

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15655

研究課題名(和文)皮膚線維増殖性癭痕におけるDAMPsの同定

研究課題名(英文)DAMPs in fibroproliferative scars

研究代表者

須永 中 (Sunaga, Ataru)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：00406117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：患者由来のケロイド検体と正常皮膚検体よりタンパク質を抽出して、ヒト樹状細胞の培養液に添加・培養することにより、ヒト樹状細胞の炎症性サイトカインの遺伝子発現を上昇させるタンパク質分画の同定を試みた。しかし、検体間の差が非常に大きく、また1検体から抽出できるタンパク質量の不足などにより、有意な結果を得ることはできなかった。

研究成果の概要(英文)：We cultured human dendritic cells with tissue lysates from keloids (k-lysate) or normal skins (NS-lysate), and analyzed the expression of inflammation-related gene. However, we could not detect significant results because of the lack of the amount of k-lysates and the variations between the specimens.

研究分野：形成外科学

キーワード：ケロイド

1. 研究開始当初の背景

感染などによる炎症では、細菌やウイルスといった異物の構成成分、すなわち病原体関連分子パターン (PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns) が、Toll-like receptor (TLR) などのパターン認識受容体 (PRRs: Pattern-recognition receptors) に danger signal として認識されることによって、一連の反応が引き起こされている。一方で、悪性腫瘍・線維化・動脈硬化・肥満など多くの疾患における病態のベースには慢性炎症があることが知られているが、この場合の炎症は PAMPs によるものではなく、原因となる danger signal は不明であることが多い。

近年、細胞障害に伴い細胞外に放出される内因性リガンドが、PRRs に danger signal として認識されることによって、非感染性炎症の原因となることが明らかになっており、PAMPs に対して DAMPs と呼ばれている。例えば脳梗塞では、細胞死によって放出される Peroxiredoxin という物質が、樹状細胞の TLR2 と TLR4 に DAMPs として認識されることにより、IL23 を介した炎症を引き起こすことが報告されている。

ケロイドなどの皮膚線維増殖性瘢痕に慢性炎症が関与していることは明らかであるが、その根本的な原因はほとんど明らかになっていない。皮膚張力など機械的刺激が関係していると考えられているが、そのみでは耳垂・耳介という皮膚張力の強くない部位が好発部位のひとつであること、臨床的にいわゆるケロイド体質というものが存在すること、自然発症例があることなどの説明がつかず、未知の根本的原因があることは明らかである。

ケロイドなどの皮膚線維増殖性瘢痕は手術・外傷などの組織障害を契機に発症することが多く、その発症に DAMPs が関与している可能性がある。我々は皮膚線維増殖性疾患における慢性炎症に DAMPs が関与しているという仮説のもとに、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ケロイドなどの皮膚線維増殖性瘢痕の発症・進行に関与している DAMPs を同定することにより、線維増殖性瘢痕の病態生理を解明し、新規治療法のターゲットを探索することである。

具体的には、患者由来のケロイド検体と正常皮膚検体より抽出したタンパク質を用いて、ヒト由来樹状細胞において炎症性サイトカイン発現をケロイド検体優位に上昇させるタンパク質を同定する。

3. 研究の方法

(1) 検体からのタンパク質抽出と線維芽細胞

胞初代培養

患者より採取した正常皮膚検体 5 個とケロイド検体 20 個より、正常皮膚由来タンパク質抽出液とケロイド組織由来タンパク質抽出液を抽出した。また、各検体から explant 法によって線維芽細胞の初代培養を行い、P5 まで拡大培養した。

(2) ケロイド検体由来タンパク質のヒト由来樹状細胞への添加と遺伝子発現解析

正常皮膚由来タンパク質抽出液とケロイド組織由来タンパク質抽出液をそれぞれヒト由来樹状細胞株の培養液に添加・培養した。ヒト由来樹状細胞より RNA を抽出し、リアルタイム PCR により炎症性サイトカイン (IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、IL-18、TNF) の遺伝子発現を比較解析した。

(3) 炎症性サイトカイン発現を上昇させるケロイド検体の選定

ケロイド検体の中で最も炎症性サイトカイン (IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、IL-18、TNF) の遺伝子発現を上昇させる検体を選定するために、ケロイド検体 10 個よりタンパク質を抽出し、ヒト由来樹状細胞株の培養液に添加・培養した。ヒト由来樹状細胞より RNA を抽出し、リアルタイム PCR により炎症性サイトカイン (IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、IL-18、TNF) の遺伝子発現を比較解析した。

(4) 炎症性サイトカイン発現を上昇させるタンパク質分画の同定

(3)にて選定されたタンパク質をショ糖密度勾配遠心分離法にて分画し、各分画をヒト由来樹状細胞株の培養液に添加・培養してサイトカインの発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) 検体からのタンパク質抽出と線維芽細胞初代培養

ケロイド組織からのタンパク質抽出に非常に難渋し、継続的な抽出が可能となるまで数検体・約 1 年を要してしましたが、正常皮膚由来タンパク質抽出液とケロイド組織由来タンパク質抽出液、正常皮膚由来線維芽細胞とケロイド組織由来線維芽細胞をそれぞれ 5 検体と 10 検体得ることができた。

(2) ケロイド検体由来タンパク質のヒト由来樹状細胞への添加と遺伝子発現解析

ケロイド検体より得られるタンパク質量が少なく、培養液に添加するタンパク質量の条件設定に難渋した。また、検体間・サイトカイン間の差が非常に大きく、正常皮膚由来タンパク質抽出液群とケロイド組織由来タンパク質抽出液群の間に有意差を認めるこ

とが出来なかった。

(3) 炎症性サイトカイン発現を上昇させるケロイド検体の選定

ケロイド 10 検体の中から炎症性サイトカイン、特に IL-1、IL-6、TNF の遺伝子発現を最も上昇させるケロイド 3 検体を選定することができた。これら 3 検体は全て臨床上のケロイド活動性が高い症例から得られたものであった。

(4) 炎症性サイトカイン発現を上昇させるタンパク質分画の同定

上記 3 検体を用いて、ショ糖密度勾配遠心分離法にてタンパク質の分画を試みたが、得られた各分画の検体量の不足により有意な結果を得ることができなかった。

正常皮膚由来線維芽細胞とケロイド組織由来線維芽細胞を十分量まで増やしたうえで蛋白質を抽出し同様のアプローチを施行したが、やはり検体間の差が大きく、正常皮膚由来線維芽細胞群とケロイド組織由来線維芽細胞群の間に有意差を認めることが出来なかった。

(5) 結論

本研究では、期待していたような結果を得ることができなかった。

理由として、

(1) ケロイドの検体間の差が非常に大きかった。これにはケロイドの活動性・発症部位・検体内の部位・発症してから年数などが関与していると考えられるため、今後検体数を増やす、活動性の非常に高い検体のみを選別するといったことにより、有意な結果を得られる可能性があると考えられる。

(2) ケロイド検体からのタンパク質の抽出やその他の条件設定に難渋した。ケロイド検体が非常に硬く、通常の方法ではホモジナイズが困難であったため、タンパク質抽出に難渋して多くの検体を消費してしまった。また抽出タンパク質量の不足により、ヒト由来樹状細胞に添加するタンパク質量の条件設定をふるることができず、その結果有意な結果が出なかった可能性がある。

(3) DAMPs は in vivo において組織内に存在するものであり、後半苦肉の策として施行した in vitro による実験では DAMPs そのものが発生していない可能性がある。

以上より、本研究の結果をもって皮膚線維増殖性癬痕の病態生理に DAMPs が関与していないと結論づけるには時期尚早であり、継続した研究が求められると考えられる。今後は大量のタンパク質を得ることが可能な巨大なケロイド検体を対象として、炎症性サイトカイン発現を上昇させるタンパク質分画の同定

の試みを継続したい。

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)

Sunaga A, Kamochi H, Sarukawa S, Uda H, Sugawara Y, Asahi R, Chi D, Nakagawa S, Kanayama K, Yoshimura K. Reconstitution of human keloid in mouse skin. *Plast Reconstr Surg Glob Open.* 5: e1304, 2017

〔学会発表〕(計 1 件)

須永中、菅原康志、宇田宏一、去川俊二、加持秀明、阿部周作、朝日林太郎: Lineage tracing を用いたインプラント被膜形成機構の解明、第 24 回日本形成外科学会総会基礎学術集会、2015/10/08、盛岡

〔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

須永 中 (ATARU, sunaga)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：00406117

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()