

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462801

研究課題名(和文)皮膚・創傷におけるversicanの機能解析

研究課題名(英文)the role of versican in skin and wound healing

研究代表者

荒牧 典子(Aramaki, Noriko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：80365311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：versicanのheterozygous ノックアウトマウスを用い、癌の移植モデルおよび創傷治癒モデルを作成・検討した。2つのモデルの実験結果から、versicanの発現及びその分解産物であるversikineが生体内での血管新生や細胞増殖への影響をもたらしている可能性が示唆された。今後の展望として、versicanの発現・分解産物を生体モデルでコントロールし、創傷治癒の促進や癌浸潤の抑制ができれば、臨床応用に発展できると考える。

研究成果の概要(英文)：In a wound-healing model using Vcanhdf/+ mice, we found that neovascularization is more strongly suppressed in Vcanhdf/+ mice than WT mice. This same phenomenon was observed using the cancer model in this study, suggesting that versican may have an important role in neovascularization. In the future, we plan to conduct functional analyses of versican on neovascularization.

研究分野：形成外科

キーワード：versican wound healing scarless wound

1. 研究開始当初の背景

申請者らが既に発表している線維芽細胞のデータ (Hattori et. al. J. Biol. Chem. 2011) から versican の発現あるいは代謝や分解が癌の増殖や創傷治癒に参与していることが示唆されている。またヒトの癌で versican が有意に発現が上昇している報告や in vitro で検討した論文が散見されるが、in vivo で、これまで、versican と癌について、in vivo で検討した報告はない。そこで、申請者らは、細胞外マトリックス - versican の発現及び分解が、創傷治癒 (血管新生・肉芽増生) や癌の増殖においてどのような意義をもたらすのかを検討する計画に至った。

2. 研究の目的

versican の heterozygous ノックアウトマウスを用い、癌の移植モデルおよび創傷治癒モデルを作成・検討し、更に in vitro の系を用いることで、癌浸潤や創傷治癒における versican の役割を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

1) メラノーマ細胞の皮下注射モデル

これまで、癌細胞の転移に versican の発現が重要な役割を果たしているという報告が、いくつかなされているが (Ricciardelli C. et. al. Am J Pathol. 2011) in vivo モデルで検討したものはない。そこで、我々は、BL6 マウス由来のメラノーマ細胞株をマウスの背部皮下に局注し、その増殖・浸潤スピードを比較検討した。versican のヘテロノックアウトマウス ($Vcan^{hdf/+}$) と littermate の WT マウスを用いた B16 メラノーマ細胞の皮下注射モデルを作成し、3 日毎に腫瘍サイズを計測した。また移植後 15 日目の組織切片を用い、その組織像の比較検討を行った。

2) 創傷治癒モデル

7-9 週齢の雄 $Vcan^{hdf/+}$ マウスと WT マウスの両側背部に直径 8mm の全層皮膚欠損を作成し、その創傷治癒過程を検討した。また創作後 5 日目の組織切片を用い、その組織像を比較検討した。

3) 線維芽細胞に対する versikine の役割

Versican の分解産物である versikine が線維芽細胞の増殖能にどのような影響を与えるかを in vitro の実験系で検討を行った。マウス線維芽細胞に versikine 発現メディウム及びコントロール vector 発現メディウムを加え、その増殖能を比較検討した。

4. 研究成果

1) メラノーマ細胞の皮下注射モデル

B16 メラノーマ細胞をマウスの背部皮下に注射し、その後 3 日毎に腫瘍サイズを計

測したところ、10 日目、13 日目、15 日目に有意差をもって、 $Vcan^{hdf/+}$ マウスでは、WT マウスに比べ、腫瘍の増大が抑制されていた。移植後 15 日目の血管新生を組織切片の endomucin 染色にて、血管数を数えたところ、 $Vcan^{hdf/+}$ マウスでは、有意差をもって、WT マウスに比べ、血管新生が抑えられていた。

2) 創傷治癒モデル

肉眼的創傷収縮の観察下では、創作後 3,5,7 日目において WT マウスに比べて、 $Vcan^{hdf/+}$ マウスの創傷治癒の遅延を認められた (図 1)。また、創作後 5 日目の創傷の肉芽組織内の血管新生を endomucin 染色で検討したところ、WT マウスに比べて、 $Vcan^{hdf/+}$ マウスにおいて血管数の減少が認められた (図 2)。

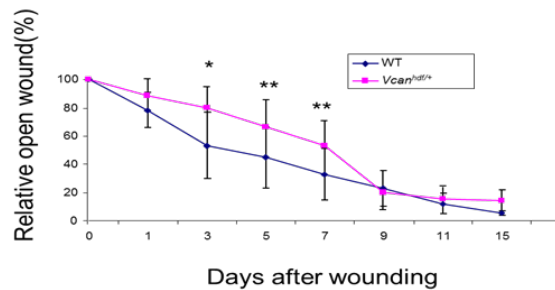


図 1 $Vcan^{hdf/+}$ マウス vs WT マウスにおける皮膚創傷治癒の比較

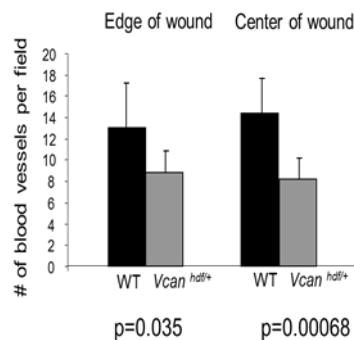


図 2 $Vcan^{hdf/+}$ マウス vs WT マウスにおける肉芽組織内の血管新生比較 (Day5)

3) 線維芽細胞に対する versikine の役割
versikine 発現メディウムを添加した群では、コントロール vector 発現メディウムを加えた群に比べ、有意に線維芽細胞の増殖

能が高かった。

これらの本研究から、versican の発現及びその分解産物である versikine が生体内での血管新生や細胞増殖への影響をもたらしている可能性が示唆された。今後の展望として、versican の発現・分解産物を生体モデルでコントロールし、創傷治癒の促進や癌浸潤の抑制ができれば、臨床応用に発展できると考える。

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 5 件)

Dubail J*, Aramaki-Hattori N*, Bader HL, Nelson CM, Katebi N, Matuska B, Olsen BR, Apte SS. A new Adamts9 conditional mouse allele identifies its non-redundant role in interdigital web regression. *Genesis*. 2014 Jul;52(7):702-12. *equal contribution (査読有)

Tanaka T,

Hattori-Aramaki N, Sunohara A, Okabe K, Sakamoto Y, Ochiai H, Hayashi R, Kishi K. Alignment of Skeletal Muscle Cells Cultured in Collagen Gel by Mechanical and Electrical Stimulation. *International Journal of Tissue Engineering*. 2014, Article ID 621529. (査読有)

Nagasao T, Aramaki-Hattori N, Shimizu Y, Yoshitatsu S, Takano N, Kishi K. Transformation of keloids is determined by stress occurrence patterns on peri-keloid regions in response to body movement. *Med Hypotheses*. 2013 Jul;81(1):136-41. (査読有)

Okabe K, Hayashi R, Aramaki-Hattori N, Sakamoto Y, Kishi K. Wound treatment using growth factors. *Modern Plastic Surgery*. 2013; 3(3), 108-112. (査読有)

Stupka N, Kintakas C, White J, Fraser F, Hanciu M, Aramaki-Hattori N, Martin S, Coles C, Collier F, Ward A, Apte SS, McCulloch

DR. Pericellular versican regulates the fibroblast-myofibroblast transition: a role for ADAMTS5 protease-mediated proteolysis. *J Biol Chem*. 2013;288(3):1907-17. (査読有)

〔学会発表〕(計 11 件)

第25回日本形成外科学会基礎学術集会 貴志和生、岡部圭介、荒牧典子、酒井成貴 毛包を含めた皮膚の完全再生 2016年9月16日 ナレッジキャピタルコングレ(大阪府大阪市)

第5回日本創傷外科学会

荒牧典子 次世代のケロイド・肥厚性癬痕治療：細胞外マトリックスから見たケロイド-ケロイド組織における versican の産生・分解 2013年7月11日 ホテルグランヴィア京都(京都府京都市)

第46回日本創傷治癒学会

荒牧典子、Apte Suneel、岡部圭介、酒井成貴、貴志和生 versicanヘテロノックアウトマウスを用いた癌浸潤における versican の役割検討 2016年12月9日 東京大学(東京都文京区)

第45回日本創傷治癒学会

荒牧典子、高戸珠恵、岡部圭介、貴志和生 ケロイドにおける versican 2015年11月30日 JP タワーホール&カンファレンス(東京都千代田区)

第9回癬痕ケロイド治療研究会

荒牧典子、村澤裕介、磯貝善蔵、岡部圭介、貴志和生 ケロイドにおける versikine-SHAP-ヒアルロン酸複合体病態関与への可能性 2014年8月31日 日本青年館(東京都新宿区)

第23回日本形成外科学会基礎学術集会

荒牧典子、村澤裕介、磯貝善蔵、岡部圭介、貴志和生 細胞外マトリックス versican の分解産物である versikine のケロイド病態関与への可能性 2014年10月10日 キッセイ文化ホール(長野県松本市)

第 45 回日本結合組織学会学術大会
第 60 回マトリックス研究会大会
合同学術大会 荒牧典子、Johanne Dubali、
Brittany Matuska、貴志和生、Suneel S.
Apte. *Adamts-9* コンディショナルノック
アウトマウスを用いた皮膚性合趾症の発生
機序に対する検討 2013 年 6 月 28 日 和
歌山県立医科大学講堂(和歌山県和歌山市)

第 22 回日本形成外科学会基礎学術集会
荒牧典子、岡部圭介、貴志和生
ケロイド組織における versikine の役割
2013 年 11 月 7 日 朱鷺メッセ 新潟コン
ベンションセンター(新潟県新潟市)

Tissue Repair and Regeneration: Gordon
research conferences (poster)
Noriko Aramaki-Hattori, Suneel S Apte.
Reduced ADAMTS5 proteolysis of versican is
associated with accumulation of
pericellular matrix in fibroblasts and transition
to a myofibroblastic phenotype.
2013.6.15 New London (USA)

Matrix metalloproteinases: Gordon research
conferences
Noriko Aramaki-Hattori, Hannah L. Bader,
Courtney M. Nelson, Johanne Dubail, Brittany
Matuska, Suneel S. Apte.
A new conditional mouse allele for Adamts9
identifies its essential role in interdigital web
regression. 2013.5.21 Lucca (Italy)

〔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
荒牧 典子 (ARAMAKI, Noriko)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：80365311

(2)研究分担者
貴志 和生 (KISHI, Kazuo)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：40224919

(3)連携研究者
()
研究者番号：

(4)研究協力者
()