

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592646

研究課題名(和文)マトリックスプロテアーゼHtrA1によるケロイド組織の浸潤メカニズム

研究課題名(英文)Analysis of HtrA1

研究代表者

内藤 素子(Naitoh, Motoko)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30378723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：正常皮膚と比較し、ケロイド組織では、HtrA1とその基質であるフィブロネクチンが高発現することを示した。またケロイド組織では、正常皮膚と比較しフィブロネクチンの断片化がより認められる傾向にあった。HtrA1のノックダウンにより細胞増殖は抑制され、その作用はHtrA1が基質とするマトリックスの有無に影響を受けることから、HtrA1はマトリックスのリモデリングを介してケロイド病態の進行に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Keloids are a dermal fibrotic disease whose etiology remains unknown. To clarify the molecular mechanism of keloid pathogenesis, we focused on HtrA1, a serine protease-family protein to investigate roles of this protein in keloid pathogenesis. HtrA1 and whose substrate, Fibronectin were over-expressed in the keloid lesions, and fragmentation of Fibronectin was observed in keloid lesions. Knockdown of HtrA1 in keloid-derived fibroblasts lead to reduce cell proliferation rate. Thus, HtrA1 may promote keloid development through matrix degradation

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 HtrA1 マトリックス リモデリング セリンプロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

HtrA1(high-temperature requirement protein A1)は、大腸菌 **HtrA** (**DegP**)のヒトホモログであり、変形性膝関節症や黄斑変性症、卵巣がんや悪性黒色種などの悪性腫瘍等、様々なヒト疾患への関与が報告されている。特に変形性膝関節症では、**HtrA1** のセリンプロテアーゼとしての機能が、病態の形成に重要な役割を担う可能性が報告されている。すなわち、**HtrA1** によって分断化 (fragment 化) されたマトリックスが、その fragment が生理活性を有し、その影響でさらにマトリックスのリモデリングや病的細胞の増殖を引き起こすという説である。ケロイドは、ヒト特有の疾患で、実験動物には発生しないことから、その病因や病態について不明な点が多く残されている疾患である。我々は、ケロイド病変部と正常皮膚から抽出した mRNA の発現プロファイルの比較検討を、マイクロアレイ解析により行った結果、**HtrA1** が、ケロイド病変部において高発現していることを見いだした。本研究では、**HtrA1** に焦点をあて、ケロイドにおける **HtrA1** の役割について検討を行った。

2. 研究の目的

ケロイドの病態形成における **HtrA1** の機能が、変形性膝関節炎で提唱されている病態モデルのような、マトリックス分解や細胞増殖に関連するものなのかを調査する。

3. 研究の方法

ケロイド組織と正常組織において、**HtrA1** 蛋白とその代表的基質であるフィブロネクチン、コラーゲンについて **RIPA buffer** により蛋白を抽出、**Western blot** により発現パターンを解析した。同様にケロイド由来培養線維芽細胞と正常皮膚由来線維芽細胞においても **HtrA1** の発現を **Western blot** にて確認した。**Stealth RNAi** (**Life Technologies**)を用いて、ケロイド由来培養線維芽細胞において **HtrA1** をノックダウンし、その増殖に対する影響を **Alama blue**、**WST assay** にて確認した。さらに、各種マトリックスでコート (フィブロネクチン、ラミニン、I型コラーゲン、VI型コラーゲン) した well でケロイド由来線維芽細胞 (コントロール **RNAi** 導入) と、**HtrA1** をノックダウンしたケロイド由来線維芽細胞を培養し、その増殖への影響がマトリックスの有無やその種類によってさらに影響を受けるかを検討した。

4. 研究成果

ケロイド組織では正常皮膚に比較し、**HtrA1** 蛋白とフィブロネクチンが高発現し、特にフィブロネクチンは、正常皮膚に比較し、極めて高い発現を示し、かつ、その fragmentation が正常皮膚よりも進んでいる傾向が見られた (図1) コラーゲン (1型、III型) は、これまでに報告されている通り高発現は確認

できたが、**fragmentation** については、症例間の差異が大きく一定の傾向を見いだせなかった。

通常の培養用 **96well** プレートにケロイド由来細胞 (コントロール **RNAi** 導入) と、**HtrA1** ノックダウン細胞を播種し、**WST** アッセイにて細胞増殖能を検討した (N=3)

。その結果、**HtrA1** ノックダウンにより、ケロイド由来細胞の増殖能が低下した (図2) このことにより、**HtrA1** は細胞の増殖を促進する因子であることが示唆された。次に、培養 well に、各種マトリックスをコートし、マトリックスの存在下で **HtrA1** の細胞増殖への影響を観察した。その結果、セリンプロテアーゼである **HtrA1** の基質として知られているフィブロネクチン、1型コラーゲン (いずれもケロイド組織において高発現) の存在下では、ラミニン (現時点で **HtrA1** の基質とは報告されていない)、IV型コラーゲン (現時点で **HtrA1** の基質とは報告されていない、かつケロイド病変部の主成分ではない) の存在下よりも細胞増殖への影響が大きいことが判明した (図3)。ただし、これは症例数1であるため、この患者の細胞特有の現象である可能性も否定できず、今後、症例数を増やして検討が必要である。

以上、ケロイドにおける **HtrA1** は、細胞増殖を正に制御する因子であり、その作用はマトリックスの分解を介したものである可能性が示唆された。

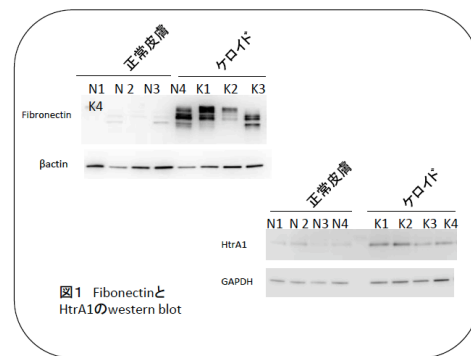


図1 FibronectinとHtrA1のwestern blot

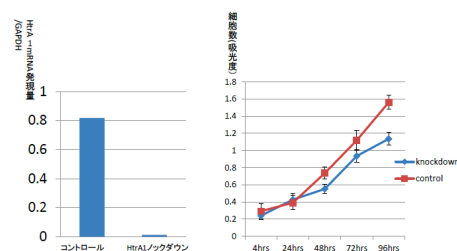


図2 HtrA1のノックダウンと細胞増殖実験

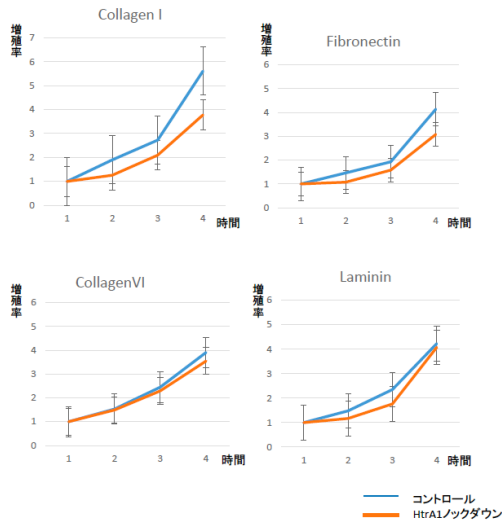


図3 HtrA1ノックダウンにおける、マトリックスの細胞増殖への影響

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 5件)

1. Ultrasound elastography to evaluate keloids.

Aya R, Yamawaki S, Naitoh M, and Suzuki S Plastic and Reconstructive Surgery-Global Open 2014; 2: pe106

2. Chondroitinase injection improves keloid pathology by reorganizing the extracellular matrix with regenerated elastic fibers.

Ishiko T, Naitoh M, Kubota H, Yamawaki S, Ikeda M, Yoshikawa K, Fujita H, Yamaguchi H, Kurahashi Y, Suzuki S. J Dermatol. 2013;40:380-383.

3. Keloids can be forced into remission with surgical excision and radiation, followed by adjuvant therapy. Yamawaki S, Naitoh M, Ishiko T, Muneuchi G, Suzuki S. Ann Plast Surg. 2011 ;67:402-406.

4. ケロイド治療成績のスケールを用いた評価 山脇聖子、内藤素子、吉川勝宇、石河利広、鈴木茂彦 日本創傷外科学会誌 3巻 p112-117, 2011年

5. ケロイド・肥厚性瘢痕の分類と評価 山脇聖子、内藤素子、鈴木茂彦 瘢痕・ケロイド治療ジャーナル 5巻 p41-44, 2011年

[学会発表] (計 9件)

1. マトリックス分解酵素に着目した新規ケ

ロイド治療法の開発

内藤素子、山脇聖子、石河利広、綾梨乃、吉川勝宇、片山泰博、鈴木茂彦

第5回に本創傷外科学会総会・学術集会 2013年7月11日～12日、ホテルグランビニア京都

2. ケロイド、肥厚性瘢痕、ピアスケロイドにおけるHtrA1の発現

山脇聖子、内藤素子、石河利広、吉川勝宇、野田和男、綾梨乃、片山泰博、鈴木茂彦 第22回日本形成外科学会基礎学術集会 2103年1月7日～8日、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター

3. ピアスケロイドの長期治療成績 山脇聖子、内藤素子、綾梨乃、吉川勝宇、石河利広、鈴木茂彦 第56回日本形成外科学会総会・学術集会 2013年4月3日～5日 京王プラザホテル

4. ケロイド病変部に存在する多能性細胞について 内藤素子、吉川勝宇、山脇聖子、石河利広、綾梨乃、鈴木茂彦 2012年7月5日～6日 第33回日本炎症・再生医学会 ホテル日航福岡

5. Serine Protease-Family Protein HtrA1 is Specifically Up-regulated in Keloid Lesions. Naitoh M, Ishiko T, Yamawaki S, Tamura T, Aya R, Yoshikawa K, Kubota H, and Suzuki S. 4th Congress of the World Union of Wound Healing Societies 2012, 9, 2-6, Pacifico Yokohama

6. ピアスケロイドにおけるHtrA1の発現 山脇聖子、内藤素子、綾梨乃、鈴木茂彦 第4回日本創傷外科学会 2012年7月26日～27日ホテルニューオータニ博多

7. ピアスケロイドにおけるHtrA1の発現 山脇聖子、内藤素子、綾梨乃、吉川勝宇、石河利広、鈴木茂彦 第21回日本形成外科基礎学術集会 2012年10月4日～5日 ホテルリステル猪苗代

8. マトリックスセリンプロテアーゼHtrA1は皮膚線維性疾患ケロイドの予後規定因子である。内藤素子 第43回日本結合組織学会学術集会 第58回マトリックス研究会大会合同学術集会 2011年6月10日別府ビーコンプラザ

9. ケロイドの基礎と凍用～マトリックスプロテアーゼHtrA1に着目して 内藤素子 第36回兵庫県形成外科医会 2014年5月17日神戸市立医療センター中央市民病院

[図書] (計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 素子（医学研究科 講師）

研究者番号：30378723

(2) 研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3) 連携研究者

（ ）

研究者番号：