

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10006

研究課題名(和文) エピジェネティクス機構制御によるケロイド・肥厚性瘢痕に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapeutic option for keloid or hypertrophic scar with epigenetic regulation

研究代表者

高成 啓介 (Takanari, Keisuke)

愛知県がんセンター(研究所)・がん病態生理学分野・研究員

研究者番号：80378190

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)：本研究では、ケロイドにおけるエピジェネティクス機構の一端を解明し、エピジェネティクス治療薬によるケロイドの治療が可能であることを検証することを目的とする。初年度、2年度ではケロイド特異的な遺伝子のスクリーニング及び同定を行った。その後ケロイド特異的な発現変動遺伝子に対し定量PCRを行い、Gene1(仮称)のケロイド組織中でmRNA発現量上昇を確認した。また、免疫染色においてもGene1タンパクは正常瘢痕よりもケロイド組織中で高く発現していた。組み換えプラスミドを用いたGene1強制発現HEK293T細胞は細胞移動能が低下し、さらにsiRNAを用いてGene1発現を阻害すると細胞移動能は回復した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究でケロイド特異的に発現する遺伝子(Gene1)が同定され、*in vitro*で細胞の移動能に関する遺伝子であることが確認できた。今回の知見は2つの点で学術的及び社会的意義があると考えられる。

1. 詳細が完全に解明されていないケロイドの病態と細胞移動能の関係性が示唆された。今後この部分に着目した研究を行うことで病態解明に貢献できる可能性がある。
2. 今回ケロイド特異的な遺伝子(Gene1)の特定及びその働きについて知見が得られた。この遺伝子を用いた治療につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate part of the epigenetic mechanism in keloids and to test the feasibility of treating keloids with epigenetics therapeutics. The following results were obtained in this study. Quantitative PCR was performed on keloid-specific expression variation genes, and it was verified that Gene1 (tentative name) significantly increased mRNA expression in keloid tissues. Immunostaining also showed that Gene1 protein was more highly expressed in keloid tissues than in normal scars. Gene1 forced expression HEK293T cells with recombinant plasmid showed decreased cell mobility, which was restored when Gene1 expression was inhibited using siRNA.

研究分野：形成外科学

キーワード：ケロイド 肥厚性瘢痕 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

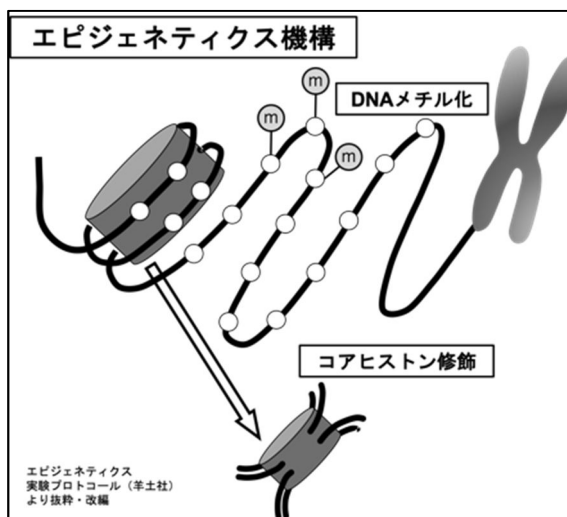
ケロイドは外的刺激などにより組織の繊維が増殖性に反応し、異常癒痕を形成するもので、疼痛・掻痒・癒痕拘縮といった症状により患者は悩まされる。ケロイドの罹患者は国内で年間 10 万人といわれ、罹患すると難治であるため、年々罹患者は増えている。特にケロイドは周囲の組織へ進展し、切除しても再発を繰り返すため難治であり、現在の治療はステロイドの外用や局所注射、切除と放射線治療などが行われているが、これらは基本的には対症療法であり、その原因の解明および病因に沿った治療が望まれている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ケロイドにおけるエピジェネティクス機構の一端を解明し、エピジェネティクス治療薬によるケロイドの治療が可能であるかを検証することである。

エピジェネティクスとは遺伝子発現のオンオフを決定づける機構であり、DNAメチル化やコアヒストンテール修飾などが代表的である(図1)。

ある疾患が発生するかどうかを決定づける遺伝子に対して、これを発現させるかど



うかをエピジェネティクスが制御しており、現在は主になん研究に用いられている。従来の診断は主に病理診断によって行われており、診断を行うためには生きた細胞を一定量以上採取し、染色した後に専門医が診断することが必要であったが、エピジェネティクス診断は、血液や組織液、排泄物など様々な試料から診断が可能である、試料となるDNAは比較的安定しており保存が可能である、疾患が顕在化する前の異常も検出できる可能性がある、原因が解明されればこれに応じた治療の可能性があるなどの特徴を持ち、診断から治療までをカバーする新しい診断・治療のツールとなる可能性を有している。

ケロイドは同じ遺伝情報を持った患者でも年齢や部位により発現が異なり、エピジェネティクス機構が関与している可能性があると考えられる。ケロイドは難治であり現在の治療は対症療法に留まるものがほとんどであるが、エピジェネティクスによる病態が解明されれば病因に沿った治療ができる可能性がある。

3. 研究の方法

本研究は名古屋大学医学系研究科 生命倫理審査委員会の承認を受けて行なった。

- 3-1. まず初年度は既存のゲノムデータベースを用いてケロイド特異的な遺伝子の探索研究を行った。パブリックデータベース(NCBI GEO)を利用し、ケロイド特異的に発現する遺伝子群の探索を行った。解析にはGSE113619、GSE92566、GSE7890のデータを用いた。続いて臨床のサンプルより樹立した正常癒痕およびケロイド由来のヒト皮膚線維芽細胞を用い、実際に候補となった7遺伝子の変動がみられるかについてin vitroで検証を行った。

3-2. 手術で破棄する組織から、ケロイド組織(n=51)および正常癒痕組織(n=63)を採取した。免疫組織染色(によって各組織の筋線維芽細胞の分布を比較し、ケロイド(n=3)と正常癒痕(n=2)の筋線維芽細胞が豊富な領域から RNA シークエンスを行った。さらに、同定した発現変動遺伝子を定量 PCR と免疫組織化学染色で検証した

4 . 研究成果

4-1. ケロイド・正常皮膚組織の遺伝子発現アレイ(GSE92566)、ケロイド・正常癒痕由来線維芽細胞の遺伝子発現アレイ(GSE7890)、ケロイド・正常癒痕組織を用いた RNA シークエンスデータ(GSE113619)において、2 遺伝子が共通してケロイド群で発現上昇を示した(発現変動 1.5 倍以上, $p < 0.05$)。また、ケロイド群で共通して発現低下を示すのは 5 遺伝子であった(発現変動 1.5 倍以上, $p < 0.05$)。

臨床サンプルでは候補となった 7 遺伝子のうち、定量 PCR において正常癒痕・ケロイド由来ヒト皮膚線維芽細胞で差次的発現を示したのは 1 遺伝子であった。この遺伝子に対してタンパク定量を行った結果、定量 PCR と同様に発現量に差がみられた。

4-2. ケロイド組織と正常癒痕組織の筋線維芽細胞の豊富な領域の比較したところ、いくつかの発現変動遺伝子が抽出された。次に、これらのケロイド特異的な発現変動遺伝子に対して定量 PCR を行ったところ、Gene1(仮称)はケロイド組織中で mRNA 発現量が有意に上昇していることが検証できた(図 2)。

また同時に、免疫組織化学染色においても Gene1 タンパクは正常癒痕組織よりもケロイド組織中で高く発現していることが分かった(図 3)。組み換えプラスミドを用いて Gene1 を強制発現させた HEK293T 細胞は、トランスウェルアッセイで細胞移動能が低

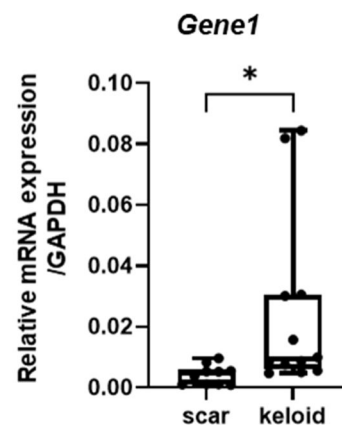


図 2 Gene 1 の発現量

下し、さらに siRNA を用いて Gene1 発現を阻害すると細胞移動能が回復した(図 4)。

以上の結果より、Gene1 は線維芽細胞の移動を負に制御し、ケロイド病態に寄与する可能性が示唆された。

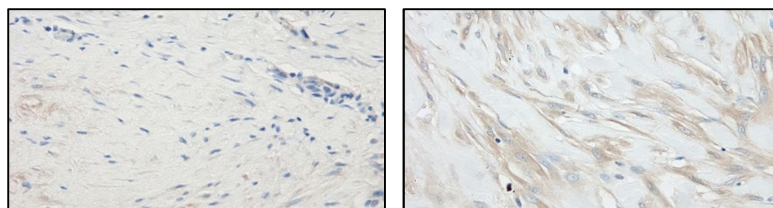


図 3 Gene 1 の組織内での発現

現在、論文投稿前であり、具体的な遺伝子名については割愛した。

5. 考察

今回の研究ではまず既存のデータベースからケロイドと正常皮膚組織で異なる遺伝子の候補の探索を行なった。その結果、7 つの候補遺伝子が同定され、これについて臨床で得

られたサンプルを用いて検討を行った。ケロイド、正常癒痕組織からそれぞれ単離した繊維芽細胞を用い発現量の差を検討したところ、一つの遺伝子 (Gene 1) でケロイド組織中の発現が正常癒痕に比べて優位に上昇しているという知見が得られた。また、この遺伝子は細胞の移動能の低下に関与していることも確認できた。これら一連の知見により、ケロイドの病態の一端に細胞移動能が関与しており、これに Gene 1 が関わっていることが示唆された。ケロイドの病態における細胞移動能変化についてはこれまでもいくつか報告があり (Dis Markers. 2023 Apr 12;2023:9638322.など) 今回の研究も合わせることで病態の解明につながり、ケロイドの治療薬の開発にもつながるのではないかと期待される。

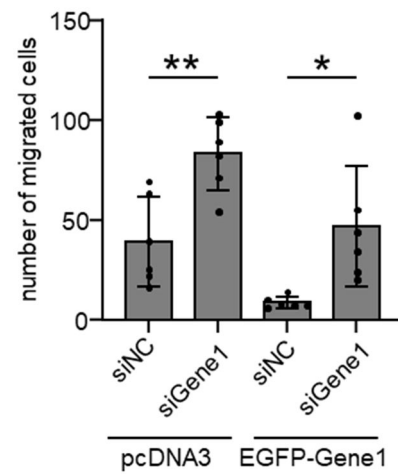


図4 細胞移動能と Gene 1 発現の関係

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大石真由美、新城恵子、高成啓介、内堀貴文、中村 優、神戸未来、落合美奈、鈴木寛久、蛭沢克己、近藤 豊、亀井 譲
2. 発表標題 パブリックデータベースを用いたケロイド関連遺伝子の探索
3. 学会等名 第12回日本創傷外科学会総会・学術集会
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	大石 真由美 (Oishi Mayumi) (00880098)	名古屋大学・医学部附属病院・医員 (13901)	
研究分担者	新城 恵子 (Sinjo Keiko) (40641618)	名古屋大学・医学系研究科・講師 (13901)	
研究分担者	亀井 譲 (Kamei Yuzuru) (10257678)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	蛭沢 克己 (Ebisawa Katsumi) (20397459)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	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	神戸 未来 (Kanbe Miki) (50597862)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	
研究分担者	中村 優 (Nakamura Yutaka) (00739724)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	
研究分担者	内堀 貴文 (Uchibbori Takafumi) (30625760)	名古屋大学・医学部附属病院・助教 (13901)	

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