

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659324

研究課題名（和文）

ケロイドにおける遺伝子発現制御の解明

研究課題名（英文）

A genomic screening for the genes upregulated by DNA demethylation in human keloid-derived fibroblasts

研究代表者

須永 中 (Sunaga Ataru)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：00406117

研究成果の概要（和文）：

自治医科大学倫理委員会の承認のもと、患者より採取したケロイド検体から皮膚線維芽細胞を初代培養・継代・保存した。典型的な胸部ケロイド症例3例のケロイド由来皮膚線維芽細胞に対して、脱メチル化酵素阻害剤にて処理した後、DNAマイクロアレイ解析を行った。その結果、脱メチル化酵素阻害剤の処理によって発現が16倍以上上昇し、かつプロモーター領域にCpG islandを有する遺伝子25種類が同定された。

この結果は、エピジェネティック制御がケロイド発生に関与している可能性があり、新しい治療ターゲットとなりうることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

We carried out a genome-wide screen for the genes upregulated by DNA demethylation in human keloid-derived fibroblasts and showed that 25 genes with promoter CpG island were upregulated 16-fold or more.

These results suggest epigenetic modification is involved in keloid pathogenesis and could be a new therapeutic target for keloid.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	0	2,200,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	2,900,000	210,000	3,110,000

研究分野：形成外科学

科研費の分科・細目：創傷治癒学

キーワード：ケロイド

1. 研究開始当初の背景

(1) ケロイド研究の現状

ケロイドは、主に創傷治癒の過程においておこる皮膚線維増殖性疾患である。臨床的には明らかな「ケロイド体質」というものが存在するため、何らかの遺伝学的背景があると考えられてきたが、いまだに特定の原因遺伝子は見つかっていない。ケロイドはヒトにしかできず、ケロイドの病態を正確に反映したモデル動物が不在であるため、ヒトから採取したケロイド検体を用いた研究しかできないことがケロイド研究の進展を妨げている。そのため、ケロイドの病態生理については徐々に理解がすすんできているものの、その病因や発生過程における有病者と健常人との違いについてはほとんどわかっていない。

(2) エピジェネティック修飾の現状

遺伝子のプロモーター領域に存在するCpG island (CGが連続する配列) のDNAメチル化やヒストンの脱アセチル化などといったエピジェネティック (epi-genetic: 遺伝の後に起こる) な修飾によっておきる遺伝子の発現抑制 (Epigenetic silencing) は、発生や発癌において大きな役割を果たしていることが知られている。例えば、発生の各段階において、もともと同じゲノムをもっているはずの細胞が、それぞれ異なる遺伝子を発現して様々な細胞に分化していく過程では、このエピジェネティックな遺伝子発現制御が主な役割を果たしていることが明らかになっている。また、多くの発癌の過程においては、癌抑制遺伝子の Epigenetic silencing が発癌の引き金にな

りうることが知られている。

近年、このエピジェネティック修飾が悪性腫瘍のみならず、生活習慣病や線維化疾患の発症にも関わっていることが示唆され始めており、エピジェネティック修飾をターゲットとした創薬などに対する期待が高まっている。

以上の背景のもとに、我々は「エピジェネティック修飾が、ケロイドの発症に大きく関与している、もしくはケロイドの病因そのものである」という仮説をたて、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ケロイド発生に関与するエピジェネティックな遺伝子発現制御を網羅的に解析することによって、ケロイドの病因を解明することである。

3. 研究の方法

(1) 検体採取、皮膚線維芽細胞の初代培養

自治医科大学倫理委員会の承認のもと、自治医科大学形成外科ケロイド・癬痕外来を受診し、手術適応となった患者約50名から正常皮膚・正常癬痕・肥厚性癬痕・ケロイド検体を採取した。採取した検体より、皮膚線維芽細胞を初代培養・継代・保存した。

(2) 脱メチル化酵素阻害剤処理・RNA抽出・DNAマイクロアレイ解析

保存した検体の中から典型的な胸部ケロイド症例3例を抽出し、それらのケロイド由来皮膚線維芽細胞を脱メチル化酵素阻害剤

5-aza-Cによって処理した。薬剤未処理群と薬剤処理群の細胞から、それぞれRNAを抽出し、Agilent SurePrint G3 Human Gene Expressionを用いてDNAマイクロアレイ解析を行った。

(3) データ解析

DNAマイクロアレイ解析の結果から、未処理群と比較して薬剤処理群において発現が16倍以上上昇している遺伝子を抽出した。UCSC Genome BrowserとMethyPrimerを用いて、抽出された遺伝子の配列を解析し、プロモーター領域周辺にCpG islandが存在するかどうか調査した。

4. 研究成果

(1) 皮膚線維芽細胞の初代培養

患者より採取した検体から皮膚線維芽細胞の初代培養を試みた結果、正常皮膚9例、正常癒痕9例、肥厚性癒痕5例、ケロイド25例の皮膚線維芽細胞の継代・保存に成功した。

(2) 薬剤処理・RNA抽出・DNAマイクロアレイ解析

脱メチル化酵素阻害剤未処理群と比較して、処理群において発現が16倍以上上昇している遺伝子68種類が同定された。

(3) データ解析

68種類の遺伝子における遺伝子配列を調査したところ、プロモーター周辺領域にCpG islandを有する遺伝子25種類が同定された。

(4) 考察

今回抽出された25種類の遺伝子は、ケロイド由来皮膚線維芽細胞において、DNAメチル化による遺伝子発現抑制を受けている可能性がある。今後は、正常癒痕由来皮膚線維芽細胞との比較により、ケロイド特異

的に発現が抑制されている遺伝子を絞り込んだうえで、Methylation-specific PCRとBisulfite sequencingによって、実際にDNAメチル化による遺伝子発現抑制が起こっているかどうかの検証作業を行っていく。最終的に絞り込まれた遺伝子については、遺伝子改変動物の作製を含めた機能解析を行う予定である。

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2件)

①須永中、菅原康志、宇田宏一、去川俊二、宮崎邦夫、今西理也、加持秀明
ケロイド研究の過去と未来
第19回日本形成外科学会基礎学術集会、
2010/09、東京

②須永中、菅原康志、宇田宏一、去川俊二、桂木容子、宮崎邦夫、加持秀明
各種Scar Scaleによる癒痕の評価
第55回日本形成外科学会総会・学術集会、
2011/04、東京

〔図書〕 (計1件)

①菅原康志、宇田宏一、去川俊二、須永中、宮崎邦夫、加持秀明
克誠堂出版
モバイルブック 形成外科、2012

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須永 中 (Sunaga Ataru)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：00406117

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし