

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860954

研究課題名(和文)ケロイド発生病態におけるエピジェネティクス制御の検討

研究課題名(英文)Analysis of epigenetic gene regulation in keloid formation

## 研究代表者

鎌塚 大 (KUWATSUKA, Yutaka)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：90437864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：HDAC阻害剤がケロイド細胞に及ぼす遺伝子発現の変動を検討した。HDAC阻害剤としてTrichostatin A (TSA)を選択し、マイクロアレイで解析した。その結果、正常真皮線維芽細胞と比較しWnt3Aなどがケロイド特異的に変動していた。さらに遺伝子カスケード解析で、上流にCREBBP/p300などが関与した可能性を見出した。一方、細胞外マトリックスを中心にRT-PCRで遺伝子発現を検討し、TSA投与後COL1A2やVersicanなどが低下し、MMP3が増加することを見出した。以上より、TSAはケロイドの発生抑制をもたらす可能性が示唆されたが、詳細なメカニズム解明が望まれる。

研究成果の概要(英文)：We examined the gene expressions of keloid cells incubated with HDAC inhibitor in vitro. First, we analyzed the influence of gene expressions induced by TSA, which is a kind of HDAC inhibitor, by using microarray analysis. As a result, we found numerous genes such as Wnt3A altered specificity in keloid cells relative to normal dermal fibroblast. Moreover, by using cascade analysis, some transcription factors including CREBBP/p300 were suggested to participate in the gene regulation induced by TSA. On the other hand, concerning of extracellular matrix such as COL1A2 and versican, lower gene expressions were detected in the TSA treated group compared with control. Meanwhile, we found MMP3 were highly expressed relative to control. HDAC2 and CREBBP gene expressions were not significantly altered. TSA may inhibit the keloid formation, however, precise mechanism examination would be needed.

研究分野：皮膚科学

キーワード：ケロイド HDAC阻害剤 エピジェネティクス トリコスタチンA

## 1. 研究開始当初の背景

肥厚性癬痕やケロイドでは、細胞外マトリックスの過剰な沈着が生じている。現在のところ、ステロイド局注や切除など様々な治療に対して著しく治療抵抗性である。一方で、遺伝子発現の調節機構としてエピジェネティクスに注目が集まっている。中でもヒストン蛋白構造を調節するヒストンジアセチラーゼ(HDAC)は、ヒストン構造を調節するのみならず、細胞質においても転写因子のアセチル化を行い、数々の遺伝子の転写を制御している。HDAC 阻害剤は近年種々の悪性腫瘍への有効性が示され、新たな分子標的薬として注目されている。

## 2. 研究の目的

皮膚線維化に関しては、全身性強皮症の線維芽細胞において HDAC7 の抑制がコラーゲン、 $\alpha$ 1(I) の産生を低下させ (Arthritis Rheum, 2009)、HDAC 阻害剤の 1 つであるトリコスタチン A (Trichostatin A; TSA) は皮膚線維芽細胞の増殖や細胞外マトリックス産生を抑制したとの報告がある (Matrix Biology, 2010)。以上から過剰な線維化が生じているケロイド病態の抑制に HDAC が関与する可能性を考慮した。今回、HDAC 阻害剤、なかでも TSA がケロイド細胞の細胞外マトリックスに及ぼす遺伝子変動を検討した。同時に、ケロイド特異的に変動する線維化に関わる分子を探索することを目的とした。

## 3. 研究の方法

1) ケロイド組織由来 (KL) と正常真皮由来の線維芽細胞 (NF) をサンプルとし、MTS アッセイを行い細胞毒性の確認を行った。  
2) マイクロアレイを用い、TSA 投与によりケロイド特異的に変動する遺伝子発現を検討した。

3) 細胞外マトリックスを中心に TSA 投与後の遺伝子発現を RT-PCR を用いて解析を行った。

## 4. 研究成果

### 1) MTS アッセイ

KL ならびに NF を 4 サンプルずつ培養し、TSA の濃度を振り分け (0  $\mu$ M, 0.6  $\mu$ M, 1.2  $\mu$ M, 2.0  $\mu$ M)、それぞれ TSA と 1 日、2 日、3 日、7 日反応させた。その後、CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega 社) のプロトコールに従い、各 well の 490nm 吸光度を測定し、生細胞数のカウントを行った。TSA では KL, NF いずれも 1.2  $\mu$ M 以上の濃度で反応させると有意に生細胞数が低下するため、0.6  $\mu$ M が妥当と判断し、48 時間反応すると KL で有意に生細胞数が低下したため、反応時間は 24 時間が妥当と判断した。

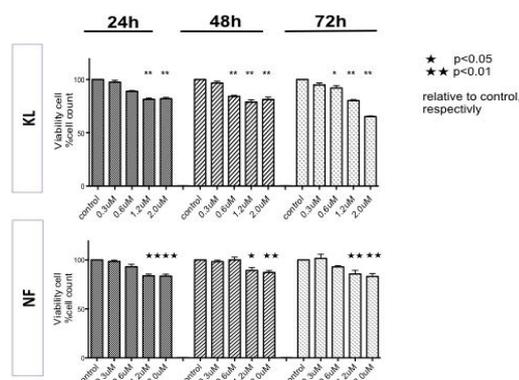


図 1 MTS アッセイによる TSA の細胞毒性

2) マイクロアレイによる遺伝子発現の検証  
KL と NF を培養し、TSA を 0.6  $\mu$ M、24 時間反応させた。その後 RNA を精製採取し、マイクロアレイを行った。Gene spring による解析の結果、ケロイドで特異的に増加している遺伝子を検証した。その中には過去に皮膚の線維化に関与すると報告された IGF-1 や Wnt3A などが含まれていた。一方で、減少している遺伝子には主に細胞増殖を調節する遺伝子が含まれていた。続いて、上流の転写因子を

探索解析するため、Cytosolutions 社に委託し遺伝子カスケード解析を行った。その結果、CREB Binding protein (CBP)や Evi1, CEBP などの転写因子がケロイド特異的に TSA の影響を受けて変動した可能性が示唆された。

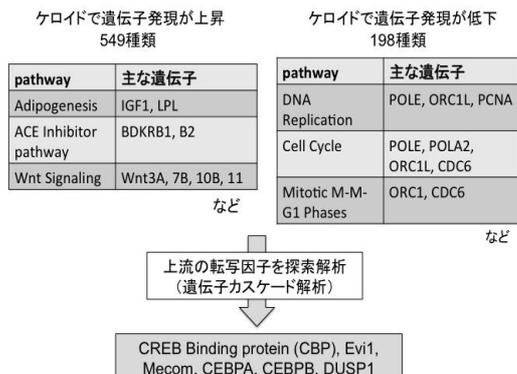


図 2 ケロイド特異的に TSA の影響をうけ発現が変動した遺伝子群

### 3) 細胞外マトリックスを中心に TSA 投与後の遺伝子発現を検証 ; RT-PCR

COL1A2 や Versican などケロイドで増加している遺伝子を中心に細胞外マトリックスの変動に TSA がどのような影響をおよぼすのか検討した。また、HDAC 2 についても発現を検証した。HDAC2 は以前の検証にて肥厚性瘢痕組織あるいはケロイド組織にて発現が上昇したが報告されており (J Invest Derma, 2012)、当施設においても発現が増加していることを確認した (data not shown)。加えて、マイクロアレイで探索した CBP についても検証を行った。KL, NF いずれもサンプル数を 4 サンプルとし培養後、TSA 投与群と TSA 非投与群を設け RNA を採取し、RT-PCR を行った。各遺伝子について TSA 非投与の群の遺伝子発現を 1.0 とし、TSA 投与群の遺伝子発現を相対的に評価した。その結果、ケロイドで発現が増加しているとされる COL1A2、Versican は TSA の投与により発現が低下することがわかった。逆に、MMP1 や MMP3 においては TSA の投与により発現が増加することがわかった。しかし、COL1A2、Versican、MMP3

は NF においても発現の変動がみられ、KL 特異的ではなかった。一方で、HDAC2 と CBP についてはほぼ変動はみられなかった。

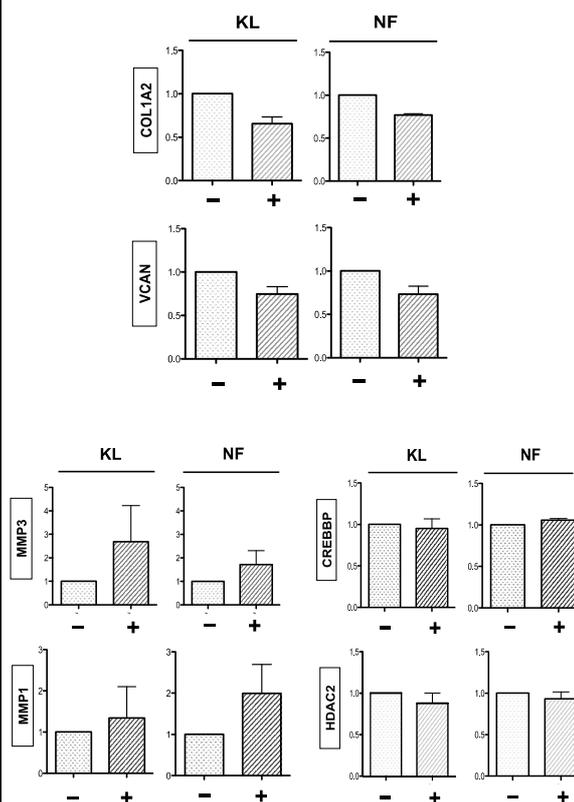


図 3 RT-PCR での各遺伝子の発現、-は TSA 非投与群、+は TSA 投与群

### 考察

今回 HDAC 阻害剤である TSA の投与により KL 特異的に遺伝子が多数変動する可能性を見出した。なかでも、Wnt に関してはケロイドの病態への関与が示唆されており (Int J Med Sci, 2013)、今後の詳細な検討が必要と考える。一方で、上流の転写因子として候補になった Evi1、CBP は線維化との関連がいられている。とりわけ CBP についてはケロイドを合併する Rubinstein-Taybi 症候群の原因遺伝子とされているため、今後の詳細な検討が望まれる。また、RT-PCR を用いた検討では、TSA によって細胞外マトリックスの発現が低下することが示唆された。その際、MMP1 と MMP3 の発現が増加していることから、TSA はこれらの発現を介して細胞外マトリックスの増

加を抑える可能性がある。しかし KL 特異的ではないため、今後濃度や投与方法などを検証し、最終的にはケロイド発生の抑制に役立つことを目指してゆきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

1. Kuwatsuka S, Kuwatsuka Y, Tomimura S, Utani A: Proposal of the new name "eruptive papular collageno-elastopathy" to unify the two indistinguishable entities, eruptive collagenoma and papular elastorrhexis. *Dermatol* 査読有 42: 440-441, 2015. 10.1111/1346-8138.12807
2. Kuwatsuka Y, Shimizu K, Akiyama Y, Koike Y, Ogawa F, Furue M, Utani A: Yusho patients show increased serum IL-17, IL-23, IL-1beta, and TNFalpha levels more than 40 years after accidental polychlorinated biphenyl poisoning. *J Immunotoxicol*, 査読有 11: 246-249, 2014. DOI: 10.3109/1547691X.2013.835890
3. Hamaguchi Y, Shirakawa T, Kuwatsuka Y, Ando S: A neonatal case of Japanese spotted fever. *Pediatr Infect Dis J*, 査読有 32: 1286-1287, 2013. DOI: 10.1097/INF.0b013e31829ee74
4. 岩永 聡, 鋤塚 大, 楊井章紀, 清水和宏, 宇谷厚志: 肝血管腫を伴った congenital multiple hemangiomatosis の1例. *日本小児皮膚科学会雑誌* 査読有 32: 177-180, 2013.
5. 浅井 幸, 鋤塚 大, 富田 元, 富村沙織, 宇谷厚志: 【強皮症およびその関連疾患】<臨床例>心筋障害を合併した全身性強皮症. *皮膚病診療* 35: 957-960, 2013.
6. 鋤塚 大, 小池雄太, 清水和宏, 宇谷厚志: 油症認定患者における IL-21, TGF- $\alpha$  の検討. *福岡医学雑誌* 査読有 104: 88-90, 2013.

7. 小池雄太, 鋤塚 大, 清水和宏, 宇谷厚志: 油症認定患者における、制御性 T 細胞産生サイトカイン IL-10, IL-35 の検討. *福岡医学雑誌* 査読有 104: 91-94, 2013.

〔学会発表〕(計26件)

1. 芦塚賢美, 鋤塚 大, 江原大輔, 小池雄太, 宇谷厚志, 村山直也: 当初粉瘤が疑われた臀部 Myxofibrosarcoma (high grade) の1例. 日本皮膚科学会第 372 回福岡地方会 今福信一皮膚科主任教授就任記念 (2015/3/14 ~ 3/15, 福岡市・ホテルニューオータニ博多)
2. Yoshimi K, Okubo Y, Ikehara S, Koike Y, Kuwatsuka Y, Utani A: A homozygous single T deletion found in the GGCX gene with PXE-like phenotypes. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (2014/12/12 ~ 12/14, 吹田市・ホテル阪急エキスポパーク)
3. Tomimura S, Nakazawa Y, Kuwatsuka S, Kuwatsuka Y, Ogi T, Utani A: Four cases of xeroderma pigmentosum diagnosed by non-radioactive system using ethynyluracil derivatives. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (2014/12/12 ~ 12/14, 吹田市・ホテル阪急エキスポパーク)
4. 根井悠里江, 福地麗雅, 佐藤之恵, 鋤塚 大, 宇谷厚志: ATL の皮疹にエキシマライトが著効した一例. 日本皮膚科学会第 324 回長崎地方会例会 (2014/12/6, 長崎市・長崎大学第 4 講義室)
5. 福地麗雅, 根井悠里江, 佐藤之恵, 鋤塚 大, 宇谷厚志, 一ノ宮 愛: 腋窩乳房外 Paget 病で肛門無疹部の皮膚生検が陽性であった1例. 日本皮膚科学会第 324 回長崎地方会例会 (2014/12/6, 長崎市・長崎大学第 4 講義室)

6. 清原龍士、池原 進、江原大輔、大久保佑美、小池雄太、田崎典子、鏝塚 大、宇谷厚志: 壊死性筋膜炎と蜂窩織炎の鑑別を要した1例. 日本皮膚科学会第324回長崎地方会例会 (2014/12/6, 長崎市・長崎大学第4講義室)
7. 吉見公佑、本多 舞、富田 元、鏝塚 大、鏝塚さやか、富村沙織、宇谷厚志: 所属リンパ節に転移した有棘細胞癌に対して、セツキシマブと放射線治療を併用した1例. 第66回日本皮膚科学会西部支部学術大会 (2014/11/8~11/9, 高松市・アルファあなぶきホール)
8. 鏝塚 大、岩永 聰、小川文秀、宇谷厚志: Angiomatoid fibrous histiocytoma を考慮した1例. 第66回日本皮膚科学会西部支部学術大会 (2014/11/8~11/9, 高松市・アルファあなぶきホール)
9. Ehara D, Yoshimi K, Kuwatsuka Y, Takenaka M, Utani A: A case of drug eruption caused by injectable ibandronate. 3rd Eastern Asia Dermatology Congress (2014/9/24 ~ 9/26, International Cnvention Center Jeju (Jeju Island, Korea))
10. K Yoshimi, Y Okubo, S Ikehara, Y Koike, Y Kuwatsuka and A Utani: A case of pseudoxanthoma elasticum like disorder with multiple coagulation deficiency. 44th Annual ESDR Meeting (2014/9/10~9/13, Tivoli Congress Center (Copenhagen, Denmark))
11. Y Koike, Y Yagi, M Yozaki, Y Okubo, K Yoshimi, Y Kuwatsuka and A Utani: Epithelial mesenchymal transition acceleration of keratinocytes at leading edge during wound healing process supplied with basic fibroblast growth factor. 44th Annual ESDR Meeting (2014/9/10~9/13, Tivoli Congress Center (Copenhagen, Denmark))
12. 清原龍士、大久保佑美、村山直也、小池雄太、鏝塚 大、富村沙織、鶴殿雅子、宇谷厚志: 乳房外 Paget 病に合併した汗管腫の一例. 日本皮膚科学会第323回長崎地方会例会 (2014/7/27, 長崎市・長崎大学病院第4講義室)
13. 吉見公佑、村山直也、本多 舞、富田 元、鏝塚 大、宇谷厚志: 皮膚原発粘液癌の1例. 第30回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会 (2014/7/4~7/5, 千代田区・学術総合センター、如水会館)
14. 鏝塚 大: 長崎地区油症患者における血清 IL-26 値の検討. 平成26年度全国油症治療研究会議 (2014/6/12~6/13, 福岡市・博多サンヒルズホテル)
15. 鏝塚 大、吉見公佑、宇谷厚志: ヒスタンジアセチラーゼ阻害剤がケロイド細胞に及ぼす遺伝子発現の検討. 第46回日本結合組織学会学術大会 第61回マトリックス研究会大会 合同学術集会 (2014/6/5~6/7, 名古屋市・ウインクあいち)
16. 本多 舞、吉見公佑、鏝塚 大、富村沙織、竹中 基、宇谷厚志: ハチアレアレルギーに対する減感作療法 当科で減感作療法を施行した11症例のまとめ . 長崎大学医学部皮膚科学教室開講100周年記念、日本皮膚科学会長崎地方会第322回例会 (2014/4/13, 長崎市・長崎大学良順会館)
17. 田崎典子、鏝塚 大、東 美智子、鏝塚さやか、宇谷厚志、鈴木貴之: 再発性多発軟骨炎、骨髄異形性症候群を合併した好中球性皮膚症の1例. 長崎大学医学部皮膚科学教室開講100周年記念、日本皮膚科学会長崎地方会第322回例会 (2014/4/13, 長崎市・長崎大学良順会館)
18. 峯 嘉子、鏝塚 大、浅井 幸、岩本直樹、谷川和好、宇谷厚志: 左足首に拍動性の腫脹生じた血管パーチエット病の1例. 日本皮膚科学会第368回福岡地方会 中山樹一郎皮膚科主任教授退官記念

- (2014/3/15, 福岡市・ホテルニューオータニ博多)
19. 本多 舞、吉見公佑、鎌塚 大、富村沙織、竹中 基、宇谷厚志、堀 眞: 当初蕁麻疹様血管炎を疑った Churg-Strauss 症候群の1例. 日本皮膚科学会第 321 回長崎地方会 (2013/12/21, 長崎市・長崎大学医学部第 4 講義室)
  20. 村山直也、富田 元、鎌塚 大、宇谷厚志: palisaded neutrophilic and granulomatous dermatitis と診断した一例. 第 65 回日本皮膚科学会西部支部学術大会 (2013/11/9 ~ 11/10, 鹿児島市・かごしま県民交流センター)
  21. 富田 元、鎌塚 大、小池雄太、浅井 幸、小川文秀、西村直樹、谷岡未樹、宇谷厚志: 分子標的薬が奏功した血管肉腫の2例. 第 65 回日本皮膚科学会西部支部学術大会 (2013/11/9 ~ 11/10, 鹿児島市・かごしま県民交流センター)
  22. 鎌塚 大、峯 嘉子、富田 元、小川文秀、宇谷厚志、古賀丈二、木下直江: Kaposiform hemangioendothelioma の1例. 第 260 回日本皮膚科学会岡山地方会 岡山大学医学部皮膚科学教室開講百周年記念地方会 (2013/9/15, 岡山市・岡山コンベンションセンター)
  23. 富田 元、鎌塚 大、小池雄太、浅井 幸、小川文秀、谷岡未樹、宇谷厚志: Pazopanib が著効した血管肉腫の1例. 第 29 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会 (2013/8/9 ~ 8/11, 甲府市・甲府富士屋ホテル)
  24. 鎌塚 大: 油症患者血清中の Heat shock protein 27 の検討. 平成 25 年度全国油症治療研究会議(2013/6/ 20 ~ 6/21, 福岡市・ホテルレガロ福岡)
  25. 池原 進、鎌塚 大、宇谷厚志、松井昂介、齋藤信夫: 結核性リンパ節炎に合併した結節性血管炎の一例. 第 112 回日本皮膚科学会総会 (2013/6/14 ~ 6/16, 横浜市・パシフィコ横浜)
  26. 宇谷厚志、 峯 嘉子、鎌塚 大、小池雄太: 油症認定患者血清における可溶性 CTLA-4 の測定. 長崎油症研究会議 (2013/6/6, 長崎市・ベストウェスタンプレミアホテル長崎)
- 6 . 研究組織
- (1)研究代表者
- 鎌塚 大 (KUWATSUKA, Yutaka)
- 長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教
- 研究者番号 : 90437864