

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10009

研究課題名(和文) ストレッチ刺激に対するケロイド由来線維芽細胞の病的カルシウムシグナル応答の解明

研究課題名(英文) Elucidation of abnormal calcium signal response in keloid-derived fibroblasts to stretch stimuli

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：独自の細胞伸展装置を用いて、ケロイド由来線維芽細胞(K-FBs)と正常真皮由来線維芽細胞(N-FBs)に繰り返しストレッチ刺激を負荷しながら、細胞内Ca²⁺濃度をリアルタイム観察し、K-FBs中に細胞内Ca²⁺濃度が病的に上昇する亜集団(約10%)を発見し、Caオシレーションも高頻度であった。シングルセル解析の結果、TRPV2(Ca²⁺チャネル)の発現細胞数がN-FBsよりK-FBsで約10%多く(11.5% vs 2.3%)、有意に発現していた。また、全Keloid-TRPV2(+)は-SMA(+)であり、ケロイド特異的亜集団がTRPV2(+)の筋線維芽細胞であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ケロイドは、縫合創、外傷や熱傷による創傷、ニキビなどの軽微な傷から発症する。赤く盛り上がり、病変部を超えて拡大し、痛みやかゆみを伴い、整容的に悩まれることも多い。様々な治療法が存在するが、第1選択は未だステロイド剤であり、長期投与すると表皮の菲薄化や皮下脂肪の萎縮などの副作用を生じる。本研究課題で解明したケロイド特異的亜集団と想定されたTRPV2(+)の筋線維芽細胞に対するTRPV2の抑制剤が、ステロイド剤に代わる治療薬に成り得るか検証を進めている。

研究成果の概要(英文)：Using our original cell stretching device, we observed intracellular Ca²⁺ levels in keloid-derived fibroblasts(K-FBs) and normal skin-derived fibroblasts(N-FBs) in real time while repeatedly applying stretch stimuli, and found a specific subpopulation (approximately 10%) in K-FBs with pathologically elevated intracellular Ca²⁺ levels. Ca oscillations were also frequently observed.

Single Cell RNA-seq analysis revealed that the number of cells expressing TRPV2(Ca²⁺ channel) was significantly higher in K-FBs(11.5% vs. 2.3%) than in N-FBs (approximately 10%). In addition, all Keloid-TRPV2(+) were -SMA(+), suggesting that the keloid-specific subpopulation was TRPV2(+) myofibroblasts.

研究分野：形成外科

キーワード：ケロイド 線維芽細胞 カルシウムイオン濃度 カルシウムシグナル応答

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ケロイドおよび肥厚性瘢痕は、外科的手術後の縫合創や外傷・熱傷後の創傷部位に一致して発症する。特に、呼吸性変動を伴う胸腹部や、四肢の関節可動部位に発症しやすい。症状として、病変部に痛みやかゆみを伴うため、精神的苦痛を訴えることも多い。シリコンジェルシート、ステロイド含有テープなどの貼付剤やトラニラスト内服といった非侵襲的治療を始め、ステロイド局所注射、外科的手術や電子線照射などの侵襲的治療まで様々な治療法が存在する。臨床的に最も行われている治療法のひとつが、ステロイド(トリアムシノロンアセトニド)の局所注射であり、数回の局注で症状緩和が得られることが多い一方で、正常な組織リモデリングも抑制するため、表皮の菲薄化や皮下脂肪の萎縮などの副作用が生じ、女性の場合は、生理不順などにも注意しておく必要がある。

ケロイドおよび肥厚性瘢痕の成因として、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、様々な基礎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、ストレッチ刺激前後の免疫染色や遺伝子およびタンパク質解析などが主流であり、繰り返しストレッチ刺激を付与しつつ、個細胞あたりの細胞内変化を動的に観察するには、ピントずれが大きく技術的に難しい。

そこで、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を用いた医工連携研究を開始した(特許番号:特許第4931017)。このデバイスは、極薄のシリコンシート両端に刺した片方の金属針をコンピューター制御でストレッチさせることができ、線維芽細胞に対して繰り返しストレッチ刺激を加えながら、共焦点レーザー顕微鏡下に連続撮影することで、個細胞あたりのタイムラプス観察ができるようになった。

2. 研究の目的

カルシウムイオンと細胞質を蛍光標識させて、細胞内カルシウムイオン濃度を蛍光輝度比で表し、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)における繰り返しストレッチ刺激に対するカルシウムシグナル応答について検証することが目的である。

3. 研究の方法

(1) 正常皮膚およびケロイド由来線維芽細胞の確保

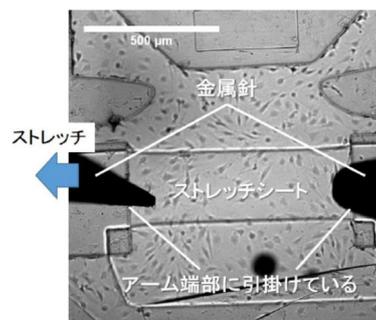
患者検体を使用した基礎研究であるため、徳島大学病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得て、N-FBsとK-FBsを分離培養して、凍結保存した。

(2) 細胞内Ca²⁺のリアルタイム蛍光観察

35mm dishに組み込まれた細胞伸展マイクロデバイス上に、N-FBsあるいはK-FBsを5×10⁴ cells/dishで播種する。ストレッチシートに充分接着させるため、インキュベーター内でover night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(Fluo-8H)と細胞質染色薬を反応させる。

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。マイクロマネ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う原理である(右図参照)。

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%とした。リアルタイム観察は、短時間5分間と長時間30分間の2パターンとした。



(3) 病的応答に關与する候補因子の選別と特定

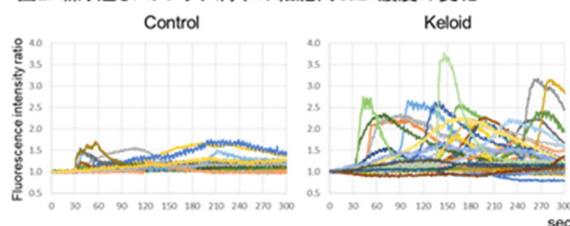
シングルセル遺伝子解析を行った。シリコンチャンバー上にN-FBsとK-FBsを播種し、over nightさせた後、伸展刺激装置を用いて、繰り返しストレッチ刺激(48時間、12回/分、ひずみ量15%)を負荷した(5%CO₂, 37℃)。single-cell RNA sequencing法を用いたライブラリー調整(10xGenomics社製)と次世代シーケンスを行い、専用ソフト(Loupe Browser)で解析した。

4. 研究成果

(1) 細胞内Ca²⁺短時間観察(5分)

ベースラインの撮影後(30秒)、K-FBs(N=4)とN-FBs(N=4)に繰り返しストレッチ刺激(4分30秒、12回/分、ひずみ量10%)を負荷しながら、0.5秒毎に共焦点レーザー顕微鏡で撮影した(図1)。K-FBsではN-FBsより細胞応答率(図2)と細胞内Ca²⁺濃度のピーク値(図3)

図1. 繰り返しストレッチ刺激中の細胞内Ca²⁺濃度の変化



が有意に高く、ROC 解析から K-FBs 内に細胞内 Ca²⁺濃度が正常範囲を超えて過剰上昇する特異的亜集団(約 10%)を発見(図 4, 5)した。

図2. 細胞応答率

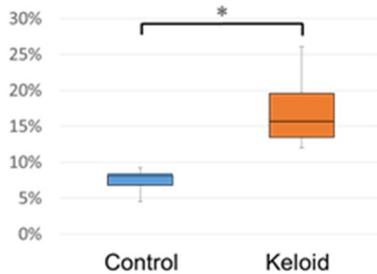


図3. 細胞応答(+)のピーク値

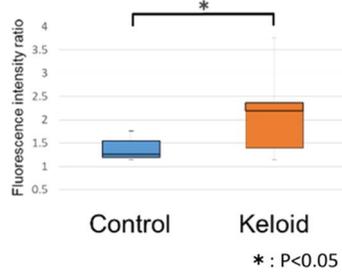


図4. ROC解析による正常範囲のカットオフ値

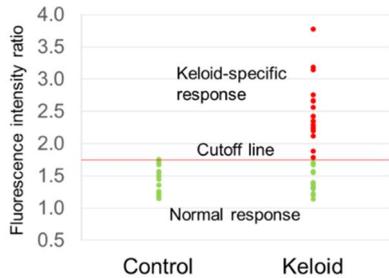
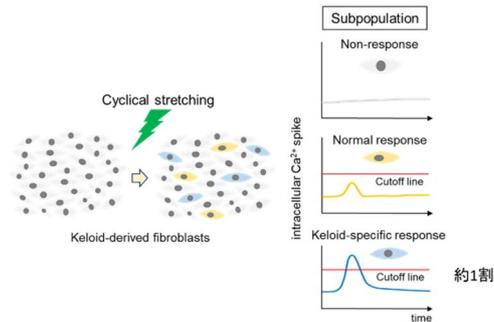


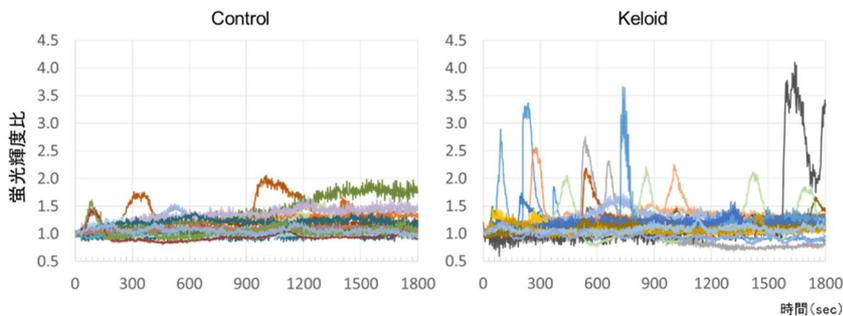
図5. ケロイド由来培養線維芽細胞中のケロイド特異的亜集団



(2) 細胞内 Ca²⁺ 長時間観察(30分)

ケロイド群では Ca オシレーションの振幅が大きだけでなく、頻発していることが判明した(図 6)。

図6. 細胞内Ca²⁺濃度の長時間リアルタイム観察



(3) シングルセル遺伝子解析

細胞内 Ca²⁺調節機構の一つで様々な外的刺激で発現し細胞内 Ca²⁺を上昇させる TRP チャンネルに注目した。結果、ヒトで発現する 6 つのサブファミリー計 27 チャンネルのうち、K-FBs(8006 cells)あるいは N-FBs(7521 cells)の検出総細胞数のうち 1%以上発現したものは、TRPC1、TRPC4、TRPM4、TRPM7、TRPML1、TRPML3、TRPP2、TRPV1、TRPV2(K-FBs 11.5% vs N-FBs 2.3%)、TRPV3、TRPV4 の 11 チャンネルであった(図 7)。このうち、TRPV2のみ K-FBs で有意に発現していた(図 8,9)。

図7. K-FBsとN-FBsにおけるTRPチャンネルの発現細胞数(%)

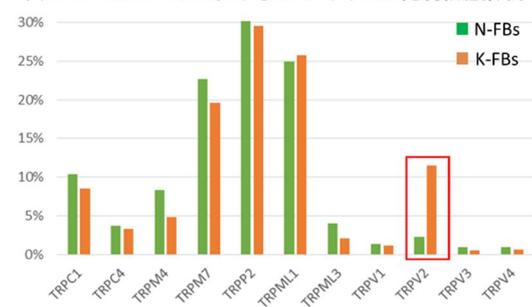
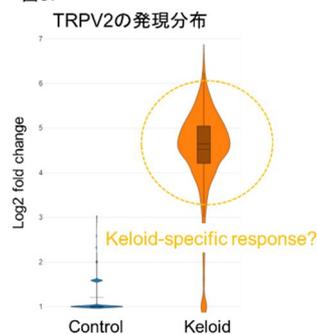


図8.

TRPチャンネルの遺伝子発現量

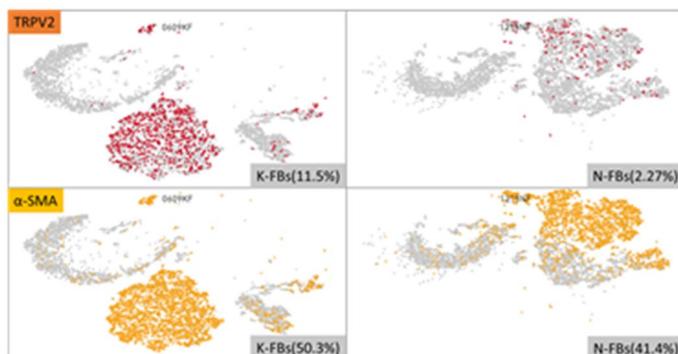
Gene Name	Control	Keloid
TRPC1	Low	Low
TRPC4	Low	Low
TRPM4	Low	Low
TRPM7	Low	Low
TRPML1	Low	Low
TRPML3	Low	Low
TRPP2	Low	Low
TRPV1	Low	Low
TRPV2	Low	High
TRPV3	Low	Low
TRPV4	Low	Low

図9.



さらに、右図のように N-FBs と K-FBs の TRPV2(+) cells はすべて筋線維芽細胞への分化を認めた。

以上から、繰り返しストレッチ刺激を契機に細胞内 Ca²⁺の病的上昇を伴うケロイド特異的亜集団が TRPV2(+)-myofibroblasts である可能性が示唆され、新しい発見であると考えている。



< 引用文献 >

Mineda K, Sato K, Nakahara T, Minami K, Yamashita Y, Ishida S, Abe Y, Hashimoto I. Cyclical stretching induces excess intracellular Ca²⁺ influx in human keloid-derived fibroblasts in vitro. *Plast Reconstr Surg.* 2022 (in press).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kazuhide Mineda, Katsuya Sato, Tasuku Nakahara, Kazuyuki Minami, Yutaro Yamashita, Soshi Ishida, Yoshiro Abe, Ichiro Hashimoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Cyclical stretching induces excess intracellular Ca ²⁺ influx in human keloid-derived fibroblasts in vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plastic and Reconstructive Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 峯田一秀, 千石遼太, 佐藤克也, 山下雄太郎, 石田創士, 安倍吉郎, 橋本一郎
2. 発表標題 ケロイド由来線維芽細胞における細胞内Ca ²⁺ の病的応答とTRPV2発現の関連性の検討
3. 学会等名 第30回 日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 千石遼太, 峯田一秀, 橋本一郎, 佐藤克也
2. 発表標題 繰り返しストレッチ刺激を受けたケロイド皮膚由来線維芽細胞におけるシングルセル遺伝子発現解析
3. 学会等名 日本機械学会 第32回バイオフロンティア講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深見 翔太, 峯田一秀, 橋本一郎, 佐藤克也
2. 発表標題 ストレッチ刺激を受けるケロイド皮膚由来線維芽細胞における発現亢進遺伝子の探索
3. 学会等名 日本機械学会 中国四国支部 第52回学生員卒業研究発表講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三宅 嶺, 峯田 一秀, 津田 達也, 橋本 一郎, 佐藤 克也
2. 発表標題 TAK-1 阻害剤によるケロイド線維芽細胞の遊走能と異常遺伝子発現を抑制する可能性の検討
3. 学会等名 日本機械学会 中国四国支部 第59期総会・講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 峯田一秀 佐藤克也 今川尊捻 山下雄太郎 石田創士 安倍吉郎 橋本一郎
2. 発表標題 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病的カルシウムシグナル応答の検討
3. 学会等名 第28回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------