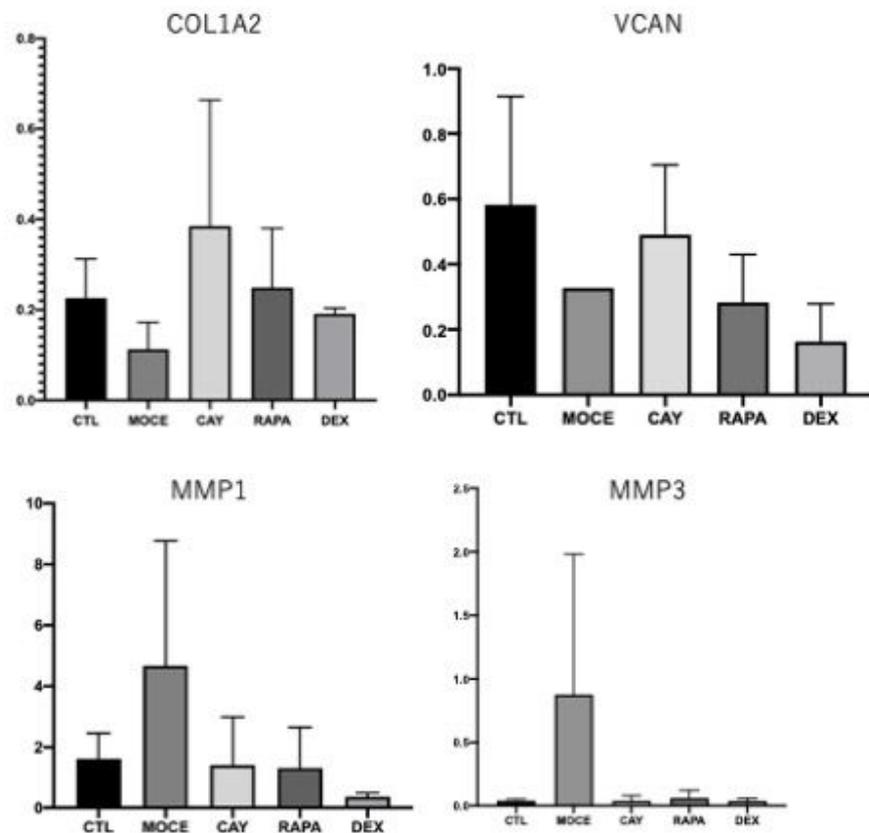


図2



図3

(5) 考察と今後の課題

今回の検証を通じて、HDAC2 を選択的に阻害する Mocetinostat は他剤と比較してもケロイド抑制効果が高いことが示唆された。ただ、今回 mRNA レベルで確認された結果について、タンパクレベルでの発現について確認できておらず、さらなる検証が必要と思われる。今後は、適切な濃度などの実験条件をさらに検討し、サンプル数を増やすことで、さらなる検証を加えてゆきた

い。また、他の HDAC2 阻害剤を用いながら、比較検討を加えてゆきたい。将来的には、HDAC 2 阻害剤を用いて、ex vivo ケロイドモデルの確立ならびに、臨床応用への道筋をつけることを今後の目標としたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yagi Y, Kuwatsuka Y, Asai M, Honda M, Utani A	4. 巻 24
2. 論文標題 Coexistence of keloids and pilomatricoma in a patient with Rubinstein-Taybi syndrome.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dermatol Online J	6. 最初と最後の頁 1-2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Koike Yuta, Yozaki Mariko, Kuwatsuka Yutaka, Utani Atsushi	4. 巻 45
2. 論文標題 Epithelial-mesenchymal transition in Bowen's disease when arising de novo and acquiring invasive capacity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 748 ~ 750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14290	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuwatsuka Yutaka, Iwanaga Akira, Kuwatsuka Sayaka, Okubo Yumi, Murayama Naoya, Ishii Norito, Hashimoto Takashi, Utani Atsushi	4. 巻 45
2. 論文標題 Bullous pemphigoid induced by ipilimumab in a patient with metastatic malignant melanoma after unsuccessful treatment with nivolumab	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e21 ~ e22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuwatsuka Yutaka, Murota Hiroyuki	4. 巻 1132
2. 論文標題 Involvement of Periostin in Skin Function and the Pathogenesis of Skin Diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Bio	6. 最初と最後の頁 89 ~ 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-13-6657-4_10	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Higuchi Maho, Kuwatsuka Yutaka, Murota Hiroyuki, Iwanaga Masako, Niino Daisuke	4. 巻 215
2. 論文標題 Clinical and histopathological significance of PD-1 expression in cutaneous lesions of adult T-cell leukemia-lymphoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pathology - Research and Practice	6. 最初と最後の頁 40 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.prp.2018.10.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kamio Yoshiyuki, Gunge Yumi, Koike Yuta, Kuwatsuka Yutaka, Tsuruta Kazuto, Yanagihara Katsunori, Furue Masutaka, Murota Hiroyuki	4. 巻 185
2. 論文標題 Insight into innate immune response in "Yusho": The impact of natural killer cell and regulatory T cell on inflammatory prone diathesis of Yusho patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental Research	6. 最初と最後の頁 109415 ~ 109415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.envres.2020.109415	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogata D, Namikawa K, Otsuka M, Asai J, Kato H, Yasuda M, Maekawa T, Fujimura T, Kato J, Takenouchi T, Nagase K, Kawaguchi M, Kaji T, Kuwatsuka Y, Shibayama Y, Takai T, Okumura M, Kambayashi Y, Yoshikawa S, Yamazaki N, Tsuchida T	4. 巻 127
2. 論文標題 Systemic treatment of patients with advanced cutaneous squamous cell carcinoma: response rates and outcomes of the regimes used	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 108 ~ 117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejca.2019.12.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuwatsuka Sayaka, Kuwatsuka Yutaka, Tomimura Saori, Takenaka Motoi, Terasaka Yoko, Izumikawa Koichi, Morinaga Yoshitomo, Yanagihara Katsuori, Murota Hiroyuki	4. 巻 48
2. 論文標題 Impact of daily wearing of fabric gloves on the management of hand eczema: A pilot study in health care workers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 645 ~ 650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15848	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asai M., Koike Y., Kuwatsuka Y., Yagi Y., Kashiya K., Tanaka K., Mishima H., Yoshiura K., Utani A., Murota H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Multifaceted array based keloidal gene expression profiling reveals specific MDFI upregulation in keloid lesions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Dermatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ced.14698	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwanaga Akira, Kuwatsuka Yutaka, Murota Hiroyuki	4. 巻 48
2. 論文標題 Molecular diagnosis of an atypical case of angiomatoid fibrous histiocytoma based on detection of the EWSR1 gene translocation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e215-e216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15823	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 岩永 聡、小池雄太、郡家 (大久保) 佑美、鍛塚 大、宇谷厚志
2. 発表標題 【研究演題】PXE診療ガイドラインの公表
3. 学会等名 日本皮膚科学会第334回長崎地方会例会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Misachi Asai, Yuta Koike, Kazuya Kashiya, Yosuke Yagi, Yutaka Kuwatsuka, Atsushi Utani, Hiroyuki Murota
2. 発表標題 Microarray analysis of molecules related to keloid itch
3. 学会等名 The 10th World Congress on ITCH (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅井幸、小池雄太、鎌塚大、宇谷厚志、室田浩之
2. 発表標題 【研究演題】Gene expression profiles in human keloid's differences between in vivo and in vitro (ケロイドの遺伝子発現プロフィール、in vivoとin vitroの違い)
3. 学会等名 日本皮膚科学会第338回長崎地方会例会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakashima MH, Kuwatsuka Y, Iwanaga M, Niino D, Murota H
2. 発表標題 Clinical and histopathological significance of programmed death-1 (PD-1) expression in cutaneous lesions of adult T-cell leukemia/lymphoma
3. 学会等名 49th ESDR Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kuwatsuka S, Koike Y, Kuwatsuka Y, Yamaoka T, Murota H
2. 発表標題 Claudin-7 in keratinocyte is downregulated by inhibition of HMG-CoA reductase, and is highly expressed in the stratum granulosum of psoriatic epidermis
3. 学会等名 49th ESDR Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅井 幸、小池雄太、櫻山和也、八木洋輔、鎌塚 大、宇谷厚志、室田浩之
2. 発表標題 Exploring the pathological factor of keloidal itch via microarray analysis (ケロイドのかゆみのメカニズム解明にむけたマイクロアレイ法による探索的研究)
3. 学会等名 第29回 国際痒みシンポジウム(国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	岩永 聡 (IWANAGA Akira) (00621947)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------