

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19615

研究課題名(和文) レックリングハウゼン病由来筋線維芽細胞の機能解析とケロイド新治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of wound healing mechanism of neurofibromatosis type I

研究代表者

久保 盾貴 (KUBO, TATEKI)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00362707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：レックリングハウゼン病由来筋線維芽細胞の機能解析を行い、neurofibrominより下流の細胞骨格に関するシグナル伝達が、瘢痕形成の原因となる機械的伸展刺激下の筋線維芽細胞への分化誘導に関わることを解明した。LIM kinaseの活性化あるいはcofilinの不活化によりアクチン重合を促進すると、機械的伸展刺激を加えても筋線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化傾向が抑制されることを明らかにし、LIMKやcofilinをターゲットとした創薬の可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レックリングハウゼン病由来筋線維芽細胞に着目することで、neurofibrominより下流の細胞骨格に関するシグナル伝達が、瘢痕形成の原因となる機械的伸展刺激下の筋線維芽細胞への分化誘導に関わることを解明したが、現在まで同様の発表は未だなされておらず、新規のものである。そして、難治であるケロイド・肥厚性瘢痕治療につながるLIMKやcofilinをターゲットとした創薬の可能性を示したことで、今後のscarless wound healingの実現へ一歩前進した。本研究は人類のQOL向上に貢献できうと考える。

研究成果の概要(英文)：We found that neurofibromin was implicated in the differentiation of fibroblasts into myofibroblasts in response to mechanical stimulation through the LIMK/cofilin/actin filament dynamics pathway. When neurofibromin was dysfunctional, LIMK and cofilin activation-inactivation change became less responsive to mechanical stimulation, leading to the stable expression of  $\alpha$ -SMA, which induce less scar formation. Thus, this molecular pathway may be a potential therapeutic target for the treatment of intractable hypertrophic scars and keloids.

研究分野：形成外科学

キーワード：筋線維芽細胞 レックリングハウゼン病 ケロイド

## 1. 研究開始当初の背景

ケロイド・肥厚性瘢痕は、ヒトの生命に直接影響を及ぼさないため、単に整容的な問題として扱われ、治療の優先度としては低く扱われてきた。しかしながら、ケロイド・肥厚性瘢痕による醜状は、患者にとって大きな精神的苦痛を伴う。また、単に精神的な問題だけでなく、ケロイド・肥厚性瘢痕は痛みと痒みを伴い、また、重度になると拘縮による運動障害も生じるようになり、QOL を著しく低下させる。そして、治療に際しての大きな問題は、ケロイド・肥厚性瘢痕は、手術で切除し丁寧に縫合しても再発することが多くあること、その一方で治療のための効果的な薬剤が存在していないということ、すなわち非常に難治であるということである。そこで、ケロイド肥厚性瘢痕の新治療薬の創薬につながるような、研究が俟たれるところである。

しかしながら、ケロイド・肥厚性瘢痕の形成機構は十分に解明されてはいない。その形成機構が不明である大きな理由の一つに、ケロイド・肥厚性瘢痕の形成には増殖因子や炎症性サイトカイン、細胞間相互作用など、様々な外的な因子が複雑に関与することがある。それらの外的因子の一つ一つを丹念に解析していくことは非常に重要なことであるが、非常に大きな労力と時間を要する。一方、形成外科領域ではレックリングハウゼン病(神経線維腫症 I 型、neurofibromatosis type 1、以下 NF-1 と略す)という全身の皮膚と神経を中心に神経線維腫を多発する疾患を治療する機会が多くある。そして、この NF-1 では、手術後の瘢痕が非常にきれいになることが知られている。とういことは、NF-1 の創傷治癒機構を研究し、その瘢痕形成のメカニズムを明らかにすれば、ケロイド・肥厚性瘢痕の新治療法開発に通じ、ひいては scarless wound healing の実現に応用できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

(1) NF-1 由来筋線維芽細胞の機能解析(タンパク産生・分泌能の解析)を行う。

NF-1 では筋線維芽細胞自体は正常皮膚よりも多く存在していることが判明している。そこで、NF-1 では筋線維芽細胞の機能発現に、正常線維芽細胞と相違があると想定し解析する。具体的には、NF-1 由来の筋線維芽細胞における、ケロイド・肥厚性瘢痕の構成成分であるコラーゲン 1 型、フィブロネクチンなどの細胞外マトリックスや細胞外マトリックス分解酵素(マトリックスメタロプロテアーゼ)産生・分泌能を調べる。

(2) NF-1 の機械的伸展刺激受容機構の解析を行う

NF-1 の筋線維芽細胞への分化誘導のメカニズムを調べる。ケロイド・肥厚性瘢痕は肩や前胸部など機械的伸展刺激を生じる場所に発生しやすい。しかし、NF-1 ではそういった部位でも反イ瘢痕はきれいになる。そこで、細胞伸展装置を用いて、NF-1 由来線維芽細胞に機械的伸展刺激を加え、機械的伸展刺激受容の観点から筋線維芽細胞分化誘導のメカニズムの解析を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 使用細胞

実験のコントロールとなる、正常皮膚線維芽細胞は、市販されている初代ヒト皮膚線維芽細胞を購入し使用した。NF-1 由来皮膚線維芽細胞は、施設倫理委員会による許可を受けたプロトコルに則り、同意の得られた NF-1 患者から腫瘍切除手術において生じた余剰皮膚を提供してもらい、腫瘍が存在しない部分の皮膚から線維芽細胞を初代培養した。いずれも、通常の培養細胞実験系で培養・継代を行い、継代数 3~8 の細胞を実験に用いた。

(2) 機械的伸展刺激の方法

細胞への機械的刺激にはストレックス社製の培養細胞伸展システムを用いた。タイプ コラーゲンにてコーティングした専用シリコンチャンパー上に培養し伸展刺激を加えた。伸展条件は、ヒトの呼吸回数を想定して 1 分間に 10 往復、伸展率 15% という設定で継続的に行った。

(3) 筋線維芽細胞のタンパク産生・分泌能の解析

ウエスタンブロッティング法および ELISA 法を用いる。また、機械的伸展刺激を加えた際の産生・分泌能の変化も観察する。

(4) 筋線維芽細胞への分化や細胞骨格制御に関連したシグナル伝達の解析

筋線維芽細胞への分化については、そのマーカーである  $\alpha$ -SMA の発現変化をウエスタンブロッティングにて解析した。

RhoA の下流にある、LIMK や cofilin の活性についてはそのリン酸化タンパク質の割合を western blotting にて測定した。また、LIMK や cofilin の機械的伸展刺激における機能を見るために、それらの siRNA を作成し使用した。さらに LIMK の constitutive active form および dominant



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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- $\beta$ 1 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 -

1. 著者名 Kiya Koichiro, Kubo Tateki	4. 巻 125
2. 論文標題 Neurovascular interactions in skin wound healing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 144 ~ 150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuint.2019.02.014	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----