

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861693

研究課題名(和文)ケロイドにおけるMFAP5の機能解析と新規治療薬の開発

研究課題名(英文)Functional analysis of MFAP5 and development of new treatment agent for keloid

研究代表者

池田 佳奈枝 (IKEDA, Kanae)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：70404746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：MFAP5の検討では有効な結果で得られず、ケロイドの治療薬としてレスベラトロールに変更して検討を行った。レスベラトロールは、ケロイド由来線維芽細胞のⅠ型コラーゲン、 α -SMA、HSP47のmRNA発現を、濃度依存性に抑制し、TGF- β 1産生を抑制した。さらに、レスベラトロールは、ケロイド由来線維芽細胞の増殖を抑制し、アポトーシスへ誘導していた。これらの結果より、レスベラトロールはケロイド由来線維芽細胞に対して線維化抑制効果を有すると考えられ、ケロイドに対する予防や治療への応用の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The study of MFAP 5 was not obtained with effective results, and it was changed to resveratrol as a therapeutic agent for keloid. Type I collagen, α -smooth muscle actin, and heat shock protein 47 expression decreased in resveratrol-treated keloid fibroblasts in a dose-dependent manner. In addition, resveratrol diminished transforming growth factor- β 1 production by keloid fibroblasts. We also demonstrated that it suppressed their proliferation and induced apoptosis of the fibroblasts. Our data indicate that resveratrol may have an antifibrogenic effect on keloid fibroblasts, suggesting the potential application of resveratrol for the treatment of keloids.

研究分野：形成外科

キーワード：ケロイド 創傷治癒

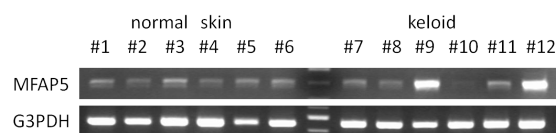
1. 研究開始当初の背景

日本人において比較的高い発生率を示すケロイドであるが、その発生のメカニズムは未だ不明な点が多い。また、ケロイドはヒト特有の疾患であり動物には発生しないことから、動物実験モデルが確立されていないことが、ケロイド研究の大きな妨げとなっている。

ケロイドは皮膚の色調の濃い人種に発生率が高く、家族発生も見られることから、遺伝的関与が指摘されている。そこで、ケロイド発生の遺伝子的解明を目的とし、ケロイド組織 5 検体、正常皮膚 5 検体、肥厚性癬痕 1 検体において、遺伝子発現パターンの違いを cDNA マイクロアレイを用いて比較し網羅的解析を行った。その結果、ケロイド組織において、正常皮膚や肥厚性癬痕の 2 倍以上の発現を示した遺伝子は 9 個であった。そのなかで、皮膚の構成成分に関与していると思われる MFAP5 に注目した。

MFAP5 は、細胞外基質である微細線維の一構成成分で、他の MFAP5 分子や微細線維の他の構成成分とイングリンを介して結合し、微細線維の構造の安定性に関与している可能性がいわれているが、その構造や機能については未だ不明の点が多い。

ケロイドにおける MFAP5 の関与について、まず、免疫組織学的検討、RT-PCR による正常皮膚検体とケロイド検体での比較検討を行った。その結果、検体の個体差はあるものの、下図のように正常皮膚と比較しケロイドで MFAP5 の発現が高い傾向がみられた。



今後さらに、MFAP5 とケロイドの関連性を研究することにより、MFAP5 をターゲットとしたケロイドの治療や予防、新薬の開発につながる可能性がある。また、ケロイドとは逆に細胞外基質の産生に乏しく創収縮能が低い難治性潰瘍や褥瘡、あるいは皮膚の老化に対するアンチエイジングにおいても、応用できる可能性がある。

また、同時にブドウの皮に含まれるポリフェノール的一种であるレスベラトロールの線維化抑制効果に着目し、皮膚の線維化疾患であるケロイドに対するその効果について検討した。レスベラトロールは、心血管保護作用や肝や腎への線維化抑制効果などの効果が報告されている。

2. 研究の目的

ケロイドは、I 型コラーゲンをはじめとする大量の細胞外基質の蓄積を特徴とする皮膚の難治性線維化疾患である。その発生の

メカニズムは未だ不明で、有効な治療法がないのが現状である。これまでに様々なアプローチからケロイド研究を行ってきたが、今回、ケロイド形成に關与する遺伝子の解明および新治療の確立を目指して、cDNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、正常皮膚と比較してケロイド組織において MFAP5 (microfibrillar associated protein 5) の発現が高いことを見いだした。本研究は、ケロイド形成のメカニズムの解明や新しい治療法の開発を目的とし、MFAP5 およびレスベラトロールの機能解析を行うことにした。

3. 研究の方法

(1) MFAP5 をノックダウンしたケロイド由来線維芽細胞の機能評価

ケロイド由来線維芽細胞において、siRNA を用いて MFAP5 をノックダウンし、RT-PCR での I 型コラーゲンの発現、細胞増殖機能、コラーゲンゲル収縮能について検討を行った。

(2) RT-PCR 法によるケロイド由来線維芽細胞の I 型コラーゲン、 α -SMA、HSP47 の mRNA 発現の評価

ケロイド患者よりケロイドを採取し、explant 法により線維芽細胞の培養を行った。ケロイドは、萎縮傾向をしめす中央部と拡大・浸潤傾向を示す辺縁部とに分けて採取し培養した。ケロイド由来線維芽細胞を、レスベラトロール添加培養液で培養を行い、RT-PCR 法によりケロイドで発現の高い因子について検討を行った。

(3) レスベラトロール投与による TGF- β 1 産生量の評価

ケロイド由来線維芽細胞にレスベラトロールをそれぞれ 25、50、100 μ M 投与し、添加培養後の上清の TGF- β 1 量の ELISA 法によって測定した。

(4) レスベラトロールが細胞増殖能に及ぼす影響の検討

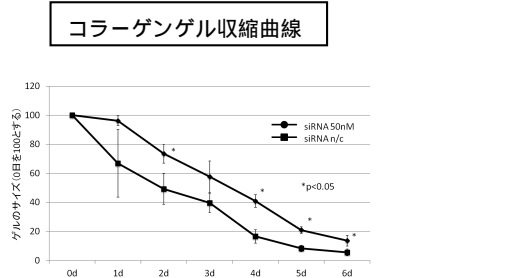
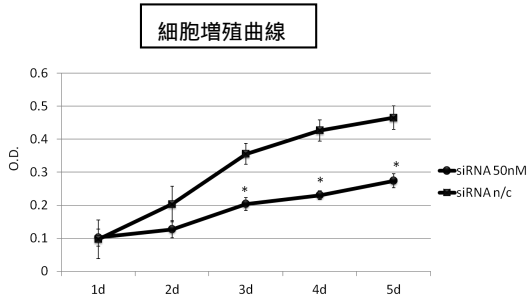
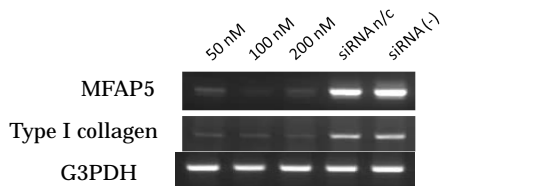
ケロイド由来線維芽細胞にレスベラトロールをそれぞれ 25、50、100 μ M 投与し、12、24、36、48 時間後にそれぞれ WST-1 assay を用いて評価した。

(5) レスベラトロールによるアポトーシス誘導の評価

アポトーシス誘導について、レスベラトロール 100 μ M 添加培養後 48 時間で annexin-V assay、細胞周期の解析を行った。また、アポトーシスの実行因子であるカスパーゼ 3 について、ケロイド由来線維芽細胞にレスベラトロールをそれぞれ 25、50、100 μ M 投与し、その活性を検討した。

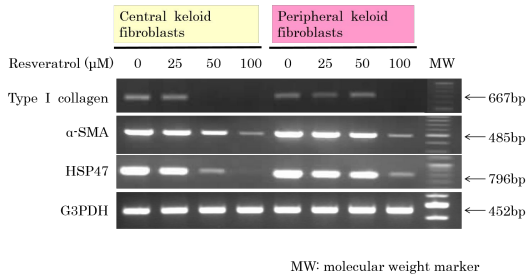
4. 研究成果

(1) ケロイド由来線維芽細胞において、siRNA を用いて MFAP5 をノックダウンすると、I 型コラーゲンの発現、細胞増殖、コラーゲンゲル収縮が抑制された。

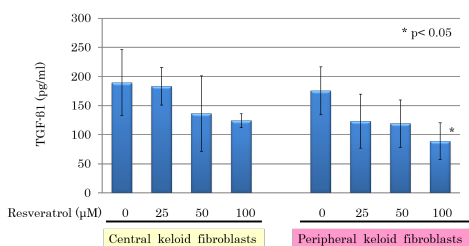


その後も検討を継続したが、思うように結果出ず、ケロイドの治療に有効と思われるレスベラトロールに対する検討を行った。

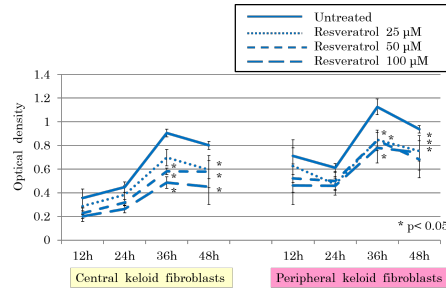
(2) レスベラトロールにより、型コラーゲン、 α -SMA、HSP47 の mRNA 発現が抑制された。



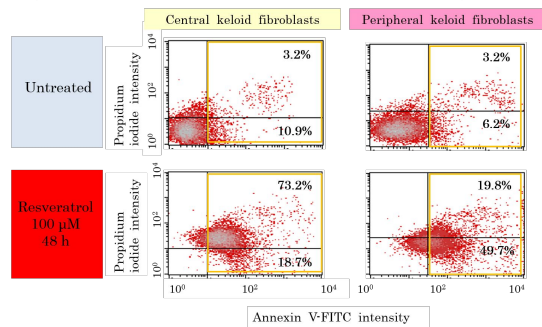
(3) ELISA の結果、レスベラトロール投与により、線維化を誘導する重要な因子である TGF- β 1 の産生が抑制される傾向にあることが示された。Peripheral keloid fibroblasts においては、レスベラトロール 100 μ M 投与で有意に TGF- β 1 産生が抑制された。



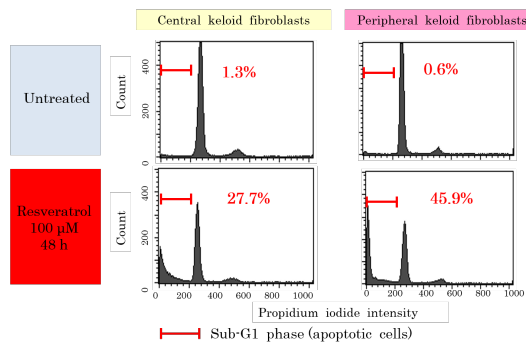
(4) レスベラトロールの細胞増殖に及ぼす影響を WST-1 アッセイにて検討したところ、レスベラトロールの濃度が高いほど、細胞増殖が抑制された。



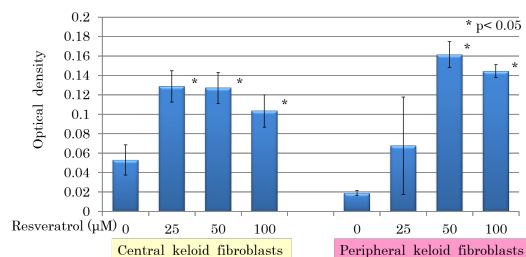
(5) アネキシン V アッセイでは、コントロールと比較し、レスベラトロール添加培養では、アポトーシス細胞が増加していた。



また、細胞周期の解析では、アポトーシス細胞を示す sub-G1 phase が増加しており、レスベラトロール投与した群では、アポトーシス細胞が増加していることが示唆された。



アポトーシスの実行因子であるカスパーゼ 3 について検討すると、レスベラトロールを添加することにより、その活性が増強された。



以上よりレスベラトロールはケロイド由来線維芽細胞のアポトーシスを誘導することが考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

池田香奈枝 (IKEDA, Kanae)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号：70404746

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()