

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18919

研究課題名(和文) 異常癬痕発症メカニズムの解明とメカノシグナル伝達経路の制御による治療

研究課題名(英文) Analysis of complex interplay of mechanosignaling pathways in abnormal scarring

研究代表者

土肥 輝之(Dohi, Teruyuki)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：10575385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究によって、異常癬痕のできやすい部位の解剖学的構造の特徴を解析し、日常動作によって力学的刺激が強くなる傾向であることがわかってきた。異常癬痕であるケロイドは辺縁正常皮膚へと炎症が波及し病変が広がるが、その局所では強いひずみが生じ、メカノシグナル伝達経路の重要な一つである Caveolin-1 / ROCK-1, ROCK-2 経路や虚血再灌流応答で重要な TLR4 経路などが活性化していることもわかってきた。今後さらに検討を重ね、新規治療法の開発につなげていきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異常癬痕であるケロイドや肥厚性癬痕は、掻痒や疼痛やひきつれに加え、ときに排膿を繰り返すこともあり、醜形とともに Quality of Life(QOL)の低下をもたらしている。特にケロイドは難治性であり、この異常癬痕の発生メカニズムの解明や根治的な治療法の開発が待たれている。本研究では、異常癬痕発生に重要な力学的要素の詳細な解析に基づいて、細胞・分子レベルでの解析・検討を行っている。得られた知見によって、より詳細な病態の解明や新たな治療標的分子の同定につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the characteristics of the anatomical structures of the skin and subcutaneous tissue of the whole body, as well as the mechanical properties caused by daily movements, and found that abnormal scars tend to occur in areas where strong mechanical loading are applied. We also found that keloids spread inflammation to the peripheral normal skin under high strain, and activation of mechanosignaling pathways related to the strain was observed. RNA sequencing analysis was then performed in three sites: in the highly strained peripheral normal skin, inside the highly stressed keloid, and in the control skin. We would like to develop novel therapies by identifying candidate factors that regulate persistent inflammation in this characteristic region.

研究分野：形成外科学

キーワード：異常癬痕 メカノシグナル伝達経路 ケロイド 肥厚性癬痕

1. 研究開始当初の背景

力学的な刺激が、皮膚の恒常性および外傷や創傷に対して与える影響については未だ不明な部分が多い。しかし、ヒトの日常生活動作による力学的刺激が強くかかる部位に異常癒痕であるケロイド・肥厚性癒痕が好発することがわかってきており、これら異常癒痕の過剰創傷治癒・線維化の亢進の大きな要因となっていることも徐々に分かってきた。

また、ケロイドや肥厚性癒痕は掻痒や疼痛やひきつれに加え、ときに排膿を繰り返すこともあり、醜形とともに Quality of Life(QOL)の低下をもたらしている。ケロイドと肥厚性癒痕や正常癒痕の違いは、周囲正常皮膚への炎症の波及が起こるか起こらないかで臨床的に定義されている。特にケロイドは難治性であり、未だ根治的治療法がなく、副腎皮質ホルモン剤のテープや注射、外科的切除術及び術後放射線照射などを用いた集学的治療が行われている。ケロイドの研究が進みづらい原因として、いまだマウスなどの動物モデルが確立されていないことが挙げられ、ヒト特有の疾患であることも示唆されている。

最近のわれわれの研究で、部分的な解析ではあるが、ヒトの「姿勢変換」という日常生活動作での皮膚の伸展変化の強さと異常癒痕であるケロイドの好発部位の関連がわかってきており、コンピュータシミュレーションの結果、ケロイドの炎症の波及・進展するケロイド辺縁正常皮膚部には長時間にわたる強い Mechanical Strain (ひずみ) が加わることが判明してきた。また、ケロイド内部辺縁には長時間の強い Mechanical Stress (応力) が加わっており、これらの力学的要素の違う部位ではそれぞれ様々なメカノシグナル伝達経路の活性化が起こってくることも少しずつわかってきた。(Dohi et al. Plast Reconstr Surg 2019)しかし依然として詳細が不明な部分も多いのが現状であり、解明が待たれている。

2. 研究の目的

異常癒痕であるケロイドにおいて、体幹部・体幹部近傍の好発部位では、ヒトに特徴的な長時間続く伸展と弛緩を繰り返す「姿勢変換」が重要かつ影響の大きな力学的刺激となっていることが判明してきた。

本研究により、マクロのレベルでは、ヒトの皮膚・皮下の構造の解析や身体部位ごとに日常生活動作における力学的要素やその変化の詳細な解析を行い、異常癒痕形成・増悪と力学的要素との相関・関連性を調査する。

また、組織から細胞・分子レベルでは、異常癒痕における、力学的要素の違う重要な部位におけるメカノシグナル伝達経路などの発現・活性化を解析し、高発現を示す特徴的な細胞群における詳細な解析を行っていく。

これによって、ケロイドをはじめとした異常癒痕の病態メカニズムの解明、新規治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

- a. 異常癒痕であるケロイド・肥厚性癒痕の好発部位の力学的特徴や解剖学的特徴を捉えるために、全身の皮膚・皮下の解剖学的構造や異常癒痕の周辺の血管構造や分布、日常生活動作による各種力学的要素の変化を捉えることとした。

具体的には、全身の皮膚・皮下組織の構造を超音波診断装置(LOGIQ e Premium®)にて網羅的に解析すると同時に、異常癒痕であるケロイド・肥厚性癒痕の好発部位において、超音波診断装置・硬度計(Indentmeter®IDM400)・3D カメラ(VECTRA®H2)・近赤外線分光法等を用いて日常生活動作による各種力学的要素・変化を網羅的に解析した。

- b. また、同時にケロイド組織検体を用いて、「姿勢変換」などの日常生活動作にて長時間にわたる強いひずみのかかっているケロイドの辺縁正常皮膚や、長時間強い応力のかかっているケロイド内部辺縁部、およびコントロール

皮膚において、注目するメカノシグナル伝達経路、また長時間のひずみと弛緩に関連した虚血再灌流応答に重要な TLR4 経路などを中心に免疫組織学的にて発現・活性について明らかにし、ターゲットとなる細胞群を特定した。

- c. b.の結果より、これらのなかで複数の経路において線維芽細胞等の間葉系細胞で主に活性化を認めたため、フローサイトメトリーにて表面マーカーによりその他の細胞群を除き、分離採取した上で、RNA シークエンス解析をケロイド内部辺縁部・辺縁正常皮膚・コントロール皮膚の3部位にて行い、遺伝子発現について網羅的に解析・比較検討を行った。
- d. また b.の結果から、ケロイド辺縁正常皮膚では、Caveolin1/ROCK1/2 経路の活性化と同時に TLR4 の活性上昇を認めたため、ケロイド由来線維芽細胞の初代培養を行い、この TLR4 経路の詳細を明らかにするために、c.の RNA シークエンス解析と同時進行で、コントロール群、TGF 投与群、LPS 投与群、TGF + LPS 投与群等に分けて、コラーゲンや SMA などの遺伝子発現を qPCR にて解析・検討を行った。

4. 研究成果

- a. まず異常癒痕発生の要因を、まず皮膚・皮下の構造を解析するために、超音波診断装置を用いて全身の皮膚・皮下組織の解剖学的特徴を解析・比較検討した。その結果、背部上方（肩甲部中心に）では皮膚が最も厚く、体幹部上部である胸部、背部上方では皮下の膜様構造である浅筋膜構造や深筋膜構造が発達していることが判明した。臀部でも筋膜構造は発達していたが、腹部とともにこの膜様構造に比して皮下脂肪が厚い傾向が認められた。そして、顔面・頸部、胸部などの部位全体における詳細な異常癒痕発生分布と日常生活動作による硬度や伸展変化、厚さの変化について、現在も解析・比較検討を行っているが、好発部位ではこれらの要素・変化が強い傾向が認められており、今後は多変量解析によって各種要素・変化の関連・相関を検討していく予定である。
- b. ケロイドの特徴として、辺縁正常皮膚へと病変が広がっていく。以前のわれわれの研究でひずみに関連してケロイド辺縁正常皮膚では、メカノシグナル伝達経路である Caveolin-1/ROCK1 経路の活性化があることがわかってきたが、本研究では ROCK2 も活性化していることが免疫染色の結果、判明した。また、SMA との共染色により、これら Caveolin-1 / ROCK1/2 経路が、高発現している細胞群は主に真皮乳頭層から網状層にかけての間質内に存在し、血管近傍の細胞での高発現も見られ、線維芽細胞・周皮細胞等の間葉系細胞を中心に発現している可能性が示唆された。また、TLR4 経路もこのケロイド辺縁正常皮膚で高発現が見られ、SMA や CD31 との共染色の結果、同様に線維芽細胞などの間葉系細胞を中心に高発現していることが確認された。
- c. そのため、つぎに、以前の研究および b.の結果を受け、ひずみが強いケロイド辺縁正常皮膚部、応力の高いケロイド内部辺縁部、コントロール皮膚の3部位の組織検体から、間葉系細胞である線維芽細胞をフローサイトメトリーにより分離採取し、RNA シークエンス解析を行った。本実験では、当初レーザーマイクロダイセクションでの細胞分離を検討し、その後 Magnetic cell sorting (MACS)法にて、細胞分離を複数回施行したが、思うような細胞数を確保することができず、分離採取法の最適化に時間を要した。そのため、現在その結果を分析・比較検討を行っているところである。（図）
- d. そして、初代培養のケロイド由来線維芽細胞を用いた投与実験の結果、TGF 投与群で、先行研究と同様に Col1A1 および SMA の遺伝子発現の上昇を認めたが、LPS 投与群に関しては、細胞傷害もあり、投与濃度の条件検討も行っており、現在は LPS などの PAMPs だけでなく、RNA シークエンスの結果などをもとに Candidate な因子に着目し、検討を行なっているところである。

本研究によって、全身の皮膚・皮下の解剖学的構造の解析を行うことができ、硬度計などのデバイスを用いて異常癒痕と各種力学的要素・変化の相関や関連の

検討の土台を作ることができた。また、ケロイドのような非常に硬い組織からの細胞分散法に苦労したが、現在は最適化でき、本研究で、力学的要素の応じた間葉系細胞の網羅的解析の結果が得られるなど、一定の成果を得ることができた。しかし、時間や予算の関係で、網羅的解析から細胞実験をつなげていくことができなかったため、今後はさらに継続して研究をすすめ、異常瘢痕の発生メカニズム解明や新規治療法・予防法の開発を目指していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 土肥輝之
2. 発表標題 力学的刺激による異常瘢痕形成メカニズムの解明およびメカノシグナル伝達経路の制御による治療
3. 学会等名 第87回日本医科大学医学会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 土肥輝之
2. 発表標題 力学的刺激が創傷治癒・瘢痕形成に与える影響の解析：力学的環境を調整する革新的治療法の開発に向けて
3. 学会等名 第87回日本医科大学医学会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 土肥輝之, Padmanan J, 赤石諭史, 寺嶋正雄, Tan P, 松本典子, 小川令, Gurtner GC
2. 発表標題 力学的刺激が異常瘢痕形成に与える影響の解析
3. 学会等名 第49回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 土肥輝之, Padmanan J, 赤石諭史, Gurtner GC, 小川令
2. 発表標題 ケロイドに対する虚血再灌流障害の影響の検討
3. 学会等名 第49回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 土肥輝之, 土佐眞美子, 青木雅代, 赤石諭史, 小川令
2. 発表標題 ケロイドの手術法の実際ー皮膚への力学的刺激の最小化に向けてー
3. 学会等名 第25回日本形成外科手術手技学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Teruyuki Dohi
2. 発表標題 Effects of various mechanical stimuli on abnormal scars
3. 学会等名 The Second Congress of The Asian Pacific Society for Scar Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 加来知恵美, 市野瀬志津子, 土肥輝之, 土佐眞美子, 青木雅代, 松本典子, 野一色千景, 有馬樹里, 赤石諭史, 小川令
2. 発表標題 ケロイド真皮網状層エオジン好性エリアの電顕観察-筋線維芽細胞とkeloidal collagen-
3. 学会等名 第28回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Hammoudeh D, Dohi T, Cho H, Ogawa R.
2. 発表標題 In Vivo Quantitative Analysis Of Subcutaneous Membranous Layers -Superficial And Deep Fascia- In Eleven Regions Of The Human Body.
3. 学会等名 Plastic Surgery Research Council (PSRC) 2021 Virtual Meeting. (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Dohi T, Akaishi S, Tosa M, Ogawa R.
2. 発表標題 Current Strategies in site-specific surgical treatment of abnormal scarring to minimize skin tension.
3. 学会等名 The 2nd World Congress of Global Scar Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Hammoudeh D, Dohi T, Cho H, Ogawa R.
2. 発表標題 In Vivo Analysis of the Superficial and Deep Fascia to Optimize Subcutaneous Sutures.
3. 学会等名 The 2nd World Congress of Global Scar Society (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 張萌雄, 土肥輝之, 若井英恵, 小川令
2. 発表標題 顔面、顎部の力学的要素の解析研究
3. 学会等名 第30回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 土肥輝之、加来智恵美、市野瀬志津子、大久保ゆり、青木雅代、土佐眞美子、松本典子、小川令
2. 発表標題 Keloidal Collagenの網羅的タンパク質解析
3. 学会等名 第29回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 若井英恵, 土肥輝之, 張萌雄, 小川令
2. 発表標題 胸部ケロイドの発生分布と各種力学的要素の関連性の検討
3. 学会等名 第65回日本形成外科学会総会
4. 発表年 2022年～2023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
研究協力者	本田 梓 (Honda Azusa)	日本医科大学・形成・再建・再生医学・大学院生 (32666)	
研究協力者	張 萌雄 (Cho Hoyu)	日本医科大学・形成・再建・再生医学・大学院生 (32666)	
研究協力者	若井 英恵 (Wakai Hanae)	日本医科大学・形成・再建・再生医学・大学院生 (32666)	
研究協力者	ディア ハムーデ (Diya' Hammoudeh)	日本医科大学・形成・再建・再生医学・Research Fellow (32666)	
研究協力者	小池 博之 (Koike Hiroyuki) (20821771)	日本医科大学・生化学・分子生物学(代謝・栄養学)・講師 (32666)	

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
研究協力者	大石 由美子 (Ooishi Yumiko) (80435734)	日本医科大学・生化学・分子生物学(代謝・栄養学)・主任教授 (32666)	
研究協力者	小川 令 (Ogawa Rei) (70398866)	日本医科大学・形成・再建・再生医学・主任教授 (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