

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16986

研究課題名（和文）ペリオスチンに着目したケロイド・肥厚性瘢痕形成機構の解明

研究課題名（英文）The mechanism of promoting abnormal scar formation with periostin in dermal fibroblasts

研究代表者

前田 大介（MAEDA, DAISUKE）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60772465

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000 円

研究成果の概要（和文）：ペリオスチンによる異常瘢痕形成の機序について、未だ解明されていない点が多い。今回、正常皮膚線維芽細胞からケロイド・肥厚性瘢痕形成への機序について検討を行った。まず、IL-4,13を投与することで線維芽細胞内でのペリオスチンの産生や分泌が増加することを確認した。TGF- β 1を投与することでも同様の結果を得た。また、ペリオスチンの刺激により線維芽細胞内でのRhoA/ROCK経路が活性化され、TGF- β 1の分泌へと導かれることを確認した。その分泌されたTGF- β 1により、隣接する細胞内で再度ペリオスチンの産生、分泌が促進されることで、異常瘢痕形成への促進に関わる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペリオスチンは、創傷治癒過程において必要なタンパクである。しかし過剰なペリオスチンが異常瘢痕形成の一因であることが、本研究において示唆された。難治性と考えられているケロイド、肥厚性瘢痕の治療法の1つとしてペリオスチンに着目することで、通常の瘢痕すら残さない(scarless wound healing)医療の開発に発展すれば、人類全体の QOL 向上に大きく貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of periostin involvement in abnormal scar formation is not yet fully understood. In this study, we investigated the mechanism by which periostin is involved in abnormal scar formation. Treatment of human dermal fibroblasts (HDFs) with IL-4 and IL-13, which are cytokines of Th2 type immune responses that are up-regulated in abnormal scars, dramatically elevated the levels of periostin mRNA and protein, and also promoted the secretion of periostin by HDFs. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) had the same effect on HDFs as IL-4 and IL-13. Stimulation of HDFs with periostin promoted RhoA/ROCK pathway-mediated TGF- β 1 secretion from HDFs. Our results suggest that IL-4 and IL-13 induce periostin expression and secretion, and in turn, secreted periostin induces RhoA/ROCK pathway-mediated TGF- β 1 secretion. Secreted TGF- β 1 then induces further periostin production and secretion, thereby promoting abnormal scar formation.

研究分野：形成外科

キーワード：ケロイド 肥厚性瘢痕 ペリオスチン

様 式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ケロイド・肥厚性瘢痕が生じる原因、メカニズムとして現在までに、細胞外マトリックスの過剰産生による線維化や炎症性疾患としての概念、そして異常なホルモンバランスや血管系との関連などについて報告されている。しかしながら、それらが効果的な治療法や予防法に繋がっていないのが現状である。

今回、その一因として考えられる炎症性疾患について着目した。過去の報告において、ケロイド・肥厚性瘢痕では病変に浸潤する T 細胞数が多いと言われている(Castagnoli C, et al. *Wound Repair Regen.* 2002(10) 107-108.)。また創傷治癒過程において、T 細胞優位の状態では細胞外マトリックス蛋白の 1 種であるペリオスチンが細胞外マトリックスの remodeling に関与している(Simon, J. et al. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2014(71) 1279-1288)。以上を踏まえると、ケロイド・肥厚性瘢痕の原因として、ペリオスチンが病変部に異常な炎症反応の継続状態を誘導しているのではないかと考えられる。実際、過去の報告において、正常組織に比べてケロイド・肥厚性瘢痕の組織では、組織内のペリオスチンが増加していた(Zhou H M, et al. *J Cell Commun Signal* 2010,(4) 99-107)。以上から、ペリオスチンの動態や分子生物学的メカニズムについて着目することで、ケロイド・肥厚性瘢痕の病態についてより解明できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

細胞外マトリックス蛋白の 1 種であるペリオスチンは主に線維芽細胞から分泌され、組織構築の維持に関与する。一方、臓器によっては、過剰なペリオスチンが組織の線維化に関与することが解明されている。皮膚において、ケロイド・肥厚性瘢痕のような異常瘢痕形成が線維増殖性疾患として考えられるため、ペリオスチンによる関与について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 正常皮膚とケロイド・肥厚性瘢痕でのペリオスチンの量

手術で採取した検体（正常皮膚、成熟瘢痕、ケロイド、肥厚性瘢痕）を用いて、免疫組織化学染色でペリオスチンの発現の違いを確認した。また、ウエスタンブロッティングを用いてペリオスチンのタンパク発現について検討した。

(2) ペリオスチンの産生と分泌

ペリオスチン産生に関与する IL-4/13、TGF- β 1 を、培養した正常皮膚線維芽細胞に投与し、ペリオスチンの産生や分泌についてリアルタイム RT-PCR、ウエスタンブロッティング、ELISA を用いて変化を測定した。

(3) ペリオスチンと RhoA/ROCK 経路の関連性

細胞内でペリオスチンの RhoA/ROCK 経路への影響について、RhoA 活性を Pull-down assay 法により測定した。また、ELISA を用いて培養液中へのペリオスチン投与により線維芽細胞から分泌される TGF- β 1 の増減を確認し、ROCK 阻害薬の Y27632 を同時に投与することで、ペリオスチン単独投与した場合と比較して TGF- β 1 の分泌に変化があるかも確認した。

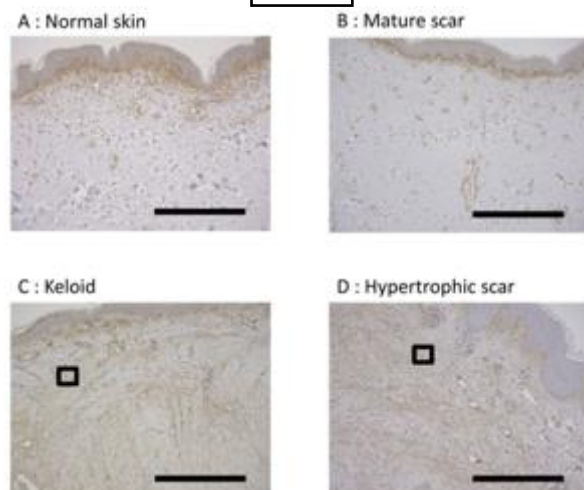
4. 研究成果

(1) 正常皮膚とケロイド・肥厚性瘢痕でのペリオスチンの量

抗ペリオスチン抗体を用いて、各組織について免疫組織化学染色を行った。結果、正常皮膚と成熟瘢痕は表皮真皮の境界線にペリオスチンが存在していたが、ケロイド・肥厚性瘢痕では、真皮下全体にペリオスチンが存在していた（図 1）。

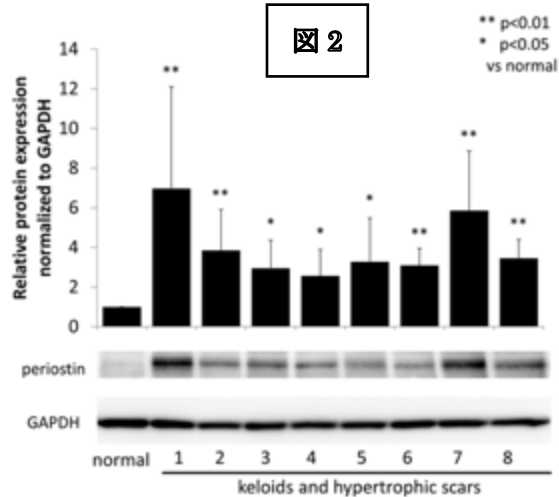
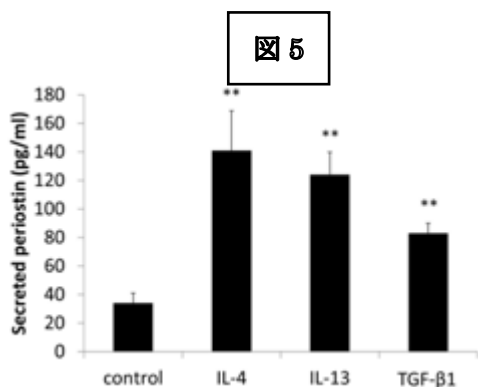
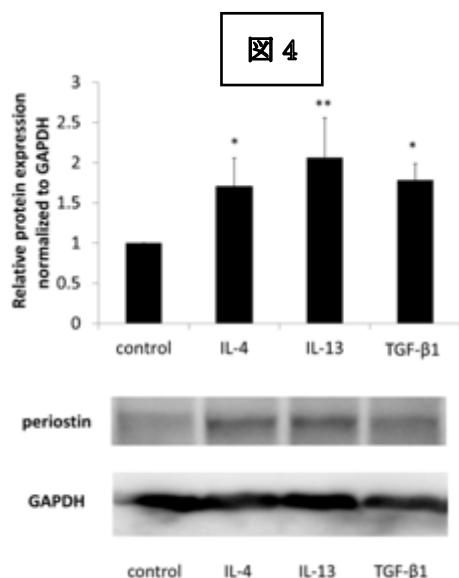
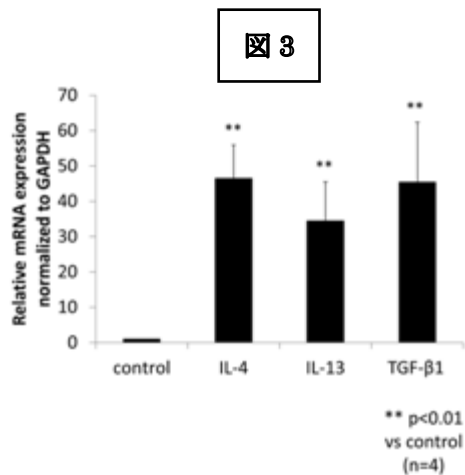
次に各細胞（正常皮膚線維芽細胞 1 つ、ケロイド・肥厚性瘢痕由来の線維芽細胞 8 つ）を培養し、ウエスタンブロッティングでペリオスチンの発現の違いを確認したところ、ケロイド・肥厚性瘢痕由来の線維芽細胞が有意に上昇していた（図 2）。

図 1



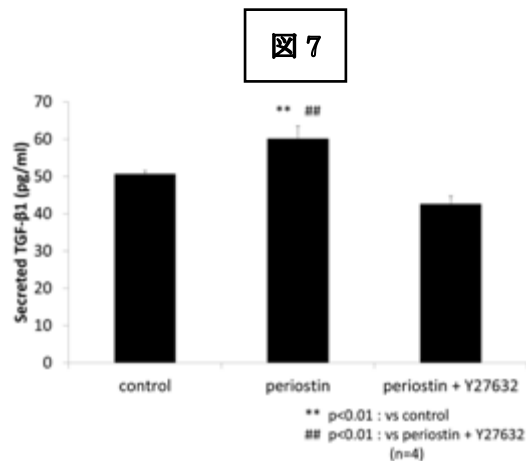
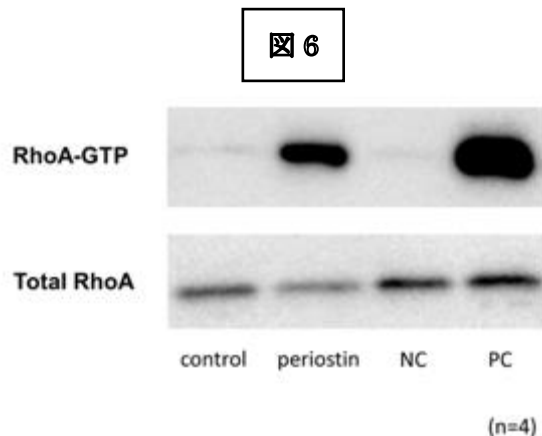
(2) ペリオスチンの産生と分泌

IL-4/13, TGF- β 1 による刺激によって、正常皮膚線維芽細胞で、ペリオスチンの発現に違いについて、リアルタイム PCR (図 3)、ウエスタンブロッティング (図 4)、ELISA (図 5) で確認すると、それぞれについて有意にペリオスチン量が増加していることを確認した。



(3) ペリオスチンと RhoA/ROCK 経路の関連性

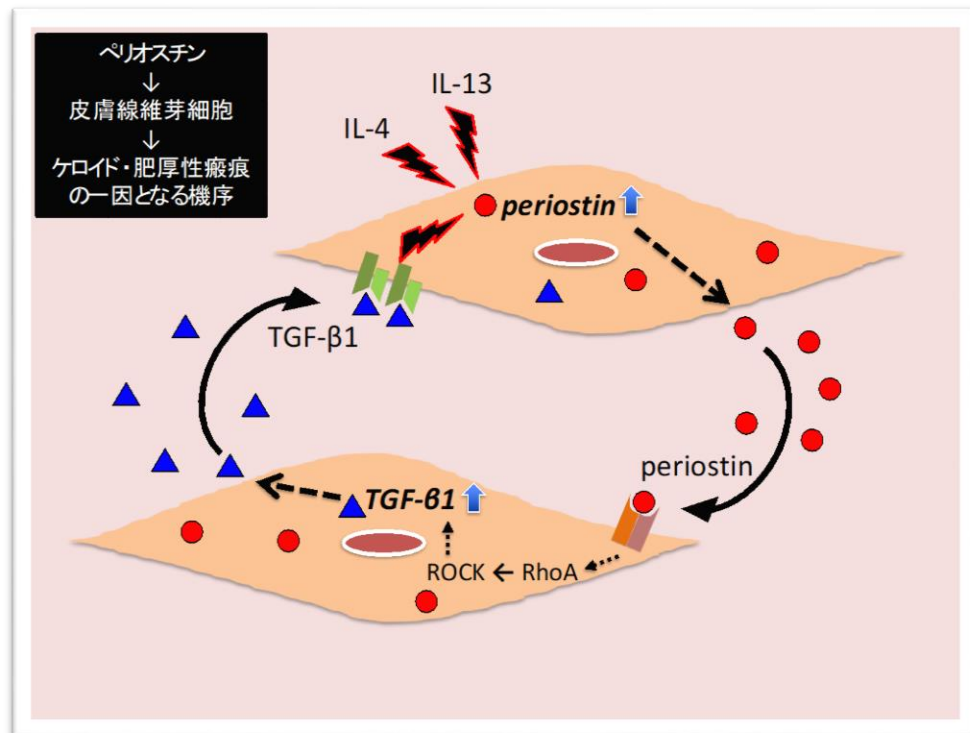
ペリオスチン投与し RhoA pull-down activation assay を行ったところ、活性型 RhoA を示す RhoA-GTP が反応していた (図 6)。ELISA を用いて培養液中へのペリオスチン投与により線維芽細胞から分泌される TGF- β 1 は増加していることがわかり、ROCK 阻害薬の Y27632 を同時に投与することで、ペリオスチン単独投与した場合と比較して TGF- β 1 の分泌は減少していた (図 7)。以上から、ペリオスチンにより線維芽細胞内で RhoA/ROCK 経路が活性化されて、TGF- β 1 が分泌されることが示された。



(4) ペリオスチンがケロイド・肥厚性瘢痕の一因となる機序

IL-4/13 や TGF- β 1 によって線維芽細胞内でペリオスチンの産生が増加し、細胞外へペリオスチンの分泌も増加する。隣接する線維芽細胞がペリオスチンの作用により、細胞内の RhoA/ROCK 経路が活性化され TGF- β 1 の産生が増加する。その TGF- β 1 が分泌されることで、また隣接する線維芽細胞を刺激してペリオスチンの産生、分泌が増加するという悪循環が生まれる、という機序が考えられた (図 8)。また、放出された TGF- β 1 が増加することで、線維化が促進されケロイド・肥厚性瘢痕へと導かれる可能性が考えられる。

図 8



5 . 主な発表論文等

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

1 . 著者名 Maeda Daisuke, Kubo Tateki, Kiya Koichiro, Kawai Kenichiro, Matsuzaki Shinsuke, Kobayashi Daichi, Fujiwara Toshihiro, Katayama Taiichi, Hosokawa Ko	4 . 巻 53
2 . 論文標題 Periostin is induced by IL-4/IL-13 in dermal fibroblasts and promotes RhoA/ROCK pathway-mediated TGF-β1 secretion in abnormal scar formation	5 . 発行年 2019年
3 . 雑誌名 Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery	6 . 最初と最後の頁 288 ~ 294
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/2000656X.2019.1612752	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 前田大介
2 . 発表標題 ペリオスチンによる異常瘢痕形成への関与について
3 . 学会等名 第27回日本形成外科学会基礎学術集会
4 . 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----