

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20356

研究課題名(和文)皮膚創傷治癒におけるメラノサイトの動態と線維芽細胞との相互作用

研究課題名(英文)The contribution of melanocytes and interaction with fibroblasts to wound healing of skin

研究代表者

前田 大介(Maeda, Daisuke)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60772465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ケロイド・肥厚性瘢痕は有色人種に多いことが知られている。言い換えれば、皮膚のメラノサイトの活性が強い人種に多いということになる。加えてケロイド・肥厚性瘢痕は、手掌・足底のようなメラノサイトの活性が弱い部位には有色人種でもケロイド・肥厚性瘢痕を生じることはほとんどない。よって、メラノサイトがケロイド・肥厚性瘢痕形成に関与する可能性が考え、実験を進めた。黒色人種、白色人種由来のメラノサイトと皮膚線維芽細胞とを共培養し、筋線維芽細胞への分化について検討を行ったが、有意差は認めなかった。また足底由来のメラノサイトの初代培養を試みるも、採取できる細胞が少なく、比較検討を行うまでには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：It is common that keloids and hypertrophic scars occur to colored races. In other words, the races with strong activity of melanocytes tend to produce abnormal scars. In addition, keloids and hypertrophic scars are rarely produced in colored races at sites where the weak activity of melanocytes such as palms and soles. Therefore, we considered the possibility that melanocytes are involved in the formation of keloids and hypertrophic scars. Melanocytes from black race or white race and skin normal fibroblasts were cocultured and we analyzed differentiation into myofibroblasts by using western blot, but no significant difference was observed. Also, when trying primary culture of plantar origin melanocytes, there are few cells that can be harvested and we did not compare samples between plantar and trunk.

研究分野：形成外科

キーワード：メラノサイト 線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトは一旦傷を生じると必ず傷あとを残す。そしてときに著しい傷あと(ケロイド・肥厚性瘢痕)を発生することもある。ケロイド・肥厚性瘢痕は、赤く盛り上がるため、整容性の低下のみならず、痛み・痒みも伴い日常生活の質を大きく下げしてしまう。さらに拘縮のため運動障害を生じることすらある。しかしながら、ケロイド・肥厚性瘢痕発生の分子生物学的メカニズムは未解明なところが多く、それ故、効果的な治療法・予防法さえないのが現状である。そして、ケロイド・肥厚性瘢痕発生の病態は、異常な皮膚の線維化であることから、これまでは細胞外マトリックスを産生する線維芽細胞を中心に研究がなされてきた。

(2) 一方、ケロイド・肥厚性瘢痕は黒色人種 > 黄色人種 > 白色人種の順に頻度が高いことは知られている。すなわち有色人種に多いわけであり、これは言い換えれば皮膚のメラノサイトの活性が強い人種に多いということになる。加えて、ケロイド・肥厚性瘢痕は、体の部位によっても生じやすい部位と、生じにくい部位があり、手掌・足底には有色人種でもケロイド・肥厚性瘢痕を生じることがほとんどない。そして、手掌・足底のメラノサイトは活性が低いことを、私が所属する研究室は以前に報告している(Yamaguchi Y et al. J Cell Biol 2004;165(2):275-285.)

(3) ケロイド・肥厚性瘢痕形成をメラノサイトの観点から研究した報告は、我々が渉猟した限り 1 報しかなかった(Gao FL et al. Int J Clin Exp Med 2013;6(7):609-613.)。それは、メラノサイトと線維芽細胞を共培養することで、線維芽細胞の細胞数の増加や mRNA レベルでのコラーゲン発現が増加している報告であった。以上のことから、ケロイド・肥厚性瘢痕形成には、皮膚に存在するメラノサイトが大きく関与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

(1) ケロイド・肥厚性瘢痕形成機構の研究は、創傷治癒の中心的役割を担うとされる“皮膚線維芽細胞”をメインになされてきた。しかし、線維芽細胞は様々な臓器に存在し、そこでは種々の細胞と相互作用し合う。そしてそれは皮膚においても同様であると考えられる。一方、ケロイド・肥厚性瘢痕は有色人種に多いことが知られている。これは言い換えれば皮膚のメラノサイトの活性が強い人種に多いということになる。加えて、ケロイド・肥厚性瘢痕は、体の部位によっても生じやすい部位と生じにくい部位があり、手掌・足底のようなメラノサイトの活性が弱い部位には有色人種でもケロイド・肥厚性瘢痕を生じることがほとんどない。よって、メラ

ノサイトがケロイド・肥厚性瘢痕形成に関与する可能性が考えられた。

(2) 創傷治癒におけるメラノサイトの動態を詳細に解明した報告はない。メラノサイトは、通常は真皮には存在せず表皮や毛包に存在する。すなわち基底膜より浅い層に存在している。しかし一旦、真皮に至る創を生じると基底膜が破綻したところから、真皮方向へと遊走していくのではないかと考えられる。そして、そこで線維芽細胞と相互作用をするのではないかという仮説を立てた。前述のように、創傷治癒時のメラノサイトの動態は知られていない。これは、動物モデルの欠如に起因すると思われる。マウスではメラノサイトは、ヒトと異なり表皮には存在せず、創傷治癒後の動態解明のモデルとして不十分である。まずは、メラノサイトがケロイド・肥厚性瘢痕形成に関与するかについて明らかにするため、メラノサイトが線維芽細胞へ与える影響について解明する必要がある。

(3) 培養細胞実験系でメラノサイトが線維芽細胞へ与える影響を解明する。これは線維芽細胞をメラノサイトと共培養することで観察する。これには、体幹由来メラノサイトと、それよりも活性が低いと報告されている手掌足底由来メラノサイトを区別して線維芽細胞と共培養する方法と、白色人種と黒色人種との人種由来のメラノサイトを区別して線維芽細胞と共培養する方法で検討を行う。

3. 研究の方法

皮膚線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化に関与するかを、人種由来別、部位別のメラノサイトとの共培養をそれぞれ行った。共培養は、接触法：線維芽細胞とメラノサイトを同一ディッシュで培養を行う方法、非接触法：線維芽細胞とメラノサイトとは培養液を共用するが、異なるディッシュで培養を行う方法、すなわちメラノサイトが分泌する因子が線維芽細胞へ影響を及ぼすかを確認する方法、にわけて検討を行った。

(1) 使用する細胞

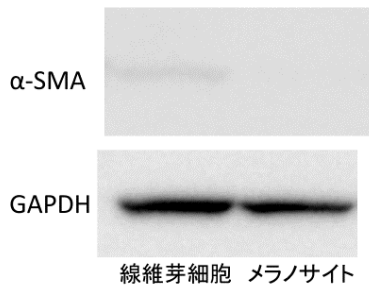
正常皮膚線維芽細胞は汎用性初代ヒト皮膚線維芽細胞を市販購入した。人種由来メラノサイトは白色人種由来のものと、黒色人種由来のものを市販購入した。いずれも体幹由来のメラノサイトであったため、足底由来のメラノサイトを準備する際、施設倫理委員会による許可を受けたプロトコールに則り、同意の得られた患者から手術における余剰皮膚を提供いただき、正常皮膚からメラノサイトを分離し初代培養した。どの細胞も、通常の培養細胞実験系で培養・継代を行い、継代数 3~8 の細胞を実験に用いた。

(2) 筋線維芽細胞への分化について
線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化については、そのマーカーである α -SMA の発現変化をウエスタンブロッティングにて解析を行った。

4. 研究成果

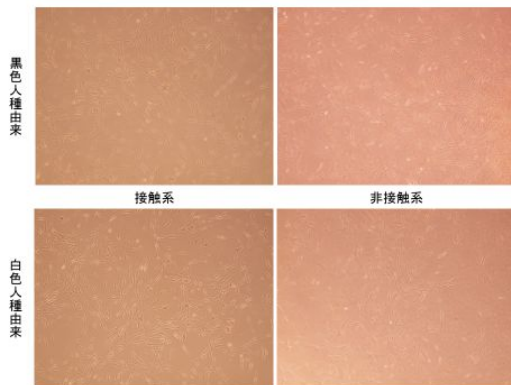
(1) 筋線維芽細胞への分化

正常線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を比較する際に、共培養するメラノサイトから α -SMA の発現がないかを確認した。以下のウエスタンブロッティングの結果より、メラノサイトから α -SMA の発現はなかった。



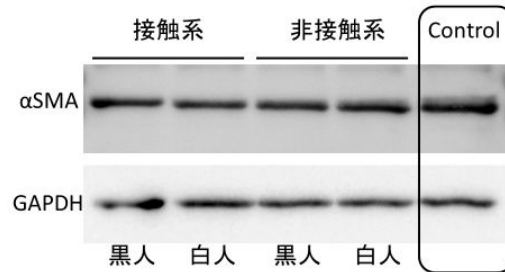
(2) 共培養による筋線維芽細胞への分化の違い

正常線維芽細胞を培養したディッシュに、24 時間の starvation を行った後、人種由来別のメラノサイトをそれぞれ接触系、非接触系にわけて、共培養を行った。共培養を開始した 24 時間後のそれぞれのディッシュの状態では、線維芽細胞の集簇性や増殖能に有意差は認めなかった。



次に、24 時間後の細胞をそれぞれ回収し、ウエスタンブロッティングにて、 α -SMA の発現の違いの検討を行った。正常線維芽細胞を単独で培養した場合 (Control) と比較して α -SMA の発現の違いは、接触系、非接触系とも有意差のある違いは認めず、また黒色人種と白色人種由来のメラノサイトで比較した場合も同様の所見であった。すなわち、線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化について、メラノサイトとの接触やメラノサイトから分泌される因子、人種由来別メラノサイ

トからの影響はないと推測された。



(3) 足底からのメラノサイト分離、培養

手術から得た足底の余剰皮膚より、ディスペパーゼを使用して表皮シートに分離した。そこからメラノサイトを分離し培養を行ったが、体幹由来と比較して足底由来のメラノサイトの細胞数は少なく、また足底の余剰皮膚の入手が限られていたため、実験に使用できるまでには至らなかった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

前田 大介 (Maeda Daisuke)

大阪大学医学部附属病院・医員

研究者番号：60772465

(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

()