

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293380

研究課題名(和文)細胞骨格制御因子をターゲットとした創傷治癒機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of wound healing process from the viewpoint of cytoskeletal regulators.

研究代表者

久保 盾貴 (KUBO, TATEKI)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00362707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：TGF- $\beta$ 、機械的伸展刺激、ET-1などの刺激がヒト皮膚線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化を促進すると同時に、細胞骨格制御因子の1つであるRhoAを活性させることが判明した。また、その分化促進がROCKを阻害することにより、抑制されたことから、ヒト皮膚線維芽細胞の分化にはRhoA/ROCK経路を介していることも確認された。よって、RhoAのような細胞骨格制御因子の活性をコントロールすることができれば、難治性皮膚潰瘍の治癒を促進させたり、あるいはケロイドのような過剰癒痕を抑制したりするなど、異常な創傷治癒過程を正常化できる可能性が示唆され、今後さらなる研究により臨床への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：When the skin is wounded, repair processes start immediately, resulting in scar formation. Excess scar formation sometimes occurs consequent to skin injury that causes abnormal wound healing, which is known as hypertrophic scars and keloids. These are characterized by substantial deposition of collagen in the dermis. Such excessive collagen production by fibroblasts and myofibroblasts is known to play a major role in scar formation, and differentiation of fibroblasts into myofibroblasts is the most important process in wound healing. However, the mechanism is not yet fully understood. We found that TGF- $\beta$ , mechanical stress, and endothelin-1 could promote differentiation of skin fibroblasts. In addition, such differentiation induced by TGF- $\beta$ , mechanical stress, and endothelin-1 was mediated through RhoA/ROCK pathway. Therefore, it was suggested that targeting to cytoskeletal regulators like RhoA can lead to invention of a new therapy for abnormal wound healing.

研究分野：形成外科学

キーワード：線維芽細胞 細胞骨格 細胞骨格制御因子 RhoA

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 皮膚の創傷治癒において皮膚線維芽細胞は中核となる細胞である。皮膚に創を生じると線維芽細胞は筋線維芽細胞に分化し創収縮の力源となり創閉鎖に貢献する。皮膚線維芽細胞は創閉鎖にはなくてはならない存在であるが、一方、皮膚線維芽細胞が機能しすぎた場合、過度の線維化を生じ、ケロイド・肥厚性瘢痕形成という難治性皮膚病変を形成する。皮膚線維芽細胞は創傷治癒において、前半の創閉鎖の段階では促進的に働き、後半の瘢痕形成の段階では抑制的に働くのが臨床現場では理想である。

(2) もし、皮膚線維芽細胞の機能を自由にコントロールできれば、褥瘡や糖尿病性足潰瘍などの皮膚潰瘍では筋線維芽細胞へ分化させ創閉鎖を促進することができ、逆にすでに閉鎖した創ではアポトーシスを促すことによりケロイド・肥厚性瘢痕形成を抑制できる可能性がある。そして我々はそれを可能にするには言わば線維芽細胞の“スイッチ”となる因子を発見することが重要と考えている。その“スイッチ”の発見には分化や遊走、アポトーシスなどの網羅的解析が必須であるが、我々はその“スイッチ”の候補として細胞骨格制御因子である Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質 (以下 Rho ファミリー) に着目してきた。

(3) 過去のさまざまな報告から、皮膚線維芽細胞においても Rho ファミリーが遊走、分化、アポトーシスに深く関与している可能性は高いと予測されるが、現状では皮膚においての Rho ファミリーに関する研究はそれほどなされていない。皮膚線維芽細胞と Rho ファミリーの創傷治癒における機構を解明できれば、難治性皮膚潰瘍やケロイド・肥厚性瘢痕の治療にも役立てると考える。

## 2. 研究の目的

細胞が正常に機能するためには、細胞が必要となるときに必要とされる場所に移動したり、分裂したり、アポトーシスしたりすることが重要である。その時々細胞はうまくその骨格を変化させ形を変えていくのだが、それを調整するのが細胞骨格制御因子である。なかでも Rho ファミリーは癌の転移や発生期の神経細胞移動・軸索伸展退縮などに大きく関与し以前より注目されてきた。そして、近年、肺や心臓・腎臓に存在する線維芽細胞において Rho ファミリーが細胞分化に関与し臓器線維化などを起こすことが明らかとなってきた。一方、皮膚においても線維芽細胞が、創収縮や瘢痕形成 (線維化に近い) に大きな役割を担っている。だとすれば、Rho ファミリーが皮膚線維芽細胞においても創閉鎖や瘢痕形成といったといった創傷治癒全体に大きく関与する可能性があり、我々はその分子機構を解明したい。

## 3. 研究の方法

以下のさまざまな刺激について、皮膚線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化に関与するかどうか、および、そこに Rho ファミリーが関与するかについて研究を行った。細胞は購入できる汎用性ヒト皮膚線維芽細胞を用いた通常の培養細胞実験系を用いた。各刺激による筋線維芽細胞への分化については、そのマーカーである  $\alpha$ -SMA の発現変化をウエスタンブロッティングなどにて解析した。Rho ファミリーについてはその中でも代表的な RhoA 蛋白の活性化をプルダウンアッセイにて測定した。

### (1) Transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )

TGF- $\beta$  が皮膚線維芽細胞を筋線維芽細胞に分化させることはよく知られている。その下流の因子としては smad ファミリーが知られているが、別の細胞では TGF- $\beta$  の系に Rho ファミリーも関与することが示唆されている。そこで、我々はリコンビナント TGF- $\beta$  をヒト皮膚線維芽細胞に加えて、過去の報告通りに筋線維芽細胞への分化が促進されるかの確認および RhoA 活性への影響について実験を行った。

### (2) 機械的伸展刺激

われわれは臨床現場においてケロイドや肥厚性瘢痕といった過剰な瘢痕を治療するが、それらは引っ張りの力 (メカニカルストレス) が加わる部位 (肩や前胸部など) に生じる傾向がある。そこで、創傷治癒過程において機械的刺激が何らかの役割を果たしており、そこに RhoA も関与しているのではないかと推測し、ヒト皮膚線維芽細胞に機械的伸展刺激を加えた時の変化を分析することとした。細胞への機械的刺激にはストレッチ社製の培養細胞伸展システムを用いた。ヒト皮膚線維芽細胞をタイプ コラーゲンにてコーティングした専用シリコンチャンバー上に培養し伸展刺激を加え、筋線維芽細胞への分化および RhoA 活性の変化を測定した。伸展条件は、ヒトの呼吸回数を想定して 1 分間に 10 往復、伸展率 15% という設定で継続的に行った。

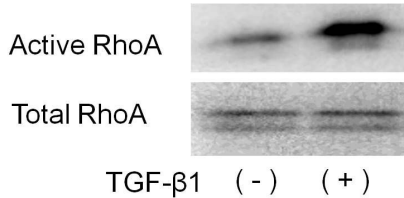
### (3) エンドセリン-1: Endothelin-1 (ET-1)

ET-1 は強力な血管収縮剤であるだけでなく、創傷治癒反応を介して様々な臓器の線維化に関与することが報告されているが、皮膚の創傷治癒に関する報告は未だ少ない。そこに着目し、ヒト皮膚線維芽細胞に ET-1 刺激を加えた時の変化を測定した。また、ET 受容体拮抗薬の Bosentan や RhoA の下流である Rho キナーゼ (ROCK) 阻害剤の Y-27632 を同時に投与した時の違いについても解析を行い、ET-1 による変化が ET 受容体や RhoA/ROCK を介しているかも分析した。

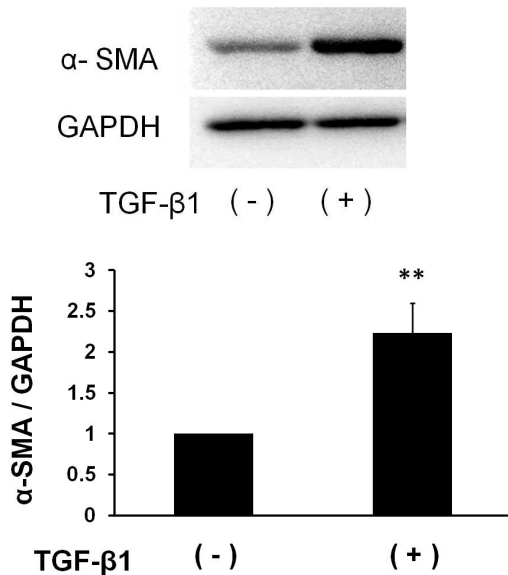
#### 4. 研究成果

##### (1) TGF-β 刺激に対する反応

細胞骨格制御因子 RhoA の変化について 24 時間の FBS starve 処理後、ヒト皮膚線維芽細胞に TGF-β (10ng/ml) を加えたものと何も加えないものを作成、10 分後にそれぞれの細胞タンパク質を回収し、プルダウンアッセイを行った。その結果、TGF-β 刺激により RhoA は活性化されることが確認された。

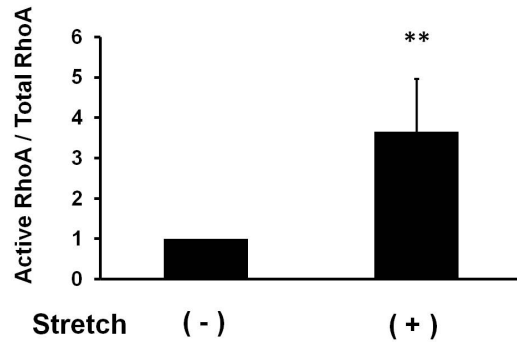
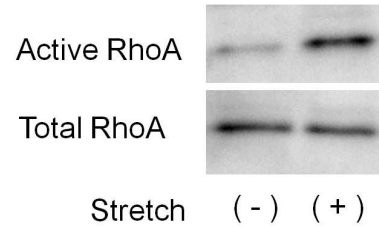


筋線維芽細胞への分化 (α-SMA) について FBS starve 処理後、ヒト皮膚線維芽細胞に TGF-β (10ng/ml) を加えた場合と何も加えない場合について、24 時間後に細胞タンパク質を回収し、ウエスタンブロッティングによる解析を行った。インターナルコントロールとしては GAPDH を用いた。その結果、TGF-β を加えることによって α-SMA 発現は有意に増加しており、過去の報告通りであることが確認された。

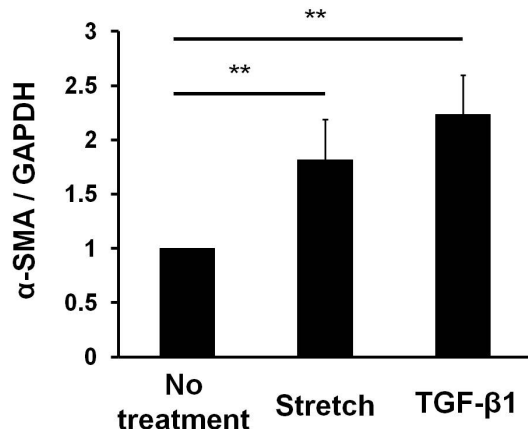
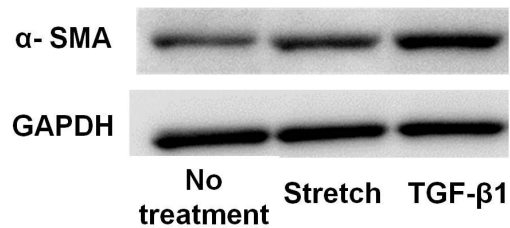


##### (2) 機械的伸展刺激に対する反応

細胞骨格制御因子 RhoA の変化について ヒト皮膚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 10 分加えた後、RhoA の活性をプルダウンアッセイにて解析した。その結果、機械的伸展刺激により RhoA の活性は有意に増加することが判明した。

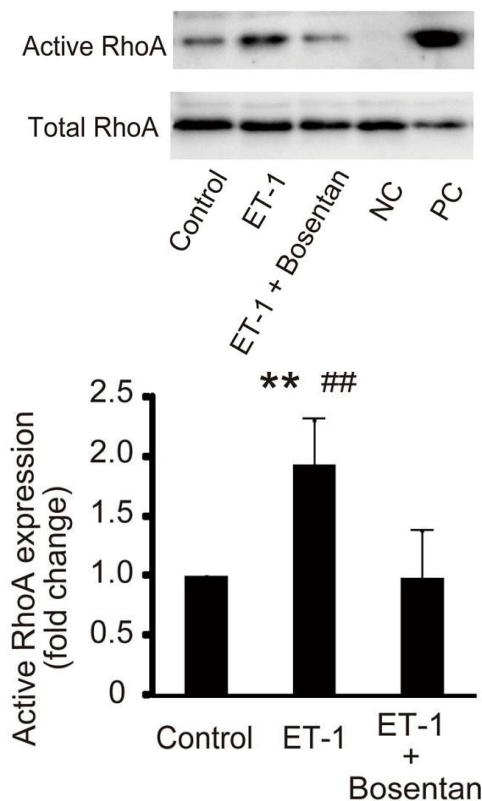


筋線維芽細胞への分化 (α-SMA) について 同様にコラーゲンコーティングした専用シリコンチャンバー上に培養し、FBS starve 処理後、機械的伸展刺激を 24 時間加えた後に細胞タンパク質を回収し、ウエスタンブロッティングによる解析を行った。ポジティブコントロールとして TGF-β を用いた。その結果、機械的刺激により α-SMA の発現は有意に増加し、筋線維芽細胞への分化が促進されることが判明した。

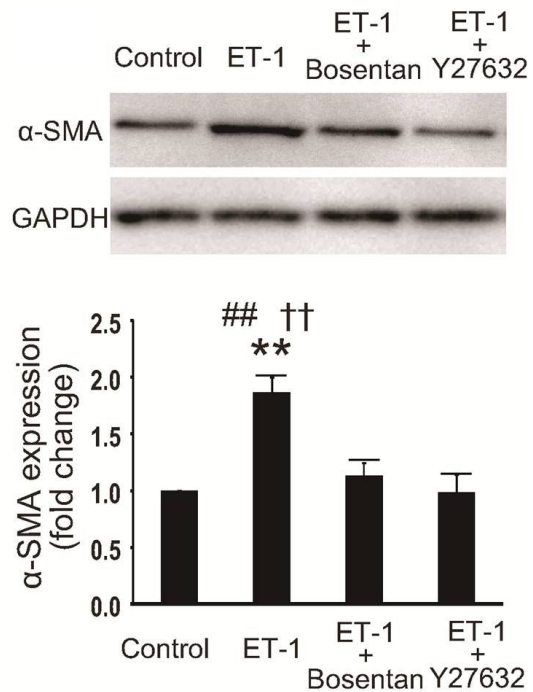


### (3) ET-1 刺激に対する反応

細胞骨格制御因子 RhoA の変化について FBS starve 処理後、ヒト皮膚線維芽細胞に ET-1 (100nM) を単独投与したものと、ET-1 と同時にその受容体拮抗薬である Bosentan (10 μM) を投与したものおよび何も投与していないものについて、24 時間後に細胞タンパク質を回収し、RhoA の活性化をプルダウンアッセイにて測定した。その結果、ET-1 投与により RhoA は活性化され、かつそれは Bosentan の同時投与により抑制されていた。すなわち、ヒト皮膚線維芽細胞において ET-1 は ET 受容体を介して RhoA を活性化させることが判明した。



筋線維芽細胞への分化 ( $\alpha$ -SMA) について同様に、FBS starve 処理後、ヒト皮膚線維芽細胞に ET-1 (100nM) を単独投与したものと、ET-1 と同時に Bosentan (10 μM) を投与したもの、さらに ET-1 と同時に ROCK 阻害剤である Y27632 (10 μmol/L) を投与したものについて、24 時間後に細胞タンパク質を回収し、ウエスタンブロットングにて測定した。その結果、ET-1 投与により  $\alpha$ -SMA の発現は有意に増加し、かつ Bosentan や Y27632 の同時投与により、その発現増加は抑制されていた。このことから、ヒト皮膚線維芽細胞において ET-1 は ET 受容体を介して、さらに RhoA/ROCK 経路を介して筋線維芽細胞への分化を促進することが判明した。



以上の研究結果から、TGF- $\beta$ 、機械的伸展刺激、ET-1 などの刺激がヒト皮膚線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化を促進すると同時に、細胞骨格制御因子の 1 つである RhoA を活性化させることが判明した。また、その分化促進が ROCK を阻害することにより、抑制されたことから、ヒト皮膚線維芽細胞の分化には RhoA/ROCK 経路を介していることも確認された。よって、RhoA のような細胞骨格制御因子の活性をコントロールすることができれば、難治性皮膚潰瘍の治癒を促進させたり、あるいはケロイドのような過剰癒着を抑制したりするなど、異常な創傷治癒過程を正常化できる可能性が示唆され、今後さらなる研究により臨床への応用が期待される。

#### 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)

[雑誌論文](計 2件)

Kiya K, Kubo T, Kawai K, Matsuzaki S, Maeda D, Fujiwara T, Nishibayashi A, Kanazawa S, Yano K, Amano G, Katayama, and Hosokawa K.

Endothelial cell-derived endothelin-1 is involved in abnormal scar formation by dermal fibroblasts through RhoA/Rho-kinase pathway.

Exp Dermatol. In press.

Ishise H, Larson B, Hirata Y, Fujiwara T, Nishimoto S, Kubo T, Matsuda K, Kanazawa S, Sotsuka Y, Fujita K, Kakibuchi M, and Kawai K.

Hypertrophic scar contracture is mediated by the TRPC3 mechanical force transducer via NFkB activation.

Sci Rep. 2015;5:11620.

〔学会発表〕(計 2件)

パネルディスカッション：ケロイド・肥厚性癬痕形成メカニズムにおける血管内皮細胞とエンドセリン 1 の役割 木矢孝一郎、前田大介、久保盾貴、細川互 第 25 回日本形成外科学会基礎学術集会 大阪 9月15日 2016

パネルディスカッション 創傷治癒の新知見 - ケロイド・肥厚性癬痕における血管内皮細胞と内皮由来収縮因子の役割 木矢孝一郎、久保盾貴、細川互 第 24 回日本形成外科基礎学術集会 盛岡 10月8日 2015

〔図書〕(計 0件)

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

久保 盾貴 ( KUBO, Tateki )

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00362707

(2)研究分担者

河合 建一郎 ( KAWAI, Kenichiro )

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80423177

細川 互 ( HOSOKAWA, Ko )

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20181498

金澤 成行 ( KANAZAWA, Shigeyuki )

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：50506243

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )