

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 13 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670777

研究課題名(和文)細胞外基質の硬度が癬痕・ケロイドの発生に関与していることの証明

研究課題名(英文)Contribution of stiffness of extracellular matrix to pathogenesis of keloid

研究代表者

去川 俊二 (Sarukawa, Shunji)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：90324194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚線維芽細胞を硬度可変ディッシュ上で培養し、機械的刺激に対する細胞の知覚・変換因子であるYAPの細胞内分布を観察した結果、硬いディッシュ上ではYAPが核内移行を起こし、軟らかいディッシュ上ではYAPが細胞質に存在することを示した。

ヒト検体を用いた免疫組織化学染色により、ケロイドにおいてYAPの核内移行が高発現していることを示した。硬いディッシュ上における培養条件において、ケロイド由来線維芽細胞の方が白色癬痕由来線維芽細胞・正常皮膚由来線維芽細胞よりも細胞外基質の遺伝子発現が高かった。

研究成果の概要(英文)： We assayed subcellular localization of YAP, which was recently identified as a sensor and a mediator of mechanical signals, in human dermal fibroblasts grown on collagen-type 1 coated-hydrogels on varying stiffness, and confirmed YAP was nuclear on hard substrates but became predominantly cytoplasmic on soft substrates.

We identified nuclear translocation of YAP in human keloids but not normal white scars and normal skins with immunohistochemical staining.

Gene expressions of extracellular matrix on hard substrates were higher in keloid-derived fibroblasts than white scar-derived fibroblasts and normal skin-derived fibroblasts.

研究分野：形成外科学

キーワード：メカノトランスダクション

1. 研究開始当初の背景

生体や細胞において機械刺激が化学信号に変換される「メカノトランスダクション」は、ズリ応力（血管内皮細胞）、伸展刺激（肺/腱線維芽細胞）、圧力（骨・軟骨）など、様々な力学的刺激によって引き起こされる。近年、細胞の足場の硬度によって、細胞の形質や分化の方向が大きく変化することが報告されている。

ケロイド・肥厚性癬痕が皮膚の緊張が強い部位に発生しやすいことから、皮膚伸展刺激によるメカノトランスダクションが癬痕形成に関与していることは明らかであるが、細胞外基質の硬度が癬痕・ケロイドに及ぼす影響に関しては報告がない。しかし、がん関連線維芽細胞（CAFs: Cancer-associated fibroblasts）では、細胞外基質の硬さの positive feedback により細胞外基質が remodeling され、CAFs の形質が維持されているという直近の報告から、癬痕・ケロイドでも同様の現象が起きている可能性が大いにあると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、**細胞外基質の硬度が癬痕・ケロイドの病態に関与している**という仮説のもとに、細胞の足場の硬度が線維芽細胞に与える影響について分子生物学的な解析を行うことである。具体的には、正常皮膚・ケロイド由来線維芽細胞をそれぞれ硬度の異なる細胞外基質上で培養し、遺伝子発現量の変化を解析することにより硬度感受性の遺伝子を同定する。また、近年細胞内のメカノトランスデューサーとして同定された YAP の細胞

内局在を、硬度可変ディッシュ上の培養細胞とケロイド・白色癬痕・正常皮膚において観察する。

3. 研究の方法

ヒト検体の初代培養より得たケロイド由来皮膚線維芽細胞（以下KeF）と白色癬痕由来皮膚線維芽細胞（以下WSF）それぞれ10株ずつを研究に用いた。まず予備実験として、Ⅰ型コラーゲンにてコーティングされた硬度可変ハイドロゲルディッシュにおける皮膚線維芽細胞の培養条件を検討した。0.5, 1, 5, 10, 50kPaのディッシュ上にてKeFとWSFを培養して、播種する細胞数と培養期間を決定した。

続いて、KeFとWSFをそれぞれ硬度2kPaと50kPaのハイドロゲル上で1週間培養した後、RNAを抽出し、qRT-PCRにてⅠ型コラーゲンの遺伝子発現を解析した。しかし、KeFとWSFにおける遺伝子発現に一定の傾向を認めることが出来なかった。そこで、用いているKeFとWSFを通常のディッシュ上にて継代した上で、Ⅰ型コラーゲンの遺伝子発現をqRT-PCRにて解析した。すると、KeFの中にもWSFと同等のⅠ型コラーゲンの発現しか認めない株が存在した。これはケロイド由来線維芽細胞のheterogeneityが原因、すなわち初代培養の過程においてケロイドの形質を有しない線維芽細胞が選択的に増殖してしまったためと考えられた。そこで、保有している全ての細胞株についてⅠ型コラーゲンの発現を解析し、発現が特に高いKeF5株と発現が低いWSF5株を以下の実験に用いることとした。

選別したKeFとWSFそれぞれ5株ずつを、硬度2kPa, 50kPaのハイドロゲ

ルディッシュと通常のディッシュ (GigaPa) で1週間培養した後、RNAを抽出し、qRT-PCRにて型コラーゲン、型コラーゲン、ファイブロネクチンの遺伝子発現を解析した。その結果、KeFの方が足場の硬度に対してより sensitive であることがわかった。

続いて足場の硬さに反応して核内移行し、タンパク質の転写の引き金となる YAP について、免疫蛍光染色を行った。その結果、50kPa のハイドロゲル上で培養した細胞において有意に YAP の核内移行が認められた。さらに、ケロイド・正常癒痕の検体を用いて YAP の免疫組織化学染色を行った。その結果、ケロイド検体において YAP の核内移行率が有意に高く、ケロイドが細胞外基質硬度の positive feedback によって硬さを増している可能性が示された。

4. 研究成果

ケロイド由来線維芽細胞では、足場の硬度に依存して、YAP の核内移行が起こり細胞外基質の発現が増すことが示され、ケロイドが細胞外基質硬度の positive feedback によって硬さを増している可能性が示された。

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)

須永中、菅原康志、宇田宏一、去川俊二、桂木容子、宮崎邦夫、加持秀明 異常癒痕の病理組織像についての再検討～不均一性についての考察

第57回日本形成外科学会総会・学術集会、2014/04/09、長崎

須永中、菅原康志、宇田宏一、去川俊二、加持秀明、阿部周作、山本崇弘： Cre-loxPシステムを用いた皮膚創傷治癒における細胞の運命追跡、第23回日本形成外科学会総会基礎学術集会、2014/10/09、松本

須永中、菅原康志、宇田宏一、去川俊二、加持秀明、阿部周作、山本崇弘： Cre-loxPシステムを用いた皮膚創傷治癒における細胞の運命追跡、第44回日本創傷治癒学会、2014/12/02、仙台

須永中、菅原康志、宇田宏一、去川俊二、加持秀明、阿部周作、朝日林太郎： Lineage tracingを用いたインプラント被膜形成機構の解明、第24回日本形成外科学会総会基礎学術集会、2015/10/08、盛岡

[図書](計 0 件)

[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

6．研究組織

(1)研究代表者

去川俊二 (Sarukawa Shunji)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：90324194

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：