

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 3月31日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究 B

研究期間：2011～2012

課題番号：23792052

研究課題名（和文）ケロイド線維芽細胞の細胞内情報伝達機構の解明；プリン受容体を中心に

研究課題名（英文） To determine the intracellular signaling of keloid fibroblasts; especially the responses of purinoceptors.

研究代表者

黒田 敬 (KURODA TAKASHI)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：30530224

研究成果の概要（和文）：

ヒト検体より採取したケロイドおよび正常皮膚から線維芽細胞を採取し、細胞内カルシウムイオン濃度を指標として細胞内情報伝達機構の差異を明らかにする事を計画した。特にアデノシン三リン酸 (ATP) とその受容体のプリン受容体に着目した。その結果、正常線維芽細胞とケロイド線維芽細胞にそれぞれ固有の反応を認めた。また、細胞内骨格 (F-actin) と小胞体の蛍光染色を行ったところ、その密度や配列に差異を認めた。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of the research is to determine the difference between intracellular signaling of normal fibroblasts and keloid fibroblasts, with emphasis on the responses of adenosine triphosphate (ATP) and purinoceptors. Fibroblasts were isolated from keloid and normal skin tissue that were obtained from human skin. Each cell has the specific responses of extracellular ATP. Fluorescent staining showed that each cell has the specific arrangement of cytoskeleton (F-actin) and endoplasmic reticulum density.

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	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：形成外科学

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：(1) ATP、(2) 肥厚性瘢痕、(3) ケロイド、(4) 細胞内カルシウム濃度、(5) P2受容体、(6) 共焦点レーザー顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

ケロイドは、良性ながらも浸潤・増殖する皮膚疾患で、その病因は未だ不明な点が多く、治療は対症療法にとどまっている。ケロイド組織中の adenosine triphosphate (ATP) 濃度が有意に高いという報告および当研究室での動物由来線維芽細胞と ATP を用いた実験結果から、細胞外の ATP がケロイドや肥厚性瘢痕の成因に関与している可能性を見出した。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトケロイド線維芽細胞を採取し、ATP および ATP 関連物質を作用させ、細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の変動を蛍光色素および共焦点レーザー顕微鏡 (LSM, Zeiss) を用いて観察し、次の点について検討を行う事を目的とした。

(1) ヒト正常線維芽細胞とケロイド線維芽細胞において ATP および ATP 関連物質による刺激に対する $[Ca^{2+}]_i$ の変動機構に差異があるか。

(2) 差異があるとすれば、その差異はどのような機序によって生じているのか (レセプタ

一の発現によるのか、細胞内情報伝達物質の相違によるのか、細胞内小器官の変化によるのかなど。

(3) その差異により生じる細胞活動はどのようなものか(分化、分裂・増殖、分泌、細胞外基質産生、細胞同士の情報伝達など)。

3. 研究の方法

(1) ヒト検体よりケロイド線維芽細胞(KF)、正常線維芽細胞(NF)を分離、培養を行う。

(2) 細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 変動をイメージングできる標本作製する。

(3) 上記で作製した標本を、各種試薬を用いて刺激し、 $[Ca^{2+}]_i$ 変動を共焦点レーザー顕微鏡 (LSM Zeiss) を用いて観察する。

①線維芽細胞はプリン受容体を有していることが知られている。ATP および ATP 関連物質による刺激に対する $[Ca^{2+}]_i$ 変動を観察する事で、発現している受容体または優位の受容体を明らかにするとともに、細胞間での $[Ca^{2+}]_i$ 変動の伝播(細胞間のカルシウム波)の特性についても解析を行う。

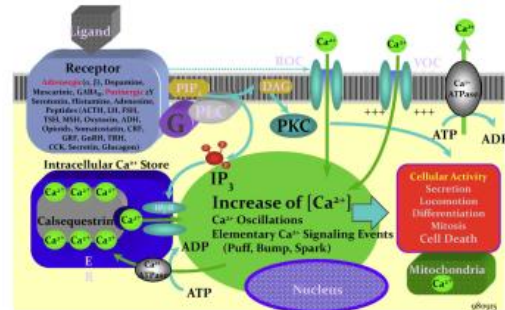
②作用させる薬物にはATP および ATP 関連物質を用い、それぞれどのように線維芽細胞で反応性が異なるか $[Ca^{2+}]_i$ を指標として解析を行う。ATP 関連物質として α 、 β -methylene ATP と Uridine triphosphate (UTP) を用いた。 α 、 β -methylene ATP はプリン受容体のうち P2X 受容体を特異的に刺激し、UTP は P2Y 受容体を特異的に刺激する事が知られている。

プリン受容体は、細胞膜上に存在する受容体のひとつで、細胞外 ATP に反応して様々な細胞活動を生ずる事が知られている。特に神経組織(中枢神経、末梢神経)および血管平滑筋で研究が進んでいる。細胞外 ATP は、情報伝達物質として働いており、autocrine、paracrine にて細胞に作用し、シナプス電流、炎症性伝達物質の分泌、gliosis、組織修復などの細胞活動に関与している事が明らかとなってきた。プリン受容体はその構造から P2X 受容体と P2Y 受容体に分かれ、それぞれ ion channel 型、G 蛋白結合型に分類される。P2X 受容体は細胞膜を貫通する筒状の構造をしており、普段は内腔が閉じているが、ATP が結合すると内腔(channel)が拡大し、細胞外 Ca^{2+} が細胞内に流入して $[Ca^{2+}]_i$ が上昇する。一方、P2Y 受容体は7回膜貫通型の受容体で、細胞膜の内側に露出した受容体蛋白に G 蛋白が結合している。この G 蛋白は IP_3 を生成する phospholipase C を活性化する。P2Y 受容体に細胞外 ATP が結合すると、細胞内に IP_3 が生成され、この IP_3 が細胞内カルシウムストアの膜に存在する IP_3 受容体に結合

し、貯蔵されていた Ca^{2+} が細胞質へ放出されて $[Ca^{2+}]_i$ が上昇する(模式図参照)。

また、細胞内カルシウムストアは、主として小胞体とその役割を担っている事が知られている。

General scheme of $[Ca^{2+}]_i$ changes



(4) 細胞の形態については細胞内骨格のひとつである F-actin を、細胞内小器官については細胞内カルシウムストアのひとつである小胞体を、蛍光染色法を用いて観察する。

4. 研究成果

ケロイドおよびヒト正常線維芽細胞における細胞内情報伝達系の差異を明らかにするため、細胞内カルシウム濃度($[Ca^{2+}]_i$) 変動をモニターし、反応の相違を観察した。

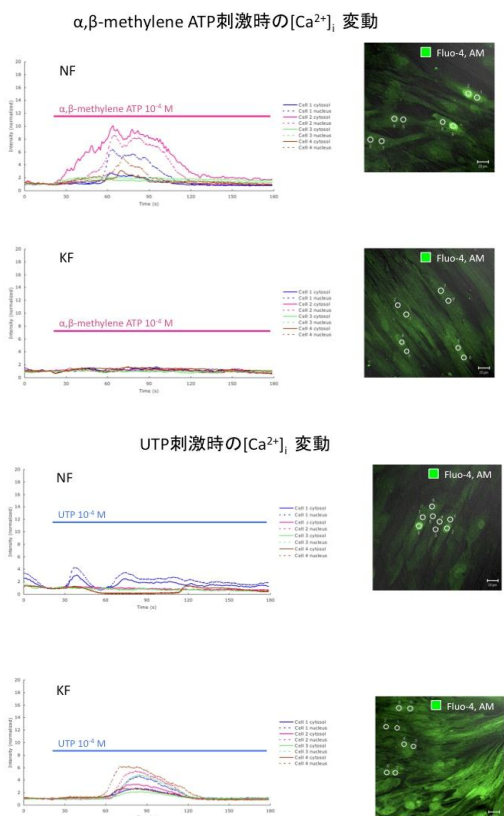
① ヒト検体より採取したケロイドおよび正常皮膚の組織標本から primary culture にて線維芽細胞を分離し、継代培養を行った。

② 線維芽細胞に細胞内カルシウムイオン蛍光指示薬 (fluo-4 AM) を導入し共焦点レーザー顕微鏡で観察可能な標本の作製を行った。

③ ②で作製した標本に、ATP および ATP 関連物質を作用させ、線維芽細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 変動の違いについて観察した。

NF および KF の両者で、ATP 刺激によって $[Ca^{2+}]_i$ の一過性上昇を認めた。ATP は 10^{-4} M の濃度で刺激した。 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、KF でより強く認められた。一方、 α 、 β -methylene ATP 刺激での $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、NF で認められたが KF では認められなかった。UTP 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は両者で認められた。いずれも、 10^{-4} M の濃度で刺激した。この結果から、NF では P2X 受容体および P2Y 受容体の両方が発現し機能しているが、KF では P2X 受容体は発現していないかあるいは P2Y 受容体が優位であると考えられる。したがって、KF での $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は細胞外 Ca^{2+} 流入による情報伝達系よりも細胞内カルシウムストアからの Ca^{2+} 放出に依存していると推測される。

ATP および ATP 関連物質の刺激により、細胞内カルシウム濃度だけでなく、細胞核内でもカルシウムイオン濃度の上昇が観察された。



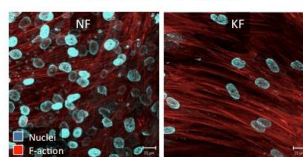
④ ③での KF の ATP および ATP 関連物質に対する $[Ca^{2+}]_i$ 変動の特性は、継代を重ねる毎に減弱した。また、継代を重ねる事によって、P2X 受容体の反応も認めるように変化した。この事は、ケロイド組織内の線維芽細胞の特性が細胞を取り巻く環境によって変化しうる可能性を示唆している。

⑤ 細胞内骨格 (F-actin) および小胞体の蛍光染色を行い、KF および NF で差異を認めるかどうか観察を行った。

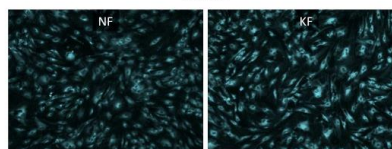
NF では、細胞は概ね平坦な形態をしており、F-actin の配列は細胞内に縦横に走行する配列をしていたが、KF の形態は殆どが紡錘状で、F-actin の配列は細胞の長軸方向に走行するものであった。また、培養した細胞の細胞数は KF で少ない印象であった。

小胞体の蛍光染色では、NF に対し KF では小胞体の蛍光が強く、その密度が高かった。このことから、KF で小胞体の量が増加していると予想したが、当該研究期間内に採取できたケロイドの症例数が統計学的検定を行える例数ではなかったため、有意差の検証はできなかった。

細胞内骨格 (F-actin)



小胞体



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 6 件)

(1) Hashizume H, Falcon BL, Kuroda T, Baluk P, Coxon A, Yu D, Bready JV, Oliver JD, McDonald DM. Complementary actions of inhibitors of angiotensin-2 and VEGF on tumor angiogenesis and growth. *Cancer Res* 2010;70(6):2213-23. doi:10.1158/0008-5472 (査読有)

(2) Misaki T, Satoh Y, Saino T, Kuroda T, Masu K, Russa DA, Ogawa A. Immunohistochemical localization of protease-activated receptors in cerebral and testicular arterioles of rats: their dependence on arteriole size and organ-specificity. *Arch Histol Cytol* 2008;71(3):179-184 (査読有)

(3) Kuroda T and Saino T. Application of tomato lectin and phalloidin in morphological analyses of the vascular network of various tissues: With special reference to postnatal development of skin. *J Iwate Med Assoc* 2007;59(2):111-126 (査読有)

(4) 本多孝之、小林誠一郎、工藤信、黒田敬 双葉皮弁を工夫した外鼻部分欠損の再建形成外科 2006;49(7):763-768 (査読有)

(5) Kuroda T, Satoh Y, Akutsu H, Shikanai Y, Miyata S, Saino T, Russa DA, Habara Y, Cui ZJ. Quantitative analysis of photodamage during fluorescence

bioimaging: monitoring of nitric oxide production using DAF-2. Bioimages 2006;14:9-18 (査読有)

(6) Kuroda T, Ehara S, Murakami. Stress fracture of the clavicle associated with sternocostoclavicular hyperostosis. Skeletal Radiol 2005;34:424-426 (査読有)

[学会発表] (計2件)

(1) 黒田敬、柏克彦、小林誠一郎、佐藤洋一 高濃度 ATP 環境下で培養した線維芽細胞の ATP に対する細胞内カルシウム動態の解析 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2010 年 3 月、盛岡

(2) 黒田敬、柏克彦、佐藤洋一、小林誠一郎 高濃度 ATP 環境下での線維芽細胞の細胞特性の変化 第 19 回日本形成外科学会基礎学術集会 2010 年 9 月、横浜

[図書] (計1件)

(1) 佐藤洋一、斎野朝幸、黒田敬 カルシウムイメージング法入門 組織細胞化学 2009;pp.119-129

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[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

黒田 敬 (KURODA TAKASHI)

岩手医科大学・医学部・助教
研究者番号：30530224

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：