

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11557

研究課題名(和文) 新たなケロイド治療法開発を目指した新規ケロイド幹細胞維持機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of maintenance mechanism of mesenchymal stem cells in keloid to develop new therapy

研究代表者

土佐 眞美子 (Tosa, Mamiko)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30301568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ケロイド患者の 発赤部と 隆起部 正常真皮から線維芽細胞および幹細胞様細胞を培養し、ケロイドを認めない 健常人の真皮由来線維芽細胞および幹細胞様細胞をコントロールとした。A遺伝子は、 で高発現を示し、A遺伝子の阻害剤Xを細胞に作用させると、ケロイド由来幹細胞においてのみ、濃度依存性の抑制効果が確認された。これらの結果より、遺伝子Aがケロイド発生に関与しており、その阻害剤Xは、ケロイドに対する新治療薬になる可能性が示唆された。今後、遺伝子Aと関連する他の遺伝子についての解析を行い、より効果的で副作用の少ないケロイド治療外用薬の確立を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Gli1 はヘッジホッグシグナルの標的転写因子である。Gli1 発現は、正常人皮膚では低いのに対して、ケロイド部においては、高発現を認め、興味深いことには、ケロイド患者の正常真皮由来の幹細胞においても高発現を認めたことから、ケロイド発生とケロイド体質決定にGli1 とそれを制御するヘッジホッグシグナルが関与している可能性が非常に高い。研究成果はケロイドの原因解明および新治療の確立につながり、それだけではなく、ケロイド体質診断法の開発創傷治療メカニズムの解明や癌治療への応用へと発展していく可能性が高く有意義な研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Fibroblasts and stem cells were cultured from (1) redness and (2) ridges (3) normal dermis of keloid patients, and (4) dermis-derived fibroblasts and stem cells of healthy individuals without keloid were used as controls. The A gene was highly expressed in (1), (2), and (3), and when the inhibitor X of the A gene was allowed to act on the cells, a concentration-dependent inhibitory effect was confirmed only in keloid-derived stem cells. These results suggest that gene A is involved in keloid development and that its inhibitor X may be a new therapeutic agent for keloids. In the future, we will analyze other genes related to gene A and aim to establish a more effective external drug for keloid treatment with few side effects.

研究分野：ケロイド

キーワード：ケロイド 幹細胞 ケロイド体質

## 1. 研究開始当初の背景

ケロイドに関する分子レベルの研究は多数報告されているが、ケロイド原因遺伝子の解明には至っていない。動物モデルが確立していないため、特効薬もなく、完治できない場合も少なくない。放置すれば、増大・悪化するためケロイド新治療の確立は急務である。

われわれは、マイクロアレイ法を用いた解析の結果、電子線治療のターゲットのひとつが、IL-6遺伝子であること、ケロイドにおいては、IL-6 シグナルの亢進により細胞増殖が促進し過剰なコラーゲン合成を引き起こすこと(Tosa et al J Invest Dermatol, 2005, 2007)、さらに、IL-6 プロモーター領域のSNP(IL-6-572 CG)がケロイドグループで有意に高いことを示し、ケロイド体質の存在を示した(Tosa et al J Invest Dermatol 2016)。また、ケロイド組織内には、10.9%に異所性骨化を認めたことから、正常皮膚には存在しないはずの細胞がケロイド内に存在するのではないかと考え、その起源として組織異常幹細胞(ケロイド組織幹細胞)に着目した。組織幹細胞は、組織の損傷が生じた際の修復過程や組織恒常性の維持にも関与する。近年、組織幹細胞の異常が、癌化や慢性炎症による線維化などを引き起こすことが報告されている(Nephrology Dialysis Transplantation 2016)。皮膚真皮にも幹細胞が存在することが知られており(Toma et al Nat. Cell. Biol. 2001)、最近では、創傷治癒過程は幹細胞が主役を担っているとする報告もある(Mariana et al Adv. Wound Care 2016)。従って、皮膚幹細胞の異常が創傷治癒過程の異常であるケロイド発生に関与している可能性はとて高い。そこで、われわれは、ケロイド患者のケロイド部と正常真皮から幹細胞を培養しケロイドを認めない健常人の真皮から得た幹細胞の遺伝子発現と比較検討した。ケロイド患者の正常真皮・ケロイド中央隆起部と平坦部、ケロイド末梢発赤部から得られた幹細胞は、大きさや数に差が認められ、A遺伝子の発現は、正常人と比較して、ケロイド患者の正常およびケロイド部で上昇していた(図参照)。A遺伝子は、ヘッジホッグシグナル下流で活性化される転写制御因子であることから、ヘッジホッグシグナルがケロイド発生やケロイド体質決定に関与している可能性が非常に高い。

## 2. 研究の目的

本研究はこれまでの知見をもとに、ケロイド真皮幹細胞に着目して、ケロイド発生新分子機構とケロイド体質診断マーカーの解明を目的とする。ヘッジホッグシグナルの阻害薬はすでに内服薬として臨床応用されており、これらを軟膏剤にして局所投与を可能にし、早期に患者に届けることを目指す。さらに、体質診断マーカーの候補遺伝子について、オーダーメイド実現化プロジェクトのケロイド解析結果を用いて、絞り込みを行い、ケロイド体質診断キットなどの実用化へと発展させる。

## 3. 研究の方法

### (1)ケロイド真皮幹細胞やケロイド組織で遺伝子Xの発現解析

これまでの予備知見では、ケロイド真皮幹細胞におけるmRNA レベルのA遺伝子の発現亢進を確認しているが、他の手法による再確認を行った。

ケロイド真皮幹細胞よりタンパク質を抽出し、ウエスタンブロット法を行い、タンパクレベルでもA遺伝子の発現を検討した。

健常人真皮由来線維芽細胞とケロイド真皮由来線維芽細胞をA遺伝子に対する抗体で免疫染色し、A遺伝子が発現している線維芽細胞の割合を比較した。

ケロイド患者と健常人の皮膚組織切片を用いてA遺伝子に対する抗体を用いた免疫染色を

行って、A遺伝子が発現している線維芽細胞の割合を比較した。

(2) ケロイド真皮幹細胞における遺伝子X発現誘導はヘッジホッグシグナルによって制御されているか？

ケロイド真皮幹細胞に1 $\mu$ M のヘッジホッグシグナル阻害剤を24, 48, 72 時間処理したのち、遺伝子Xの発現をリアルタイム定量PCR 法を行った。

ヘッジホッグシグナル阻害剤を処理したケロイド真皮幹細胞では、A遺伝子の転写活性も抑制されているかどうかをリアルタイム定量PCR法を行って、A標的遺伝子の発現低下を指標として 検討し、リアルタイム定量PCR 法の解析結果は、他の手法(ウエスタンブロット法や免疫染色法)によっても確認した。

(3) hedgehog シグナル経路を抑制すると、ケロイドを形成しない性質のケロイド真皮幹細胞になるのか？

ケロイド真皮幹細胞にhedgehog シグナルの阻害剤を作用後、線維芽細胞培養液で培養し72 時間後に細胞を回収してtotal RNA を抽出しコラーゲン関連遺伝子(FN1、COL1 2)発現やコラーゲン合成能を解析し、Mock の検体と比較した。

ケロイド由来線維芽細胞を合成細胞外気質ゲルに混合しヌードマウスの皮下に移植し、翌日からX遺伝子阻害剤を75mg/kg皮下注射し一ヵ月間連日投与し、その2か月後に皮下から組織サンプルを回収し、total RNA を抽出しコラーゲン関連遺伝子(FN1、COL1 2)発現を解析し、Mock の検体と比較した。

(4) ケロイド発症やケロイド体質決定における遺伝子X 標的遺伝子群の同定

ケロイド真皮幹細胞のtotal RNA を用いてマイクロアレイを行なって、正常真皮幹細胞と比較してケロイド患者の正常真皮幹細胞とケロイド真皮幹細胞において発現変化している遺伝子X標的遺伝子群の探索を試みた。発現差2 倍以上でp 値の低い順にいくつか候補分子を絞り、ケロイド真皮線維芽細胞を用いてRNAi 法を行って候補分子を発現抑制した時のコラーゲン関連遺伝子(FN1、COL1 2)発現やコラーゲン合成能を検討した。

(5) ケロイド発症やケロイド体質決定に関わるヘッジホッグシグナル経路以外のシグナル伝達経路の関与

マイクロアレイの結果から、パスウェイ解析を行って、他のシグナル伝達経路がケロイド発症やケロイド体質決定に関わっているのかどうかを検討した。項目B と同様に、発現差2 倍以上でp 値の低い順にいくつか候補分子を絞り、ケロイド真皮線維芽細胞を用いてRNAi 法を行って候補分子を発現抑制した時のコラーゲン関連遺伝子(FN1、COL1 2)発現やコラーゲン合成能を解析し、正常真皮線維芽細胞の結果と比較検討した。

#### 4 . 研究成果

(1) ケロイド真皮幹細胞やケロイド組織でA遺伝子の発現解析

A遺伝子とヘッジホッグシグナルの受容体である遺伝子Bの発現は、ケロイド真皮幹細胞において健常人真皮幹細胞と比較して上昇していた。タンパクレベルでもケロイド由来幹細胞(KS)において、健常真皮由来幹細胞(NS)と比較して、A遺伝子発現の上昇を認めた。

健常人真皮由来線維芽細胞(NF)とケロイド由来線維芽細胞(KF)におけるA遺伝子陽性細胞率  
NFと比較してKFにおいてA遺伝子陽性細胞率は上昇していた。

ケロイド組織および健常人皮膚組織における線維芽細胞のA遺伝子陽性率  
NFと比較してKFにおいてA遺伝子陽性細胞率は上昇していた。

(2) ケロイド真皮幹細胞におけるA遺伝子発現誘導はヘッジホッグシグナルによって制御されているか？

1  $\mu$ M のヘッジホッグシグナル阻害剤処理により、KSにおける経時的なA遺伝子の発現低下を認めた。つまり、ケロイド真皮幹細胞におけるA遺伝子の発現はヘッジホッグシグナル伝達経路によって制御されていると考えられる。

ヘッジホッグシグナル阻害剤を処理したKSでは、A遺伝子標的遺伝子の発現低下を認めた。A遺伝子の転写活性も抑制されていることが確認できた。

(3) hedgehog シグナル経路を抑制すると、ケロイドを形成しない性質のケロイド真皮幹細胞になるのか？

ケロイド真皮幹細胞にhedgehog シグナルの阻害剤を作用後、コラーゲン関連遺伝子(FN1、COL1 2)発現やコラーゲン合成能は、Mock の検体と比較して抑制された。

ヌードマウスに移植したKFを含む移植組織において、A遺伝子阻害剤投与群はMockの検体と比較して、組織体積の減少、コラーゲン関連遺伝子発現の低下を認めた。

(4) ケロイド発症やケロイド体質決定におけるA遺伝子標的遺伝子群の同定

ケロイド真皮幹細胞と正常真皮幹細胞と比較して発現変化しているA遺伝子標的遺伝子群をピックアップできた。

(5) ケロイド発症やケロイド体質決定に関わるヘッジホッグシグナル経路以外のシグナル伝達経路の関与

マイクロアレイの結果から、パスウェイ解析を行って、発現差2倍以上でp値の低い順に候補分子を絞ることができた。現在、ケロイド真皮線維芽細胞を用いてRNAi法を行って候補分子を発現抑制した時のコラーゲン関連遺伝子(FN1、COL1 2)発現やコラーゲン合成能を解析し、正常真皮線維芽細胞の結果と比較検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 土佐真美子、小川 令	4. 巻 16
2. 論文標題 ケロイドの病態と治療	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本医科大学医学雑誌	6. 最初と最後の頁 8-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 土佐真美子、阿部芳憲、田中信之、小川 令
2. 発表標題 ケロイド真皮由来間葉系幹細胞に着目したケロイド発症機構の解明と治療への応用
3. 学会等名 第27回日本形成外科基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土佐真美子、阿部芳憲、田中信之、小川 令
2. 発表標題 ケロイド新治療薬開発への挑戦
3. 学会等名 第27回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土佐真美子、阿部芳憲、田中信之、小川 令
2. 発表標題 ケロイド新治療薬開発に向けたケロイド患者と健常人の真皮における遺伝子発現プロファイル解析
3. 学会等名 第10回日本創傷外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土佐真美子
2. 発表標題 ケロイド病変部位における遺伝子発現プロファイルの検討
3. 学会等名 第26回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mamiko Tosa, Yoshinori Abe, Rei Ogawa, Teruyuki Dohi, Nobuyuki Tanaka
2. 発表標題 Hedgehog Signaling Pathway Maintains Mesenchymal Stem Cells in Keloid.
3. 学会等名 The Meeting American Society of Plastic Surgery 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	阿部 芳憲  (Abe Yoshinori)  (00386153)	日本医科大学・先端医学研究所・助教   (32666)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携 研究者	田中 信之  (Tanaka Nobuyuki)  (80222115)	日本医科大学・先端医学研究所・教授   (32666)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------