

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：32666

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659838

研究課題名（和文）ケロイド由来線維芽細胞のカルシウムイオンチャネル解析

研究課題名（英文）Analysis of Calcium Ion Channel of Keloid-Derived Fibroblasts

研究代表者

石井 暢明 (Ishii Nobuaki)

日本医科大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：00445826

研究成果の概要（和文）：軟骨などではカルシウムイオンチャネルが静水圧などの力学的刺激に顕著に反応することが判明しているが、皮膚の線維化では顕著な役割を担っていない可能性が示唆された。ただし、カルシウムイオンチャネルをブロックすることにより、細胞への直接刺激ではなく、組織や臓器を通じた生理学的な間接的作用が得られるため、今後検討を要すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Ca ion channels are activated by mechanical forces such as hydrostatic pressure especially on chondrocytes in the articular cartilage. However, such ion channels are not significantly activated on fibroblasts in the skin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,700,000	510,000	2,210,000

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：組織培養・移植学

1. 研究開始当初の背景

われわれは、皮膚を伸展すると、皮膚の血管新生、神経増生および細胞増殖が著明に生じることを明らかにしてきた。この伸展刺激の反復で、皮膚に神経原性炎症が生じ、また細胞が直接力学的刺激を感受して、これら生物学的な変化が皮膚や創に生じることもわかってきた。これは臨床的には肥厚性瘢痕やケロイドの組織像と一致するため、これら異常瘢痕の主要な原因の一つが、

日常生活における、くりかえされる皮膚の伸展刺激である可能性を考えている。

2. 研究の目的

本研究では皮膚真皮の線維芽細胞が、皮膚の伸展刺激によってどのような反応を示すか研究した。特に、いままで注目されることのなかった、細胞が伸展刺激を感受するとされるメカノレセプターの1つであるカルシウムチャネルに焦点を絞った。海外ではカルシウムイオンチャネルブロッカー

はケロイドの治療薬として使用されている報告があるため、新しい治療法の開発に役立つ可能性があると考えた。

細胞は剪断応力、静水圧、浸透圧、張力といった力学的刺激を常に受け、細胞増殖、各種液性因子や基質の産生・分泌、血管新生や細胞増殖また細胞外基質の産生などを調節していることが知られている。たとえば血流は血管内皮細胞や血管平滑筋に剪断応力や伸展刺激を与え、血管径の調節および血管新生を制御している。また軟骨細胞は常に体重によって生じる、関節液を介した高い静水圧（歩行時には深海 300m の 30 気圧）を感受し、細胞外基質の蓄積が生じていると考えられる。これらの力学刺激を感受する構造は細胞のメカノレセプター（メカノセンサー）として広く研究されている。メカノレセプターとして考えられているのは細胞外基質と細胞が接着する、細胞膜にあるインテグリンをはじめとする接着分子、カルシウムイオンチャネルなど、また細胞内ではアクチンフィラメントなどの細胞骨格が考えられている。本研究では、ケロイド組織においてカルシウムイオンチャネルの機能亢進が生じているかどうか検討した。

3. 研究の方法

ケロイドおよび正常皮膚（図1：手術時に切除された廃棄された皮膚）から線維芽細胞を採取し、細胞に伸展刺激を与えるための装置で培養した。



図1 ケロイド検体と正常皮膚検体

（テスト検体としてケロイドの発赤部と、dog ear 修正に用いて廃棄する正常皮膚部位を対象とした。）

その培養細胞の細胞増殖能、コラーゲン分泌能、各種サイトカイン・成長因子産生能を、リアルタイムRT-PCRおよびcDNAマイクロアレイ法にて測定した。

ケロイド手術時に切除された、ケロイドおよび正常皮膚（手術時に創の修正目的で切除された廃棄されたもの）を100mm²の培養ディッシュ（Becton Dickinson, Franklin Lakes, N. J.）に移し、0.5cm程度まで細切した。10%ウシ胎仔血清含有ダルベッコ改変イーグル培地を用いた細胞増殖培地（DMEM + 10% FBS + 1% ABAM）で、37°C 5%CO₂で1週間静置培養した。

1週間で培養ディッシュ底面に細胞が増殖しているのを確認し、トリプシンEDTAを用いて細胞を採取、第三継代細胞となるまで継代培養した。

その細胞を、細胞に伸展刺激を与えるための装置（図2：細胞をシリコン膜に播種し、そのシリコン膜を伸展する装置）で24時間伸展刺激を加えながら、5日間培養した。



図2 細胞伸展装置

種々の伸展刺激の強度・周期を調節可能である。

5日後に細胞をトリプシンEDTAを用いて採取し、液体窒素にて瞬間凍結し、RNeasy® (QIAGEN)にて全RNAを抽出した後、網羅的遺伝子解析と

Reverse-Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)を行った。遺伝子は、メカノシグナル伝達経路の代表的遺伝子8つを検討した。CTGF、TGFβ3、CACNA1B、ITGA10、TNFα6、MAPK12、PLA2G2A、WISP1 コントロール遺伝子には Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用い、1% Agarose gelにてバンドを確認した。

4. 研究成果

線維芽細胞を伸展することにより、ケロイドや正常皮膚から採取した細胞共にいわゆるTGFβ、WNT、TNFといったメカノレセプター(図3)を介した、機械受容シグナル伝達系路(メカノシグナル伝達経路:図4)が活性化することが判明した。

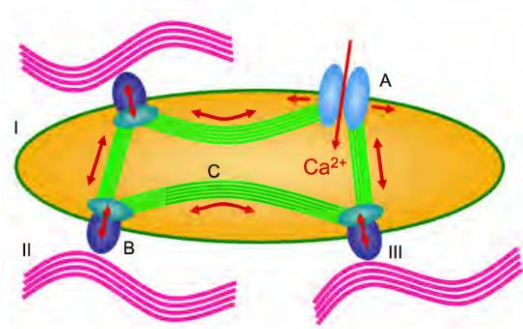


図3 細胞のメカノレセプター

(Iは細胞、IIは基質、IIIは細胞膜上の接着分子を示す。皮膚の張力によって基質が伸展されるとインテグリン(B)をはじめとした細胞接着分子や細胞骨格のアクチンフィラメント(C)に刺激が感受され、最終的にCaチャンネル(A)が開くと考えられている。)

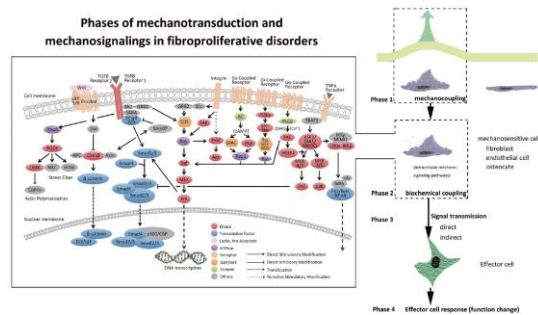


図4 メカノシグナル伝達経路

今回の研究で、ケロイドでは特にメカノシグナル伝達経路の中でもTGFβ、WNT、TNFの3経路が活性化していることが判明した。

一方、カルシウムイオンチャンネルのシグナル伝達系路に関しては、皮膚伸展刺激においては、他のシグナル伝達系路に比べて顕著には活性化されないことが判明した。

軟骨などではカルシウムイオンチャンネルが静水圧などの力学的刺激に顕著に反応することが判明しているが、皮膚における伸展刺激ではそれほどの役割を担っていない可能性が示唆された。ただし、カルシウムイオンチャンネルブロッカーによるケロイド

の治療報告が存在するため、細胞への直接刺激ではなく、組織や臓器を通じた生理学的な関節的作用が得られるため、今後検討を要すると考えられた。

リアルタイム RT-PCR では、CTGF、TGF β 3、CACNA1B、ITGA10、TNF α 6、MAPK12、PLA2G2A、WISP1 の著明な発現増加を認め、マイクロアレイでの結果を裏付けることができた。

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 1 件)

Huang C, Akaishi S, Ogawa R.

Mechanotransduction pathways in cutaneous scarring. Arch Dermatol Res. 2012 Oct;304(8):589-97.

[学会発表] (計 1 件)

小川 令. 傷の線維化における物理的刺激の役割-皮膚や傷はどのように力を感じているか? 第 9 回線維化病態研究会. 2012. 12. 10 (東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 暢明 (Nobuaki Ishii)
日本医科大学医学研究科研究員
研究者番号: 00445826

(2) 研究分担者

小川 令 (Rei Ogawa)
日本医科大学医学部准教授
研究者番号: 70398866

(3) 連携研究者

なし