

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月12日現在

機関番号：17301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659551
 研究課題名（和文） ケロイド細胞を用いたモデルマウスの作製
 研究課題名（英文） Creation of keloids model mouse using collagen sponge seeded with keloids-derived mesenchymal cells
 研究代表者
 宇谷 厚志（UTANI ATSUSHI）
 長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号：10292707

研究成果の概要（和文）：

ケロイド組織由来の培養間葉系細胞(KL細胞)をコラーゲンスポンジに播種しヌードマウスに移植したところ、1ヵ月後にはバーシカンが過剰沈着しており、ケロイド組織におけるマトリックス過剰沈着を再現できた。この系を用いて、IL-1bをコラーゲンスポンジに直接注射することで、バーシカン過剰沈着を抑制できた。このことより、難治性疾患であるケロイドの治療方法の開発に有用なモデルの開発に成功したと言える。

研究成果の概要（英文）：

Versican, one of extracellular matrices deposited in keloids lesion, excessively accumulated in collagen sponge seeded with keloids-derived mesenchymal cells (KL cells) at 1month after implanted in the subcutaneous space in nude mouse. Using this model, Il-1b directly injected into collagen-sponge inhibited the excessive deposition of versican. These findings suggest that this model is useful for developing therapeutic modality for refractory disease keloids.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：ケロイド、マウス、バーシカン、コラーゲン、動物モデル

1. 研究開始当初の背景

ケロイドは単純切除では再発が極めて多い疾患であり、機能障害のみならず痒痒・疼痛、外見上の問題などが患者のQOLを低下させている難治性疾患である。

ケロイドの治療方法開発が進まない原因の1つに適切なモデルが存在しないことが挙げられる。治療方法の開発へ繋がるケロイドモデルを創製することが重要と考えられている。

2. 研究の目的

ケロイドの最大の特徴は細胞外マトリックス (Extracellular Matrix: ECM) が過剰に沈着することだが、正常皮膚創傷治癒過程とは沈着するECMの種類が大きく異なっている。今研究ではケロイド病変部由来の細胞 (KL細胞) のECM過剰産生の機序を詳細に調べる。同時にKL細胞を用いてモデル動物を作製し、ケロイド治療への創薬に役立てることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ケロイド組織の採取ならびにKL細胞の樹立。

複数の組織、初代培養細胞を用いることで研究データの精度を増す。複数の患者から病変部位由来の初代培養細胞を確立する。

(2) KL細胞のECM産生能力を検討する。

まずは、マイクロアレイにて、マトリックス全般の発現増加を解析する。特にケロイドに特異的に過剰沈着するコンドロイチン硫酸をもつプロテオグリカンであるバーシカンの産生増強へのシグナルに焦点をあて、検討する。

病変部、病変部由来培養細胞の両者でバーシカン発現増強の機構を解析する。

①バーシカンプロモーター活性、

②RT-PCR

(3) サイトカイン等のスクリーニングによりバーシカン産生を抑制するものを同定する。

(4) ケロイドモデルの作成

KL細胞をnudeマウスに移植する方法論・評価法の確立。

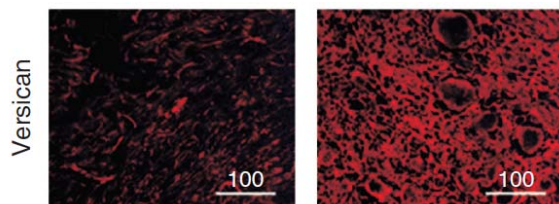
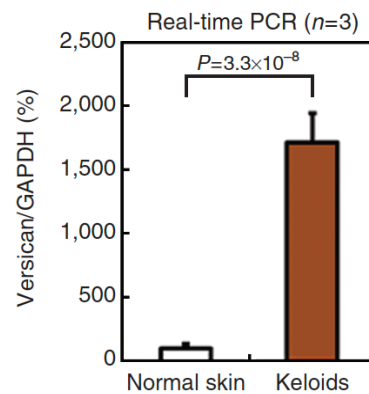
コラーゲンスポンジをscaffoldとして使う。

(5) IL-1bをヌードマウス皮下のKL細胞/コラーゲンスポンジに直接投与し *ex vivo*での抑制効果を見る。

4. 研究成果

(1) ケロイド組織ではRT-PCRにて発現増加が明

らかにされた。



またモノクローナル抗体を用いた免疫染色によりバーシカンが異常沈着していることも明らかにされた。

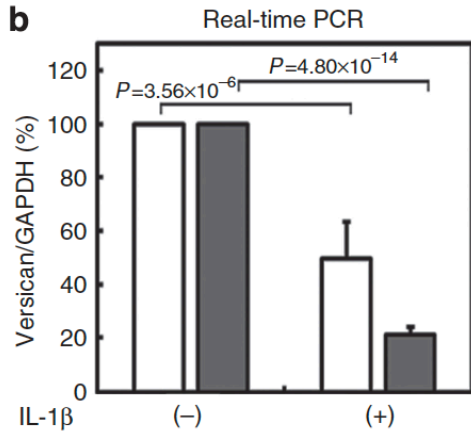
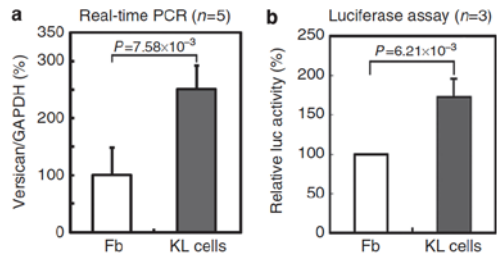
(2) マイクロアレイ解析から、培養KL細胞では、バーシカンを含むECM分子の過剰産生が明らかになった (Table 1)。

Table 1. Microarray analysis of upregulated ECM genes in KL cells

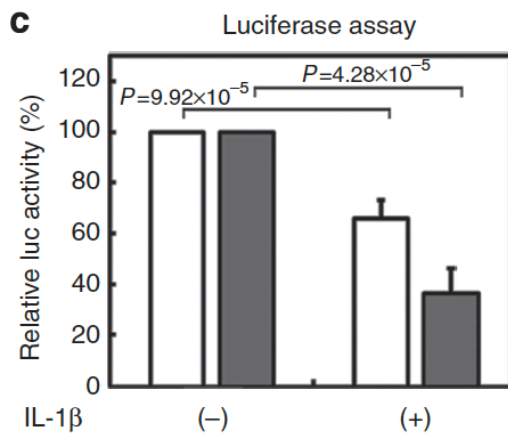
Gene	Protein	mRNA KL cells /mRNA Fb ¹
COL10A1	Collagen α 1 (X)	10.4
COL2A1	Collagen α 1 (II)	10.3
ACAN	Aggrecan	6.2
COL9A1	Collagen α 2 (IX)	3.9
COL11A1	Collagen α 1 (XI)	3.6
LUM	Lumican	3.4
COL8A1	Collagen α 1 (VIII)	2.8
VCAN	Versican	2.5
THBS1	Thrombospondin 1	2.4
COL17A1	Collagen α 1 (XVII)	2.2
COL9A3	Collagen α 3 (IX)	2.1

Abbreviations: ECM, extracellular matrix; Fb, fibroblast; KL, keloid lesion.
¹Determined by microarray analysis performed in the current study.

(3) KL細胞におけるバーシカン分子の発現増加 (real-time PCR) は、転写増加 (luciferase assay)によると考えられた。



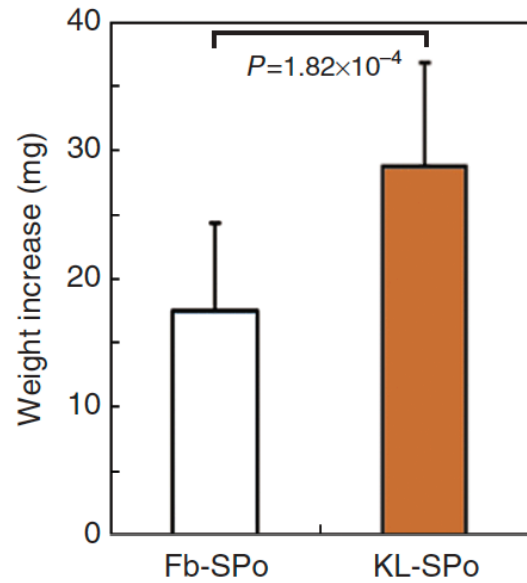
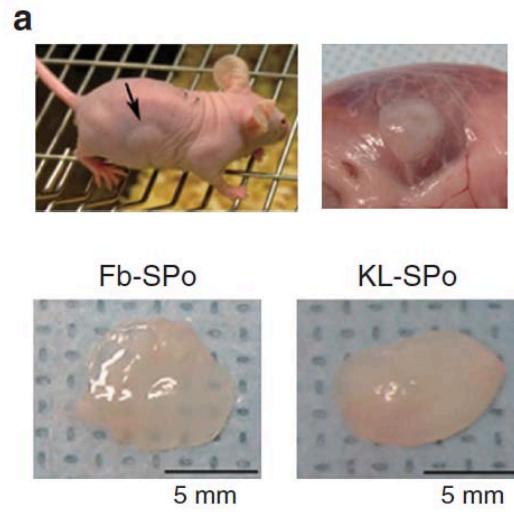
また、KL細胞(グレイ)、正常線維芽細胞(白)ともに、IL-1bにより、転写活性が低下することが判明した。



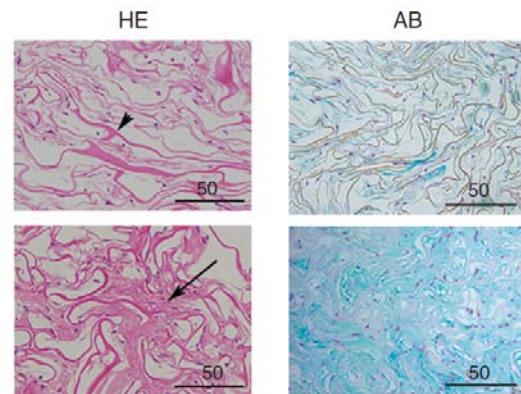
(4) ケロイドモデルの作成

細胞を播種し、ヌードマウス皮下に1か月間おいたケロイドスポンジ(KL-Spo)は、正常線維芽細胞スポンジ(Fb-Spo)より厚く、重くなっていた。重さの違いは、次のグラフにあるように平均29mg (KL-Spo)と17mg(Fb-Spo)と12mg程度であるが、てんびん秤で測ることが出来るため、非常に簡便にかつ客観的に観察できるという利点を有す

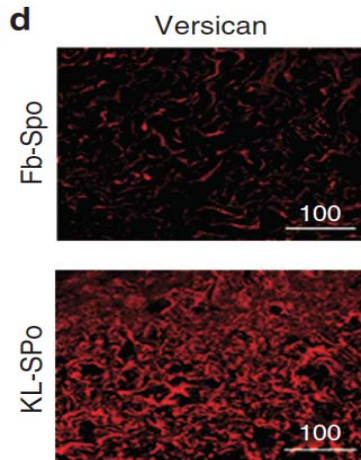
る。



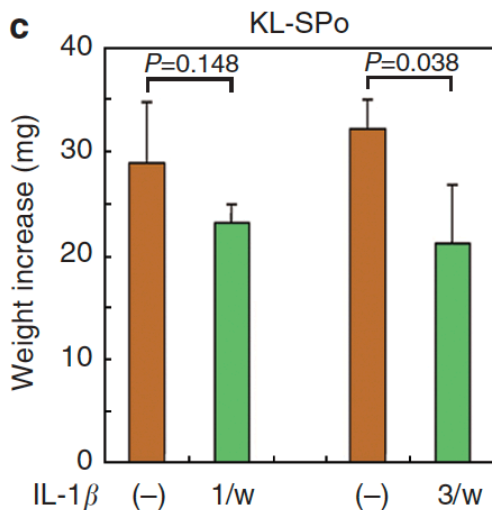
KL-SPO(下段)は、Fb-Spo(上段)に比べ、基質を多く含む(HE染色、下段)グリコサミノグリカンを多く含む(アルシヤンブルー(AB)染色)。



KL-Spoはバーシカン(免疫組織染色)を多量に含んでいた。



(5) IL-1 β を週に3回注射することで、有意差をもって、ケロイドスポンジの重量の増加を抑制することができた。



KL細胞を用いたex vivoモデルを作製し、直接薬剤を投与し、その効果を客観的にみることを可能にした。この系はケロイド治療への創薬に繋がるものと考えられる。

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2件) いずれも査読有り

- (1) Yagi Y, Muroga E, Naitoh M, Isogai Z, Matsui S, Ikehara S, Suzuki S, Miyachi Y, Utani A: An ex vivo model employing keloid-derived cell-seeded collagen sponges for therapy development. *J Invest Dermatol* 2013 Feb; 133(2): 386-393.
doi: 10.1038/jid.2012.314
- (2) Kashiyama K, Mitsutake N, Matsuse M, Ogi T, Saenko VA, Ujifuku K, Utani A, Hirano A, Yamashita S: miR-196a downregulation increases the expression of type I and III collagens in keloid fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2012 Jun; 132(6): 1597-1604.
doi: 10.1038/jid.2012.22

[学会発表](計6件)

- (1) Yagi Y, Ikehara S, Kashiyama K, Utani A: Profile of gene expressions specific to keloids lesion: the comparison with adjacent normal dermis. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (2012/12/7-2012/12/9, 那覇市)
- (2) Yagi Y, Muroga E, Aota S, Naitoh M, Suzuki S, Miyachi Y, Utani A: Exogenous IL-1 β downregulates versican expression in keloids cells and dermal fibroblasts: The study on treatment of keloids using animal model. [poster]. 22nd World Congress of Dermatology(WCD) (2011/5/24~2011/5/29, Seoul, KOREA)
- (3) 宇谷厚志: 【シンポジウム ケロイド・皮膚線維化の病態と治療戦略】ケロイドにおけるバーシカンの強発現機構の解析ならびに治療

を目的としたケロイド動物モデルの作成. 第43回 日本結合組織学会学術大会・第58回マトリックス研究会 (2011/6/10～2011/6/11, 別府市)

(4) 八木洋輔, 室賀絵里, 青田伸一, 内藤素子, 鈴木茂彦, 宮地良樹, 宇谷厚志: 外因性 Interleukin-1ベータによるケロイド細胞のパーシカン産生抑制:in vitro ならびにex vivo 解析. 第43回 日本結合組織学会学術大会・第58回マトリックス研究会 (2011/6/10～2011/6/11, 別府市)

(5) Yagi Y, Muroga E, Aota S, Naitoh M, Suzuki S, Miyachi Y, Utani A: Therapeutic trial with exogenous IL-1 beta utilizing ex vivo model of keloids. 41st Annual ESDR Meeting (2011/9/7～2011/9/10, Barcelona, SPAIN)

(6) Yagi Y, Muroga E, Aota S, Naitoh M, Suzuki S, Miyachi Y, Utani A: A therapeutic trial with ex vivo animal keloids model. 日本研究皮膚科学会第36回年次学術大会・総会(JSID) (2011/12/9～2011/12/11, 京都市)

[図書](計0件)
該当なし

[産業財産権]
○出願状況(計0件)
該当なし

○取得状況(計0件)
該当なし

[その他]
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

宇谷 厚志 (UTANI ATSUSHI)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号:10292707

(2)研究分担者

小川 文秀(OGAWA FUMIHIDE)
長崎大学・大学病院・講師
研究者番号:10333519

(3)連携研究者

該当なし