

機関番号：14301  
研究種目：若手研究 (B)  
研究期間：2009～2010  
課題番号：21791742  
研究課題名 (和文) ケロイドの病態形成に関与する糖鎖機能の解析  
研究課題名 (英文) Analysis of roles of glycosaminoglycans in keloid pathogenesis  
研究代表者  
山脇 聖子 (YAMAWAKI SATOKO)  
京都大学・医学研究科・時間雇用教職員  
研究者番号：70378777

研究成果の概要 (和文) :ケロイド病変部では、コラーゲン束を取り囲むようにして、デルマトン硫酸、コンドロイチン硫酸が多量に蓄積していた。特にコンドロイチン硫酸は、通常は皮膚には微量しか存在しない成分であり、ケロイドに特徴的な異常コラーゲンの形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Excess accumulation of dermatan sulfate and chondroitin sulfate surrounding abnormal collagen bundles were found in keloid lesions. We propose that chondroitin sulfate plays a crucial role in the development of keloid lesions through the abnormal collagen fiber formation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2010年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：ケロイド、糖鎖、GAG

## 1. 研究開始当初の背景

ケロイドは、にきびや虫刺されなどのごく軽微な創傷において炎症が持続し、腫瘤を形成すると同時に周囲の正常皮膚に徐々に増大していくもので、形成外科診療において頻度の高い良性疾患であるが、治療には非常に難渋し、その病態形成のメカ

ニズムや病因もいまだ解明が進んでいない。申請者らはケロイド病変部において、糖鎖の一種であるグリコサミノグリカン（以下 GAG）が過剰蓄積していることを発見し、ケロイドの病態と何らかの関与がある可能性が高いと推察された。蛋白が多彩な機能を獲得するのは、翻訳後修飾によ

るところが大きく、その中で最も頻度の高い修飾である糖鎖は、蛋白質機能を決定づける要因として重要視されている。このような観点から、ケロイドにおける糖鎖の異常蓄積は、病変部を構成する細胞になんらかの重大な影響を与え、病態形成に深く関与する可能性が高いと推察し、本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

グリコサミノグリカンには、ガラクトースあるいはグルクロン酸とヘキソサミンから成る二糖が、繰り返し直鎖状に伸びた構造を持つ。この二糖の組み合わせや硫酸化、エピマー化（糖の立体構造が反転化すること）により、ヒアルロン酸（以下 HA）、ヘパラン硫酸（以下 HS）、コンドイチン硫酸（以下 CS）、デルマトン硫酸（以下 DS）、ケラタン硫酸（以下 KS）が知られており、コンドイチン硫酸はその硫酸基の位置によりさらに CS-A、C、D、E に分類される。しかし、これら GAG 間の構造上の違いは、糖の水酸基や硫酸基の位置が若干異なるのみであり、機能的に大差を生まないようにもみえる。しかし、最近になって、この微細な使い分けが生体ではなされていることがわかってきた。このため、ケロイドに過剰蓄積している糖鎖の種類と局在を同定し、その糖鎖がケロイド病態形成においてどのような機能的役割を果たしているのかを解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ケロイド病変部に蓄積しているグリコサミノグリカン（以下 GAG）の種類と組織内における局在について、実験を行った。インフォームドコンセント後、手術を受けた患者より得たケロイド組織 4 例、正常皮膚組織 2 例を用いた。切除組織を 4%パラホルムアルデヒド、あるいは 1%酢酸含有 95%エタノールで固定後、パラフィン包埋し作製したパラフィン切片に対して、トルイジンブルー染色、各種 GAG 分解酵素（コンドイチナーゼ ABC、コンドイチナーゼ AC、デルマトナーゼ、ヒアルロニダーゼ）処理を行ったものと、酵素処理を行わない切片に対して、アル

シアンブルー染色（pH2.5）を行った。

(2) 同切片に対して、酵素前処理後、ビオチン化ヒアルロン酸結合蛋白、抗ケラタン硫酸抗体、抗コンドイチン硫酸抗体、抗パーシカン抗体による免疫組織化学染色による染色を行った。

(3) (1)、(2) で、ケロイド組織には大量のコンドイチン硫酸 A、B、C（CSA、CSB、CSC）が蓄積していることが考えられたため、それを確かめるべく、二糖解析を実施した。

組織を蛋白分解酵素で処理したのち、GAG 分解酵素で二糖に分解し、HPLCで標準物質との比較により、量を測定し、乾燥重量で除し、mgあたりの含有量を測定する。この方法により、以下の種類の二糖について定量する。

CS $\Delta$ Di0S（コンドイチンの二糖）、CS $\Delta$ Di6S（GalNAc の 6 位に硫酸基を持つ二糖=CS-C）、CS $\Delta$ Di4S（GalNAc の 4 位に硫酸基を持つ二糖=CS-A）、DS（デルマトン硫酸の 2 糖）、HA（ヒアルロン酸の二糖）、M-KS（ケラタン硫酸モノ硫酸）、D-KS（ケラタン硫酸ジ硫酸）。

## 4. 研究成果

(1) 正常皮膚に比較し、ケロイド病変部は、トルイジンブルーによる濃染をみとめた（図 1）。また、正常皮膚に比較し、ケロイド組織切片は、アルシアンブルーによる濃染を認めた（図 2-a, b）。この濃染は、コンドイチナーゼ ACI（図 2-c）、ヒアルロニダーゼ（図 2-d）、のいずれによっても退色し、その退色の程度は、コンドイチナーゼ AC  $\geq$  ヒアルロニダーゼの順であった。このことより、ケロイド組織には、コンドイチン硫酸、デルマトン硫酸、ヒアルロン酸が存在し、特にコンドイチン硫酸が大量に存在することが推測された。

(2) ビオチン化ヒアルロン酸結合蛋白、抗コンドイチン硫酸抗体、抗パーシカン抗体による免疫組織学的染色（図 3）では、病変部に染色性を強く認め、病変部内におけるヒアリン化した異常コラーゲン束周囲に強い染色性が観察された。抗ケラタン硫酸抗体による免疫組織化学染色では染色性を確認できなかった。以上より、ケロイド病変部にはコ

ンドロイチン硫酸が多量に存在し、コラーゲン束周囲および病変部辺縁に蓄積していることが判明した。

(3) 二糖解析の結果 (図 4)、ケロイド組織におけるもっとも含有量が多い GAG は、コンドロイチン硫酸 (以下 CS)、ついでデルマトラン硫酸 (以下 DS) であった。ケロイド組織の乾燥重量 1mg 中、平均含有量は、CS が  $4.13 \pm 1.05 \mu\text{g}$ 、DS が  $5.08 \pm 0.78 \mu\text{g}$  であった。これに対して、正常皮膚では、乾燥重量あたり、CS が  $0.34 \pm 0.21 \mu\text{g}$  であった。従って、ケロイド組織における CS、DS の含有量は、正常皮膚組織に比較して、CS ばは 12 倍、DS は 5 倍、多量であることが判明した。過去の報告から、正常皮膚における主な GAG は、DS と HA が知られている。しかし、CS は、皮膚には少量しか含まれず、軟骨組織に大量に含有される GAG として知られている。ケロイド組織は硬く、断面は乳白色で光沢をもつ。患部は皮膚が本来もつしなやかさが欠如しており、患部のひきつれや機能障害をもたらすが、このような病態の原因として、軟骨の主成分である CS の患部への大量蓄積が示唆された。

以上より、ケロイド組織には、通常の皮膚組織には微量しか存在しない GAG (CS、コンドロイチン硫酸) が大量に蓄積しており、それは、異常コラーゲン線維を取り囲む形で存在することがわかった。このことは、CS がケロイドに特徴的な異常コラーゲン形成に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

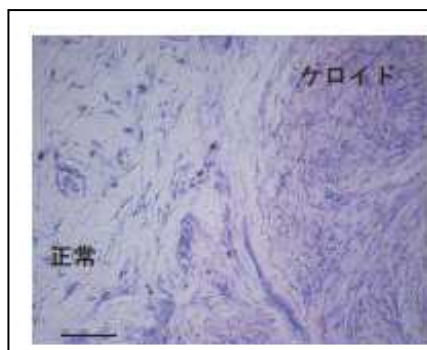


図 1

Bar=100  $\mu\text{m}$

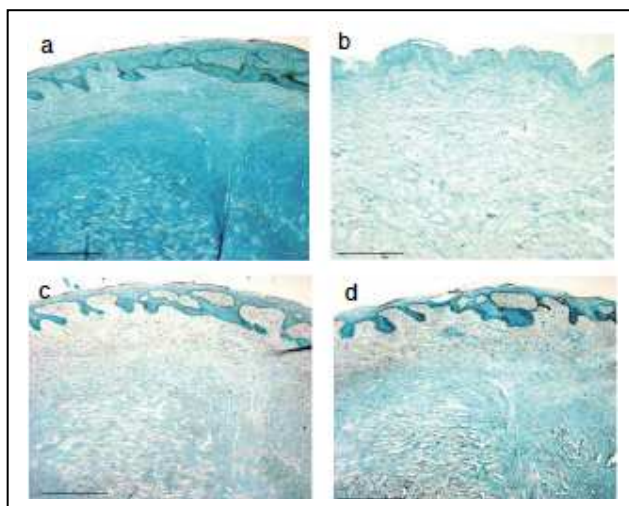


図 2

Bar=500  $\mu\text{m}$

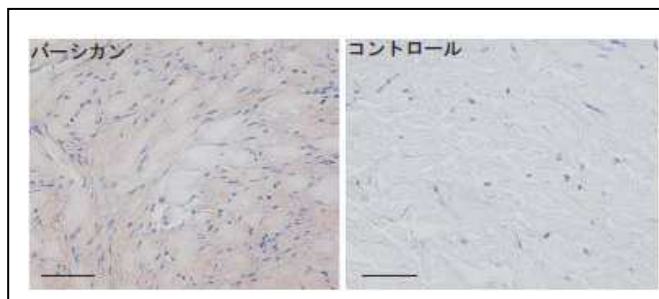


図 3

Bar=50  $\mu\text{m}$

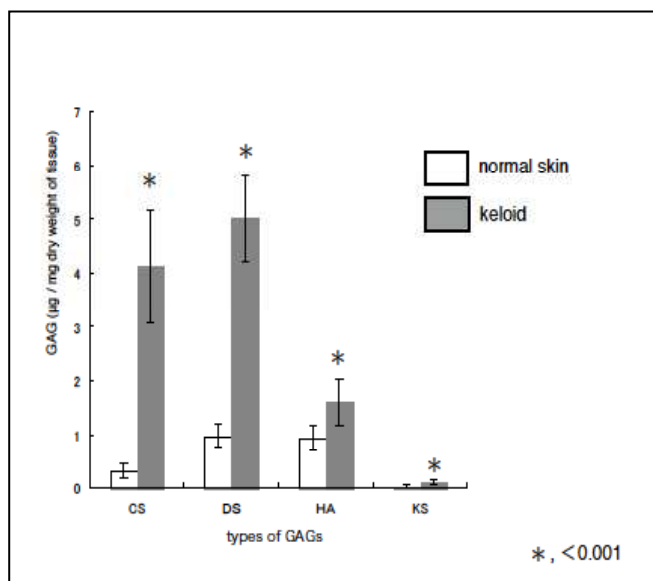


図 4

\* , <math>P < 0.001</math>

## 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3件)

- ① 山脇聖子他、Keloids can be forced into remission with surgical excision and radiation followed by adjuvant therapy、Ann Plast Surg、査読有、in press.
- ② 山脇聖子、「甲賀病院におけるケロイド治療の現況」、公立甲賀病院紀要、査読無、13巻、2010、pp. 81-85
- ③ 山脇聖子、内藤素子、「ケロイド・肥厚性瘢痕の手術療法」、PEPARS、査読無、No. 33、2009、pp. 38-47

[学会発表] (計4件)

- ① 山脇聖子、内藤素子、「ケロイド肥厚性瘢痕の分類と評価」、第4回瘢痕・ケロイド治療研究会 (パネルディスカッション)、2010年11月30日
- ② 山脇聖子、内藤素子、「肥厚性瘢痕・ケロイドの治療」、平成22年度日本形成外科学会秋季学術講習会、2010年9月15日
- ③ 山脇聖子、内藤素子、「scar scaleによる術後2年間のケロイド治療成績評価」、第2回日本創傷外科学会総会学術集会、2010年7月30日
- ④ 山脇聖子、内藤素子、「ケロイド治療後の時系列評価の試み」、第53回日本形成外科学会学術集会総会、2010年4月7日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山脇 聖子 (YAMAWAKI SATOKO)

京都大学・医学研究科・時間雇用教職員

研究者番号：70378777