

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16997

研究課題名（和文）1細胞遺伝子解析を駆使したケロイドにおける線維化機構の解明

研究課題名（英文）Single-cell RNA sequencing in keloid tissue to understand the mechanism of fibrosis

研究代表者

今福 匡司（Imafuku, Tadashi）

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・助教

研究者番号：10908809

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：皮膚の線維増殖性病変であるケロイドの発生機序及び線維化進展機構は、未だ解明されていない。組織微小環境における多様な細胞間相互作用はケロイドの病態形成に関連すると推定される。本研究では、ケロイド切除手術患者を対象に単一核RNAシーケンス解析を施行し、組織中の細胞不均一性及び細胞間相互作用を解析した。その結果、ケロイド病変部には線維芽細胞、ケラチノサイト及びマスト細胞が非ケロイド部と比較して多く存在した。また、ケロイド部に特徴的な線維芽細胞サブタイプはケラチノサイトやマスト細胞との相互作用頻度が多いことを算出し、ケラチノサイトやマスト細胞と線維芽細胞の連関が病態進展に関連する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ケロイドは自然退行することが稀であり、周囲の正常皮膚へと線維化症状が拡大する線維増殖性病変である。痛みや痒みが長期間継続し、重度の場合は感染を繰り返すこともあるが、その根治治療法はまだない。本研究では、これまで報告のない単一核による1細胞遺伝子発現解析を用いて、ケロイド治療薬のターゲットになりうる細胞間相互作用を解明し、新たな基礎的知見を得ることができた。さらに、本研究結果は肺線維症や肝硬変など他臓器における線維化機構の理解へと波及効果が期待される。

研究成果の概要（英文）：The mechanisms of keloid pathogenesis and fibrosis development remain to be completely elucidated. Cell-cell interactions in the tissue microenvironment (TME) are associated with the pathogenesis of keloids. In this study, we performed single-nucleus RNA sequencing of patients with resected keloid lesions to analyze cellular heterogeneity and cell-cell interactions in TME. The results showed that more fibroblasts, keratinocytes and mast cells were detected in keloid lesions than in non-keloid lesions. In addition, we calculated that the fibroblast subtype, which is characteristic of keloid areas, interacts more frequently with keratinocytes and mast cells. Therefore, we found that the interaction between fibroblasts and keratinocytes or mast cells may be related to the pathological progression of the keloid disease.

研究分野：1細胞遺伝子発現解析

キーワード：1細胞遺伝子発現解析 線維化 細胞間相互作用 ケロイド

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ケロイドは創傷治癒過程の異常であり、手術痕などの損傷部位を超えて周囲の正常皮膚へと病変部が拡大する線維増殖性病変である。自然に退行することは稀であり、痛みや痒みが長期間継続し、重度の場合は感染を繰り返すこともある。治療薬は存在せず、ステロイドや抗アレルギー剤などの対症療法に留まっており、手術による切除しか手立てはなく、患者にとって大きな負担となる。そのため、ケロイドの発生機序及び線維化進展機構の解明が求められるが、未だ詳細に解明されていない。近年、組織微小環境における細胞ポピュレーションの変動は病態の発生や進展に影響することが報告されており、ケロイドにおいても、その病変形成及び線維化の進展に組織中の線維芽細胞、血管内皮細胞、免疫細胞などの相互作用が重要であると推定される。実際、我々は次世代シーケンサー (NGS) を用いた網羅的な遺伝子発現解析を耳輪や耳垂に発生したケロイド領域及びその周辺の正常皮膚領域を対象に実施した結果、ケロイド領域では免疫に関連する遺伝子が多く存在する傾向が Gene Ontology 解析により示された (図 1)。すなわち、ケロイド領域では免疫細胞が活性化しており、線維化の進展に関与する可能性が示唆される。

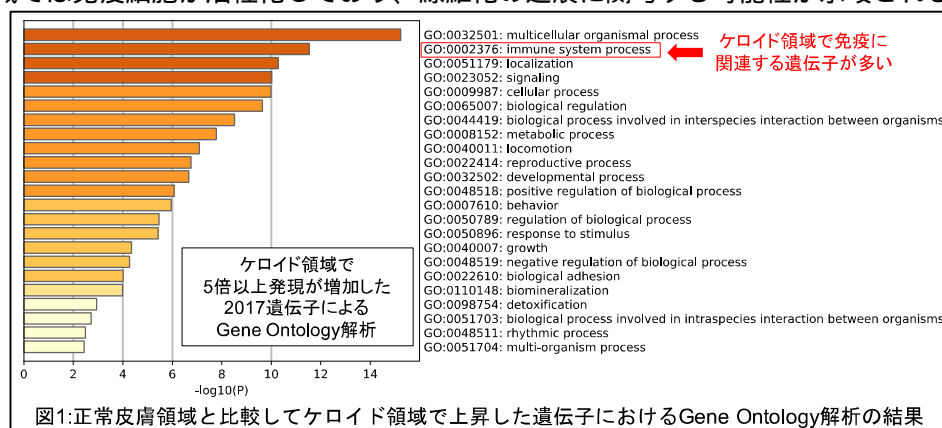
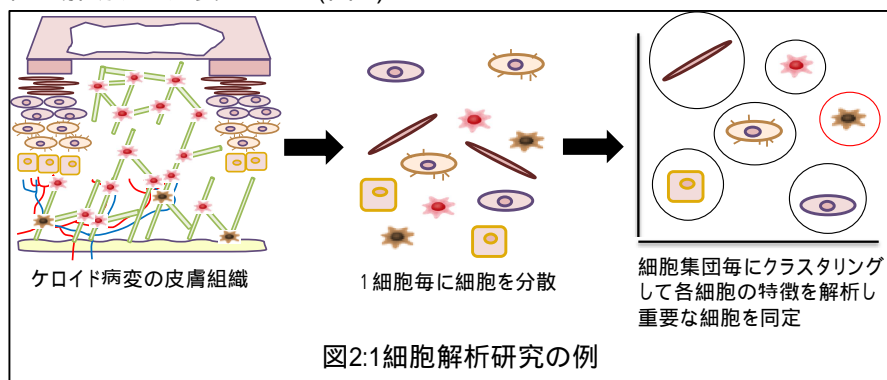


図1:正常皮膚領域と比較してケロイド領域で上昇した遺伝子におけるGene Ontology解析の結果

従来、線維化の進展機構は細胞外基質の産生など、線維芽細胞の活性化機序として研究されてきた。しかし、線維化の形成過程では刺激を受けた一部の細胞が起点となり、周囲の細胞へ波及的に作用していくため、組織中では同種の細胞であっても異なる活性化状態で不均一に存在する。また、線維芽細胞には発生起源の異なる多様な細胞種が存在し、線維化において独自の役割を担うことも明らかになった。従って、複雑な線維化の進展機構を解明するためには、これまで我々も施行してきたケロイド組織の細胞を全て平均化した網羅的な遺伝子解析では、組織線維化の進展に重要な細胞を同定することが難しい。この問いを解決するには、組織中の細胞を1細胞レベルで分散し、細胞毎の遺伝子発現を測定する1細胞遺伝子発現解析を用いて、組織内の細胞不均一性を解明する必要がある (図 2)



2. 研究の目的

ケロイド患者の皮膚組織を用いて包括的 1 細胞遺伝子解析を施行し、同患者由来正常皮膚組織または 1 細胞解析データバンクなどを利用して線維化進展を担う細胞及び遺伝子候補を同定することを目的し、病態機構の解明と創薬ターゲットの発見を目指す。

3. 研究の方法

和歌山県立医科大学倫理審査委員会にて審査承認済 (承認番号 3274) のプロトコルに基づいてケロイド切除術を施行し、得られたケロイド組織残余検体を対象に 1 細胞遺伝子発現解析に取り組んだ。

4. 研究成果

(1) ケロイド切除組織における 1 細胞遺伝子発現解析

細胞生存率と分離細胞数の収量を最大にできる細胞分散酵素の組み合わせと処理条件をケロイド組織検体で検討し、最適な分散条件を検討した。最適化した条件で1細胞遺伝子発現解析を行なった結果、線維芽細胞やケラチノサイトなどケロイド組織中に多く存在すると推定される細胞が検出されなかった(図3)。この原因として、ケロイドが重度な線維化組織であり、細胞と細胞外マトリックスや結合組織との強固な結合により単一細胞として分散できていない細胞が存在し、正確に組織内細胞不均一性を反映できていないと考察した。実際に検出された細胞は、容易に1細胞へ分散可能な免疫細胞のみであった(図3)。そのため、細胞膜を除去し、単一核を精製することで1細胞の遺伝子発現情報を解析する単一核RNAシーケンス解析(snRNA-seq)によって、1細胞遺伝子発現解析に取り組むようにプロトコルを変更した。

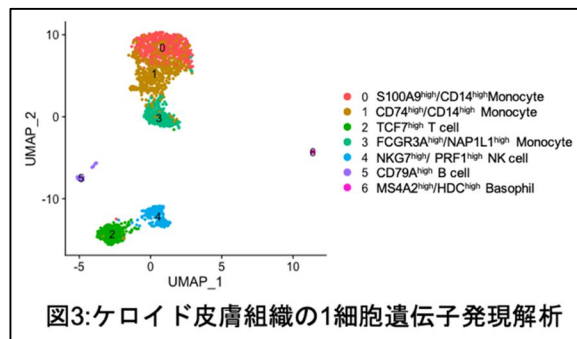


図3:ケロイド皮膚組織の1細胞遺伝子発現解析

(2) ケロイド切除組織における snRNA-seq

組織中の細胞から核を抽出するために、Nonidet P40 や Digitonin, Tween20 を用いて細胞膜を溶解し、核を抽出した。ケロイド病変部及び周辺の非ケロイド病変部における snRNA-seq を施行した結果、合計 15 種類の細胞集団を得ることができた。その中でもケロイド病変部に多く存在する 6 種類の細胞集団を見出し、これらは線維芽細胞、ケラチノサイト及びマスト細胞であった。また、線維芽細胞にはケロイド部に多く存在する線維芽細胞 (c14) と非ケロイド部に多く存在する線維芽細胞 (c1) が存在し、両者の遺伝子発現エンリッチメント比較した結果、細胞外マトリックスの産生に関連する遺伝子が多く、活性化した線維芽細胞集団であることが明らかとなった(図4)。

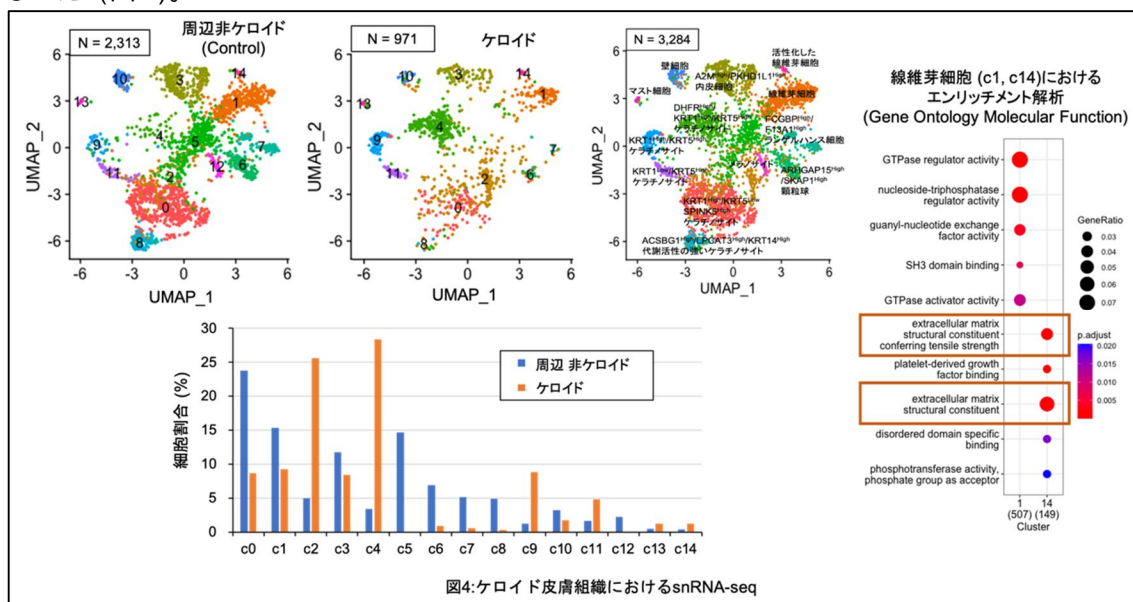


図4:ケロイド皮膚組織におけるsnRNA-seq

(3) 細胞間相互作用解析

細胞間相互作用解析ツールである CellChat を用いて、ケロイドに特徴的な線維芽細胞 (c14/FB2) と相互作用頻度が高い細胞を計算した。その結果、ケロイド部に多く存在したケラチノサイト (c9/KC4, c11/KC5) 及びマスト細胞 (c13/Mast) との相互作用が多いことが明らかとなり、ケラチノサイト-線維芽細胞連関やマスト細胞-線維芽細胞連関がケロイドの病態進展に関連する可能性を見出した(図5)。

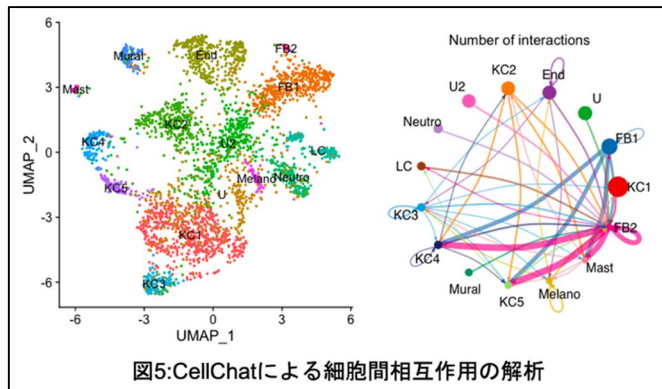


図5:CellChatによる細胞間相互作用の解析

本研究により、snRNA-seq を用いてケロイド組織中の細胞不均一性を解析し、ケロイドに特徴的な活性化線維芽細胞とケラチノサイトやマスト細胞との細胞間相互作用を見出した。snRNA-seq の確立に時間がかかり、1例での検討しか取り組めていないため、今後は確立した条件で症例数を増やすことで、細胞間相互作用に重要な役割を示す因子を同定し、治療薬の開発に繋げる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

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

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