

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 5 月 30 日現在

機関番号：74314
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2010～2011
課題番号：22791720
研究課題名（和文）：ケロイドにおける COMP の発現と役割について
研究課題名（英文）：Expression and Pathogenic Role of
Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) in Keloids
研究代表者
庄野 文恵 (SHOUNO FUMIE)
公益財団法人田附興風会・医学研究所 第5研究部・研究員
研究者番号：30437412

研究成果の概要（和文）：

ケロイドは、正常皮膚細胞と異なり、創傷治癒後にも、COMP とコラーゲンを継続的に細胞外に分泌していることを証明した。TGF- β 1 により創傷治癒の初期を再現し、ケロイドと正常細胞の COMP の発現量がほぼ同じであることを示した。これらの結果から、COMP そのものがコラーゲンの生成を促進してはいないと推測し、COMP の mRNA を細胞内に導入してその mRNA を増加させ、COMP の mRNA が、コラーゲンの生成量を調節すること発見した。本成果は、ケロイド固有の生化学的回路の一部を世界で初めて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We proved that keloid is continuously secreting COMP and Collagen out after the wound is healed. Then it was shown that the amounts of COMP secreted from keloid and from normal cells were almost the same by a simulation of early healing process using TGF- β 1. Those results did not suggest that COMP itself increased Collagen production. By a transfection of COMP mRNA to both keloid cells and normal dermal cells, we found that COMP mRNA regulates collagen production. This is the first discovery of one of keloid specific biochemical regulation paths.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総 計	2,200,000	660,000	2,860,000

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、同一個体、COMP、TGF- β 1、コラーゲン、mRNA、創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

ケロイドは、皮膚の損傷を契機として生じる、隆起性病変である。皮膚が損傷すると、創傷治癒に関与する細胞から Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) が産生され、損

傷部位の線維芽細胞ではコラーゲンタイプ I の生成が増加する。創傷治癒後もコラーゲンタイプ I の過剰生成が持続し、不規則に蓄積することで、ケロイドが生じる。

これまでに、ケロイド患者の病変部と、非ケロイド患者の正常皮膚との遺伝子や蛋白

質の発現を比較した報告は散見されるが、同一個体での病変部と正常皮膚とを比較した報告はなかった。そこで、ケロイド病変形成の分子機構の解析を目的として、ケロイド全切除および術後放射線照射を予定していた患者1名より、ケロイド組織と非病変部皮膚組織を得て線維芽細胞を培養し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、ケロイド線維芽細胞では Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) が48.5倍と2番目に多く増加していた。

COMP は、Thrombospondin family に属する、細胞外マトリクス蛋白質である。軟骨、腱、靱帯に豊富に存在し、コラーゲンネットワークの安定化機能を有することが知られている。また、COMP は、TGF- β 1 存在下で増加すること、プロコラーゲンおよびコラーゲン分子と結合して線維形成を促進する働きがあることが報告されている。しかし、正常な皮膚組織やケロイドにおける COMP の発現や機能についての報告はなかった。

2. 研究の目的

既知の知見より、皮膚の創傷治癒過程で COMP の産生が増加すると推測した。そして、ケロイドでは COMP の過剰生成が持続し、COMP がコラーゲンタイプ I の線維形成を促進している可能性があるとして推測した。

そこで、ケロイドと正常皮膚における COMP の発現の違いと、COMP がケロイド形成に果たす役割を調べる目的で、以下の研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 皮膚組織内の COMP の存在を調べるため、15例ケロイド組織と6例の正常皮膚組織を得て、免疫組織染色を行った。

(2) COMP がケロイドで持続的に過剰発現しているかを調べるため、同一個体由来のケロイド組織と正常皮膚組織、ケロイド線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞、の5組のペアサンプルを用い、Western Blot 法で COMP 量を比較した。非ケロイド患者の皮膚組織と正常皮膚線維芽細胞をコントロールとして用いた。

(3) ケロイドにおける COMP の役割を調べるため、COMP の減少が、コラーゲンタイプ I の線維形成を抑制し得るかを検討した。ケロイド線維芽細胞に COMP siRNA もしくは negative siRNA(コントロール)を導入し、COMP とコラーゲンタイプ I の生成量を、RT-PCR 法、Western Blot 法、免疫細胞蛍光染色法を用いて検討した。

① COMP mRNA の抑制持続時間を確認するため、

siRNA 導入より24時間毎96時間までサンプルを回収し、RT-PCR 法を用いて COMP mRNA とコラーゲンタイプ I (COL1A2) mRNA 量を調べた。

② 蛋白レベルでの COMP 量抑制を確認するため、siRNA 導入より24時間毎96時間まで Cell lysate を回収した。Western Blot 法を用い、COMP および細胞膜付近に沈着したプロコラーゲンの量を計測した。

③ siRNA 導入より96時間後、細胞外の COMP およびコラーゲンタイプ I (COL1A1) の免疫細胞蛍光染色を行った。

(4) COMP がコラーゲンの線維形成を促進することを確認するため、ケロイド線維芽細胞および正常皮膚線維芽細胞に recombinant COMP を添加して細胞外 COMP 量を増加させた。48時間後にサンプルを回収し、Western Blot 法を用いて、沈着するプロコラーゲン量を計測した。

(5) ①創傷治癒過程での COMP の発現を調べるため、ケロイド線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞に TGF- β 1 を添加し、創傷治癒過程の初期を再現し、24時間後の COMP の発現量を Western Blot 法で計測した。

② 創傷治癒が完了したモデルとして、ケロイド線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞を無血清培養液で48時間培養し、COMP の発現量を Western Blot 法で計測した。

(6) (3)(5)の結果より、ケロイドでは COMP そのものがコラーゲンの生成を促進しているのではなく、COMP mRNA がコラーゲンタイプ I mRNA を調節していると推測した。

細胞内におけるケロイド形成の調節機構を調べるため、ケロイド線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞を、COMP cDNA 発現プラスミド導入群(pCOMP)、空ベクター導入群(empty)、プラスミド導入なし群(noDNA)=コントロール、の3群に分け、プラスミド導入から48時間後、real time PCR 法でコラーゲンタイプ I (COL1A2) mRNA 量を計測し、比較した。

4. 研究成果

(1) COMP はケロイド組織の線維芽細胞の周囲に存在する

① 免疫組織染色の結果、ケロイド組織では15例中10例で COMP が検出されたが、正常皮膚組織では6例全例で検出されなかった(表1)。サイズの大きいケロイドでは、COMP が検出され、サイズの小さいケロイドでは陰性と

なる傾向にあった。

表 1 免疫組織染色

Keloid tissues	negative		positive		total
	—	±	+	++	
Small size (<10cmf)	0	5	4	1	10
Large size	0	0	0	5	5
total	5		10		15

Normal dermis	negative		positive		total
	—	±	+	++	
	6	0	0	0	6
total	6		0		6

Staining Score
>50% : ++
6～50% : +
1～5% : ±
0% : —

② 免疫組織染色の代表例を示す。ケロイド組織の中央部、境界部ともに真皮の浅層、深層部で COMP 陽性であった(図 1)。ケロイド組織の拡大像では、線維芽細胞に沿って COMP が検出された(図 2)。正常皮膚では COMP 陰性であった(図 3)。

図 1 ケロイドの免疫組織染色(×20)

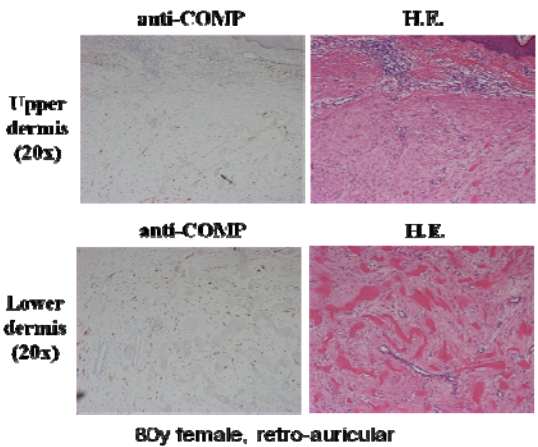


図 2 ケロイドの免疫組織染色(×200)

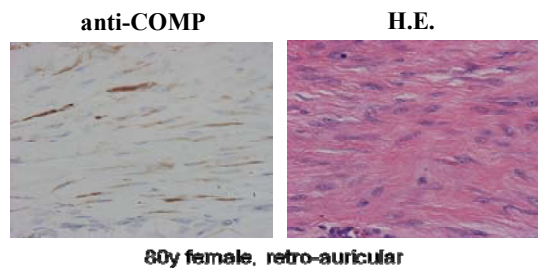
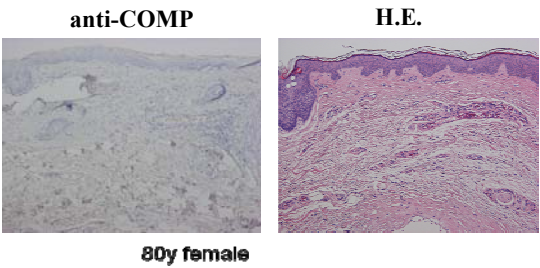


図 3 正常皮膚の免疫組織染色(×40)



(2) ケロイド線維芽細胞では COMP の過剰生成が継続している

同一個体由来のケロイド組織(KT)と正常皮膚組織(NT)の COMP 量は、KT>NT であった(図 4)。ケロイド線維芽細胞(KF)と正常皮膚線維芽細胞(NF)の COMP 量は KF>NF であった(図 5)。NT と NF の COMP 量は、非ケロイド患者より得たコントロールサンプルと同程度であった。

KF では COMP の過剰生成が持続していたが、ケロイド患者より得た NF の COMP 生成量はわずかであった。このことから、培養線維芽細胞の COMP 産生能は、由来組織の性質を継承することを確認した。

図 4 ケロイド組織と正常皮膚組織の COMP 量

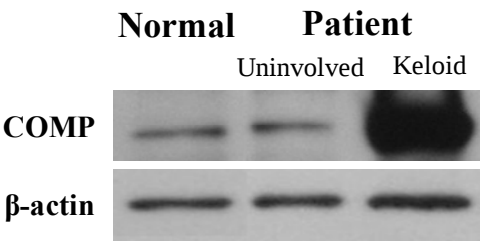
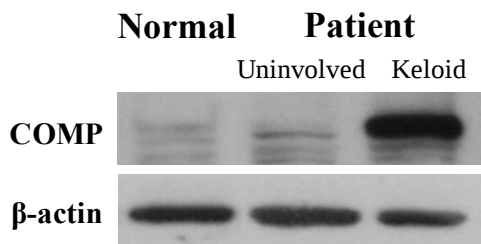


図 5 ケロイド線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞の COMP 量



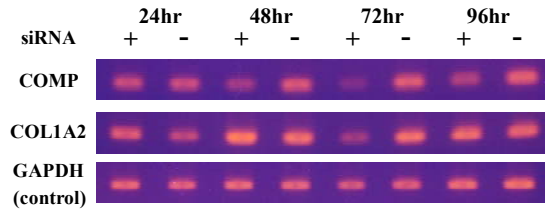
(3) ケロイドにおいて、COMP は、コラーゲンタイプ I の生成を促進する

① COMP siRNA による COMP mRNA 量の抑制は、導入より 48 時間後から著明になり、96 時間後まで持続していた(図 6)。また、導入より 72 時間後には、コラーゲンタイプ I (COL1A2)

mRNA 量の減少がみられた。

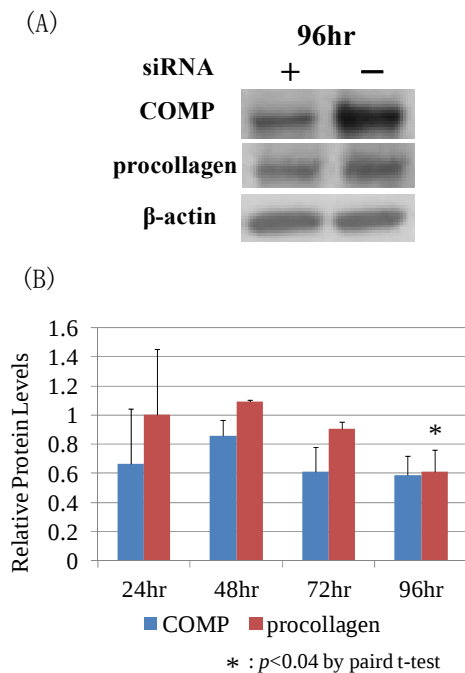
この結果から、ケロイド線維芽細胞では、COMP mRNA 量の変化によって、コラーゲンタイプ I mRNA 量に変化している可能性が考えられる。

図 6 COMP siRNA 導入により
COMP mRNA と COL1A2 mRNA が減少



② COMP siRNA による COMP の抑制は 96 時間持続し、沈着するプロコラーゲン量も減少した(図 7-A)。図 7-B は、COMP siRNA 導入による、COMP およびプロコラーゲンの減少割合を示したグラフである。COMP siRNA 導入により COMP 量は減少し、96 時間後、プロコラーゲン量は有意に減少した。

図 7 COMP siRNA 導入により
COMP とプロコラーゲンが減少

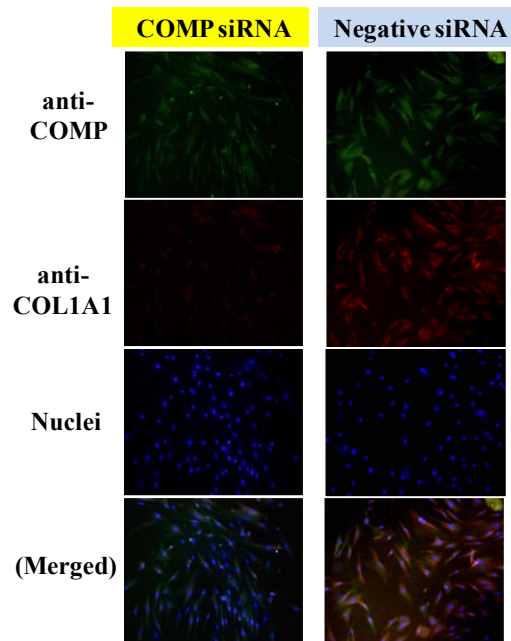


COMP 量抑制で、沈着するプロコラーゲン量が減少したという結果から、COMP がケロイド形成に果たす役割が二つ考えられる。一つには、COMP が易水溶性のプロコラーゲンと結合することで、プロコラーゲンが培養液中へ拡散せず、細胞膜付近に高密度にとどまること

から、COMP によるコラーゲンの線維形成の促進が考えられる。もう一つは、COMP 量がコラーゲン生成量を調節している可能性が考えられる。

③ 図 8 は、ケロイド線維芽細胞に siRNA 導入して 96 時間後の、免疫細胞蛍光染色の結果である。COMP siRNA 導入群では、COMP とともにコラーゲンタイプ I の減少がみられた。

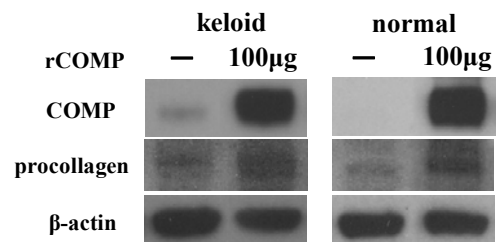
図 8 ケロイド線維芽細胞の COMP 抑制により
コラーゲンタイプ I が減少



(4) COMP はコラーゲンの線維形成を促進する

細胞外の COMP 量増加により、ケロイド線維芽細胞 (KF) でも正常皮膚線維芽細胞 (NF) でも、細胞表面に沈着するプロコラーゲン量が増加した(図 9)。プロコラーゲンの増加率は、KF では 3.17 ± 1.52 、NF では 1.44 ± 0.65 であった(平均値±標準偏差)。この結果から、COMP はコラーゲンの線維形成を促進することが示された。

図 9 COMP 添加により
沈着するプロコラーゲンが増加



(5) 創傷治癒過程で COMP が増加する

① ケロイド線維芽細胞(KF)と正常皮膚線維芽細胞(NF)ともに、TGF- β 1 存在下に COMP が増加した(図 10)。COMP の増加率は、KF では 2.86 ± 0.22 、NF では 3.09 ± 0.92 と、ほぼ同程度であった(平均値 $\pm$ 標準偏差)。

② KF、NF とも、創傷治癒完了モデルである無血清状態での培養により、COMP 量は減少した(図 11)。COMP の減少率は、KF では 0.41 ± 0.06 、NF では 0.82 ± 0.64 であった(平均値 $\pm$ 標準偏差)。

図 10 TGF- β 1 存在下に COMP は増加する

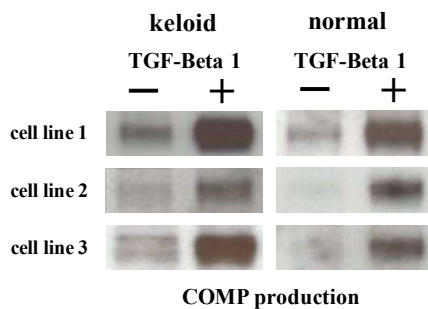
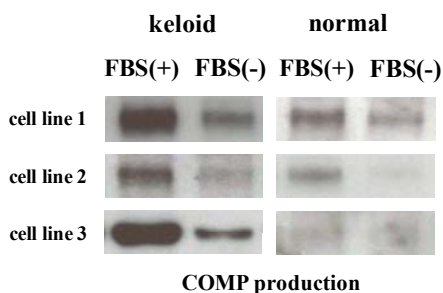


図 11 無血清培養液では COMP が減少する

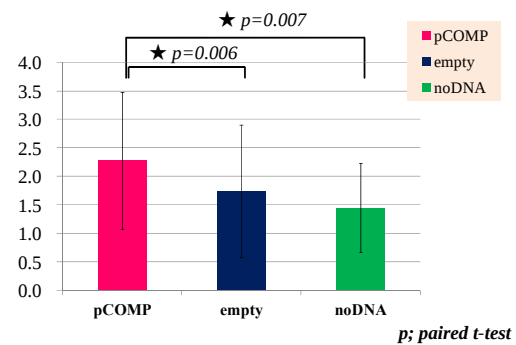


これらの結果から、COMP は創傷治癒過程で一時的に増加するといえる。また、KF における COMP の過剰生成は、何らかの制御が働いていると考えられる。

(6) ケロイドでは、COMP mRNA はコラーゲンタイプ I mRNA の調節因子である

図 12 において、pCOMP は COMP cDNA 発現プラスミド導入群、empty は空ベクター導入群、noDNA はプラスミド導入なし群(コントロール)、を示す。ケロイド線維芽細胞(KF)では、COMP mRNA の発現を増加させた pCOMP 群は、コラーゲンタイプ I mRNA 量が他の 2 群に比べて有意に増加した。NF では、COMP mRNA の発現増加によるコラーゲンタイプ I mRNA 量の増加はみられなかった。

図 12 ケロイド線維芽細胞では COMP mRNA の増加により COL1A2 mRNA 量が増加



ケロイドでは、COMP mRNA の増減にともない、コラーゲンタイプ I mRNA の量が増減した。ケロイドでは、正常皮膚にはない、COMP mRNA によるコラーゲンタイプ I mRNA の転写調節経路の存在が考えられる。なお、コラーゲンタイプ I mRNA 量の変化は COMP mRNA 量の変化より遅れるため、COMP mRNA によるコラーゲンタイプ I mRNA の転写調節は直接的とは考えにくい。

(7) まとめ

ケロイドでは、創傷治癒後も COMP の過剰生成が持続し、COMP によるコラーゲンの線維形成促進に加えて、COMP mRNA の増加がコラーゲンタイプ I の生成を促進させていることが示された。

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 1 件)

① Inui Shigeki, Shono Fumie, Nakajima Takeshi, Hosokawa Kou, and Itami Satoshi, Identification and characterization of cartilage oligomeric matrix protein as a novel pathogenic factor in keloids, American Journal of Pathology, 査読有、179(4)、2011、1951~1960

〔学会発表〕(計 4 件)

① Fumie Shono, Continuing Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) production in keloids for uncontrolled collagen accumulation, 16th International Congress of IPRAS (International Plastic Reconstructive & Aesthetic Surgery)、2011年5月22日~25日、Vancouver Convention Center (Vancouver, Canada)

②庄野 文恵、Expression and Pathogenic Role of Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) in Keloids、International Scar Meeting in Tokyo 2010、2010 年 11 月 30 日、都市センターホテル・東京

③庄野 文恵、ケロイドにおけるCOMP(cartilage oligomeric matrix protein)の同定と役割の解析、第19回日本形成外科学会基礎学術集会、2010年9月15日、パシフィコ横浜・横浜

④Fumie Shono、Expression and Pathogenic Role of Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) in Keloids、第 20 回日中形成外科学会、2010 年 8 月 26 日、上海国際会議場・上海（中国）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

庄野 文恵 (SHOUNO FUMIE)

公益財団法人田附興風会・医学研究所

第 5 研究部・研究員

研究者番号：30437412