

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861696

研究課題名(和文) Scarless Healingを目指して-MRTF-A miceによる癒痕解析

研究課題名(英文) Analysis for the scar formations associated MRTF-A

研究代表者

長尾 宗朝 (Nagao, Munetomo)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：00364349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ケロイドを代表とする異常癒痕とかがわりが深く、その鍵となる細胞の代表に筋線維芽細胞が挙げられる。筋線維芽細胞はTGF- $\beta$ をはじめとする様々なサイトカインを発現し、刺激を受けて過剰に作用することで、ケロイドや肥厚性癒痕が生じるものとも考えられている。われわれは筋線維芽細胞をいかに制御するかといったところに着目し、線維化に関わる因子であるMRTF経路の阻害薬(CCG-1423)を用いた刺激実験を行った。CCG-1423は、細胞障害も強く、濃度調整も行ったが、本実験においては細胞収縮抑制などの期待した結果は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：Abnormal scar formations, for example, keloids and hypertrophic scars, are often caused by myofibroblasts. These cells contract the surrounding extracellular matrix resulting in the increased tissue density characteristic of scar tissue. However, its roles in abnormal scar formations are largely unknown. In this research, we showed that myocardin-related transcription factor-A (MRTF-A), a co-activator of serum response factor (SRF), mediates prohypertrophic signaling related between the scar formations and myofibroblasts. We used the methods by collagen gel contraction assay, stimulating MRTF inhibitor.

At the result, MRTF inhibitor suppressed the fibroblasts even if cell viability. However, our studies have expected the result to the potential therapeutic targets for the new treatment of abnormal scars.

研究分野：形成外科

キーワード：癒痕 ケロイド MRTF-A

1. 研究開始当初の背景

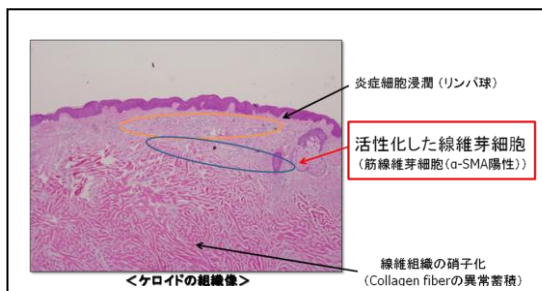
ケロイドを代表とする異常癒痕形成の詳細なメカニズムは、未だ明らかではないものも多く、良性疾患であるものの QOL を著しく障害する原因となっている。これまでも多施設での研究報告はなされているものの、病態の解明には至っていない。その研究が進まない大きな理由の一つとしては、未だ動物モデルが存在していないことが挙げられる。われわれはこれまでも、動物実験モデルを作成すべく、免疫不全マウスにケロイド細胞の移植注射なども行ってきた (H23 年度科学研究助成事業他) が、完成には至っていない。

そのためケロイド、癒痕治療のための新たな薬剤の作用を検討するにあたっては、動物モデルが使えないといった点から、われわれは細胞の 3 次元的細胞収縮力による評価法であるコラーゲンゲルコントラクションアッセイを用いて、心筋の線維化促進作用をもつ MRTF-A (Myocardin-Related Transcription Factor-A) などの新たな因子に着目し、ケロイドやその他の異常癒痕における線維芽細胞を用いて、癒痕形成との関わり合いにつき解析を行う計画を立てた。

2. 研究の目的

ケロイドを代表とする異常癒痕とかかわりが深く、その鍵となる細胞の代表に筋線維芽細胞が挙げられる。われわれはつまり、その筋線維芽細胞をいかに制御するかといったところが最大のテーマであり、そのゴールとなる究極の目的は、タイトルとした scarless wound healing (傷あとが残らない) であると言える。

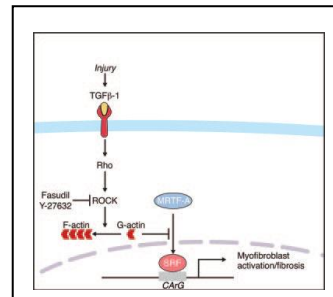
筋線維芽細胞は TGF-β をはじめとする様々なサイトカインを発現する。その作用が創収縮、創傷治癒に寄与していると考えられているわけであるが、筋線維芽細胞が刺激を受けて過剰に作用することで、ケロイドや肥厚性癒痕が生じるものとも考えられており、それが重要な要因の一つと考えられる。



そのため筋線維芽細胞のシグナル伝達過程メカニズムに作用する因子を含むと考えられる阻害剤等の薬剤効果を検討することで、分子レベルでの創傷治癒、癒痕形

成との関わり合いを明らかにすることができるものと思われる。

その一つとして着目したのが、線維化に関わる因子である MRTF-A である。MRTF-A (Myocardin-Related Transcription Factor-A) は、心筋の線維化に関わる因子の一つである。そのメカニズムは、組織損傷が起きた時に、TGF-β1 が線維芽細胞に作用し、Rho-ROCK 経路から MRTF-A を活性化させることで、筋線維芽細胞のフェノタイプとなり、さらに細胞外基質を産生するとの報告がある (Kawahara K. et al., Mol. Cell. Biol. 2010, Eric MS. et al Circ Res. 2010 他)。



MRTF-A のメカニズム

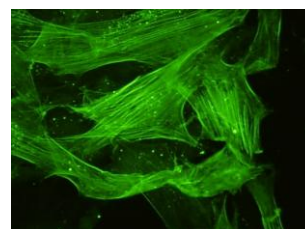
これらのメカニズムは、皮膚においても同様に作用する可能性があるものと思われ、それらを検証することで皮膚の癒痕形成における新たな知見が得られる可能性が高いものと考えた。

その理論をもとに結果が得られれば、MRTF-A 阻害剤は、今後、新たな癒痕化抑制治療薬となりうる可能性が考えられる。これらを検証するのが研究の目的である。

3. 研究の方法

研究当初は、ケロイドマウスモデルの作成を主眼におき、研究を進める計画であった。それに先立ち、MRTF-A ノックアウトマウスを購入して癒痕作成、解析を行う予定であったが、諸手続き等の関係からまずは細胞レベルでの MRTF に関わる各種治療薬の効果を検証することで、新たな癒痕治療法開発の可能性につき検討する計画に変更となった。

実験は、ヒト由来正常皮膚線維芽細胞を用い、TGF-β 刺激を行うことで、actin stress fiber が構築されることを α-SMA の発現をみることで確認し、それを筋線維芽細胞として研究に用いた。



ヒト正常皮膚線維芽細胞の TGF-β 刺激による α-SMA の発現

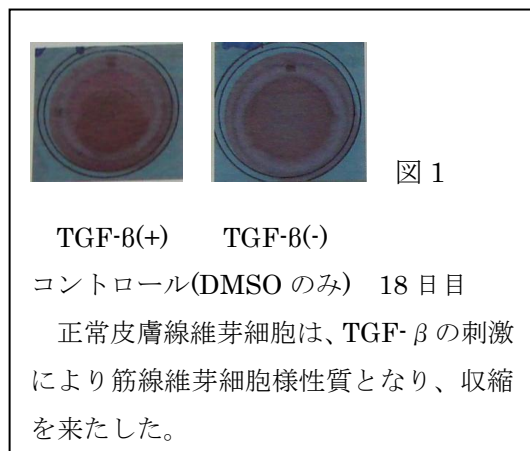
これらの細胞に、各種 MRTF/SRF 経路の阻害薬による細胞収縮抑制効果の検証を行った。

実験は、コラーゲンゲルコントラクション

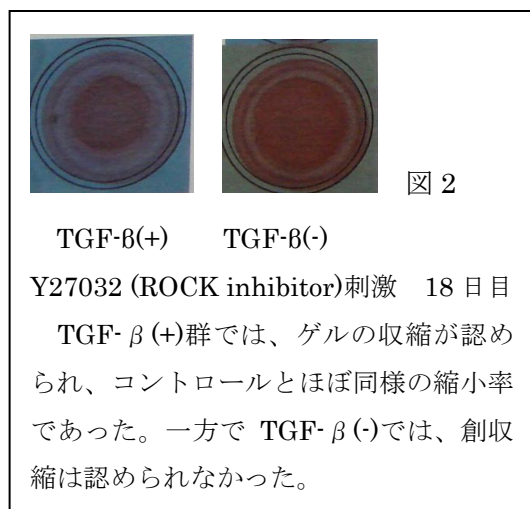
アッセイを用いた。正常皮膚線維芽細胞は、プレートあたり  $4 \times 10^4$  個とし、コントロールを TGF- $\beta$  刺激なし、また DMSO のみとし、薬剤は Y27032(ROCK inhibitor)、CCG1423(MRTF inhibitor)の2剤を用いてコラーゲンゲル内に包埋した。培地は、0.2%BSA、1%ITS 添加 DMEM を用い、経時的にゲルの収縮の差を検討した。

#### 4. 研究成果

コラーゲンゲルコントラクションアッセイによる、細胞収縮の差につき検証した。全ての条件において4日目、7日目と、細胞収縮による差は認められなかった。9日目あたりから細胞の収縮が認められ始め、特に TGF- $\beta$  の刺激群では、コントロールで著明な差が認められた(図1左)。

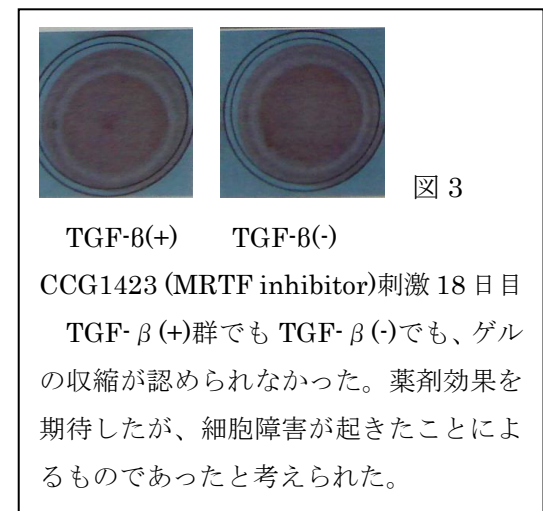


次に、同様の条件下に Y27032 (ROCK inhibitor)で刺激を行った。コントロールと同様に18日目の観察では、TGF- $\beta$  刺激群でゲルの収縮が認められた(図2)。



さらに同様の条件下に CCG1423 (MRTF inhibitor)で刺激を行った。18日目の観察では TGF- $\beta$  (+)群、TGF- $\beta$  (-)群ともにゲル収縮は認められなかった。これは、薬剤の効果として収縮を抑制しているものと思われた

が、細胞をよく観察すると、細胞が死滅していた。これらは薬剤による細胞障害が疑われた。各種濃度を調整してみたが、同様の結果となった(図3)。



以上、仮説として、MRTF/SRF 経路の阻害薬の使用により、細胞の収縮が抑えられることを期待したが、今回の結果として、筋線維芽細胞による創収縮をコントロールするような新たな可能性は見出せなかった。理論上は線維化抑制に効果がある可能性も残されており、実際にケロイド由来の線維芽細胞を用いたり、薬剤の濃度調整や、実験系をマウスに移行するなどして検討を行い、新たな瘢痕治療薬の開発に寄与したいと考えている。

近年、臨床現場においては、傷あと(瘢痕)を治すといったことにとどまらず、傷あとをいかに残さないか、目立たなくさせるかといった時代に突入している。

現在は、これまでに当研究施設において蓄積したケロイド、肥厚性瘢痕、成熟瘢痕、健康皮膚などの組織のパラフィン包埋切片から MRTF の局在に関するプロファイリングが進行している。

さらに組織学的な局所における MRTF の関わり合いが明らかになることで、経皮吸収型の薬剤治療など、臨床的な新たなステージに発展できることを期待したい。

これらの結果も、順次、創傷研究関連の国内外学会で順次発表していく予定である。

#### <引用文献>

1. Kuwahara K. et al., Myocardin-Related Transcription Factor A Is a Common Mediator of Mechanical Stress- and Neurohumoral Stimulation-Induced Cardiac Hypertrophic Signaling Leading to Activation of Brain Natriuretic Peptide Gene Expression Mol. Cell. Biol. 30(17):4134-4148, 2010.

2. Eric MS. et al., Myocardin-Related Transcription Factor-A Controls Myofibroblast Activation and Fibrosis in Response to Myocardial Infarction. Circ Res. 107:294-304, 2010.
3. 長尾宗朝. Circulating fibrocyt の性質異常とケロイド病態との関連性. 北海道医誌 85(3):195-203, 2010.
4. 岸隆行. MRTF によるアクチン細胞骨格制御を介した悪性黒色腫細胞の細胞運動抑制効果に関する検討. 岩手医誌. 66(1):37-46, 2014.

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 1 件)

- (1) JSW Scar Scale 2011 の改訂 -治療ガイドラインの作成に向けて一分類点数と当科における治療の実際: 長尾宗朝, 安岡智之, 本多孝之, 柏克彦, 小林誠一郎: 癬痕・ケロイド治療ジャーナル査読無 9号 2015

[学会発表] (計 3 件)

1. ケロイド体質の予測は可能か! - Fibrocyte とケロイド病態との関連性 - 第 56 回日本形成外科学会総会; 2013 年 4 月 5 日. 於東京 (招待講演)
2. 前額部腫瘍として認められた隆起性皮膚線維肉腫の 1 例 第 31 回日本頭蓋顎顔面外科学会; 2013 年 10 月 24~25 日, 於名古屋
3. パネルディスカッション「JSW Scar Scale 2011 の改訂」第 9 回癬痕・ケロイド治療研究会; 2011 年 8 月 31 日, 於東京

[図書] (計 1 件)

1. 小川令編著; 長尾宗朝他, 克誠堂出版、癬痕・ケロイドはここまで治せる Less-scar Wound Healing のための形成外科, ケロイド発症における fibrocyte の関与の可能性, 2015,

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等  
[http://pras.iwate-med.ac.jp/Staff\\_shao\\_jie.html](http://pras.iwate-med.ac.jp/Staff_shao_jie.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長尾 宗朝 (NAGAO Munetomo)  
岩手医科大学 形成外科・助教  
研究者番号: 00364349

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号: