

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03848

研究課題名（和文）細胞骨格を制御することで癒痕ゼロを実現する

研究課題名（英文）Scarless wound healing by regulation of actin cytoskeleton

研究代表者

久保 盾貴（Tateki, Kubo）

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00362707

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 6,800,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト皮膚線維芽細胞は、伸展刺激を受けることでRhoA/ROCK/LIMK2/cofilin pathwayを介して筋線維芽細胞への分化が促進する。またBcl2の発現が増加し、Baxが低下することでアポトーシスに耐性を持つことが示された。しかし、LIMK2の活性化あるいは不活性化により筋線維芽細胞への分化促進は抑制されることが分かった。さらにLIMK2を不活性化した場合は、線維芽細胞の増殖能が低下し、Bcl2の発現が減少することが明らかになった。RhoA/ROCK/LIMK2/cofilin pathwayをターゲットとすることでケロイド・肥厚性癒痕の新治療法の開発へ繋がる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト皮膚線維芽細胞が伸展刺激によりアポトーシスがどのような動態を示すかを報告した研究は少ない。今回、線維芽細胞は伸展刺激によりアポトーシスに耐性を獲得することが示され、ケロイド・肥厚性癒痕形成の一因が明らかとなった。また、LIMK2に注目することで皮膚線維芽細胞の分化およびアポトーシスの両方の側面からケロイド・肥厚性癒痕の病態を制御できる可能性が示唆された。ケロイド・肥厚性癒痕の薬物治療は未だ確立されたものがなく難治性の病態であるが、LIMK2をターゲットにした治療法の開発は今後「傷跡を残さない治療」を実現する可能性があり、異常癒痕に悩む数多くの患者たちのQOLを改善できうと考える。

研究成果の概要（英文）：Normal human dermal fibroblasts promote differentiation into myofibroblasts via the RhoA/ROCK/LIMK2/cofilin pathway upon mechanical stimulation. In addition, Bcl2 expression is increased while Bax is decreased following mechanical stimulation, indicating that the fibroblasts are resistant to apoptosis.

Activation or inactivation of LIMK2 suppresses the promotion of differentiation into myofibroblasts. Furthermore, inactivation of LIMK2 reduced the proliferative potential of fibroblasts and decreased Bcl2 expression. Since keloids and hypertrophic scars are due to, in part, fibroblast differentiation into myofibroblasts and resistance to apoptosis, targeting the RhoA/ROCK/LIMK2/cofilin pathway may lead to new therapeutic agents.

研究分野：形成外科学

キーワード：アポトーシス 伸展刺激 線維芽細胞 LIMK2

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトの皮膚は外傷などの損傷の後、傷跡を残す。外科的な技術の進歩にも関わらず、ケロイド・肥厚性瘢痕といった異常瘢痕が生じることがある。疼痛や激しい掻痒感、醜形などの問題を生じることも多く、また大きな瘢痕になると拘縮による機能障害など QOL を大きく損なう症状を伴う。皮膚線維芽細胞は筋線維芽細胞に分化することで、創閉鎖に働きかけるが、分化とアポトーシスの制御が利かなくなることがあり、その結果としてケロイド・肥厚性瘢痕を生じると考えられる。その形成には、様々な増殖因子やホルモン、サイトカイン、伸展刺激など、多数の因子が複雑に関与しており、細胞増殖因子・サイトカイン(PDGF、TGF- $\beta$ 、CTGF5 など)をターゲットにした様々な阻害薬が研究に使用されたが、いずれも確実な成果を得られていない。一方で、細胞の分化およびアポトーシスには細胞骨格の変化を伴うことが知られており、今回我々は「細胞骨格とその制御」と「線維芽細胞の分化およびアポトーシス」を結びつける因子を特定できないであろうか? という点に着目して解析を行うことで、ケロイド・肥厚性瘢痕の治療法開発へと結びつけたいと考えた。

### 2. 研究の目的

「傷跡を残さない技術の開発」が目的である。ケロイド・肥厚性瘢痕は、いまだその成因は明らかになっていないが、関節部位など可動部に好発し、ケロイドと皮膚の伸展刺激との関係を検討した報告も多数あり、伸展刺激がケロイド・肥厚性瘢痕形成の重要な要因であると思われる。そこで、細胞骨格の変化を起こすトリガーである伸展刺激により、皮膚線維芽細胞の分化およびアポトーシスがどのように変化するか解析することで、ケロイド・肥厚性瘢痕の成因を探り、その制御因子を見つけることで新たな治療法に結びつく可能性があると考えた。「傷跡を残さない技術の開発」が実現すれば、ケロイド・肥厚性瘢痕で苦しむ多くの患者を救済でき、人類の QOL を大きく向上させると考える。

### 3. 研究の方法

(1) LIM kinase2 の constitutive active および dominant negative type を発現するアデノ随伴ウイルスの作成および正常皮膚線維芽細胞への遺伝子導入

皮膚線維芽細胞は伸展刺激により RhoA/ROCK/LIMK2/cofilin pathway を介して細胞骨格の制御を受ける。我々はその中でも、細胞分化およびアポトーシスに関与する重要なタンパク質である cofilin およびその上流の LIMK2 に着目して解析を行うことにした。

過去の文献より、LIMK2 は 505 番目の塩基(Threonine)を Valine に変更することで dominant negative type に、Glutamate に変更することで constitutive active type になることがわかっている。そこで正常 LIMK2 プラスミドに、PCR 法を用いて Point mutation を導入し、constitutive active および dominant negative LIMK2 を発現するプラスミドを作成し、それぞれのアデノ随伴ウイルスベクターを作成した。そして購入した正常皮膚線維芽細胞に投与することで constitutive active および dominant negative LIMK2 の遺伝子導入を行った。また、それぞれのタイプの LIMK2 が機能的に作用しているか、ウエスタンブロットを用いてリン酸化 cofilin の発現量を確認した。

(2) 機械的刺激に対する反応

機械的刺激による皮膚線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化

皮膚線維芽細胞は筋線維芽細胞に分化することでコラーゲンなどの細胞外マトリックスを過剰に分泌し、ケロイド・肥厚性瘢痕形成の一因となっている。そのため、線維芽細胞への分化を制御することで、異常瘢痕形成を抑制できる可能性がある。そこで、正常皮膚線維芽細胞に constitutive active もしくは dominant negative type の LIMK2 を遺伝子導入することで、Rho/ROCK/LIMK2/cofilin pathway の惹起を阻害できるのではないかと考えた。

正常皮膚線維芽細胞および constitutive active もしくは dominant negative type の LIMK2 を発現した皮膚線維芽細胞に対して伸展刺激を加え、それぞれの細胞で筋線維芽細胞への分化を示すマーカーである  $\alpha$ -SMA の発現ウエスタンブロットで解析した。

機械的刺激による皮膚線維芽細胞のアポトーシス動態の変化

ケロイド・肥厚性瘢痕の病態には線維芽細胞のアポトーシスが深く関わっており、線維芽細胞がアポトーシスに対して抵抗を持つことで、ケロイド・肥厚性瘢痕形成の一因となっていることが報告されている。しかしその一方、皮膚線維芽細胞が機械的刺激を受けることで、アポトーシス動態がどのように変化するかを報告した研究は非常に少ない。ケロイド・肥厚性瘢痕の成因には皮膚の伸展刺激が関わっていることはすでに広く知られており、重要な因子であると思われる。そこで我々は、伸展刺激を受けることで、皮膚線維芽細胞はアポトーシスに対して抵抗を持つ可能性があると考えて、伸展刺激の有無で細胞死を来す細胞数の割合およびアポトーシス関連タンパク(Bax, Bcl2, Caspase3)の発現がどのように変化するかをウエスタンブロットで調査した。

(3) LIM kinase2 dominant negative 導入による細胞形態、アポトーシスの変化

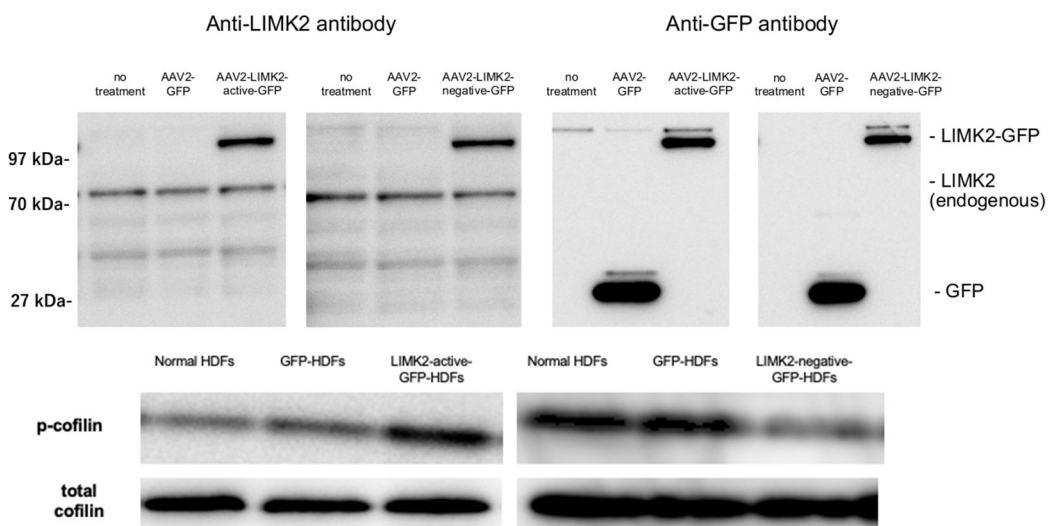
今回の研究の目的はケロイドおよび肥厚性瘢痕形成を RhoA pathway を介して制御することにある。そのため、対象とした筋線維芽細胞への分化が、伸展刺激がない状態でも抑制できる LIMK2 dominant negative に焦点を当てて検討を行った。正常皮膚線維芽細胞に LIMK2 dominant negative type を遺伝子導入することで、細胞死およびアポトーシス関連タンパク (Bax, Bcl2, Caspase3) がどのように変化するかをウエスタンブロットで解析した。

4. 研究成果

(1) LIM kinase2 の constitutive active および dominant negative type を発現するアデノ随伴ウイルスの導入

正常皮膚線維芽細胞に対してアデノ随伴ウイルスの導入を行い、LIMK2(GFP tag)の発現をウエスタンブロットにより確認した。コントロールとして GFP のみを発現するアデノ随伴ウイルスを使用した。

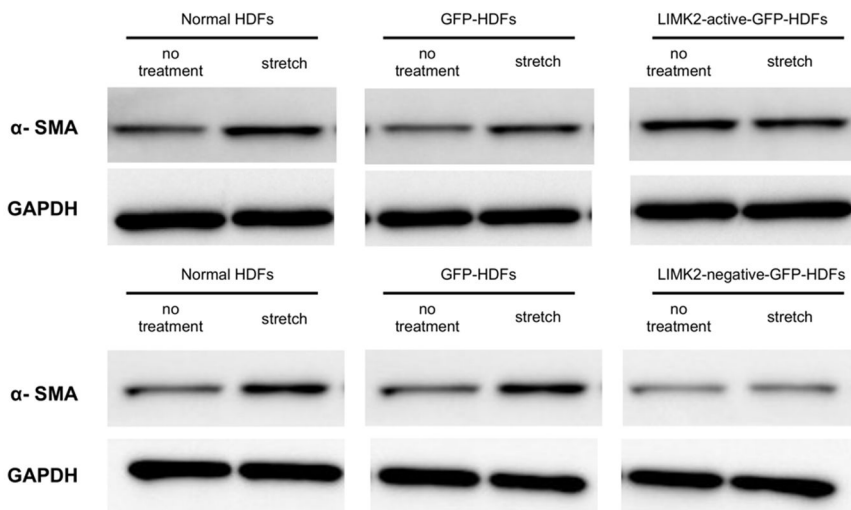
いずれのウイルスベクターも効率良く皮膚線維芽細胞に遺伝子導入出来ていることが確認できた。また、リン酸化 cofilin の発現量もウエスタンブロットで確認したが、constitutive active 群ではリン酸化 cofilin の発現上昇を、dominant negative 群では発現低下が見られた。そのため、LIMK2 の constitutive active および dominant negative の遺伝子導入により、機能的にも問題なく作用していることが確認できた。



(2) 機械的伸展刺激に対する反応

機械的伸展刺激による皮膚線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化

正常皮膚線維芽細胞および、皮膚線維芽細胞に(1)の LIMK2 constitutive active および dominant negative を遺伝子導入した細胞で、筋線維芽細胞への分化を示す  $\alpha$ -SMA の発現をウエスタンブロットにより確認した。またそれぞれの細胞で、伸展刺激の有無でどのように  $\alpha$ -SMA の発現が変化するかも解析した。線維芽細胞をコラーゲンコーティングした専用シリコンチャンパー上に培養し、FBS starve 処理後、機械的伸展刺激を 24 時間加えた後、細胞を回収しウエスタンブロットによる解析を行った。すると、過去の報告通り、正常皮膚線維芽細胞では機械的伸展刺激により  $\alpha$ -SMA の発現の上昇を認めた。一方、LIMK2 constitutive active では伸展刺激を行わない状

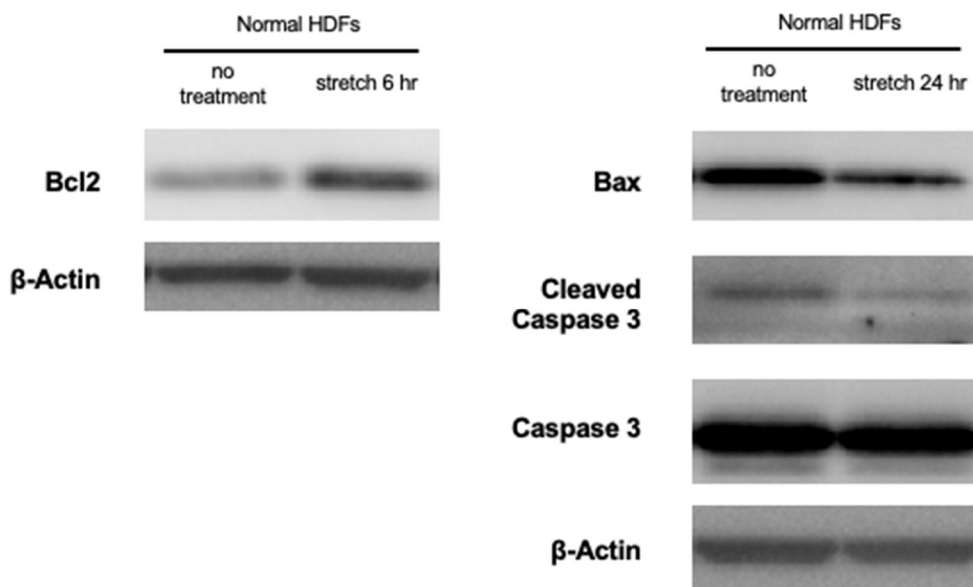


態での  $\alpha$ -SMA は正常皮膚線維芽細胞と比して高く、dominant negative では低くなることが示されたが、両群ともに伸展刺激を加えたことによる  $\alpha$ -SMA の発現の変化は認めなかった。このことは、LIMK2 を活性あるいは不活性状態にすることで、RhoA/ROCK/LIMK2/cofilin pathway が正常に作用せず、筋線維芽細胞への分化誘導に障害を生じていたと考えられた。このことは、RhoA/ROCK/LIMK2/cofilin pathway を何らかの形で阻害することで、筋線維芽細胞への分化を制御できることを示しており、ケロイド・肥厚性瘢痕の治療や予防につながる可能性が示唆された。

#### 機械的刺激による皮膚線維芽細胞のアポトーシス動態の変化

正常皮膚線維芽細胞に機械的刺激を加えることで、アポトーシスが亢進するか阻害されるかの解析を行った。線維芽細胞をコラーゲンコーティングした専用シリコンチャンバー上に培養し、FBS starve 処理後、機械的伸展刺激を 24 時間加えた後、Hoechst 染色および Propidium Iodide 染色を用いて総細胞数および死細胞の割合の変化を確認したが、機械刺激の有無でそれらが変化することはなかった。

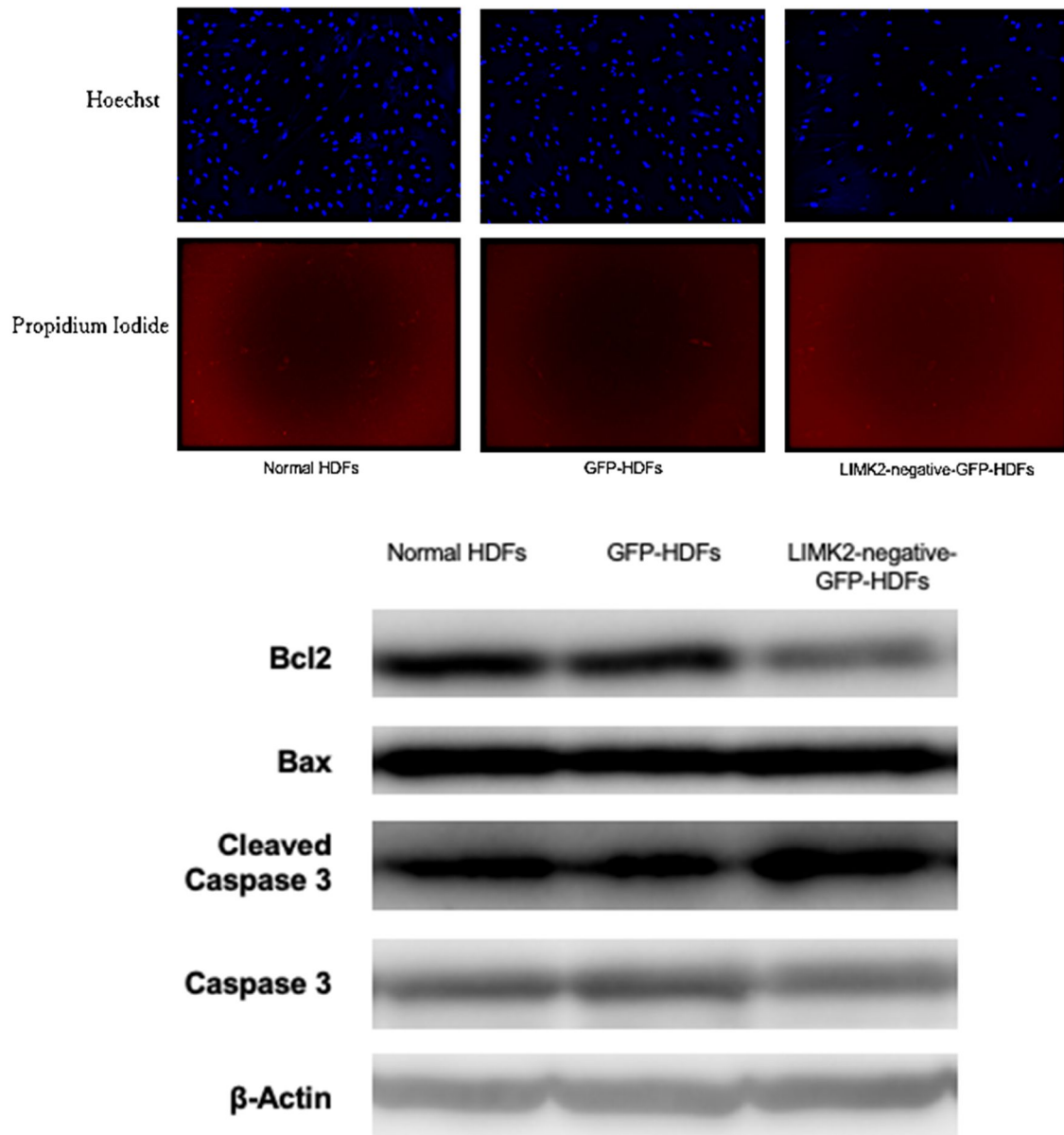
次にウエスタンブロットにより、アポトーシス関連タンパク(Caspase3、Bax、BCL2)の発現を確認した。すると 6 時間の伸展刺激を加えた群において Bcl2 の発現上昇、24 時間の伸展刺激を加えた群において Cleaved Caspase3 および Bax では減少が見られた。このことは、正常皮膚線維芽細胞に伸展刺激を加えることで、細胞死までは至らないものの、アポトーシスに対する抵抗を



獲得することが示唆されている。

#### (3) LIM kinase2 dominant negative 導入による細胞形態、アポトーシスの変化

まず、正常皮膚線維芽細胞に LIMK2 dominant negative を導入した細胞の増殖能を確認した。線維芽細胞を継代し、Dish に生着した段階でアデノ随伴ウイルス(LIMK2 dominant negative およびコントロールとして GFP)を投与、10%FBS を保ったまま、48 時間の培養を行った。培養の後、Hoechst 染色および Propidium Iodide 染色を用いて総細胞数および死細胞の割合の変化を確認したところ、AAV-LIMK2 dominant negative 群において、細胞増殖が著しく抑制されていることが分かった。一方死細胞の割合については各群で変化がないことが明らかになった。次に AAV 投与し 48 時間後に培地を 0%FBS に交換し 24 時間経過したのちに細胞を回収し、 $\alpha$ -SMA およびアポトーシス関連タンパクの発現を確認した。すると、Bax および Cleaved Caspase3 では発現の変化は見られなかったものの、Bcl2 では発現低下が認められた。つまり、正常皮膚線維芽細胞において LIMK2 を阻害することで、Bcl2 の発現低下を通じて細胞のアポトーシスを誘導する可能性がある。



以上の結果から、皮膚線維芽細胞は伸展刺激を受けることで筋線維芽細胞への分化促進が起き、アポトーシスは抑制されることがわかった。これは、ケロイド・肥厚性瘢痕の病態と矛盾していない。また LIMK2 の機能を阻害することで、細胞骨格の制御に重要な役割を持つ Rho 経路を制御できることが示された。すなわち、細胞増殖能を大きく抑制すること、筋線維芽細胞への分化誘導を起こさないこと、Bcl2 の発現低下することからアポトーシス誘導作用を示す可能性があることがわかった。この事実は、今後のケロイド・肥厚性瘢痕の成因および治療法の開発に結びつく可能性がある

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒田一也、前田大介、久保盾貴
2. 発表標題 ケロイド、肥厚性瘢痕形成におけるLIMK2の役割
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

〔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
研究分担者	松崎 伸介  (Matsuzaki Shinsuke)  (60403193)	森ノ宮医療大学・保健医療学部・教授   (34448)	
研究分担者	河合 建一郎  (Kawai Kenichiro)  (80423177)	兵庫医科大学・医学部・准教授   (34519)	

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
---------	---------