

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592722

研究課題名(和文)ケロイド発生におけるWnt5aシグナル伝達機構の解明と分子標的治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of Wnt5a signal transduction mechanism(s) in keloid and application of molecular targeted therapy

研究代表者

M GHAZIZADEH (GHAZIZADEH, MOHAMMAD)

日本医科大学・医学部・その他

研究者番号：30190979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ケロイド由来線維芽細胞、正常皮膚由来線維芽細胞を用い、Wntシグナル関連遺伝子β-カテニン、リン酸化β-カテニンとGSK3β、全GSK3β、FZD4受容体、ROR2受容体の発現を解析した結果、ケロイド由来線維芽細胞においてWnt5aの発現が蛋白やmRNAレベルで高く、β-カテニンの高発現を確認した。Wntシグナル経路に関する84遺伝子発現比較解析により、数個のPITX2、WNT9A、ACTBを含んだ遺伝子の増加を認めた。ケロイド発生において、WntシグナルのWnt5a/β-カテニン経路が関与している可能性が示唆された。また、EMTの可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：We studied the expression and function of Wnt5a considering frizzled4 receptor, ROR2, Wnt signal downstream targets (GSK3-beta and beta-catenin) as well as epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers and 84 Wnt signal-related genes in primary fibroblast cultures and tissue samples from keloid (KF) and normal dermis (NF) using molecular biology, immunohistochemical and RT2 Profiler PCR Array methods. A high expression of Wnt5a and beta-catenin was found in KF compared to NF. Treatment of NF and KF with recombinant Wnt5a peptide resulted in an increase in total beta-catenin and phosphorylated beta-catenin at Ser33/37/Thr41 but no significant change in phosphorylated beta-catenin at Ser45/Thr41 positions. Several Wnt signal-related genes were also upregulated. In addition, evidence for EMT in keloid was observed. These findings highlight a potential role for a Wnt/beta-catenin pathway triggered by Wnt5a in keloid pathogenesis and development of molecular targeted therapy for keloid.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Keloid pathogenesis Wnt5a beta-catenin EMT Wnt signal-related genes 分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

ケロイドは微細な傷から発生し拡大し続ける難治性疾患であり、その治療方法は確立されていない。ケロイド発生に関する分子レベルのメカニズムは、未だ解明には至っていない。Wnt シグナル伝達経路が細胞の増殖、分化、生存、進展等に重要な関与を示している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ケロイド発生における Wnt5a シグナル伝達機構の解明と分子標的治療への応用である。

3. 研究の方法

1) ケロイド組織、ケロイド由来線維芽細胞 (KF)、正常皮膚組織、正常皮膚由来線維芽細胞 (NF) を使用した。Wnt ファミリーおよび Wnt シグナル関連遺伝子 β -カテニン、リン酸化 β -カテニン、全 GSK3- β 、リン酸化 GSK3- β 、frizzled4 (FZD4) 受容体、ROR2 受容体の発現を免疫組織化学法、半定量 PCR 法を用いて解析した。2) ケロイド由来線維芽細胞 (KF) および正常皮膚由来線維芽細胞 (NF) を分離培養し、リコンビナント Wnt5a ペプチドで刺激した。それぞれの線維芽細胞の β -カテニン、リン酸化 β -カテニン (Ser33/37/ Thr41)、リン酸化 GSK3- β をウェスタンブロット法にて解析した。3) 免疫染色を用いてケロイドおよび正常皮膚組織の epithelial- mesenchymal transition (EMT) を検索した。4) Wnt シグナルの刺激・抑制前後のケロイドおよびケロイド由来線維芽細胞 (KF) と正常皮膚由来線維芽細胞 (NF) から RNA を抽出し、RT² Profiler PCR Array を用いて Wnt シグナル経路に関する 84 遺伝子発現を比較検討した。

4. 研究成果

免疫組織化学法による Wnt5a の発現は正常皮膚よりケロイド組織に強く見られた。Wnt ファミリーの mRNA レベルの発現解析では、KF にお

いて Wnt5a の発現が著明に亢進し (Fig. 1-2), Wnt シグナルの重要な標的因子である β -カテニンも高く発現していることを確認した。一方、Wnt シグナル (β -カテニン非依存的経路) の主要な受容体である FZD4、ROR2 の発現は、蛋白レベルで、NF と KF で有意差を認めなかった。

リコンビナント Wnt5a ペプチドを添加した結果、 β -カテニン、リン酸化 β -カテニン

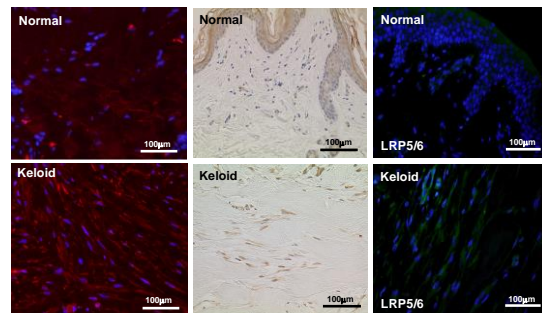


Fig. 1 Immunostainings for Wnt5a and LRP5/6 in normal skin and keloid fibroblasts in tissue sections.

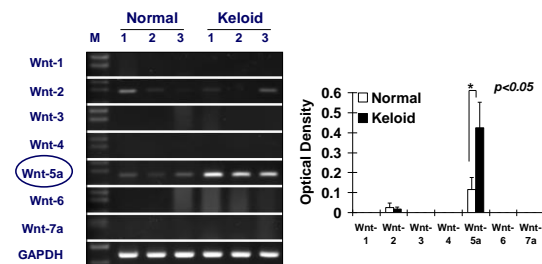


Fig. 2 RT-PCR analysis for Wnt family members in cultured normal and keloid fibroblasts.

(Ser33/37/Thr41)、リン酸化 GSK3- β の発現は、NF、KF 双方において著明に増加した。その一方で、リン酸化 β -カテニン (非依存 β -カテニン非依存的経路: Ser45/Thr41)、全 GSK3- β の発現は Wnt5a 添加による影響を受けなかった (Fig. 3-5)。Wnt シグナル経路に関する 84 遺伝子発現の比較検討により、数個の PITX2、WNT9A、ACTB を含んだ遺伝子の増加を認めた。

結語として、ケロイド発生において、Wnt シグナルの Wnt5a/ β -カテニン経路が関与している可能性が示唆された (Fig. 6)。また、EMT の可能性と分子標的治療への応用可能性

も示唆された。

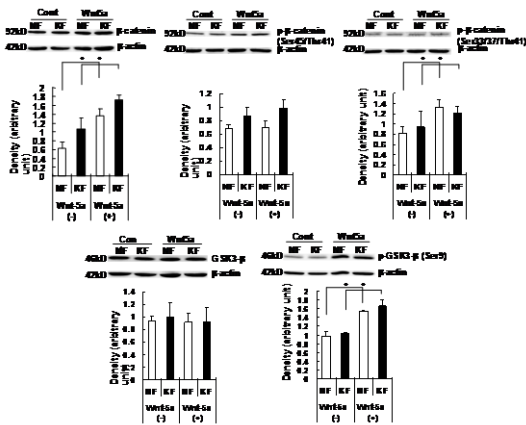


Fig. 3 Effect of recombinant Wnt5a peptide on beta-catenin and GSK3-beta.

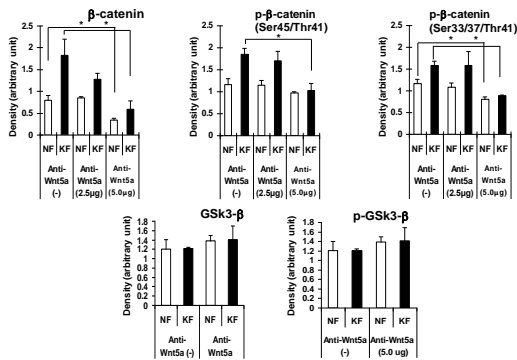


Fig. 4 Effect of inhibition of Wnt5a on beta-catenin and GSK3-beta.

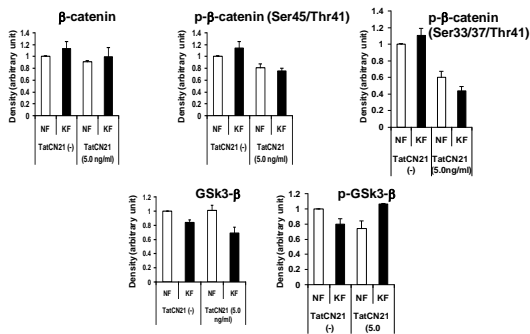


Fig. 5 Effect of Inhibition of CaMKII on beta-catenin and GSK3-beta.

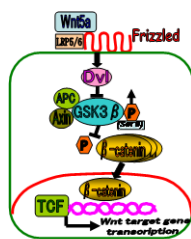


Fig. 6 Wnt signal pathway in keloid.

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 件)

1) Tatsuo Oguro, Mohammad Ghazizadeh. A protocol for preparation of chromosome spread and processing for transmission electron microscopy. *Am J Exp Clin Res* 2(2):105-106, 2015.

2: Shinichi Igota, Mamiko Tosa, Masahiro Murakami, Seiko Egawa, Hajime Shimizu, Hiko Hyakusoku, Mohammad Ghazizadeh. Identification and characterization of Wnt signaling pathway in keloid pathogenesis. *Int J Med Sci* 10(4):344-354, 2013.

3: Ghazizadeh R, Tosa M, Ghazizadeh M. Clinical improvement in psoriasis with treatment of associated hyperlipidemia. *Am J Med Sci* 341(5):394-398, 2011.

[学会発表] (計 件)

1) Mohammad Ghazizadeh, Shinichi Igota, Seiko Egawa, Mamiko Tosa. Wnt/beta-catenin signaling is involved in keloid pathogenesis. 3rd International Conference on Surgery and Anesthesia 2014/11/17 - 2014/11/19, Chicago USA.

2) Mohammad Ghazizadeh, Mamiko Tosa, Seiko Egawa. Wnt/beta-catenin signaling in keloid pathogenesis. 第23回日本形成外科学会基礎学術集会 2014年10月9日-2014年10月10日. 松本市

3) IL-6 promoter polymorphisms and keloid susceptibility in the Japanese population. Mohammad Ghazizadeh, Mamiko Tosa, Atsushi Watanabe, Seiko Egawa, Masahiro Murakami. 第43回日本創傷治療学会 2013年11月14日-15日. 大分

4) Mohammad Ghazizadeh. Functional implication of Wnt/beta-catenin signaling in keloid. The 2nd international conference and exhibition on metabolomics and systems biology. 2013/4/8-2013/4/10 "Best Poster Award." Chicago, USA.

5) Mohammad Ghazizadeh, Seiko Egawa, Hajime Shimizu, Shinichi Igota, Mamiko Tosa. Characterization of Wnt signaling pathway in keloid pathogenesis. 65th International conference on tissue science and engineering. 2012/10/1-2012/10/3. Chicago, USA.

6) Mohammad Ghazizadeh, Seiko Egawa, Hajime Shimizu, Shinichi Igota, Mamiko Tosa. Involvement of a Wnt/beta-catenin canonical signaling pathway in keloid pathogenesis. 第37回日本研究皮膚科学会総会. 2012年12月7日-2012年12月9日. 那覇, 沖縄

7) Hajime Shimizu, Shinichi Igota, Mamiko Tosa, Seiko Egawa, Mohammad Ghazizadeh. Micro-RNA expression profiles in keloid and normal dermal fibroblasts. 第37回日本研究皮膚科学会総会. 2012年12月7日-2012年12月9日. 那覇, 沖縄

8) Mohammad Ghazizadeh, Hajime Shimizu, Seiko Egawa, Mamiko Tosa. Potential involvement of the stem cell factor receptor c-kit in keloid pathogenesis 第110回日本皮膚科学会総会. 2012年6月1日-2012年6月3日. 京都

〔図書〕 (計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

(モハマッド ガジザデ (M GHAZIZADEH)
日本医科大学・老人病研究所・准教授)

研究者番号：30190979

(2) 研究分担者

(土佐 眞美子 (TOSA MAMIKO)
日本医科大学・医学部・助教)

研究者番号：30301568

(3) 連携研究者

(清水一 (SHIMIZU HAJIME))

日本医科大学・老人病研究所・マネージメントサポートスタッフ)

研究者番号：60398873

(3) 連携研究者

(村上 正洋 (MURAKAMI MASAHIRO))

日本医科大学・医学部・准教授)

研究者番号：00239500