

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462798

研究課題名(和文)ケロイドに対する新規分子標的併用療法の開発

研究課題名(英文) Novel combination-oriented molecular-targeting therapy for keloid

研究代表者

西野 健一 (Nishino, Kenichi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00138471

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)：ケロイドは、傷を修復する線維芽細胞がコラーゲンを異常産生し、細胞自身が異常増殖することが病因と考えられている。ケロイドにおけるTGF- β 、IL-6などの過剰発現が注目されており、それらの経路に対して抑制効果が期待できる分子標的治療薬として、HDAC阻害剤とMEK阻害剤の組み合わせによる影響を検討した。

ケロイド線維芽細胞株に対して、まずHDAC阻害剤単剤による濃度依存性の増殖抑制効果とコラーゲン産生抑制効果が認められた。一方、MEK阻害剤の単剤の影響は有意には認められなかった。HDAC阻害剤とMEK阻害剤の併用による影響を検討したが、HDAC阻害剤単剤の効果を上回る結果は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：Keloids are fibro-proliferative diseases characterized by the accumulation of an extracellular matrix such as collagen. The aberrant proliferation and production of extracellular matrix have been related to the expression pattern of different cytokines, including TGF- β and IL-6 in keloid fibroblasts. The therapies which target to these cytokines and related molecules have possibility to ameliorate keloid. In this study, we evaluated the effects of HDAC inhibitor and MEK inhibitor, as the candidate chemicals for targeting the pathway, against keloid fibroblasts. HDAC inhibitor suppressed proliferation and production of collagen in keloid fibroblasts, and MEK inhibitor weakly suppresses those. Moreover, we investigated the effect of the combination of HDAC inhibitor and MEK inhibitor. As the results, the combination did not show the significant combined effect to suppress keloid fibroblasts.

研究分野：ケロイド

キーワード：ケロイド 線維芽細胞 コラーゲン MEK阻害剤 HDAC阻害剤

1. 研究開始当初の背景

ケロイドは未だ難治性とされており、線維芽細胞の異常増殖と細胞外マトリックスの過剰産生と蓄積を呈する疾患である。また、本来の創部を越えて周囲の健常組織に浸潤拡大することから、腫瘍性の増殖としても捉えられている。ケロイド発症の病因は不明のままであり、このような過剰増殖性瘢痕の治療・予防法の確立は、単に形態のみならず、瘢痕を最小限に抑え良好な機能を獲得する点において、すべての外科領域で重要な課題である。

ケロイド発症機序は未解明であるが、数々の基礎研究の結果から、ケロイド形成の主役を担うコラーゲンの異常産生には TGF-β や IL-6 などが関与することが明らかになってきた。さらに、TGF-β シグナル伝達経路遮断薬は有望なケロイド治療薬として期待されている。加えて、近年、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤がケロイド線維芽細胞に対してアポトーシス (細胞死) 誘導効果ならびにコラーゲン合成抑制効果を発揮することが報告された (Arch Dermatol Res, 2011; 303: 573-580)。

一方、TGF-β 伝達経路にはキナーゼの一種である MEK が存在し、MEK 阻害剤がケロイド発症経路に重要な TGF-β 経路を抑制することによって、ケロイド線維芽細胞に対して抑制効果をもつことが考えられる。

今回、新規の HDAC 阻害剤であり臨床試験中である OBP-801/YM753 と、新規 MEK 阻害剤であり、薬剤承認を受けている trametinib を用いて、ケロイド線維芽細胞に対する効果を調べることにした。がん治療においては、MAP キナーゼ経路の恒常的活性化が認められるがん細胞において、MEK 阻害剤と HDAC 阻害剤の併用は極めて顕著な細胞死効果を誘導するとしている (Biochem Biophys Res Commun, 2013; 433: 456-462)。ケロイド線維芽細胞における 2 剤の併用による効果については、現在のところ報告されていない。

さらに、近年ではケロイド治療薬候補として、いくつかの phytochemical 化合物がケロイド線維芽細胞に対して抑制効果をもつことが報告されている。

2. 研究の目的

ケロイドの分子機構の解明研究における成果の中から、高い効果が期待される二種類の分子標的薬剤の併用について検討する。それぞれ単剤でのケロイド線維芽細胞に対する増殖抑制効果とコラーゲン合成抑制効果を検討した後、二剤を組み合わせた併用効果を検討する。また、ケロイド発症経路の抑制効果が強いと期待される phytochemical 化合物についても同様の検討を行う。

3. 研究の方法

HDAC 阻害剤、MEK 阻害剤それぞれ単剤でのヒトケロイド線維芽細胞に対する影響

の検討

ヒトケロイド線維芽細胞に対する HDAC 阻害剤および MEK 阻害剤の影響を細胞増殖、細胞周期、コラーゲン産生能、IL-6 産生能、について評価を行った。

HDAC 阻害剤と MEK 阻害剤の併用効果の検討

両薬剤の併用によるヒトケロイド線維芽細胞に対する細胞増殖抑制効果とコラーゲン産生抑制効果について検討を行った。

phytochemical 化合物によるケロイド治療の可能性の探索

ケロイド発症経路に関する文献検索および、の結果から考えられるコラーゲン合成系に影響を有するとされる経路を再度確認した。そのケロイド発症経路に対して抑制効果が期待できる phytochemical 化合物について、ヒトケロイド線維芽細胞の細胞増殖、コラーゲン産生能について抑制効果を示すか否か検討した。

4. 研究成果

HDAC 阻害剤、MEK 阻害剤それぞれ単剤でのヒトケロイド線維芽細胞に対する影響

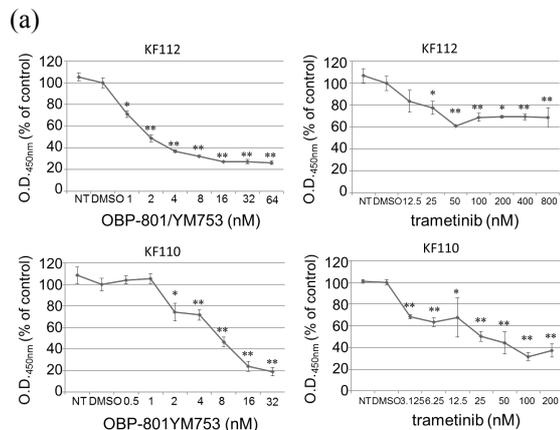
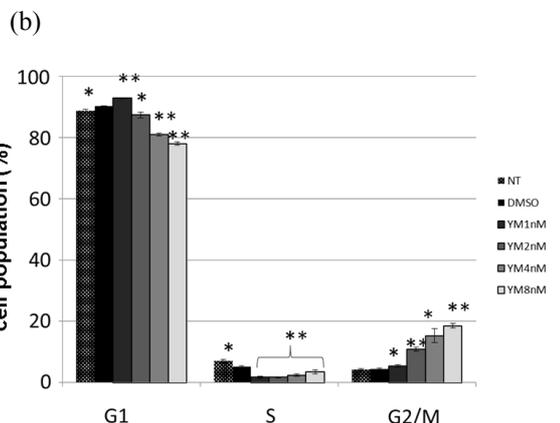


図 1-(a) ヒトケロイド線維芽細胞 (KF112, KF110) に対する、HDAC 阻害剤、MEK 阻害剤処理 72 時間後の細胞増殖への影響 (WST-8 assay)



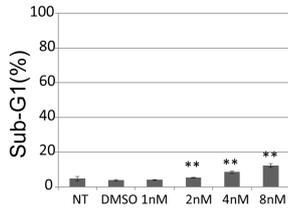


図 1-(b)KF112 に対する HDAC 阻害剤単剤処理 72 時間後の細胞周期変化への影響 (フローサイトメトリー)

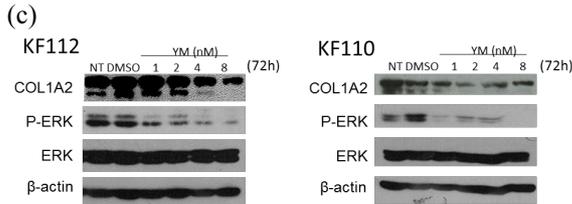


図 1-(c) KF112,KF110 に対する HDAC 阻害剤処理 72 時間後のコラーゲン発現および ERK のリン酸化に対する影響 (Western blotting)

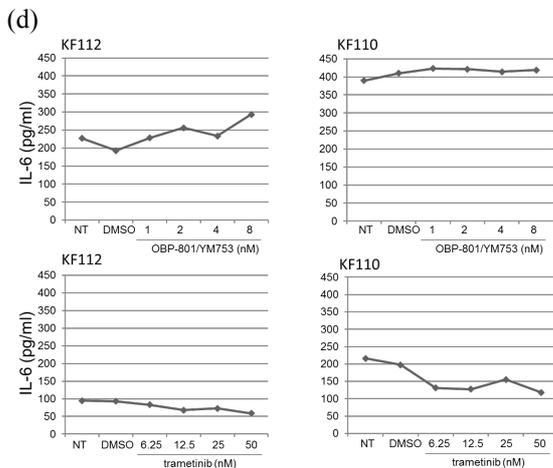


図 1-(d) KF112,KF110 に対する HDAC 阻害剤、MEK 阻害剤それぞれ単剤処理 72 時間後の培養上清中 IL-6 発現量の測定 (ELISA)

KF112, KF110 に対して、HDAC 阻害剤は濃度依存性に細胞増殖を抑制した (図 1-a)、細胞周期解析を行った結果、G2/M 期停止とアポトーシス誘導が認められた (図 1-b)。コラーゲン (COL1A2) 合成に対してはタンパク質レベルで抑制効果が認められた (図 1-c)。さらに KF112,KF110 に対し、HDAC 阻害剤は ERK の脱リン酸化能を有することが明らかとなった。培養上清を用い、ELISA を行った結果、IL-6 の産生に対する HDAC 阻害剤の影響は認められなかった (図 1-d)。

一方、MEK 阻害剤のヒトケロイド線維芽細胞の増殖抑制効果については、KF112 に対する効果は弱いものの、KF110 に対しては濃度依存性な抑制効果が認められた (図 1-a)。培養上清中の IL-6 発現量に対しては、MEK 阻害剤は KF112 に対しては抑制効果を認め

なかったものの、KF110 に対しては、やや抑制傾向を示した (図 1-d)。

HDAC 阻害剤、MEK 阻害剤併用によるヒトケロイド線維芽細胞に対する影響

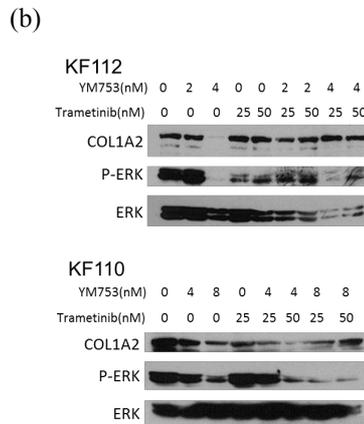
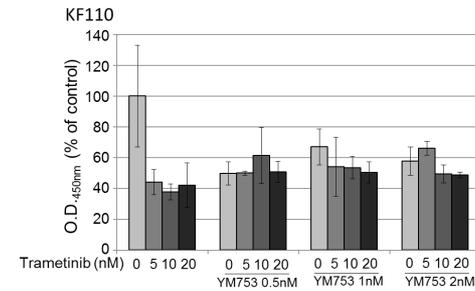
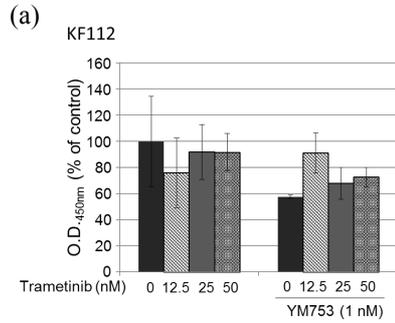


図 2-(a),(b) KF112, KF110 に対する HDAC 阻害剤と MEK 阻害剤併用 72 時間後の影響

(a) WST-8 assay

(b) Western blotting

KF112, KF110 に対し、両薬剤の併用による細胞増殖への影響を WST-8 にて検討したが、併用効果は認められなかった。両者の併用によるコラーゲン産生への影響を Western blotting にて確認したが、同様に併用効果は認められなかった。

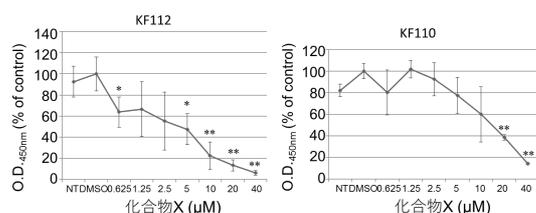
以上の結果から、HDAC 阻害剤である YM753/OBP-801 はヒトケロイド線維芽細胞に対して、細胞増殖抑制効果、コラーゲン合成抑制効果をもつことが明らかとなった。一方の MEK 阻害剤は今回使用したケロイド線維芽細胞 KF112 に対しては細胞増殖抑制効果ならびにコラーゲン合成の抑制効果は弱い印象であった。trametinib によるケロイド線維芽細胞に対する影響は細胞株により異なる可能性も考えられたが、HDAC 阻害剤と

MEK 阻害剤との併用効果については認められないと判断した。

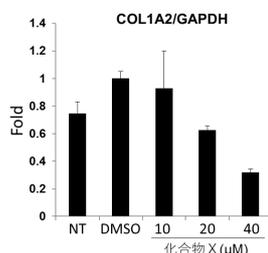
phytochemical 化合物によるケロイド治療の可能性の探索

HDAC 阻害剤 OBP-801/YM753 がケロイド線維芽細胞に対して細胞増殖抑制効果とコラーゲン合成抑制効果を認めることが明らかとなった。さらに、ケロイド治療薬としてはより副作用が少なく、かつ IL-6 産生抑制効果も有することが期待される phytochemical 化合物が理想的ではないかと考えた。そこで、HDAC 阻害作用が癌細胞において報告されている、化合物 X を候補とした。

(a)



(b)



(c)

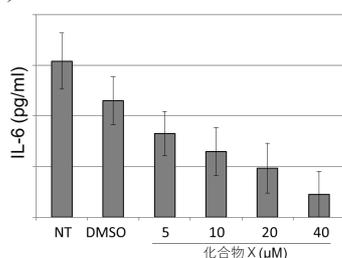


図 3-(a-c) 化合物 X によるヒトケロイド線維芽細胞に対する影響

- (a) 化合物 X 処理 72 時間後(WST-8 assay)
- (b) 化合物 X 処理 48 時間後のコラーゲン mRNA の発現量 (リアルタイム RT-PCR)
- (c) 化合物 X 処理 48 時間後の培養上清中の IL-6 発現量 (ELISA)

化合物 X は Kf112, Kf110 に対し、濃度依存性に細胞増殖抑制効果を示し (図 3-a)、コラーゲン合成抑制効果が mRNA レベルで確認された (図 3-b)、その機序の一つとして、IL-6 の抑制効果が関与している可能性が示唆された (図 3-c)。その後の解析により、化合物 X には HDAC 阻害効果は Kf112 において認められなかったため、化合物 X の細胞増殖抑制効果、コラーゲン合成抑制効果は HDAC

阻害効果とは別の機序によるものと考えられた。

詳細な分子メカニズムの考察を含めて、以下のとおり報告した。

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)

Sulforaphane suppresses cell growth and collagen expression of keloid fibroblasts. Kawarazaki A., Horinaka M., Yasuda S., Numajiri T., Nishino K., Sakai T. Wound Repair and Regeneration, vol 25 (2), 224-233, 2017.

6. 研究組織

(1)研究代表者

西野 健一

(NISHINO, Kenichi)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00138471

(2)連携研究者

酒井 敏行

(SAKAI, Toshiyuki)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：20186993

河原崎 彩子

(KAWARAZAKI, Ayako)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：50550498