

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861701

研究課題名(和文)線維芽細胞亜集団の形質転換による新しい癒痕治療の開発

研究課題名(英文)Differences in subpopulations of dermal fibroblasts

研究代表者

中山 玲玲(Nakayama, Rerei)

杏林大学・医学部・その他

研究者番号：50584801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：損傷後の治癒過程で重要な調整的役割を持つ皮膚線維芽細胞は、不均一な多機能細胞集団であり、真皮内の局在(浅層または深層)により性質が異なることはこれまでも報告してきた。真皮深層の線維芽細胞は浅層の細胞と比べて癒痕化に強く関わると考えられ、その相違の詳細が判明すれば新しい癒痕治療につながる。本研究では、マイクロアレイ解析で浅層細胞と深層細胞の遺伝子発現を包括的に比較解析した。19638遺伝子中692遺伝子に有意な発現差を認め、TGF- β を中心としたシグナル伝達経路に大きな違いが指摘された。また代表的な線維化関連遺伝子以外にも発現が大きく因子としてのPI16、APCDD1などをあげることができた。

研究成果の概要(英文)：Fibroblasts, which consist of many subpopulations with different functions, play important roles in the healing process after tissue injury. It has been suggested that fibroblasts located in deep layer (DF) of dermis are involved more deeply in tissue fibrosis than fibroblasts located in superficial layer (SF) of dermis. In this study, we made a comprehensive evaluation of the difference between DFs and SFs with microarray analysis. In the result, 692 were selected as differentially expressed genes out of a total of 19638 genes. Some signaling pathways such as TGF- β were detected to differ between SFs and DFs. Furthermore, new finding is that PI16 and APCDD1 were most significantly differentially expressed genes in SFs versus DFs.

研究分野：癒痕

キーワード：皮膚線維芽細胞 癒痕

1. 研究開始当初の背景

皮膚線維芽細胞は損傷後の治癒過程で重要な調整的役割を持つ。極めて不均一な多機能細胞集団であり、体の部位により、または真皮内の深さ(浅層:乳頭層、深層:網状層)により線維芽細胞の性質が異なることは以前より周知されている。我々の研究室でも、顔面と体幹からそれぞれ採取した皮膚線維芽細胞を比較し、顔面の線維芽細胞はⅠ型およびⅡ型コラーゲンやフィブロネクチン、TGF- β 1と-3、CTGF(connective tissue growth factor)という profibrotic factor の mRNA 発現が低く、TGF- β 2 の mRNA 発現が高いことを報告した [Kurita M, et al., Connective tissue research, 2012;53(5):349]。また真皮浅層と深層のそれぞれから線維芽細胞を採取し、浅層由来線維芽細胞は深層由来線維芽細胞と比較して、培養するとサイズが小さく、培養ディッシュ内で細胞密度が高くなり、増殖速度が早いこと、遺伝子発現をみると深層線維芽細胞は浅層線維芽細胞よりもⅠ型およびⅡ型コラーゲンやフィブロネクチン、TGF- β 1と-3、CTGF の mRNA 発現が高く、TGF- β 2 の mRNA 発現が低い事を証明した [Kaminishi-Tanikawa A, et al., J Plast Surg Hand Surg, 2011;45:219-225]。

真皮を5層に分けて調べた実験から、真皮深層から採取した線維芽細胞は浅層由来線維芽細胞と比べて profibrotic factor の発現が多く、肥厚性瘢痕から採取した線維芽細胞に近いことが報告されている [Wang J, et al., Laboratory Investigation, 2008;88:1278-1290]。真皮深層の線維芽細胞が瘢痕化に強く関わることは、豚を用いた熱

傷モデルで、真皮浅層までの熱傷(SDB)がほとんど瘢痕化せず治癒するのに対して真皮深層に至る熱傷(DDB)では肥厚性瘢痕を生じる事からも示唆されている [Cuttle L, et al., Burns, 2006;32:806-820]。

以上から、皮膚線維芽細胞の違いが、そこに生じる瘢痕状態に何らかの影響を与えていると考えられる。しかし浅層線維芽細胞と深層線維芽細胞の機能的相違の可能性は報告されているものの、それを決定するものが何であるのかは、明らかになっていない。

2. 研究の目的

瘢痕形成への関与が異なる線維芽細胞亜集団(浅層由来線維芽細胞と深層由来線維芽細胞)の遺伝子発現を包括的に比較解析することで、各細胞集団のマーカーとなる蛋白や、機能的相違の決定に影響する因子をみつけることを目的とする。その結果から、遺伝子介入などで細胞の機能的性質を操作して効果的な瘢痕治療につなげる事を最終的な目標とする。

3. 研究の方法

<細胞採取と培養>

インフォームドコンセントのもと、4症例の形成外科手術時に除去された小範囲の非病変皮膚を用いた。皮下組織を除いた後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で3回洗浄し、顕微鏡下にメスおよびはさみで表面および裏面からそれぞれ皮膚の一部を採取し、それぞれ浅層真皮、深層真皮として線維芽細胞採取を行った。4下に16~24時間、0.25%トリプシンと反応させ、表皮を除去した。それぞれの真皮標本をエクスプラントとして培養

ディッシュにおき、線維芽細胞増殖培地（ダルベッコ変法イーグル培地，10%FCS，0.6mg/ml グルタミン）で 37 5%CO₂ インキュベーターで培養した。3週後に継代し、2-5 継代の線維芽細胞を実験解析に用いた。

<マイクロアレイ解析>

浅層由来線維芽細胞と深層由来線維芽細胞のそれぞれの培養ディッシュから、DNase と QIA シュレッダー（いずれも QIAGEN）を用いて Total RNA を抽出し、Ambion WT expression kit (Affimetrix)を用いて complimentary DNA を調整後、Ambion WT terminal labeling kit (Affimetrix)で cDNA の細分化とラベル化を行った。次に GeneChip Human Gene 1.0 ST Array chips にハイブリダイズし、チップを GeneChip Scanner 3000 7G system でスキャンした。

<リアルタイム RT-PCR>

上記と同様に抽出した Total RNA を High capacity RNA-to-cDNA kit で逆転写し、FAST SYBR Green Master Mix を使って遺伝子発現を解析した（すべて Applied Biosystems）。リファレンス遺伝子として GAPDH を用いた。

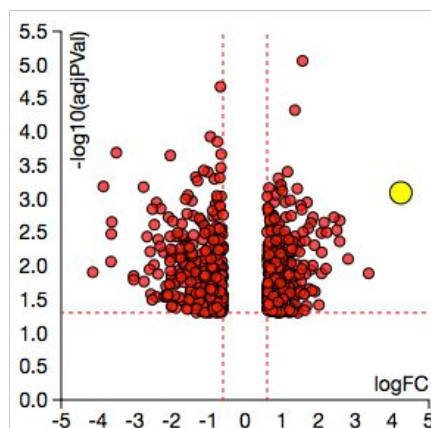
4 . 研究成果

それぞれのサンプルから、浅層由来線維芽細胞(Superficial fibroblast; SF)および深層由来線維芽細胞(Deep fibroblast; DF)を採取し、継代して細胞数を増やす事が出来た。SF は DF と比較して細胞のサイズが小さく増殖速度が早いことを確認した。

またリアルタイム RT-PCR で、SF は Anti-fibrotic factor(collagenase など)の発現が高い一方、DF は Pro-fibrotic factor (型 型 collagen, fibronectin, TGF- ,

CTCF など)の発現が高いという結果であることを確かめた。

マイクロアレイ解析で発現が測定できた 19638 遺伝子の中で、SF と DF とで有意に発現に差があったのは 692 遺伝子だった。



SF と DF の RNA 発現が最も異なる因子は、DF の発現が多いのは peptidase inhibitor 16 (PI16), SF の発現が多いのは adenomatous polyposis coli down-regulated 1 (APCDD1) であった。リアルタイム RT-PCR で、PI16 は DF が SF の 350 倍、APCDD1 は SF が DF の 91 倍であることを確認した。

また pathway 解析で、TGF- シグナル伝達経路に大きな相違を認めた。

これまでの研究で、線維芽細胞の中の異なる亜集団である SF と DF は、遺伝子発現の一部に大きな相違点があり、それが機能的役割の違いに結びついていることが示唆された。また包括的な解析を行った事で、代表的な線維化・癒痕関連遺伝子以外に大きな発現相違のある遺伝子を指摘する事ができた。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中山玲玲 (Nakayama Rerei)

杏林大学・医学部・形成外科・医員

研究者番号：50584801