

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390457

研究課題名(和文) 炎症後色素沈着の機序の解明と低瘢痕創傷治癒に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Study of molecular mechanisms of post-inflammatory hyperpigmentation and scarless wound healing

研究代表者

岡崎 睦 (OKAZAKI MUTSUMI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：50311618

研究成果の概要(和文): 身体各部位由来の正常皮膚由来線維芽細胞を用いて、瘢痕形成、色素沈着にかかわるサイトカインの発現解析を行い、線維芽細胞の部位特異性を明らかにした。特に急性期創傷治癒過程において、真皮深層の線維芽細胞は、浅層の細胞に比較して創収縮、細胞外器質の産生に有利な性質を有しており、真皮内の線維芽細胞の部位特異性は、非常に合目的であることを報告した。さらに、解剖学的な部位による真皮線維芽細胞の特異性を明らかにするため、同一個体由来の顔面真皮線維芽細胞および体幹真皮線維芽細胞について、増殖特性および、瘢痕形成、色素沈着に深くかかわると考えられる因子(サイトカイン、マーカー、細胞外器質)の発現解析を行った。結果として、同一個体由来の顔面、体幹線維芽細胞はほぼ一致した増殖特性を示すが、瘢痕形成にかかわる因子の発現は、顔面由来の線維芽細胞で低発現であることが明らかになった。一方、体幹由来の線維芽細胞は、色素沈着に関するメラニン刺激性サイトカインである Stem cell factor を高発現していた。これらの知見は、顔のきずは体のきずに比べて、肥厚しにくく、色素沈着をきたしにくい、という臨床的な印象とよく一致し、臨床的に経験される創傷治癒の部位特異性は、線維芽細胞の部位特異性に起因することが示唆された。

研究成果の概要(英文): We investigate anatomical heterogeneity of the fibroblasts using several in vitro assays which are considered to be reflect the fibrotic and melanogenic properties of fibroblasts. Especially, it was shown that fibroblasts obtained from deep dermis showed stronger tendency for wound contraction and extracellular matrix production than those from superficial dermis. The findings suggest that deep dermal fibroblasts were appropriate for compensation of tissue deficit in acute phase wound. Differences between facial and trunk fibroblasts are also investigated using primary fibroblasts obtained from identical donors. As a result, both fibroblasts showed identical proliferative capacities, and it was revealed that trunk fibroblasts showed stronger fibrotic properties than facial fibroblasts. In parallel, trunk fibroblasts showed stronger expression of stem cell factor, one of the representative melanogenic cytokines, than facial fibroblasts. The fact that site-specificities of wound healing experienced in clinical settings are well reflected in cultured fibroblasts suggest that the properties of wound healing is, at least partly, defined with residential fibroblasts.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
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：(1) 癒痕形成 (2) 創傷治癒 (3) 部位特異性 (4) 線維芽細胞 (5) 色素沈着 (6) サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

外傷や手術後、レーザー照射の治療結果や患者の満足度を左右する重大なマイナス要素として、過剰な癒痕形成や色素沈着（いわゆる炎症性色素沈着）がある。さらに、一般的創傷治癒において、炎症後色素沈着や過剰癒痕形成のメカニズムを解明し最小限に抑えることは、われわれ形成外科医にとって、基礎・臨床医学を通じた根本的かつ永遠の課題であった。研究代表者は、色素沈着や創傷治癒の基礎研究、および主として頭頸部癌切除後の再建、口唇・鼻腔・顔面領域の形成に従事しており、口腔・鼻腔内では体表に比べて創傷治癒が迅速で肥厚性癒痕を形成することも希であることから、この違いが低癒痕創傷治癒のヒントになっていると考えてきた。

2. 研究の目的

炎症後色素沈着と過剰癒痕形成のメカニズムの解明を研究目的に設定し、同一個体の身体別部位由来の初代培養細胞を用いて、色素沈着、癒痕形成にかかわる可能性のある in vitro での因子（増殖能、サイトカイン発現）について調べることにより、臨床的に経験される創傷治癒の身体部位特異性と局所に存在する細胞の部位特異性との整合性を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

初代培養細胞の確立

形成外科手術中に余剰として廃棄される皮膚検体を、患者の同意のもと、施設の倫理委員会の審議、許可を受けたプロトコルにのっとり採取した。線維芽細胞は、10% Fetal calf serum (FCS) を添加した DMEM 培地を基本培地 (Fibroblast growth medium: FGM) として、細胞遊走法にて初代培養を行った。ケラチノサイトは、Bovine pituitary extract (BPE), Epidermal growth factor を含む無血清ケラチノサイト培地による無血清培養法にて、初代培養を確立した。それぞれ passage 3-6 の細胞を用いて、解析を行った。

増殖特性の評価

特に、線維芽細胞の癒痕形成にかかわる因子として in vitro での増殖特性の評価を行った。12 well plate に 10,000 cells/well で細胞を播種 (FGM) し、4 日ごと 32 日目まで、培地交換と同時に、細胞数をカウントした。

培養上清中の細胞外器質、サイトカイン濃度の測定

増殖特性評価の項と同様の条件で線維芽細胞を培養し、4 日目の培養上清を回収した。コラーゲン、TGF 1, TGF 2, SCF について、それぞれ市販の EIA, ELISA キットを用いて上清中の濃度を測定した。細胞回収時の細胞数で、分泌量の標準化を行った。

細胞外器質、サイトカイン、マーカーの mRNA 発現解析

増殖特性評価の項と同様の条件で線維芽細胞を培養し、4 日目に細胞を回収した。カラムを用いる市販のキットを用いて mRNA を抽出し、逆転写を行った。サイバークリーンを用いたリアルタイム PCR 用に、代表的な因子についてプライマーの最適化を行い、GAPDH を内部標準として mRNA 発現レベルの比較を行った。

コラーゲンゲル収縮アッセイ

タイプ 1 コラーゲン酸性溶液を用いて、終濃度 100,000 cells/ml, 3.0 mg/ml となるように線維芽細胞、コラーゲン溶液を調整し、12 well plate に 1 ml ずつ播種した。1 日後に FGM 1 cc を追加した。4 日目にコラーゲンゲルをプレートの側壁から剥離し、1 時間後にゲルの写真撮影を行い、画像処理によって面積を算出した。

4. 研究成果

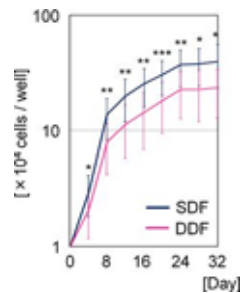
1) 真皮浅層、深層由来の線維芽細胞の差異について

5 名の健常ドナーより得られた皮膚検体より、真皮浅層由来の線維芽細胞 (SDF)、深層由来の線維芽細胞 (DDF) の初代培養を確立し、両者の差を調べた。

SDF は、大きく平坦な DDF に比較して、小型で、紡錘形をしており、プレート内で重層する傾向があった。

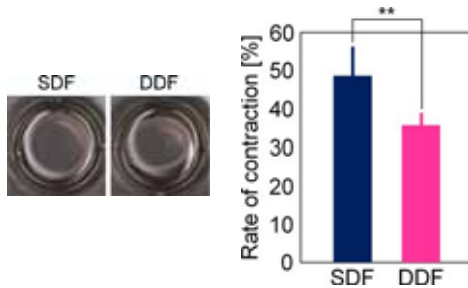
増殖特性の差異について

12 well プレート内で継続して測定した細胞数を図に示す。SDF が DDF よりも増殖能に富んでおり、より強い重責傾向を示していた。



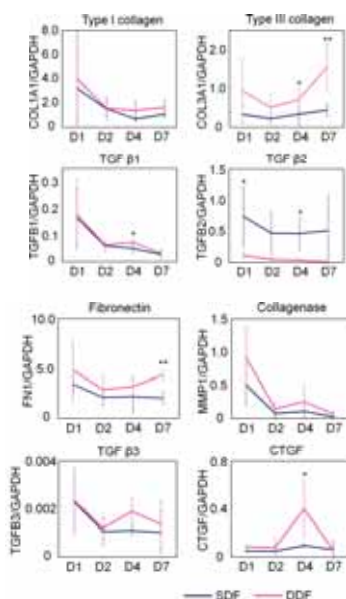
コラーゲンゲル収縮能の差異について

DDF は SDF に比較して強い収縮能を呈した。代表的なコラーゲンゲル像および収縮率を示す。



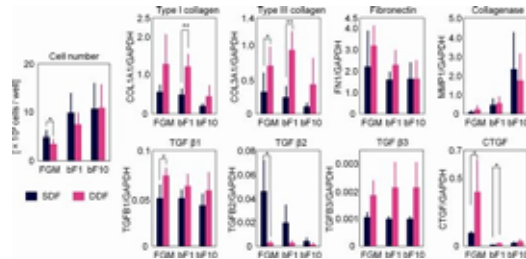
創収縮にかかわる因子の mRNA 発現の差異

創収縮にかかわる因子の mRNA 発現を経時的に測定・比較した。DDF は SDF に比較して、Type I, III コラーゲン、ファイブロネクチン TGF s、CTGF など、細胞外器質産生、創収縮にかかわる因子の多くを高発現していた。



bFGF 添加条件下での mRNA 発現の差異

創傷治癒に強い影響を及ぼす代表的なサイトカインである bFGF の 1, 10 ng/ml 添加条件下によって、増殖能、各因子の発現は大きく変動したが、SDF および DDF 間の大小関係は不変であった。



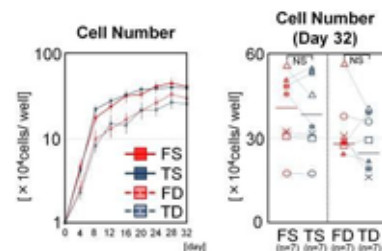
以上の所見より、DDF は SDF よりも強い細胞外器質産生能、創収縮能を有していることがわかった。創傷治癒には創傷局所に存在する線維芽細胞が主たる役割を果たすことが知られている。SDF、DDF は、傷が深くなるほど、補填する欠損組織量が増大し、より強い創収縮が望まれることから、非常に合目的な分布をしていることがわかった。以上の結果を論文報告した。(Kaminishi-Tanikawa et al. 文献参照)

II) 顔面・体幹の真皮線維芽細胞の差異について

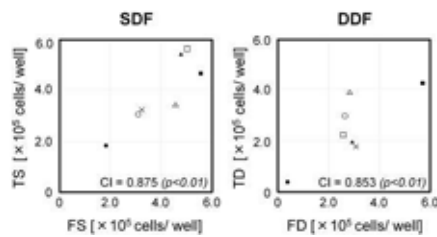
臨床経験上、顔面と体幹の創傷は異なった治癒パターンを呈する、すなわち顔面のきずは体の傷に比較して低癒痕、低色素沈着で治癒することが知られている。局所の線維芽細胞の性質の差が、原因となっている可能性を検討するため、7名の同一健康ドナーより得られた皮膚検体より、顔面浅層(FS)、顔面深層(FD)、体幹浅層(TS)、体幹深層(TD)由来線維芽細胞の初代培養を確立し、両者の差を調べた。

増殖特性の差異について

浅層、深層、各々の顔面、体幹由来の線維芽細胞は、ほぼ同じ増殖特性を示した。図は、経時的な細胞数の変化と、細胞播種 32 日目の細胞数である。

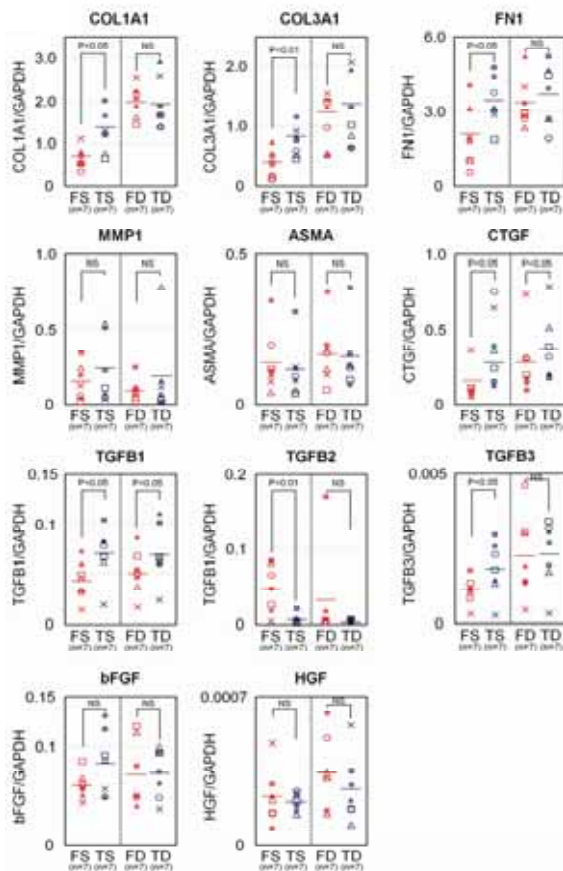


一方、ドナーごとの FS-TS 間、FD-TD 間には、高い相関関係を認めた。すなわち、線維芽細胞の増殖特性は、部位によるよりもドナーによる部分が大きいものと考えられた。



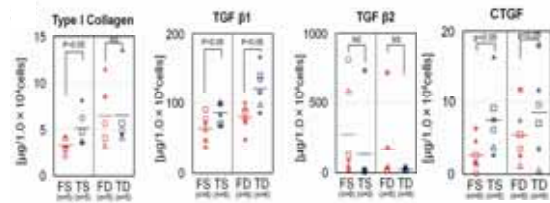
線維化因子の mRNA の発現について

顔面、体幹由来の線維芽細胞間の mRNA 発現解析を行ったところ、体幹由来の線維芽細胞のほうが線維化の因子と考えられる各因子を強く発現していた。特に、TGF- β 1、CTGF については、浅層においても、深層においても体幹由来の線維芽細胞において高発現であった。



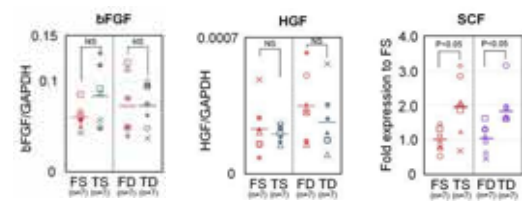
培養上清中への線維化因子の分泌について

代表的な因子については培養上清内の蛋白レベルでの産生量の差についても検討を行った。やはり、TGF- β 1、CTGF は体幹由来の線維芽細胞において、高産生であった。



メラニン原性サイトカイン mRNA 発現について

線維芽細胞はメラノサイトに対してパラクラインで作用するメラニン刺激性サイトカイン (bFGF, SCF, HGF) を産生することが知られている。顔面、体幹由来の線維芽細胞間の、これらサイトカインの mRNA 発現解析を行ったところ、SCF のみ顔面体幹間で差を認めた。浅層、深層、いずれにおいても体幹由来の線維芽細胞で高発現であった。



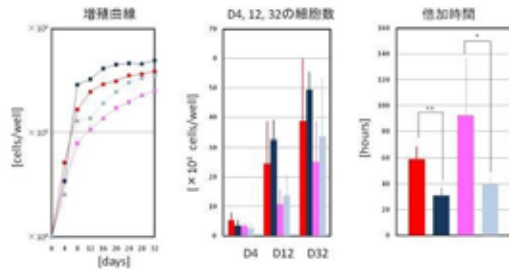
以上より、顔面由来の線維芽細胞に比較して、体幹由来の線維芽細胞は、瘢痕形成に強くかわるサイトカインとして知られる TGF- β 1、CTGF などをはじめとする線維化因子を高発現しており、色素沈着と関連すると考えられる SCF を高発現していることがわかった。これらは、臨床的に認められる「体のきずは顔のきずよりも瘢痕、色素沈着となる傾向が強い」という知見とよく一致する。創傷治癒の部位特異性は、局所の線維芽細胞の性質による部分が有る可能性が示唆された。以上の結果を申請書作成時現在論文投稿中である。

III) ケロイド由来線維芽細胞の特異性について

耳垂ケロイドは、ケロイドの中でも肥厚性瘢痕様の性質を呈するところがあり、特徴的である。健常線維芽細胞と、耳垂ケロイド由来線維芽細胞との性質の差を調べた。

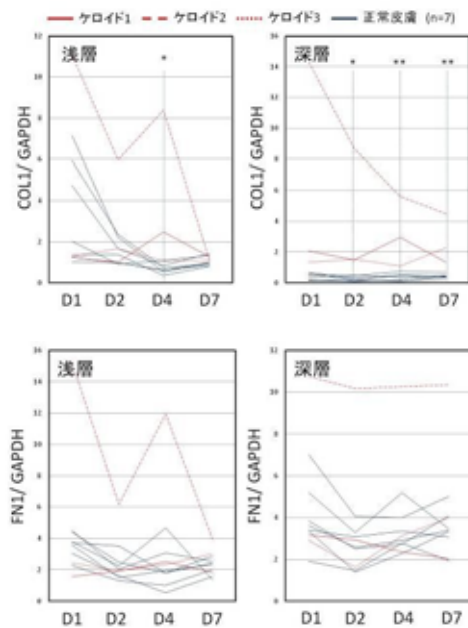
増殖特性の差異について

浅層、深層それぞれについて耳垂ケロイド由来の線維芽細胞の細胞密度は低かった。また、細胞播種4日目から8日目までの倍加時間はケロイド由来の線維芽細胞において有意に高値だった。耳垂ケロイド由来の線維芽細胞は、健常真皮由来線維芽細胞に比較して、増殖能が低かった。



線維化因子の mRNA の発現について

前項までの検討同様に多数の線維化因子について、mRNA 発現を調べたが、健常真皮真皮線維芽細胞 (n=7) と耳垂ケロイド由来線維芽細胞 (n=3) との間に明らかな差を認めただのは type1 コラーゲン発現量のみであった。しかし、耳垂ケロイド検体のうち1検体由来の線維芽細胞は、他の検体に比較して、各因子とも群を抜いて高発現であった。図は type1 コラーゲンとファイブロネクチンの mRNA 発現の経時的変化を示す。



臨床的に耳垂ケロイドは、圧迫のみで軽快を得ることができるものから、切除、放射線治療などによっても再発するものまで、かなりケロイドとしての重症度に幅が有る疾患である。結果は、こういった耳垂ケロイドの広い疾患概念を反映したものであったと考えている。以上を学会報告した。(川口ほか 2010)

〔雑誌論文〕(計2件)

- 1) Kurita M, Okazaki M, Fujino T, Takushima A, Harii K. Cyclic Stretch Induces Upregulation of Endothelin-1 with Keratinocytes In Vitro: Possible Role in Mechanical Stress-induced Hyperpigmentation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011 May 1. [Epub ahead of print].
- 2) Kaminishi-Tanikawa A, Kurita M, Okazaki M, Kawaguchi R, Ihara A, Niikura M, Takushima A, Harii K. Fibroblast obtained from superficial and deep dermis showed different features for wound healing. *J Plast Surg Hand Surg*, in press.

〔学会発表〕(計6件)

- 1) 川口留奈, 栗田昌和, 岡崎睦, 上西昭子, 多久嶋亮彦, 波利井清紀 耳垂ケロイドおよび健常皮膚の線維芽細胞の増殖特性の比較 第28回日本頭蓋顎顔面外科学会学術集会 2010年10月28,29日 京都大学百周年時計台記念館、京都
- 2) 栗田昌和, 岡崎睦, 上西昭子, 川口留奈, 多久嶋亮彦, 波利井清紀 顔面および体幹由来線維芽細胞の癒痕形成・色素沈着関連遺伝子発現の違い 日本形成外科学会基礎学会 2010年9月16,17日 パシフィコ横浜、横浜、神奈川県
- 3) 上西昭子, 栗田昌和, 岡崎睦, 川口留奈, 多久嶋亮彦, 波利井清紀 創傷治療における真皮浅層と深層由来の線維芽細胞の部位特異性 第2回創傷外科学会総会・学術集会 2010年7月30,31日 ANAクラウンプラザホテル神戸、神戸、兵庫県
- 4) Kurita M, Okazaki M, Kaminishi A, Kawaguchi R, Takushima A, Harii K. Cultured facial and trunk dermal fibroblasts show different property for scarring and pigmentation. The 10th Korea-Japan Congress of Plastic and Reconstructive Surgery, 16-18, June, 2010, Paradise hotel Busan, Busan, Korea
- 5) 上西昭子, 栗田昌和, 岡崎睦, 川口留奈, 大浦紀彦, 多久嶋亮彦, 波利井清紀 線維芽細胞の部位特異性 東京大学医学部形成外科学教室第21回同門学術集会、2010年1月16日、東京大学医学部付属病院 入院棟 A15

階 大会議室、文京区、東京

6) 栗田昌和、岡崎睦、上西昭子、大浦紀彦、
多久嶋亮彦、波利井清紀 皮膚、皮下組織お
よび筋組織由来の細胞群の増殖特性 第
18 回日本形成外科基礎学術集会 2009 年 10
月 1-2 日 都市センタービル 千代田区 東
京

〔図書〕(計 1 件)

Okazaki M. Aging and Melanocytes
Stimulating Cytokine Expressed by
Keratinocyte and Fibroblast. pp385-391.
Textbook of Aging Skin, Miranda A. Farage,
Kenneth W. Miller and Howard I. Maibach
eds. Springer Berlin Heidelberg, 2010.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
あった。種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 睦 (OKAZAKI MUTSUMI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授
研究者番号：50311618

(2) 研究分担者

栗田 昌和 (MASAKAZU KURITA)
杏林大学・医学部・助教
研究者番号：20424111

(3) 連携研究者

上西 昭子 (AKIKO KAMINISHI)
杏林大学・医学部・その他
研究者番号：30532064

川口 留奈 (RUNA KAWAGUCHI)
東京医科歯科大学附属病院・医員
研究者番号：30568407