

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 5 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592297

研究課題名（和文） cAblチロジinkinナーゼ抑制によるケロイドの新しい分子治療の確立と発症機序の解明

研究課題名（英文） Establishment of new molecular therapy of keloid and elucidation of mechanism of development by inhibition of cAbl tyrosine kinase

研究代表者

M GHAZIZADEH (MOHAMMAD GHAZIZADEH)

日本医科大学・老人病研究所・准教授

研究者番号：30190979

研究成果の概要（和文）：われわれは、ケロイド発生に IL-6 シグナルが関与していることを明らかにしてきた。本研究では、IL-6 を誘導する TGF- β および PDGF のレセプターと c-Abl チロジinkinナーゼシグナルを同時に抑制する小分子標的治療薬の STI571(Imatinib mesylate) および小分子ペプチド PD173955 に着目し、ケロイドに対する抑制効果の検討を行った。ケロイド由来線維芽細胞(KF)において、c-Abl、TGF- β レセプター、PDGF レセプターの過剰発現を認めた。STI571 と PD173955 投与群では、NF、KF ともに細胞増殖能、細胞外マトリックス (ECM) 関連遺伝子発現、細胞移動に対する抑制効果とアポトーシスが認められた。一方、STI571 と PD173955 を抑制すると、細胞増殖能、コラーゲン産生能およびアポトーシスへの影響は見られなかった。ヌードマウスに、ケロイド組織および正常皮膚組織を移植したところ約 5 週目より皮下の硬結を認め、組織学的検討の結果、硝子状コラーゲンバンドルの増殖が認められた。今後はこのマウスに STI571 と PD173955 を投与しその効果を検討していく。今回の結果より、ケロイドに対する新しい治療薬として、c-Abl チロジinkinナーゼをターゲットとした分子標的治療薬の有効性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have shown that IL-6 signaling pathway is involved in keloid development. The present study aimed at analysis of the inhibitory effect of small molecule therapeutic agent STI571 (imatinib mesylate) and small molecule peptide PD173955 which simultaneously inhibit TGF- β receptor and PDGF receptor and c-Abl tyrosine kinase signaling on keloid. Over-expression of c-Abl, TGF- β receptor, PDGF receptor was found in keloid-derived fibroblasts (KF). Treatment of both normal dermal fibroblasts (NF) and KF cells with STI571 and PD173955 resulted in inhibitory effect on cell growth, migration, ECM-related gene expression, and apoptosis. In addition, inhibition of STI571 and PD173955 abolished the effect on cell growth, collagen synthesis and apoptosis. Implantation of keloid and normal skin tissues into nude mice showed hardening of subcutaneous tissue after 5 weeks which on histological examination revealed accumulation of collagen bundles. Subsequently, we treat these mice with STI571 and PD173955 and evaluate their effects. These results indicate that inhibition of c-Abl tyrosine kinase may prove useful for the development of new molecular therapy of keloid.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：ケロイド・c-Abl・分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

ケロイド病変の発生に IL-6 シグナルが活性化されている事を我々は報告している。IL-6 シグナルが TGF- β と PDGF により誘導され、ケロイドに TGF- β と PDGF の過剰発現が報告されている。

2. 研究の目的

TGF- β と PDGF シグナルを同時に抑制する分子標的治療薬 STI571 (Imatinib mesylate) および分子標的ペプチド PD173955 に注目し、新たなケロイド新薬の可能性を求めてケロイド抑制効果の検討を行った。

3. 研究の方法

ケロイド由来線維芽細胞(KF)と正常真皮由来線維芽細胞(NF)を樹立した後

(1) 細胞外マトリックス関連遺伝子発現およびコラーゲン合成能の解析を行った。KFにおいて a) STI571 と PD173955 投与群, b) コントロール群を作成し、STI571 (2 μ M) と PD173955 (10nM) 濃度で 24 時間作用させ、その後、各群の細胞から RNA、タンパクを抽出した。細胞外マトリックス関連遺伝子 collagen type 1 α (COL1A1)、fibronectin 1 (FN-1) などの産生能を ELISA で解析した。NF についても同様に解析し、KF と比較検討した。STI571 と PD173955 の効果については KF および NF を培養下での創傷への治癒効果の検討のための wound healing assay を用い更なる検討を行った。

(2) STI571 と PD173955 投与後の細胞増殖能の解析は：a) STI571 と PD173955 の効果を抑

制するために、recombinant TGF- β (10ng/ml) 又は、PDGF-BB (40ng/ml) を作用させその効果を検討した。b) MTT assay により細胞増殖能の解析を行った。Annexin V 免疫染色により cell apoptosis をフローサイトメーターで解析を行った。また、免疫組織化学法をもちいてケロイドにおける c-Abl の発現、また PDGF-alpha, TGF-beta と各レセプターの発現にも解析を行った。NF についても同様に解析し、KF と比較検討した。

(3) それぞれ 10^6 個の KF 細胞を BALB-C nu/nu ノードマウス (実験群 n=3, 対象群 n=3) の皮下に移植しその増殖能を検討した。また、同様なマウス (実験群 n=5, 対象群 n=5) を用いてケロイド及び正常皮膚の移植を行いそれぞれの結果を観察し、STI571 と PD173955 投与を行っている。

4. 研究成果

(1) STI571 (2 μ M) と PD173955 (10nM) 投与群では、NF 及び KF とともに、細胞増殖能や細胞外マトリックス関連遺伝子発現が抑制された。In vitro wound healing assay でも、同様に STI571 と PD173955 投与群において、STI571 と PD173955 の KF および NF に対する細胞移動抑制効果が明らかになった。

(2) STI571 と PD173955 を抑制すると MTT assay により細胞増殖能に影響は見られず、ELISA 法によってコラーゲン産生にも影響は見られなかった。さらに、フローサイトメーターによる解析では cell apoptosis に影響は見られなかった。また、正常真皮由来線維

芽細胞よりケロイドにおける c-Abl、PDGF- α 、TGF- β とそれぞれのレセプターの過剰発現は免疫染色組織化学的に確認できた。

(3) KF 細胞移植においてはヌードマウスにケロイド発生は見られなかった。ケロイド及び正常皮膚の移植においてそれぞれ3週間後には移植片は消失したが5週間目から皮下の硬結を認めたことから、組織を採取し組織学的検討を行ったところ硝子状コラーゲン bundle の増殖が認められた。STI571 と PD173955 投与を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件) 全て査読有

1: Ghazizadeh R, Tosa M, Ghazizadeh M. Clinical improvement in psoriasis with treatment of associated hyperlipidemia. *Am J Med Sci* 341(5), 2011, 394-398. doi: 10.1097/MAJ.0b013e3181ff8eeb

2: Sato S, Sasaki Y, Adachi A, Ghazizadeh M. Validation of glomerular basement membrane thickness changes with aging in minimal change disease. *Pathobiology* 77(6), 2010, 315-319. DOI: 10.1159/000321961

3: Fujiwara M, Hasebe T, Kajita M, Ishizuya-Oka A, Ghazizadeh M, Kawanami O. RCAN1 regulates vascular branching during *Xenopus laevis* angiogenesis. *J Vasc Res* 7:48(2), 2010, 104-118. DOI: 10.1159/000316873

4: Ghazizadeh R, Shimizu H, Tosa M, Ghazizadeh M. Pathogenic Mechanisms Shared between Psoriasis and Cardiovascular Disease. *Int J Med Sci* 7(5), 2010, 284-289. doi:10.7150/ijms.7.284

5: Sato S, Ghazizadeh M. Lamellar body formation and dark multi-vesicular body's pocket in fetal and after-born normal rat alveolar type II cells: Ultrastructural study. *Exp Lung Res* 35(9), 2009, 748-755. doi: 10.3109/01902140902874222

6: Sato S, Yanagihara T, Ghazizadeh M, Ishizaki M, Adachi A, Sasaki Y, Igarashi T, Fukunaga Y. Correlation of autophagy type in podocytes with histopathological diagnosis of IgA nephropathy. *Pathobiology* 76(5), 2009, 221-226. DOI: 10.1159/000228897

7: Hiro Eda H, Sato S, Sasaki Y, Adachi A, Ghazizadeh M. Ischemic damage and subsequent proliferation of oligodendrocytes in hippocampal CA1 region following repeated brief cerebral ischemia. *Pathobiology*. 2009; 76(4):204-211. DOI: 10.1159/000218337

8: Yokota T, Nagashima M, Ghazizadeh M, Kawanami O. Increased effect of fucoidan on lipoprotein lipase secretion in adipocytes. *Life Sci*. 2009 Apr 10;84(15-16):523-529. Doi:10.1016/j.lfs.2009.01.020

9: Tosa M, Murakami M, Ghazizadeh M, Hyakusoku H. Chronologic change of the maximum dimension of BCG-induced keloids. *Dermatol Surg* 35(2), 2009, 189-194. DOI: 10.1111/j.1524-4725.2008.34408.x

10: Shimizu H, Ghazizadeh M, Sato S, Oguro T, Kawanami O. Interaction between β -amyloid protein and heparan sulfate proteoglycans from the cerebral capillary basement membrane in Alzheimer's disease. *J Clin Neurosci* 16(2), 2009, 277-282. Doi: 10.1016/j.jocn.2008.04.009

[学会発表] (計 5 件)

1) Ghazizadeh M, Shimizu H, Tosa M, Egawa Seiko, Murakami M: Effect of imatinib mesylate (STI571) on keloid fibroblast cell functions. The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (Fukuoka), 2009. 12.

2) Mohammad Ghazizadeh, Hajime Shimizu, Seiko Egawa, Mamiko Tosa. Inhibition of keloid fibroblast cell growth by a Src family-specific tyrosine kinase inhibitor. 第25回日本皮膚外科学会総会, 2010, 9.

3) Mohammad Ghazizadeh, Hajime Shimizu, Shinichi Igota. Involvement of Wnt signaling pathway in abnormal wound healing. 第3回日本創傷外科学会総会. 2011, 7. 札幌.

4) Mohammad Ghazizadeh, Shinichi Igota, Hajime Shimizu, Seiko Egawa, Mamiko Tosa. Targeting the Wnt signaling pathway in keloid. 第26回日本皮膚外科学会総会. 2011, 8. 富山.

5) Mohammad Ghazizadeh, Hajime Shimizu, Seiko Egawa, Mamiko Tosa. Potential involvement of the stem cell factor receptor c-kit in keloid Pathogenesis 第111回日本皮膚科学会総会, 2012, 6. 京都.

[図書] (計1件)

1. Ghazizadeh M, Ghazizadeh R. Application of a novel technique for observing internal ultrastructure of human chromosomes with known karyotype. In: Microscopy: Science, Technology, Applications and Education. A. Mendez-Vilas and J. Diaz (Eds.), No. 4, Vol. 1, pp. 3-10. Formatex, Badajoz, Spain 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

M GHAZIZADEH (MOHAMMAD GHAZIZADEH)
日本医科大学・老人病研究所・准教授
研究者番号：30190979

(2) 研究分担者

土佐 眞美子 (TOSA MAMIKO)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：30301568

清水 一 (SHIMIZU HAJIME)
日本医科大学・老人病研究所・マネージメントサポートスタッフ
研究者番号：60398873

村上 正洋 (MURAKAMI MASAHIRO)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00239500

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：