

令和元年6月18日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17019

研究課題名(和文)ケロイド・肥厚性瘢痕由来細胞への繰り返し伸展刺激による細胞内シグナルの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the intracellular signal due to the repetition stretch stimulation to cells derived from keloid and hypertrophic scar

研究代表者

峯田 一秀(MINEDA, Kazuhide)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教

研究者番号：70747815

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)：ケロイド由来線維芽細胞(K-FBs)と正常皮膚由来線維芽細胞(N-FBs)に対して、繰り返しストレッチ刺激を付与し、共焦点顕微鏡下で細胞内カルシウムイオン濃度をリアルタイム観察した。N-FBs群(約7%)と比較し、K-FBs群(約20%)で細胞応答率が有意に高く、ストレッチ刺激に対する易感受性を認めた。細胞内カルシウムイオン濃度は、ピーク後にnegative feedbackによる調整がみられた。ピーク値を比較すると、K-FBsが有意に高く、N-FBsを正常応答と仮定した場合、ROC解析によるカットオフ値は1.77であり、KFBs中の約13%で病的応答を示す細胞集団が存在すると推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題で、ケロイド由来線維芽細胞は繰り返しストレッチ刺激に易感受性であり、約13%に細胞内カルシウムイオン濃度の過剰な上昇を伴う病的応答が確認された。我々は、この病的応答を示す細胞集団がケロイド体質特有のものであると推察しており、原因として、小胞体-細胞質間の細胞内カルシウムイオン濃度調節機構の機能異常でないかと考えている。今後、細胞内カルシウムイオン濃度を調節している小胞体膜上のカルシウムポンプ/チャネルについて検証し、ケロイド体質の解明を目指す。

研究成果の概要(英文)：For fibroblasts derived from keloid (K-FBs) and fibroblasts derived from normal skin(N-FBs), we gave stretching stimulation repeatedly and observed intracellular calcium ion concentration under the confocal microscope in real time. The cellular response rate of K-FBs groups was significantly high in comparison with the N-FBs groups (approximately 7%), and K-FBs groups (approximately 20%) showed high sensitivity for the stretching stimulation. The intracellular calcium ion concentration had the adjustment by negative feedback after the peak. When K-FBs was significantly high and supposed N-FBs to compare the peak value with the normal response, the cutoff value by the ROC analysis was 1.77, and it was speculated that the cell population indicating the pathologic response was present in approximately 13% in K-FBs.

研究分野：形成外科

キーワード：ケロイド カルシウムシグナル応答 ストレッチ刺激 カルシウムイオン 病的応答

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)ケロイド・肥厚性癬痕の成因として、病変部における力学的刺激が注目されており、既存の伸展刺激装置を用いて、様々な研究が行われている。しかしながら、既存の伸展刺激装置では、細胞に対する伸展刺激前後の細胞骨格などの静的観察、もしくはmRNA やタンパク質の解析などが主流である。大型の伸展刺激装置では、繰り返し伸展刺激に対する個細胞あたりの動的観察は困難であり、ケロイド・肥厚性癬痕に関連した力学的刺激に対する線維芽細胞・表皮角化細胞の動態変化(細胞感受性など)については未知なところが多い。

(2)我々は、徳島大学理工学部の佐藤らが特許を取得している細胞伸展マイクロデバイスに注目した(特許番号：特許第 4931017 号,発明者：佐藤克也,南和幸)。このデバイスは、ストレッチシート両端のアームをマイクロマニピュレーターを用いて、最大 20%まで伸展させることができ、接着細胞に対して繰り返し伸展刺激を加えることが可能である。また、培養皿ごと共焦点レーザー顕微鏡下に設置できるため、同一細胞のタイムラプス観察が行える。佐藤らは、骨芽細胞に焦点をあて、蛍光標識させたカルシウムイオンやアクチンファイバーの動的観察を行い、カルシウムシグナルやアクチン細胞骨格の動態変化の解析を行っている(Sato K at al.Strain magnitude dependent intracellular calcium signaling response to uniaxial stretch in osteoblastic cells.JBSE, Vol.10,No.3,2015)。

(3)このマイクロデバイスは、接着性細胞であれば骨芽細胞以外にも応用可能であるため、真皮線維芽細胞に応用することに着想し、徳島大学内で医工連携研究を始めることになった。

2. 研究の目的

正常皮膚由来線維芽細胞とケロイド由来線維芽細胞に繰り返しストレッチ刺激を与え、細胞内カルシウムイオン濃度のリアルタイム観察をした結果、カルシウムシグナル伝達について比較検証を行うことが目的である。

3. 研究の方法

(1)正常皮膚由来線維芽細胞とケロイド由来線維芽細胞の確保

徳島大学病院倫理審査委員会から承認された本研究課題に対する同意を得て、切除したケロイド組織と正常皮膚から線維芽細胞を explant 法で培養し、P2~3 で凍結保存した。

(2)細胞伸展の前準備

35mm dish に組み込まれた細胞伸展マイクロデバイス上に、正常皮膚由来線維芽細胞(N-FBs)もしくはケロイド由来線維芽細胞(K-FBs)を 5×10^4 cells/dish で播種する。フィブロネクチンでコーティングしたストレッチシートに接着させるため、インキュベーター内で overnight させる(5%CO₂,37℃)。そして、カルシウムイオンを可視化するため、カルシウム蛍光指示薬(Fluo8H)と細胞質染色薬(Calcein Red Orange)を反応させる。

(3)細胞伸展マイクロデバイスのセッティング

共焦点レーザー顕微鏡下で、プログラミングされた伸展装置にマイクロデバイスを設置する。マイクロマニピュレーターに接続した金属針をアーム端部に引っ掛けて、ストレッチシートを引っ張るといった原理である。

(4)繰り返し伸展刺激と蛍光撮影の設定

呼吸性変動を伴う胸郭の動きを仮想して、伸展回数は 12 回/分、伸展強度(ひずみ量)は 10% に設定した。一周期は、吸気期(伸展開始)：呼気期(解除)：休止期 = 1 : 1.5 : 1 でプログラムした(図 1)。補正のベースラインのために 30 秒待機させた後、4 分 30 秒のストレッチ刺激を付加しながら、0.5 秒間隔で合計 5 分間の連続撮影を行った。

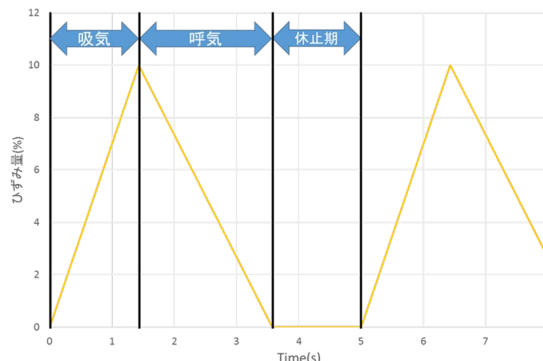


図 1. 細胞に与えるひずみ波形

(5)細胞内カルシウムイオン濃度の変化

細胞内カルシウムイオン濃度の変化を測定する細胞に ROI(Region of Interest)を設定し、プラグイン(Ratio Profiler)を使用して、ROI 内の経時的カルシウムイオン濃度を計測した(図 2)。Fluo8H の輝度値を Calcein Red Orange の輝度値で除算した蛍光輝度比を算出した。蛍光輝度比の上昇率が 10%以上かつ凸を示す細胞をカルシウムシグナル応答(+)と定義した。

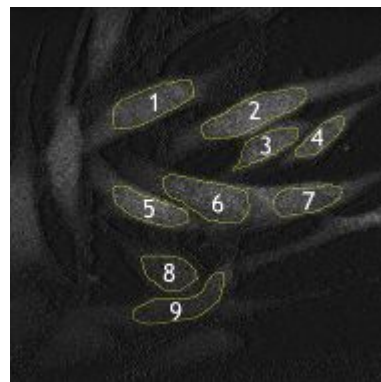


図 2 . ROI 画像

4 . 研究成果

(1)細胞内カルシウムイオン濃度の動態変化

上述の蛍光輝度比をヒートマップ化することで、細胞内カルシウムイオンの濃度変化をダイナミックに観察できるようになった(図 3)。

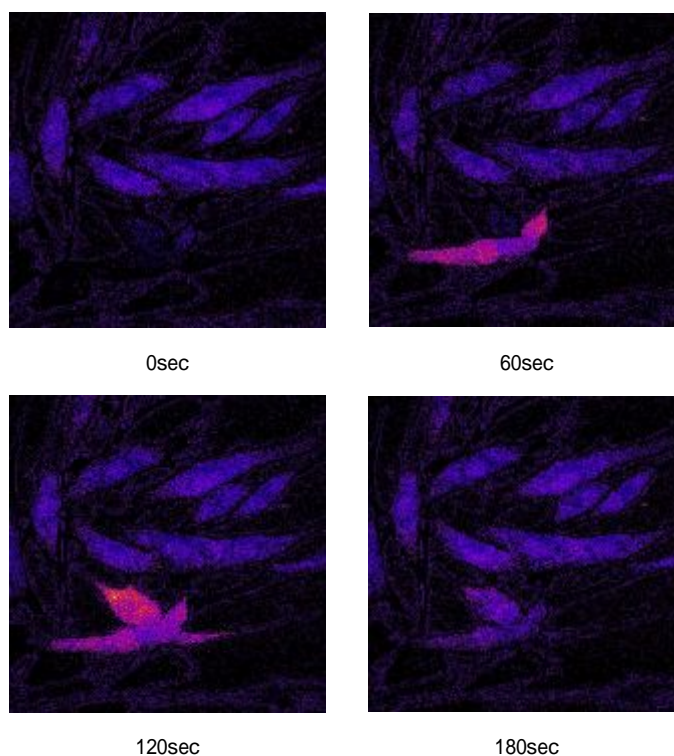
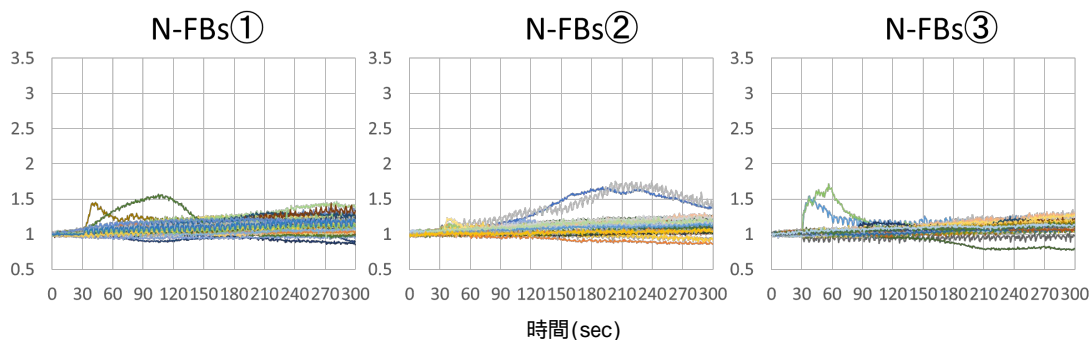


図 3. 蛍光輝度比のヒートマップ

(2)繰り返しストレッチ刺激に対する N-FBs と K-FBs の結果

N-FBs 群と K-FBs 群ともそれぞれ 3 献体ずつ観察し、蛍光輝度比の変化をグラフにした(図 4)。それぞれ N-FBs 群内または K-FBs 群内における有意差はなかった。



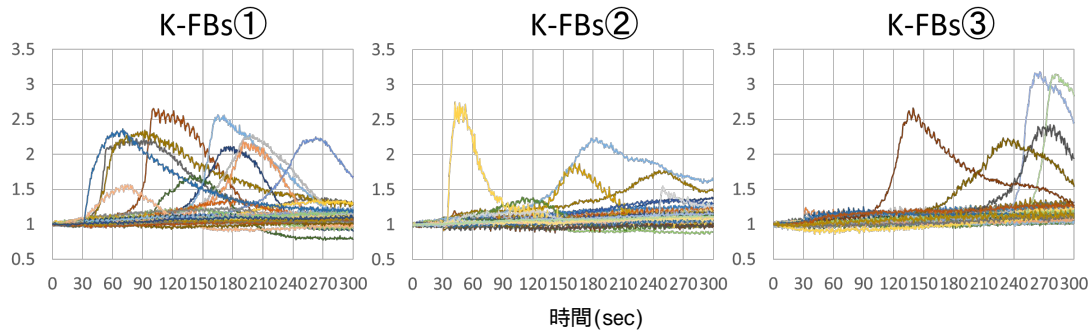


図4. 細胞内カルシウムイオン濃度の経時的変化

(3)細胞応答率と輝度比のピーク値、細胞応答のカットオフ値

細胞応答率に関して、N-FBs 群($6.90 \pm 2.4\%$)と比較し、K-FBs 群($20.0 \pm 6.0\%$)では、有意に細胞応答率が高値であった(図 5a)。従って、K-FBs 群ではストレッチ刺激に対する感受性が高いと推察した。蛍光輝度比に関して、細胞応答がみられたすべての細胞で、それぞれピーク値に達した後、negative feedback によって、細胞内カルシウム濃度が調整された。しかし、ピーク値を比較すると、N-FBs($1.45 \pm 0.30\%$)と比べて、K-FBs($2.16 \pm 1.02\%$)では、細胞内カルシウム濃度のピーク値が有意に高く、K-FBs 中に病的なカルシウムシグナル応答を起こす集団が存在すると推察した(図 5b)。N-FBs を正常なカルシウムシグナル応答と仮定した場合、ROC 解析で割り出したカットオフ値は 1.77 であった(図 5c)。K-FBs 群でカットオフ値を超える細胞は、約 13% 存在し、病的応答であると推察された。

我々は、病的応答の原因が小胞体-細胞質間の細胞内カルシウムイオン濃度調節機構の機能異常でないかと考えている。今後、細胞内カルシウムイオン濃度を調節している小胞体膜上のカルシウムポンプ/チャネルについて検証していく予定である。

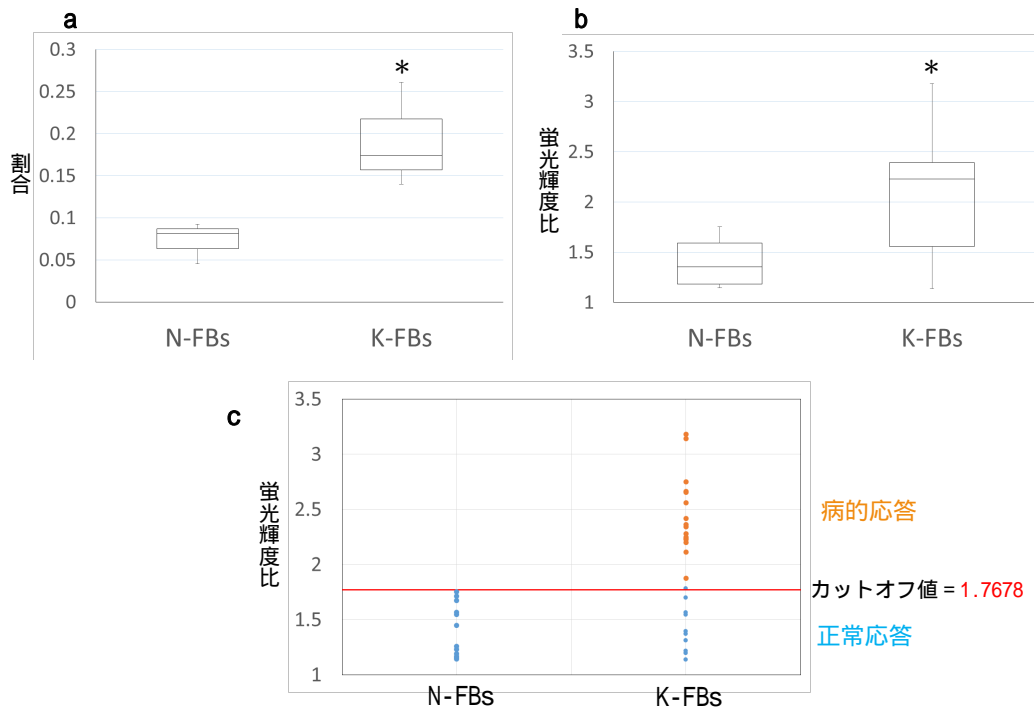


図5. 細胞応答率、ピーク値、カットオフ値について(* : $P < 0.05$)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Abe Y, Hashimoto I, Ishida S, Mineda K, 他1名4番目. The perifascial areolar tissue and negative pressure wound therapy for one-stage skin grafting on exposed bone and tendon. J Med Invest.65(1.2):96-102:2018. doi:10.2152/jmi.65.96. 査読有

Abe Y, Kashiwagi K, Ishida S, Mineda K, 他2名4番目. Risk factors for delayed healing at the free anterolateral thigh flap donor site. Arch Plast Surg.Jan;45(1):51-57:2018. doi:10.5999/aps.2017.00563. 査読有

Kanayama K, Mineda K, 他6名2番目. Blood Congestion Can Be Rescued by Hemodilution in a Random Pattern Skin Flap. Plast Reconstr Surg. 139(2):365-74:2017. doi:10.1097/PRS.0000000000002935. 査読有

Feng J, Mineda K, 他 9 名 2 番目. An injectable non-cross-linked hyaluronic-acid gel containing therapeutic spheroids of human adipose-derived stem cells. SCIENTIFIC REPORTS. 7:1548:2017. doi:10.1038/s41598-017-01528-3. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

三宅 嶺, 今川 尊稔, 須谷 和弘, 峯田 一秀, 他 : ステロイド剤投与によるケロイド由来線維芽細胞のストレッチ刺激に対する感受性抑制の可能性についての検討, 日本機械学会中国四国学生会 第 49 回学生員卒業研究発表講演会. 2019 年 3 月.

峯田一秀. ケロイド由来線維芽細胞における繰り返しストレッチ刺激に起因したカルシウムシグナル応答の検討. 第 27 回日本形成外科学会基礎学術集会. 2018 年 10 月 18~19 日; 東京.

今川 尊稔, 須谷 和弘, 峯田 一秀, 他 : 持続的な繰り返しストレッチ刺激に対する真皮線維芽細胞の Ca²⁺シグナル応答, 第 29 回バイオフィロンティア講演会. 2018 年 10 月.

須谷 和弘, 峯田 一秀, 他 : 前胸部ストレッチを模擬した刺激に対する正常およびケロイド線維芽細胞の刺激感受性の違い, 第 29 回バイオフィロンティア講演. 2018 年 10 月.

峯田一秀. 繰り返しストレッチ刺激を契機としたヒト線維芽細胞におけるカルシウムシグナル応答の検討. 第 47 回日本創傷治癒学会. 2017 年 11 月 27~28 日; 京都.

須谷和弘. 呼吸を模擬したストレッチ付与に対する線維芽細胞の応答評価. 日本機械学会 第 28 回バイオフィロンティア講演会. 2017 年 10 月 28~29 日; 徳島.

〔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) 研究協力者

研究協力者氏名: 佐藤 克也

ローマ字氏名: (SATO, Katsuya)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。