

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670771

研究課題名(和文) レックリングハウゼン病に着目したscarless wound healing

研究課題名(英文) Mechanism of wound healing process in neurofibromatosis type 1

## 研究代表者

久保 盾貴 (KUBO, TATEKI)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00362707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：レックリングハウゼン病(以下NF-1)という全身の皮膚と神経を中心に神経線維腫を多発する疾患では、手術後の傷あとが非常にきれいになることが知られている。そこで、NF-1の創傷治癒を研究し、その傷あと形成のメカニズムを明らかにすれば、「傷あとを残さない医療」に応用できる可能性があると考え研究を行った。その結果、NF-1患者の癒痕がきれいになるのは、その原因遺伝子産物であるNeurofibrominの機能異常により、伸展刺激に対して正常線維芽細胞のようなアクチン重合促進が生じず、筋線維芽細胞への分化促進や細胞外マトリックス産生増加が引き起こされないからであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been known that neurofibromatosis type 1 (NF-1) patients don't develop hypertrophic scar and keloid. Therefore, if the mechanism of wound healing process in NF-1 is fully understood, it may be applicable for the treatment of hypertrophic scar and keloid. We cultured dermal fibroblasts from NF-1 patients and analyzed the behavior of those cells. Decrease in response to the mechanical stress was detected, possibly due to dysfunction of actin polymerization. Neurofibromin was considered to be involved in those abnormal responses.

研究分野：形成外科学

キーワード：レックリングハウゼン病

## 1. 研究開始当初の背景

(1)ヒトの皮膚は手術や外傷で一旦傷を生じると必ず傷あとが残る。そして、著しい傷あと(ケロイド・肥厚性瘢痕)を残すこともある。顔面に傷あとを生じた場合、「自分の顔面に醜状痕を持つ」という精神的苦痛は想像を絶するものがある。また、単なる整容性の問題だけではなく、ケロイド・肥厚性瘢痕になると強い痛みと痒みを生じ、日常生活の妨げとなる。そして、大きな傷あとは、必ず収縮し拘縮するために運動機能の障害も生じるようになる。手術や外傷を受けても傷あとを残さないようにできれば、人類の生活の質を大きく向上させると考えられるが、ケロイド・肥厚性瘢痕の形成機構は現在もなお十分に解明されていない。

(2)一方、我々形成外科ではレックリングハウゼン病(神経線維腫症I型、Neurofibromatosis type 1、以下NF-1)という全身の皮膚と神経を中心に神経線維腫を多発する疾患を治療する機会がある。そして、このNF-1では、手術後の傷あとが非常にきれいになることが知られている。とういことは、NF-1の創傷治癒を研究し、その傷あと形成のメカニズムを明らかにすれば、「傷あとを残さない医療」に応用できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

「傷あとを残さない医療」の開発が本研究の目的である。NF-1の患者より採取した皮膚線維芽細胞を用いて、NF-1患者の創傷治癒を研究し、傷あと形成のメカニズムを分化と細胞骨格の観点から解明していきたい。傷あとが非常にきれいになるNF-1患者の創傷治癒機構を解明できれば、「傷あとを残さない医療」に応用できる可能性があり、傷あとで苦しむ多くの患者を救済でき、人類の生活の質を大きく向上させると考える。

## 3. 研究の方法

### (1)NF-1患者由来の初代皮膚線維芽細胞の培養確立

施設の倫理委員会による許可を受けたプロトコルにのっとり、同意の得られたNF-1患者から、形成外科手術における余剰皮膚をご提供いただいた。それを、explant法にて初代培養を行い、NF-1患者由来皮膚線維芽細胞を得た。コントロールとなる正常人由来初代皮膚線維芽細胞は市販品を購入し、同じ培地にて培養・継代を行った。いずれも passage3-8 の細胞を用いて、実験・解析を施行した。

### (2) Transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ ) 刺激による分化能および細胞骨格制御因子への影響についての比較

皮膚線維芽細胞は筋線維芽細胞に分化してコラーゲンなどの細胞外マトリックスを

過剰に産生し、ケロイド・肥厚性瘢痕を生じることから、筋線維芽細胞への分化抑制を制御できれば、傷あとを残さない医療に応用できる可能性がある。そのため、まず第1段階としてNF-1由来の皮膚線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化が抑制されているか、あるいは逆に促進されているかを検証した。通常、線維芽細胞はtransforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 刺激により筋線維芽細胞への分化が強く引き起こされる。それを利用し、筋線維芽細胞のマーカーである $\alpha$ -SMAのウエスタンブロッティングを行い、NF-1由来線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化を正常ヒト由来線維芽細胞と比較した。

また同時に、TGF- $\beta$  刺激による細胞骨格制御因子であるRhoファミリーへの影響を検証した。Rhoファミリーとは分化やアポトーシス、細胞遊走などに関与する重要因子であり、近年様々な分野で研究され、その阻害剤や促進剤の開発も進んできており、治療薬としての実現性も高い。よって、NF-1の傷あと形成にも分化やアポトーシスを介してRhoファミリーが関与することが判明すれば、それを新治療開発の糸口にできる可能性がある。そこで、我々はTGF- $\beta$ をNF-1由来皮膚線維芽細胞に投与して分化を誘導し、Rhoファミリーの1つであるRhoAの活性化を測定するプルダウンアッセイを行い、Rhoファミリーの分化への関与も調査した。

### (3) 伸展刺激による分化能および細胞骨格制御因子への影響についての比較

ケロイドや肥厚性瘢痕は肩や前胸部など機械的伸展刺激を生じる場所に発生しやすい。そこで我々は、NF-1患者の傷あとがきれいになりやすいのは、機械的刺激に対する反応性の違いによるのではないかと推測した。通常、線維芽細胞に機械的刺激が加わると筋線維芽細胞への分化が促進されると考えられているので、NF-1由来線維芽細胞に機械的伸展刺激を加えた時、分化能や細胞骨格制御因子への影響が正常線維芽細胞と異なるのかを、それぞれ $\alpha$ -SMAやRhoAについて検証した。機械的伸展刺激にはStrex社製細胞伸展装置を用い、タイプコラーゲンにてコーティングした専用シリコンチャンバー上に細胞を培養して行った。

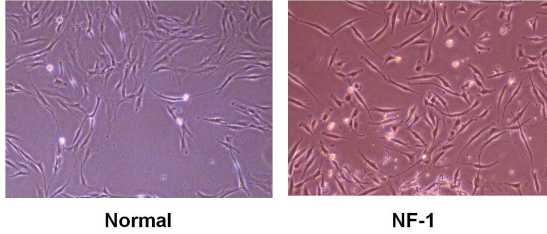
### (4) Neurofibromin siRNAを用いた検証

NF-1はNeurofibromin遺伝子の変異により、その遺伝子産物であるNeurofibrominの機能不全を生じ、その結果神経線維腫などの症状を示す。よって、Neurofibrominを抑制するsiRNAを正常ヒト皮膚線維芽細胞に導入すると、NF-1と同じ状態を再現できる可能性がある。その状態での分化や細胞骨格制御因子への影響、およびそれらのシグナル伝達を解析する。siRNAの導入はリポフェクション法にて行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) NF-1 患者由来の初代皮膚線維芽細胞

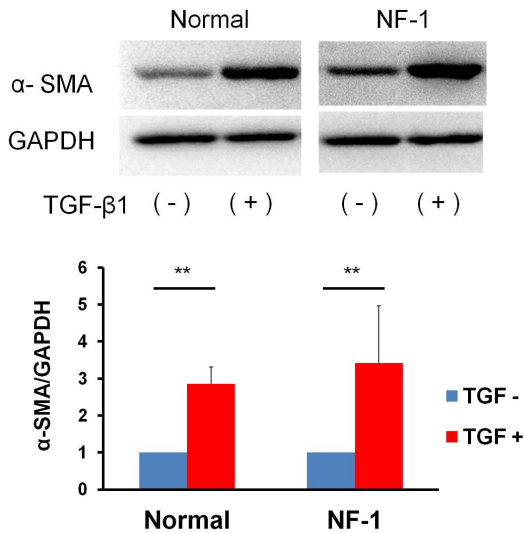
NF-1 患者由来の皮膚線維芽細胞は、正常皮膚線維芽細胞と同等の細胞増殖能を有し、形態の相違も見られなかったことから、それらの比較実験を行うこととした。



##### (2) Transforming growth factor-β (TGF-β) 刺激による分化能および細胞骨格制御因子への影響についての比較

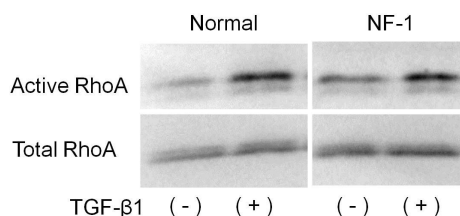
分化能 (α-SMA) について

FBS starve 処理後、それぞれの線維芽細胞に TGF-β を加え、24 時間後に細胞を回収し、ウエスタンブロッティングによる解析を行った。いずれにおいても α-SMA は有意に増加しており、すなわち、TGF-β 刺激による筋線維芽細胞への分化能に関しては、NF-1 由来線維芽細胞は正常線維芽細胞と違いが認められなかった。



細胞骨格制御因子への影響について

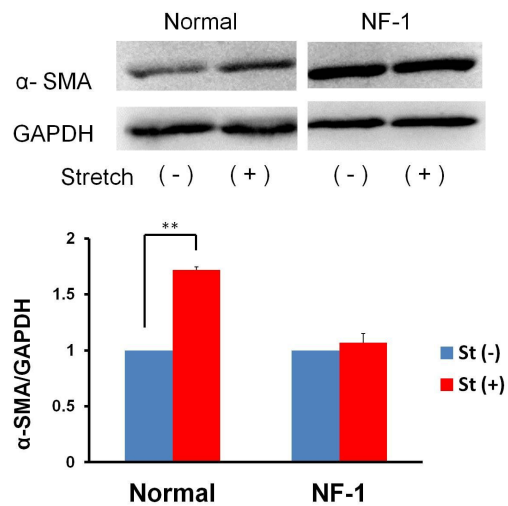
FBS starve 処理後、それぞれの線維芽細胞に TGF-β を加え、10 分後に細胞を回収し、RhoA の活性をプルダウンアッセイにて解析した。いずれにおいても、RhoA は活性化され、これについても違いは認めなかった。



##### (3) 伸展刺激による分化能および細胞骨格制御因子への影響についての比較

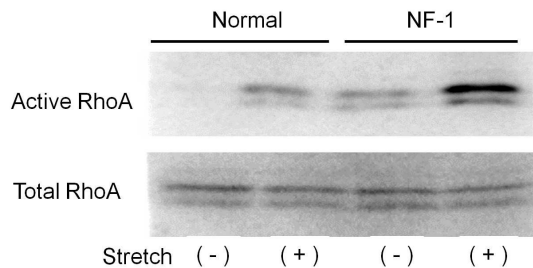
分化能 (α-SMA) について

それぞれの線維芽細胞をコラーゲンコーティングした専用シリコンチャンバー上に培養し、FBS starve 処理後、機械的伸展刺激を 24 時間加えた後、細胞を回収しウエスタンブロッティングによる解析を行った。その結果、正常線維芽細胞では α-SMA の発現が有意に上昇しているのに対し、NF-1 由来線維芽細胞では明らかな上昇が認められなかった。また、タイプ コラーゲンの発現についても同様の結果であった。すなわち、NF-1 患者の傷がきれいになりやすい要因は、機械的刺激に対する線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化能の違いにある可能性が示唆された。



細胞骨格制御因子への影響について

機械的伸展刺激を 10 分加えた後、RhoA の活性をプルダウンアッセイにて解析した。いずれにおいても RhoA は活性化され、違いを認めなかった。このことから、上記の機械的刺激に対する分化能の違いは RhoA の下流もしくは RhoA を介さないシグナル伝達経路に違いがあることが推測された。

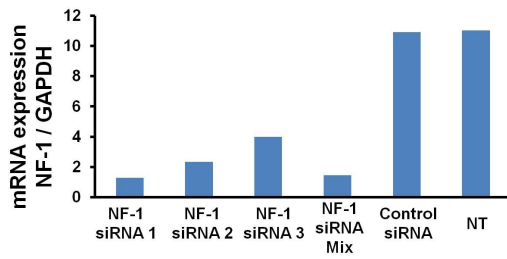


##### (4) Neurofibromin siRNA を用いた検証

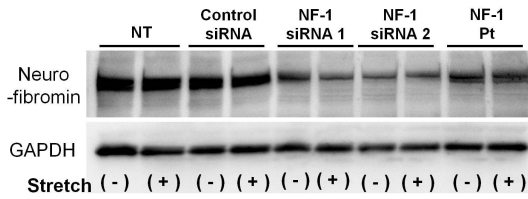
siRNA によるノックダウン効果の確認

リポフェクション法を用いて、正常ヒト皮膚線維芽細胞に Neurofibromin siRNA を導入し、Neurofibromin の遺伝子発現およびタンパク発現がノックダウンされることを確認した。

リアルタイム qRT-PCR による  
遺伝子発現ノックダウンの確認

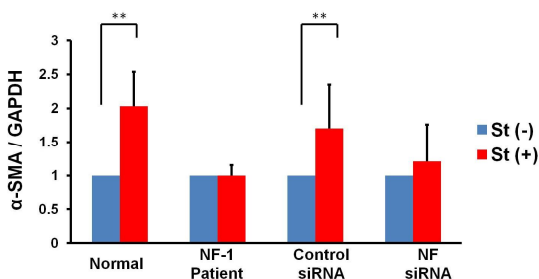
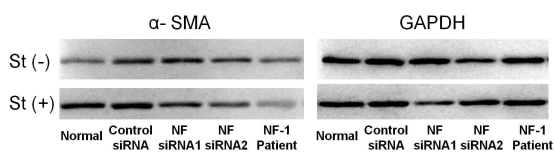


ウェスタンブロッティングによる  
タンパク発現ノックダウンの確認  
(伸展刺激にても変化なし)



伸展刺激による分化能の違いについて

NF-1 由来線維芽細胞で確認された、正常線維芽細胞との伸展刺激に対する分化能の違いについて、Neurofibromin siRNA を導入した皮膚線維芽細胞でも同様の結果が確認された。すなわち、Neurofibromin siRNA 導入線維芽細胞に伸展刺激を加えても、筋線維芽細胞への分化を示す  $\alpha$ -SMA の発現上昇が認められなかった。これにより、NF-1 由来線維芽細胞の伸展刺激に対する正常線維芽細胞との違いは、その原因遺伝子産物である Neurofibromin の機能低下 (不全) に起因することが示された。

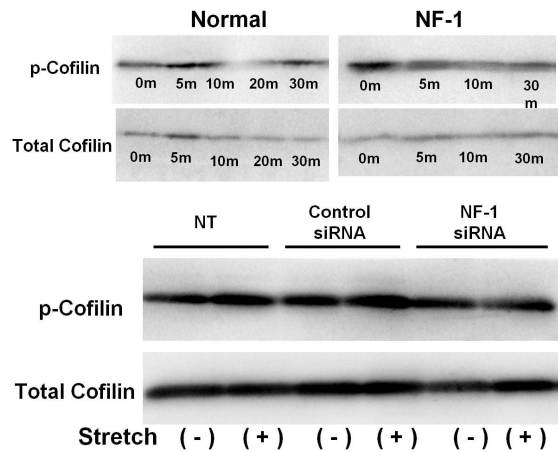


伸展刺激のシグナル伝達経路における Neurofibromin の関与について

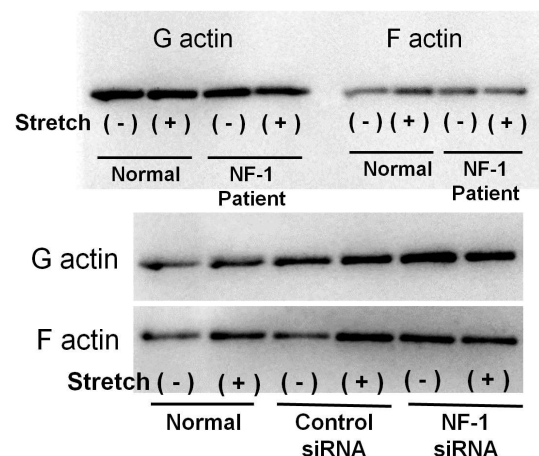
細胞に伸展刺激が加わると、RhoA が活性化され、その下流にある LIMK がリン酸化し、さらにその下流にある Cofilin がリン酸化 (不活化) される。Cofilin はアクチン脱重合因子であり、活性化状態でアクチン線維を切断し

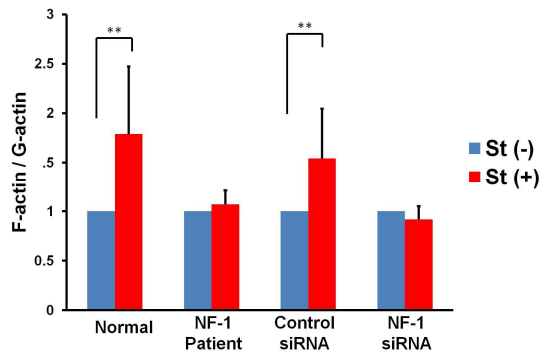
F (繊維状) アクチンを G (球状) アクチンへと分断する。よって、伸展刺激により Cofilin がリン酸化 (不活化) されると、アクチン線維の重合が促進され、F アクチンが増加すると考えられている。

NF-1 の原因遺伝子産物である Neurofibromin は伸展刺激受容器として働く細胞骨格 Actin の上流にある LIMK に対して抑制的に作用することが知られており、このことが前述の伸展刺激に対する反応性の違いを引き起こしているのではないかと推測した。正常線維芽細胞に伸展刺激を加えると、RhoA が活性化され (先述) その下流にある Cofilin のリン酸化が促進された。一方で、NF-1 由来線維芽細胞では、伸展刺激を加える前から Cofilin のリン酸化が亢進しており、伸展刺激を加えても明らかなリン酸化の促進は認められない傾向であった。また、Neurofibromin siRNA を導入した皮膚線維芽細胞でも同様の傾向であった。



さらに、正常線維芽細胞では、伸展刺激により Cofilin がリン酸化 (不活化) されることによりアクチン重合が促進し、その結果、F アクチン / G アクチン比が増加するが、NF-1 患者由来線維芽細胞や Neurofibromin siRNA 導入皮膚線維芽細胞では、伸展刺激を加えても F アクチン / G アクチン比の増加が見られなかった。





以上の結果から、NF-1 患者の癒痕がきれいになるのは、その原因遺伝子産物である Neurofibromin の機能異常により、伸展刺激に対して正常線維芽細胞のようなアクチン重合促進が生じないことに起因し、その結果、筋線維芽細胞への分化促進や細胞外マトリックス産生増加が引き起こされないからであることが示唆された。

#### 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)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 特になし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

久保 盾貴 ( KUBO, Tateki )  
 大阪大学・医学系研究科・准教授  
 研究者番号：00362707

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：