

機関番号：32661

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791756

研究課題名 (和文) ケロイドにおける MMPs と TIMPs の発現異常による増殖伸展機構の解明

研究課題名 (英文) The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in the remodeling of keloids: implications for mechanisms of keloid progression

研究代表者

今泉 りさ (IMAIZUMI RISA)

東邦大学・医学部・シニアレジデント

研究者番号：20453847

研究成果の概要 (和文) : ケロイドは、創傷治癒過程の異常により隆起した癬痕を形成し、もとの創傷の範囲を超えて周囲の健常皮膚へ浸潤し、細胞外マトリックスの過剰蓄積を特徴とする。細胞外マトリックスの代謝・リモデリングには、Matrix metalloproteinases (MMPs) とその阻害因子である Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) が関与している。この研究の結果から、ケロイド線維芽細胞では TIMP-2, MT1-MMP を介して活性化した MMP-2 が、過剰に蓄積した膠原線維束の remodeling と同時にケロイド病変の拡大にも関与している事が示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Keloid is characterized by excessive deposition of collagen, resulting from aberrant extracellular matrix (ECM) production and degradation. Previous studies have demonstrated that collagenases such as matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) are involved in producing and degrading ECM in normal wound healing and that fibroblasts have a crucial role in the expression and activity of MMPs and TIMPs during the process of healing. The present study indicates that MMP-2 activity can be promoted in keloid fibroblasts between collagen bundles in cooperation with TIMP-2 and MT1-MMP. This could contribute to remodelling of collagen bundle regions and invasion of fibroblasts into peripheral normal regions through promoted degradation of ECM.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：ケロイド、正常成熟癬痕、MMP-2、TIMP-2、MT1-MMP、膠原線維束

1. 研究開始当初の背景

ケロイドは、創傷治癒過程の異常により隆起した癒痕を形成し、もとの創傷の範囲を超えて周囲の健全皮膚へ浸潤する皮膚線維化病変であり、細胞外マトリックスの過剰蓄積を特徴とする疾患である。その形成機序に関しては様々な観点から解明が試みられているが、今なお不明な点が多く残されている。

我々はケロイドにおける細胞外マトリックスの過剰蓄積には、組織再構築に重要な役割を果たしている MMPs や TIMPs の異常発現が関与していると考えている。MMPs は細胞外マトリックスの代謝に関与し、その活性は TIMPs によって阻害される事が分かっている。しかし MMPs や TIMPs についての報告は、正常創傷治癒過程に関するものが極めて多いのに対し、ケロイドにおける MMPs と TIMPs の発現異常に関する解析はほとんど行われていない。また健全皮膚へ浸潤していくというケロイドの増殖進展メカニズムについても十分な検討は行われていない。MMPs と TIMPs という観点からみたケロイドについての研究はこれまでほとんど報告がなく、今後本研究によるケロイドの組織から細胞、さらに分子レベルにおける多角的な解析は、ケロイド発症とその増殖進展のメカニズムの証明にきわめて重要である。

2. 研究の目的

近年我々は、MMP-2 が特に創傷治癒過程後期の組織再構築に関与している事に着目し、ケロイドでの MMP-2 とその inhibitor である TIMP-2 を中心に MMPs および TIMPs の発現性について解析を行ってきた。その有意義な成果として、免疫組織化学的解析ではケロイドで正常成熟癒痕

に比べ線維芽細胞に両分子の有意な発現増加を認め、さらにケロイドでは、TIMP-2 に比べ MMP-2 の発現増加傾向が認められた事を報告している (Figure 1 参照)。つまり、ケロイドでは細胞外マトリックスの沈着と分解が同時に進行しているが、その中でも MMP-2 の発現増加がより目立つ事から、より細胞外マトリックスの分解に傾いている事を示唆する。また MMP-2, Membrane-type 1 MMP (MT1-MMP), TIMP-2 の発現の局在を検討するために行った蛍光抗体法による予備実験では、膠原線維束周囲の線維芽細胞に MMP-2, MT1-MMP, TIMP-2 が発現し、膠原線維束自体には MMP-2 のみ発現を認めた (Figure 2 参照)。この事から、ケロイド膠原線維束の分解に MMP-2 が特異的に関与している事が示唆される。培養ケロイド線維芽細胞では MMP-1, -2, MT1-MMP, TIMP-2 の全ての蛋白の発現増加を認め、さらに活性型 MMP-2 が相対的に増加し MMP-2 の活性化が亢進している事が確認された。細胞外マトリックスが過剰に蓄積しているケロイドで、より分解の方向に傾いていれば、ケロイドは治癒方向へ向かうはずであるが、隆起した癒痕は難治性で、治癒するどころかさらに周囲の健全皮膚へ浸潤していくのである。

近年、数種の腫瘍で MMP-2, TIMP-2, MT1-MMP の発現増加と MMP-2 の活性化亢進によってその浸潤能が亢進すると、それらは autocrine および paracrine によって調整されている事が報告されている。本研究では、MMPs, TIMPs 各分子の中でケロイドの細胞外マトリックスの合成と分解に重要な役割を果たすと考えられている MMP-2, MT1-MMP, TIMP-2 に焦点を絞り、ケロイドにおける細胞外マトリックス過剰蓄積と周囲への拡大伸展機構のメカニ

ズムを、各分子の発現性と autocrine mechanism から更に検討を重ね、ケロイド増殖進展のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織化学的解析

平成 20 年度までに蒐集したケロイド 70 例、正常成熟癒痕 40 例を用い、MMP-2, MT1-MMP, TIMP-2 の発現の局在を蛍光抗体法により解析する。

(2) ケロイド由来培養線維芽細胞・正常成熟癒痕由来線維芽細胞の樹立

外傷あるいは手術後に発生したケロイド・正常成熟癒痕を手術的に採取する。病理組織学的診断へ提出するとともに、患者の同意を得た症例で余剰生検体を無菌的に初期培養し、継代培養後、各種培養線維芽細胞(ケロイド由来線維芽細胞、正常癒痕由来線維芽細胞)を樹立する。

(3) 正常皮膚由来培養線維芽細胞の樹立

正常皮膚由来培養線維芽細胞を購入し、継代培養後、ケロイド由来培養線維芽細胞との比較に用いる。

(4) 各種培養線維芽細胞を用いた MMPs と TIMPs の発現性の解析

まず、樹立した各種培養線維芽細胞を継代培養後、経時的に細胞から蛋白を抽出する。MMPs と TIMPs の発現性を、Western blot 法や Gelatin zymography にて解析し、免疫組織化学的解析で得られた *in vivo* の解析結果を *in vitro* で検証する。

(5) 統計学的解析

Western blot 法、Gelatin zymography で得た結果を、NIH image を用いた densitometry による解析を行い、統計解析ソフト Stat View を用いて有意差検定と相関関係を解析する。

4. 研究成果

(1) 免疫組織化学的解析

これまでに蒐集したケロイド70例を用いて、蛍光抗体法によるMatrix metalloproteinase (MMP)-2, Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2, Membrane-type 1 MMP (MT1-MMP)の発現局在を検討した結果、膠原線維束周囲の線維芽細胞にMMP-2, MT1-MMP, TIMP-2が発現し、膠原線維束自体にはMMP-2のみ発現を認めた。この事から、ケロイド膠原線維束の分解にMMP-2が特異的に関与している事が示唆された。

(2) ケロイド由来培養線維芽細胞・正常成熟癒痕由来線維芽細胞の樹立

患者から得たケロイド・正常成熟癒痕組織と購入した正常皮膚由来培養線維芽細胞から、ケロイド由来培養線維芽細胞・正常成熟癒痕由来線維芽細胞・正常皮膚由来培養線維芽細胞を樹立した。

(3) 各種培養線維芽細胞を用いた MMPs と TIMPs の発現性の解析

樹立した各種培養線維芽細胞を継代培養後、経時的に細胞から蛋白を抽出した。MMPsとTIMPsの発現性を、Western blot法やGelatin zymographyで解析した結果、ケロイド由来培養線維芽細胞ではMMP-2の活性と発現性が、正常皮膚由来培養線維芽細胞に比べ有意に増加して

いることが確認された。

今回得られた結果に加え、既に広く知られている線維芽細胞におけるMMP-2の活性化と細胞外マトリックスの分解のメカニズム、また昨年度の実験で得られた蛍光抗体法によるケロイドでのMMP-2の発現局在等の結果から、ケロイドではMMP-2, TIMP-2, MT1-MMPが共発現している膠原線維束間の線維芽細胞で、MT1-MMP, TIMP-2 を介してMMP-2 が活性化され、その活性化したMMP-2が膠原線維束のマトリックス分解に関与していると考えられる。数種の腫瘍では、MMP-2とTIMP-2, MT1-MMPの発現増加とMMP-2の活性化亢進によってその浸潤能が亢進することが報告されており、元の創傷の範囲を超えて周囲の健常皮膚へ浸潤するケロイドにおいても、TIMP-2, MT1-MMPを介して活性化したMMP-2が、過剰に蓄積した膠原線維束のremodelingと同時にケロイド病変の拡大にも関与していることが示唆された。

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2件)

- ① Akasaka Y, Imaizumi R (8番目), 他12名. The mechanisms underlying fibroblast apoptosis regulated by growth factors during wound healing. J Pathol. 2010 Jul;221(3):285-99. (査読有)
- ② Imaizumi R (1番目), Akasaka Y, 他5名. Promoted activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 in keloid

fibroblasts and increased expression of MMP-2 in collagen bundle regions: implications for mechanisms of keloid progression. Histopathology. 2009 May;54(6):722-30. (査読有)

[学会発表] (計1件)

Risa Imaizumi, The role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 in the remodeling of keloids: implications for mechanisms of keloid progression. Pan-Pacific Surgical Association, 29th Biennial Congress. 2010.01.14, Sheraton Waikiki Hotel, Honolulu, Hawaii

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今泉 りさ (IMAIZUMI RISA)
東邦大学・医学部・シニアレジデント
研究者番号：20453847

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし