

令和 4 年 9 月 1 日現在

機関番号：84519

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18430

研究課題名（和文）ケロイド・肥厚性瘢痕における組織内神経分布

研究課題名（英文）Nerve distribution in keloids and hypertrophic scars.

研究代表者

松添 晴加（MATSUZOE, HARUKA）

地方独立行政法人神戸市民病院機構神戸市立医療センター中央市民病院（第1診療部、第2診療部、第3診療部）  
・中央市民病院・副院長

研究者番号：70814721

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、ケロイド・肥厚性瘢痕組織内での神経線維の分布や神経関連タンパクの発現を検討し、組織内の神経の局在と掻痒や痛みなどの症状との相関を明らかにする事である。この2年間で、検体提供者へ十分な説明をした上で協力を頂きケロイドおよび正常皮膚の組織確保を行い、ケロイド2検体、正常皮膚2検体についてreal-time PCRによる神経関連タンパク遺伝子の発現解析と免疫組織学的染色による組織解析を施行した。ケロイド組織内においては正常皮膚組織内と比較してPGP9.5の発現が高く、表皮内へ伸展するPGP9.5陽性神経線維が見られた。このことが、制御困難な異常知覚と関連してい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

これまでのケロイド・肥厚性瘢痕の病態解明に向けた研究は、線維芽細胞様細胞の増殖やアポトーシス、細胞外マトリックスの蓄積や炎症性細胞などの観点から行われており、異常知覚を含めた神経の観点での詳細な報告はない。さらに検体数を増やしケロイド・肥厚性瘢痕組織内における神経関連タンパクの発現や神経局在を検討することでケロイド・肥厚性瘢痕の病態解明の糸口を発見し、いずれは新たな治療法の確立につなげたい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we will examine the distribution of nerve fibers and the expression of nerve-related proteins in keloids and hypertrophic scars. The purpose of this study is to clarify the relationship between the localization of nerves in the tissues and symptoms such as itching and pain.

In the past two years, we have secured keloids and normal skin tissues with the cooperation of the sample donors after explaining them thoroughly. We analyzed the expression of nerve-related protein genes by real-time PCR and immunohistological staining in two keloid and two normal skin samples. PGP9.5 expression was higher in keloid tissues than in normal skin tissues, and PGP9.5-positive nerve fibers extending into the epidermis were observed. This may be associated with dysregulated abnormal perception.

研究分野：形成外科学

キーワード：ケロイド 肥厚性瘢痕 異常知覚 組織解析 遺伝子発現解析

### 1. 研究開始当初の背景

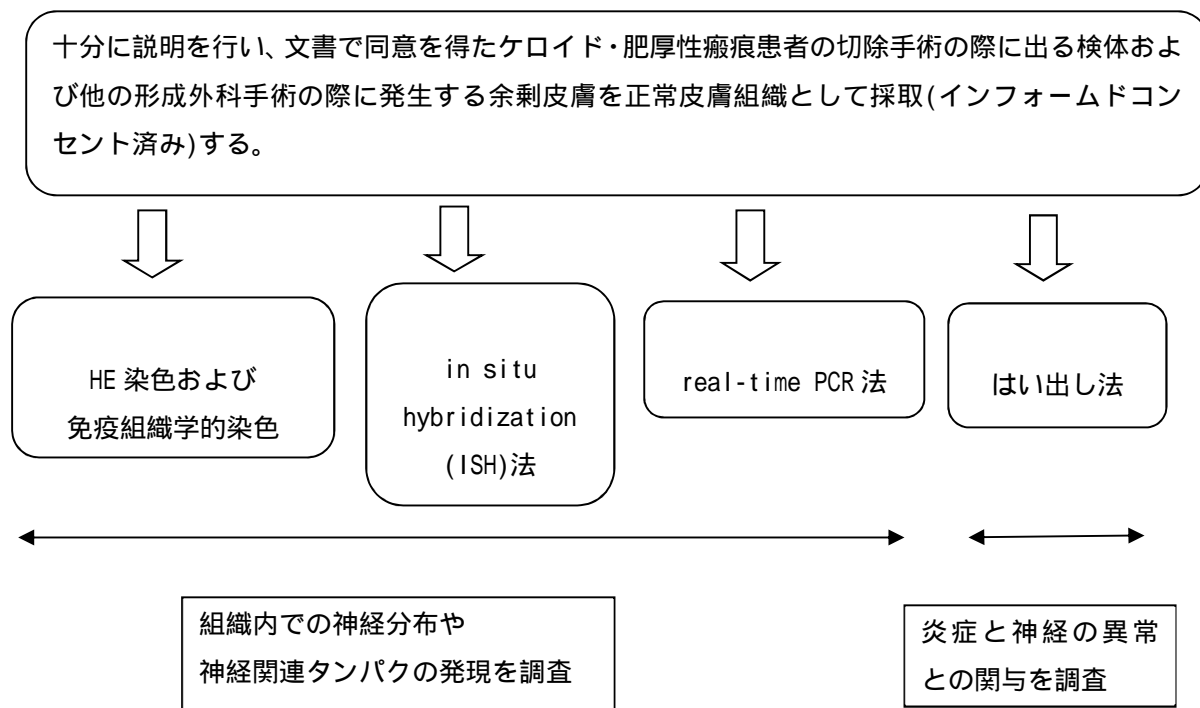
ケロイド・肥厚性瘢痕は、創傷治癒の異常な過程で生じ、赤みと硬結を伴った膨隆が特徴的である。また、制御困難な掻痒や痛み、ピリピリとした異常知覚等の持続的な苦痛を伴う。各種治療（外科的切除、ステロイド貼付剤や局注、トラニラスト内服等）で肉眼的所見が改善しても、異常知覚が残存することがあり大きな問題となる。病態メカニズムについては、線維芽細胞様細胞の異常増殖と細胞外マトリックスの過剰蓄積と分解抑制等が報告され、肥満細胞の増加や TGF- $\alpha$  および IL-1、IL-6 等の炎症性サイトカインの発現上昇が報告されているが、病態の解明にはほど遠く、根本的な治療アプローチができず病態解明が急がれている。

これまで皮膚の掻痒や疼痛の研究においては、真皮及び表皮内での神経関連タンパクの走行や発現についての報告 (*Ikoma et al. Neuro science. 2006.*) があり、これらの神経ペプチドが肥満細胞やランゲルハンス細胞を刺激し、炎症性サイトカインの分泌を亢進していることが報告されている (*John C Ansel et al. Cut NeurBio 1997*)。また、ケロイド・肥厚性瘢痕と類似して、掻痒や異常知覚等の症状を有するアトピー性皮膚炎や接触性皮膚炎では、皮膚組織内の神経の分布に関しては、神経線維が真皮内から上皮内への進展している像が見られ (*Ilka et al. Cell tis Res2000.*、*Tominaga et al. J Derma2014*)、その走行と症状、炎症と神経との関連が示唆されている。しかし、ケロイド・肥厚性瘢痕では神経線維の組織内分布や神経関連タンパクの発現がどのようになっているのか詳細な報告はまだされていない。

### 2. 研究の目的

ケロイド・肥厚性瘢痕の組織内での神経線維の分布や神経関連タンパクの発現を組織学的手法および分子生物学的手法も用いて検討をし、組織内における神経の局在と掻痒、疼痛といった症状との相関、炎症と神経の異常との関与について明らかにする。

### 3. 研究の方法



採取した検体をホルマリン固定パラフィン包埋して、HE 染色および免疫組織学的染色（抗 S-100 抗体・抗 PGP9.5 抗体、抗 CGRP 抗体、抗 SubstanceP 抗体、抗 NGF 抗体、抗 p75 抗体等の種々の抗体を使用）を行う。

末梢神経のシュワン細胞やメラノサイト、樹状細胞に陽性を示す S-100 タンパク、神経細胞の細胞質や軸索、新たな神経伸長で見られる PGP9.5 の免疫組織学的染色を行うことで、皮膚での有髄神経および神経の伸長を正常皮膚およびケロイド・肥厚性瘢痕で検討する。また、皮膚の痛覚を司る C fiber の自由終末より分泌される神経ペプチドである SubstanceP と CGRP (カルシトニン遺伝子関連ペプチド) の免疫組織学的染色を行い、組織内での C fiber の局在と神経線維を比較する。

scanning 顕微鏡にて組織内でのそれぞれの染色分布を確認し、コンフォーカルレーザー顕微鏡にて、線維の伸長や組織での分布をさらに詳細に解析する。

in situ hybridization を行い、それぞれのタンパクの組織内発現を詳細に確認する。

採取した組織検体を細切し凍結する。この凍結された組織から RNA を抽出し、real-time PCR を施行し、NGF、S-100、PGP9.5、CGRP、Substance P、p75 等の神経関連タンパクの発現を見る。

検体より、はい出し法を用いて細胞採取、培養し、ケロイド由来線維芽細胞様細胞に神経ペプチドを添加して、細胞の炎症性サイトカインの産生を測定し、正常皮膚由来のものと比較する。

#### 4. 研究成果

令和 2 年度～3 年度の 2 年間で、正常皮膚組織 6 検体、ケロイド組織 10 検体の提供を受け、それぞれパラフィンブロック、凍結ブロック、RNA 抽出用の凍結組織を作成、保存した。

その中で、正常皮膚組織 2 検体、ケロイド 2 検体について、real-time PCR を施行し組織内における神経関連タンパク (PGP9.5、P75、NGF) の発現を確認し、抗 PGP9.5 抗体、抗 p75 抗体を用いた免疫組織染色を行い、それぞれの組織内における末梢神経の局在と症状との相関について検討した。今回施行した、real-time では、PGP9.5 発現量が正常皮膚組織内と比較してケロイド組織内で高かったが、その他の遺伝子発現については差が見られなかった。

また、real-time PCR で発現量の差が見られた PGP9.5 の免疫組織染色では、ケロイド組織内の真皮～表皮基底層において、PGP9.5 陽性神経線維の増生を認め、共焦点顕微鏡では表皮へ向けて伸展する神経線維が見られた。P75 の免疫組織染色でも、P75 陽性神経線維が表皮へ向けて伸展していた。以上より、ケロイド組織内では PGP9.5 陽性神経線維数が多く、表皮へ向けて伸展した末梢神経が制御困難覚異常に関与する可能性が示唆された。これらの研究成果については、第 30 回日本形成外科学会基礎学術集会（○松添 晴加、他：ケロイドにおける神経関連タンパクの発現：第 30 回日本形成外科学会基礎学術集会、東京、令和 3 年 10 月）にて発表した。

今後も引き続き、検討症例数、検討項目数を増やし検討を進め、ケロイドと神経の関連について研究を継続する。

	年齢	性別	部位	症状 (疼痛、掻痒)
正常皮膚組織	N1	64 女性	腹部	(-)
	N2	65 男性	腹部	(-)
ケロイド	K1	50 男性	前胸部	(++)
	K2	40 男性	前胸部	(++)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 松添 晴加
2. 発表標題 ケロイドにおける神経関連タンパクの発現
3. 学会等名 第30回日本形成外科学会基礎学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------