

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659825

研究課題名（和文） TGF- β の拮抗因子としての HGF～ケロイド治療の新たな可能性を探る～研究課題名（英文） Does HGF act as a inhibitor of TGF- β mediated keloid formation?

研究代表者

山本 有平 (YAMAMOTO YUHEI)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70271674

研究成果の概要（和文）：HGF (hepatocyte growth factor、肝細胞増殖因子) は肝などの臓器で TGF- β (transforming growth factor- β) に拮抗し線維化を抑制する作用を持つ。HGF はケロイド線維芽細胞においても TGF- β に拮抗し I 型コラーゲン mRNA 発現を抑制した。HGF が TGF- β に拮抗する機序の一つとして、TGF- β が受容体に結合して以降の細胞内伝達系を阻害する可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：HGF (hepatocyte growth factor) and TGF- β (transforming growth factor- β) often act antagonistically each other. For example, TGF- β accelerates liver fibrosis, whereas HGF prevents its progression. In our study, HGF suppressed type I collagen mRNA expression in keloid fibroblasts. HGF is suggested to repress TGF- β signal transduction pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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、創傷治癒、増殖因子、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

近年、ケロイドを肺・肝・腎などの多臓器と同様に線維化疾患の一つとして解釈する考え方がある。いずれの臓器も TGF- β の働きによるコラーゲン産生の増加が線維化の本体である。TGF- β が受容体に結合後、活性化された Smad3 が核内に移動し I 型コラーゲンの転写が促進され、コラーゲン合成が増加する。

また、TGF- β は各臓器固有の線維芽細胞や上皮細胞などを α -SMA (α -smooth muscle actin) 陽性の筋線維芽細胞に分化させる。線維化の維持には TGF- β によって分化、活性化した筋線維芽細胞が関与していると考えられる。ケロイドにおいても筋線維芽細胞の

病態への関与は明らかである。

HGF は肝線維症マウスの肝星細胞において Smad3 を核外に移動することで TGF- β の働きを抑制していることが既に明らかとなっている。また HGF はラット肺胞上皮細胞において、Smad7 の活性化によって TGF- β /Smad3 経路を遮断すること、筋線維芽細胞への分化を抑制することが明らかになっている。

よって、HGF はケロイド由来の皮膚線維芽細胞においても同様に TGF- β に拮抗し、線維化の進行を抑制する可能性がある。

2. 研究の目的

ケロイド線維芽細胞においても HGF が TGF- β に拮抗しコラーゲン産生を抑制すること、

筋線維芽細胞への分化を抑制すること、HGFのTGF- β 抑制効果がSmad3を標的としたものであること等を証明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 線維芽細胞の培養

ケロイド患者、正常人（非ケロイド患者）よりケロイド組織、正常皮膚組織を採取した。Explant法により初代培養を行い、第3～5継代の細胞を実験に使用した。組織の採取については患者より文書による同意を得た上で実施し、当研究機関の倫理委員会の指針に従った。

(2) 線維芽細胞のTGF- β 、HGFによる刺激

①細胞増殖率：

正常及びケロイド線維芽細胞を96wellプレートに 3.0×10^3 個/well播種した。培養液は10%FBS (fetal bovine serum) +DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)とした。播種後24時間でHGFを20 ng/ml添加した。添加後24、48時間の細胞増殖率をMTSアッセイで評価した。

②mRNA発現：

正常及びケロイド線維芽細胞を6wellプレートに 3.0×10^4 個/well播種した。培養液は10%FBS+DMEMとした。48時間後に培養液を1%FBS+DMEMに交換し、24時間のstarvationを行った。培養液中にTGF- β 5 ng/ml、HGF 10-40 ng/mlを単独または同時に添加し刺激した。刺激後96時間で線維芽細胞を回収し、I型コラーゲン、TGF- β 、 α -SMAのmRNA発現をreal time PCRで評価した。

(3) HGFによるTGF- β 拮抗機序の検証

培養した線維芽細胞をTGF- β やHGFで刺激した。刺激後のSmad3の細胞内局在をウェスタンブロットや細胞染色で評価した。

①ウェスタンブロット：ケロイド線維芽細胞を150 mmプレートに 2.5×10^5 播種した。培養液は10%FBS+DMEMとした。96時間後に培養液を1%FBS+DMEMに交換し24時間のstarvationを行った。培養液中にTGF- β 5 ng/ml、HGF 40 ng/mlを単独または同時に添加し刺激した。刺激後30分で細胞から核タンパク、細胞質タンパクを抽出し、ウェスタンブロットでリン酸化され活性化したSmad3 (pSmad3)の発現を評価した。

②細胞染色：chamber slideにケロイド線維芽細胞を 3×10^3 播種した。培養液は10%FBS+DMEMとした。細胞の十分な増殖、安定を確認した後、TGF- β 10 ng/ml、HGF 40 ng/mlを添加した。添加後1時間で免疫細胞染色を行い、Smad3の細胞内での局在を評価した。

4. 研究成果

(1) HGFのケロイド線維芽細胞抑制効果

①細胞増殖(図1)：MTSアッセイでは、control群とHGF 20 ng/ml投与群とで24、48時間後の細胞増殖率に差はなかった。HGFによるケロイド線維芽細胞増殖抑制効果、筋線維芽細胞アポトーシス誘導効果は明らかとならなかった。HGFの濃度、培養液中のFBSに含まれるサイトカインの影響も考えられるため、今後も検証が必要である。

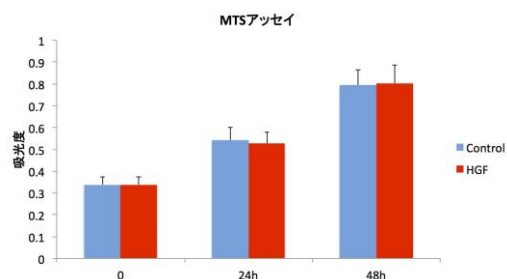


図1：MTSアッセイ、N=5、mean±SEM

②I型コラーゲン(図2)：HGFの単独刺激でケロイド線維芽細胞のI型コラーゲンmRNA発現が抑制された。また、TGF- β 刺激によって亢進したI型コラーゲンmRNA発現は、同時に添加したHGFの濃度に依存して抑制される傾向が見られた。

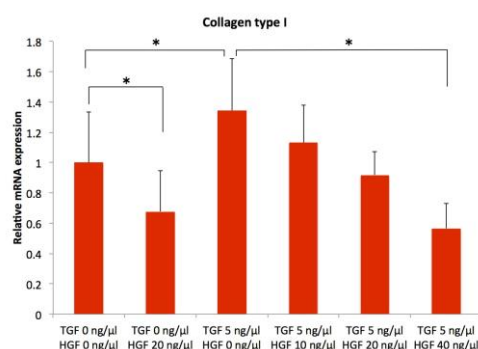


図2：Real time PCR、N=5、mean±SEM

③TGF- β (図3) : TGF- β 刺激によって亢進したケロイド線維芽細胞の TGF- β mRNA 発現は、同時に添加した HGF の濃度を増加しても抑制されなかった。

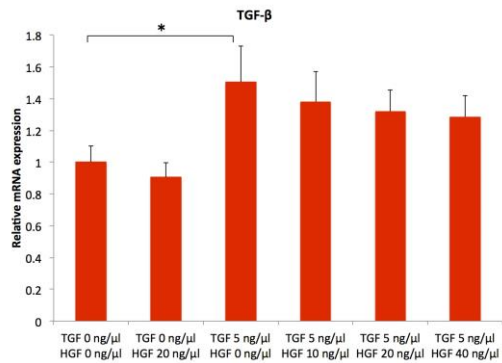


図3 : Real time PCR、N=5、mean \pm SEM

④ α -SMA (図4) : HGF の単独刺激でケロイド線維芽細胞の α -SMA mRNA 発現は抑制されなかった。また、TGF- β 刺激によって亢進した α -SMA mRNA 発現は、同時に添加した HGF の濃度を 40 ng/ml にしたところ抑制されたが、control 群の水準にまでは抑制されなかった。

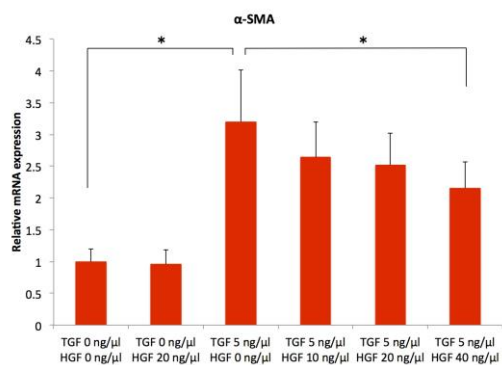


図4 : Real time PCR、N=5、mean \pm SEM

(2) HGF の TGF- β 拮抗機序

①ウェスタンブロット (図5) : TGF- β 刺激によってケロイド線維芽細胞核内の pSmad3 が増加するが、TGF- β 、HGF の同時刺激では pSmad3 の発現は核内で低下し細胞質内で増加する像が得られた。

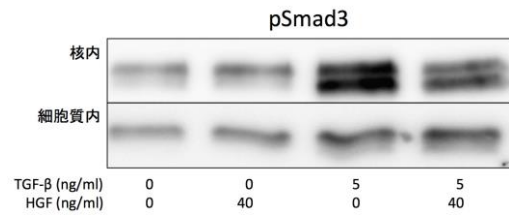


図5: 刺激後のケロイド線維芽細胞の核タンパクおよび細胞質タンパクのウェスタンブロット

②細胞染色 (図6) : TGF- β 刺激によりケロイド線維芽細胞内の Smad3 が核内により多く分布する像が得られた。一方で、HGF の刺激で核内の Smad3 が減少する像が得られた。

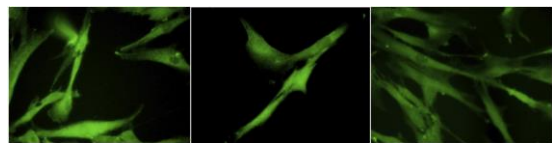


図6 : ケロイド線維芽細胞 Smad3 細胞染色、左から control、TGF- β 添加群、HGF 添加群

(3) 得られた成果の意義 :

本研究は他臓器において線維化を抑制する作用を示している HGF をケロイド皮膚線維芽細胞に応用したこと、HGF の作用機序の詳細について検討を加えたことに意義がある。同時に、ケロイド病態の詳細の解明につながる知見が得られたこともまた大きな意義である。

他臓器における HGF の線維化抑制の機序として、TGF- β に拮抗し、コラーゲン産生の抑制、筋線維芽細胞への分化の抑制、筋線維芽細胞のアポトーシスの促進、TGF- β 産生の抑制等の作用が既に示されている。今回の我々の研究結果では HGF がケロイド線維芽細胞においても I 型コラーゲン産生を抑制する可能性を示すことができた。また、高濃度の HGF であれば筋線維芽細胞への分化を抑制できる可能性があると考えられた。一方、筋線維芽細胞のアポトーシスの促進、TGF- β 産生の抑制、といった効果は明らかではなかった。

HGF のケロイド線維芽細胞における TGF- β に対する分子生物学的拮抗機序は、TGF- β が受容体に結合して以降の細胞内伝達系のブロックと考えられた。TGF- β が受容体に結合すると Smad3 が活性化し核内に移行し、コラーゲン転写が促進される。HGF はケロイド線維芽細胞において Smad3 の核内以降を抑制し、コラーゲン産生を低下させる可能性が示唆された。しかし、同時に著明な筋線維芽細胞への分化抑制が生じなかったため、更なる検証、解析が必要である。TGF- β が Smad3 を活

性化して以降のコラーゲン産生と筋線維芽細胞分化を促進する機序が、それぞれ何らかの特異性を有するか、あるいは別の経路に依存するか現時点では不明である。それぞれの遺伝子の転写領域などの分子生物学的機序が関与する可能性がある。

HGF のケロイド線維芽細胞に対する抗線維化作用を示すことができたため、HGF の実際の臨床応用も期待される。臨床応用に向けては、依然として課題があり、使用方法、濃度、時期等を検討しなければならないといえる。今回の結果では HGF はケロイド線維芽細胞のコラーゲン産生を低下させたが、筋線維芽細胞への分化抑制は低く、TGF- β 産生抑制や筋線維芽細胞のアポトーシス誘導抑制の効果は認めなかった。すなわち、TGF- β 活性が高まり筋線維芽細胞へ分化し一旦ケロイドとして病態が確立した段階での HGF 投与は、ケロイド線維芽細胞を消失させるには至らず、より高濃度の投与を必要とすることが予想される。筋線維芽細胞に分化しケロイドとしての病態を確立する前に予防的に投与する方が、効果が大きいと推察される。肝星細胞においては、TGF- β の刺激によって筋線維芽細胞に分化する過程で、HGF の作用部位である c-Met 受容体の発現が一時的に亢進し HGF 感受性が高まるとの報告がある。ケロイド成立過程で皮膚線維芽細胞にも同様の現象が生じていれば、HGF をケロイド成立過程で投与する方が有利となると考えられる。

よって、今後継続して検討していくべき課題として、TGF- β による筋線維芽細胞への分化の詳細な機序の解明、ケロイド成立過程での皮膚線維芽細胞の HGF 感受性の時期的な差異の解明などを予定している。

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)

[学会発表] (計 5 件)

- (1) 村尾尚規、「多角的アプローチによるケロイド・肥厚性瘢痕の基礎的研究～ケロイドを腫瘍、炎症、線維化疾患として捉える～」、第 4 回日本創傷治癒学会イブニングセミナー、2012 年 12 月 3 日、札幌
- (2) 村尾尚規、池田正起、林利彦、斎藤亮、舟山恵美、小山明彦、古川洋志、山本有平、「ケロイド線維芽細胞における HGF (hepatocyte growth factor) の TGF- β 拮抗効果および機序の検証」、第 4 回日本創傷外科学会総会・学術集会、2012 年 7 月 26 日、福岡
- (3) 村尾尚規、林利彦、池田正起、舟山恵美、小山明彦、古川洋志、山本有平、「ケロイド線維芽細胞における HGF (hepatocyte

growth factor) の TGF- β 抑制作用」、第 83 回日本形成外科学会北海道地方会、2012 年 2 月 25 日、札幌

- (4) 村尾尚規、林利彦、池田正起、舟山恵美、小山明彦、古川洋志、山本有平、「ケロイド線維芽細胞における HGF (hepatocyte growth factor) の TGF- β 拮抗作用についての検証」、第 20 回日本形成外科学会基礎学術集会、2011 年 10 月 7 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 有平 (YAMAMOTO YUHEI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70271674

(2) 研究分担者

古川 洋志 (FURUKAWA HIROSHI)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：00399924
小山 明彦 (OYAMA AKIHIKO)
北海道大学・大学病院・講師
研究者番号：70374486
舟山 恵美 (FUNAYAMA EMI)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：1053630
林 利彦 (HAYASHI TOSHIHIKO)
北海道大学・大学病院・助教
研究者番号：00432146
斎藤 亮 (SAITO AKIRA)
北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師
研究者番号：70507574