

平成 22年 5月 16日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19592068

研究課題名 (和文) 創面でのデュロタキシス依存性細胞移動がケロイド発症に及ぼす影響

研究課題名 (英文) Effect of durotaxis-dependent cell movement in wound on development of keloid

研究代表者

吉本 信也 (YOSHIMOTO SHINYA)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：90220748

研究成果の概要 (和文)：

ケロイドは難治性の皮膚肉芽腫であり、過剰な細胞外マトリックスの蓄積や、線維芽細胞の増殖により特徴付けられる異常な創傷治癒の形態である。また、創傷部位を越えて浸潤・進展することにより、腫瘍性の増殖としても捉えられている。創傷治癒過程におけるサイトカイン等の関与については多くの議論がなされているが、ケロイド発症の病因は不明のままであり、このような過剰増殖性瘢痕の治療・予防法の確立は、形成外科領域において緊急かつ重要な課題である。病因を解明する一つのヒントとして、創傷治癒過程における細胞の異常増殖、浸潤及び進展が起こるといふ点が上げられる。また、それに伴う細胞外基質の不整な蓄積が見出されている。ケロイドはメカニカルストレスを受けやすい前胸部や関節部などの部位に好発することが示唆されている。我々は伸展培養装置 NC-500 を使用し、コラーゲンコートシリコン膜上で創傷治癒モデルを用いたケロイド線維芽細胞の創面の埋まり方を観察したところ、伸展方向と創面の方向が垂直な場合と水平な場合で差異がみられた。デュロタキシスは細胞の接着、移動と関与するため、我々が以前より着目していたテトラスパニンウェブ関連分子の創面における細胞接着、移動への関与を調べたところ、テトラスパニンウェブ関連分子の CD151、EWI-F の SiRNA ノックダウンにて、細胞接着能の低下がみられた。ケロイド由来繊維芽細胞、正常皮膚繊維芽細胞に比べて、表皮角化細胞への影響が大きく、以上の結果より、テトラスパニン関連分子がケロイド繊維芽細胞に与える影響は非常に少ないが、表皮細胞においては細胞接着能に影響を与えていることが考えられ、皮膚創傷治癒に大きく関連した分子である可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Keloids are skin fibrotic conditions that can be caused by minor insults to skin, such as acne or ear piercing, or by severe injuries such as burns. Keloids are characterized by an overabundant deposition of extra-cellular matrix such as collagen, and their histologic morphology has a characteristic manner. Keloid occurs more often on chest, shoulder or elbow-joint etc. which is easily affected by mechanical stretch. So we consider that the response to mechanical stress of fibroblast derived from Keloid may be different from that of normal skin fibroblast. We analyzed the sensitivity to mechanical stress using cell stretch apparatus (NC-500) which has silicon chambers on which the fibroblasts are cultured and scratched (We called wound repair scratch model). We found that wound repair is deffernted vertical and horizontary scratch. Furthermore knockdown of CD151 and EWI-F tetraspanin web moles induced detachment of cells from a culture apparatus.

This effect is higher in keratinocytes than in keroid fibroblasts and normal fibroblasts. Therefore, we suggest that tetraspanin web moles affect skin wound healing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

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：創傷治癒学 ケロイド

1. 研究開始当初の背景

ケロイドは形成外科領域において、未だ難治性の皮膚肉芽腫病変であり、その発症メカニズムに関しては、未だ示されていない。これまで様々な基礎的研究が行われているが、われわれは以前よりケロイド発症の分子メカニズムの解明を、メカニカルストレスを中心として行ってきた。今回の研究は、デュロタキシスという新しい観点から、ケロイド発症のメカニズムを捉えようとした。

2. 研究の目的

ケロイドは、未だ難治性の皮膚肉芽腫であり、過剰な細胞外マトリックスの蓄積や、繊維芽細胞の増殖により特徴付けられる異常な創傷治癒の形態である。ケロイド発症のメカニズムとしては遺伝的因子、サイトカインの分泌および感受性制御、細胞外マトリックス構築の制御等様々な問題が予想されているが未だ明確なメカニズムは示されていない。病因を解明する一つのヒントとして、創傷治癒課程における細部の異常増殖、浸潤および進展が起こるという点が上げられる。また、それに伴う細胞外基質の不整な蓄積が見出されている。この結果、ケロイドは柔軟性に乏しい組織となり、正常組織に浸潤することで機能的または形態的な問題を惹起している。さらに重要な別の特徴として、ケロイドはメカニカルストレスを受けやすい前胸部や関節部などの部位に好発することが指摘されている。我々はこの点に着目し、進展培養装置 NC-500 を使用し、コラーゲンコートシリコン膜上でのケロイド繊維芽細胞のメカニカルストレス感受性とそのシグナル伝達経路について解析してきた。この結果、ケロイド繊維芽細胞と正常繊維芽細胞とでシグナル伝達を担う MAP キナーゼの活性化パ

ターンの違いを見出した(2003)。また、ケロイド繊維芽細胞では正常繊維芽細胞に比べてメカニカルストレス負荷後のコラーゲンおよび TGF- β の mRNA 発現量が多いことを確認した(2004)。これらの結果はケロイド繊維芽細胞が正常皮膚組織由来の繊維芽細胞とシグナル伝達経路において質的に異なる状態であることを示唆している。また、メカニカルストレスがケロイドの特徴を発現させる因子である可能性を示している。さらに正常細胞とケロイド由来細胞との機械的刺激に対する遺伝子変動の比較を cDNA マイクロアレイを用いて網羅的に行った結果、膜蛋白、細胞骨格に関する遺伝子変動に差がみられた。この研究過程で、伸展刺激が足場の変動と細胞が接着斑などに存在する分子を介して検知し、誘導されると予想された。これに類似した現象として細胞が足場の強度を認識し、より安定性の高い固い足場へと移動するというデュロタキシスという現象が発表されている(Chun-Min Lo ら、2000年)。ケロイドはコラーゲンなどの蓄積により形成された組織で固く安定した組織である。従ってケロイド組織が足場を提供している可能性があり、デュロタキシスがケロイドの重要な特徴である浸潤および進展に関与することが考えられた。従って今回我々はデュロタキシス依存性細胞移動がケロイド発症にどのように関わってくるのかについて、研究を行い、デュロタキシス依存性の細胞移動の分子メカニズムの解析およびケロイド細胞および正常の皮膚構成細胞のデュロタキシス依存性細胞移動の特長の違いを明らかにすることをその研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) 伸展培養装置 NC-500 を用いたケロイド由来皮膚線維芽細胞のメカニカルストレス負荷実験 (In vitro 創傷治癒モデルによる)

コラーゲンを足場とした伸縮性シリコンチャンパー上に、ケロイド由来線維芽細胞、および正常線維芽細胞を播種し、1 日間において細胞接着させた後、周期的伸展刺激を行い、その細胞形態や、移動、配列を計時的に観察した。さらに、細胞接着後に、シリコンチャンパー上をスクラッチした仮の創傷治癒モデルを用いて、創面での細胞の這い出し、埋まり方を計時的に観察した。さらに伸展刺激に対して遺伝子発現、タンパク分子の発現の変化があるかどうかを調べるため RT-PCR およびウエスタンブロット法を用いて、候補となる遺伝子、タンパク質を解析した。

(2) テトラスパニンウェブ関連タンパクがケロイド由来線維芽細胞や皮膚構成細胞の接着・運動に与える影響の解析

これまでの我々の研究において、テトラスパニン web 構成分子が細胞の接着を介して伸展刺激に関与する可能性が考えられた。そこでテトラスパニンウェブ構成分子の候補として、CD9, CD81, CD151, EWI-2, EWI-F、および、接着分子として知られている integrin $\alpha 3$, $\beta 1$, $\alpha 6$, $\beta 4$ の 9 遺伝子に関して、SiRNA ノックダウンを行い、通常の播種および、スクラッチ創の 2 種類で創面への細胞の移動や細胞間の接着を観察した。ケロイド細胞以外の比較として、正常皮膚線維芽細胞、正常皮膚表皮角化細胞、*HeLa* 細胞を用いた。

4. 研究成果

(1) ケロイド由来線維芽細胞における伸展メカニカルストレス負荷時の細胞への影響

周期的伸展負荷をかけることによって、ケロイド由来線維芽細胞、正常線維芽細胞ともに、時間経過とともに伸展のベクトル方向と垂直に細胞が配列していくことが明らかとなった。また、シリコン膜上の培養細胞シートに伸展方向に垂直、または平行にスクラッチした創傷治癒モデルにおいて、24 時間後に平行にスクラッチしたものは創が細胞で充填されたが、垂直にスクラッチしたものは、創面への細胞が充填されず、欠損部位が残存していた。さらに、MEK 分子の発現量が伸展方向に対するスクラッチの方向 (垂直と水平) で差がみられた。

(2) テトラスパニンウェブ関連分子が細胞接着に与える影響

テトラスパニン関連分子の siRNA ノックダウンを行ったところ、一部で細胞の接着能が低下することが示された。細胞接着能の低下は、CD151, EWI-F, integrin $\alpha 6$ でみられ、ケロイドおよび正常線維芽細胞より、表皮角化細胞、*HeLa* 細胞において、顕著な差がみられた。表皮角化細胞、*HeLa* 細胞両者では、細胞-細胞間接着が減少し、特に表皮角化細胞では、敷石状のコロニー形成が減少した。テトラスパニンウェブ構成分子の創面における皮膚接着制御の役割は、ケロイド線維芽細胞では、大きな役割を見出す事はできなかったが、表皮角化細胞では、細胞接着能に大きな影響を与える事が分かった。このことは、正常皮膚の創傷治癒においてテトラスパニンウェブ構成分子が細胞接着に重要な役割を担っている可能性が高い事を示しており、ケロイド以外の皮膚創傷治癒研究にもつながる研究成果を得た。

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 7 件)

① Kanazawa Y, Nomura J, Yoshimoto S, Ichinose M, Cyclical cell stretching of skin-derived fibroblasts downregulates connective tissue growth factor (CTGF) production, *Connective Tissue Research*, 査読有、No50、2009、322-329

② Rikihisa N, Udagawa A, Yoshimoto S, Ichinose M, Treatment of velopharyngeal inadequacy in a patient with submucous cleft palate and myasthenia gravis, *Cleft Palate Craniofacial Journal*, 査読有、No 46、2009、558-562

③ Kubota Y, Unoki, H, Bujo H, Udagawa A, Yoshimoto S, Low-dose GH supplementation reduces the TLR-2 and TNF-alpha expression in visceral fat, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有、No368、2008、81-87

④ Kuriyama M, Udagawa A, Yoshimoto S, Ichinose M, DNA methylation changes during cleft palate formation induced by retinoic acid in mice, *Cleft Palate Craniofacial Journal*, 査読有、No45、2008、545-551

⑤ Kuriyama M, Udagawa A, Yoshimoto S, Ichinose M, Tessier number 7 cleft with oblique clefts of bilateral soft palates and rare symmetric structure of zygomatic arch, *J Plastic reconstructive Aesthetic surgery*, 査読有、No61、447-450

⑥Udagawa A, Arikawa K, Shimizu S, Yoshimoto S, Ichinose M, A simple reconstruction for congenital unilateral lower lip plasty, Plastic and Reconstructive Surgery, 査読有、No120、2007、238-244

⑦Morioka D, Yoshimoto S, Udagawa A, Okubo F, Yoshikawa A, Primary repair in adult with untreated cleft lip-cleft palate, Plastic and Reconstructive Surgery, 査読有、No120、2007、1981-1988

〔学会発表〕（計2件）

① 深谷佳孝、吉本信也ほか、皮膚創傷治癒におけるテトラスパニンウェブ関連タンパクの細胞接着制御の役割、日本形成外科基礎学術集会、2009.10.8、東京

② 野村純、金沢雄一郎、吉本信也ほか、ケロイド由来皮膚線維芽細胞を用いた *In vitro* 創傷治癒モデルにおけるメカニカルストレスの影響、ケロイド・肥厚性瘢痕研究会、2008.3.8、東京

〔図書〕（計2件）

① 炭山嘉伸、有馬陽一、吉本信也、羊土社 感染症・合併症ゼロをめざす創閉鎖 2010、205

② 落合武徳、清水孝徳、吉本信也、羊土社、ビジュアル基本手技シリーズ 確実に身に付く！縫合・局所麻酔 創に応じた適切な縫合法の選択と手技のコツ 2009、141

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉本 信也 (YOSHIMOTO SHINYA)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：90220748

(2) 研究分担者

宇田川 晃一 (UDAGAWA AKIKAZU)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70323425
野村 純 (NOMURA JUN)
千葉大学・教育学部・准教授
研究者番号：30252886
杉田 克夫 (SUGITA KATUO)
千葉大学・教育学部・教授
研究者番号：40211304