

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670776

研究課題名(和文) 真のケロイド線維芽細胞を同定する！～heterogeneityへの挑戦～

研究課題名(英文) Establishment of immortalized cell lines of keloid fibroblasts

研究代表者

須永 中 (Sunaga, Ataru)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：00406117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ケロイド由来線維芽細胞に組換えレンチウイルスを用いてhTERT遺伝子を導入することにより、不死化細胞株を作製した。作製した細胞株からsingle cell由来の細胞株をexpandし、コラーゲンtype1遺伝子の発現を解析することにより、真にケロイドの形質を有していると考えられる細胞株を同定した。今後この細胞株を詳細に解析することにより、ケロイドの病態が明らかになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We introduced hTERT gene to human keloid-derived fibroblasts and established 48 immortalized cell lines.

After 20 passages, we identified 5 true keloid fibroblast cell clones which maintained the highest collagen type 1 expression.

研究分野：形成外科学

キーワード：ケロイド

## 1. 研究開始当初の背景

従来は均一な細胞集団と考えられていた悪性腫瘍が、個々の細胞ごとに遺伝子変異やエピジェネティック修飾の異なる不均一な細胞集団であることが明らかになってきている。線維化疾患であるケロイドを構成する細胞は、当然不均一な集団であると考えられるが、これまでほぼ全てのケロイド研究において、ケロイド検体より初代培養された線維芽細胞が、いわゆるケロイド線維芽細胞として使用されており、ケロイドを構成する細胞集団の不均一性に着目した報告はない。

我々は、ケロイドを構成する線維芽細胞は不均一な集団であるという仮説のもとに、その集団の中からケロイド形質を強く保持している細胞を選択的に抽出・解析することができれば、ケロイドの真の病態を明らかにすることができるかと考え、本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

ケロイド検体から初代培養により得られたケロイド線維芽細胞は、*in vitro*での遺伝子やタンパク質の発現において正常皮膚線維芽細胞と異なる形質を有することが、多くの研究で示されている。しかし、この「いわゆる」ケロイド線維芽細胞は、大きく分けて以下の3種類のポピュレーションに分類可能であると考えられる。

A ケロイドの形成に関与しており、*in vitro*においてもコラーゲン産生量増大などケロイドの形質を維持している線維芽細胞

B ケロイドの形成に関与していたが、*in vitro*の環境になって皮膚張力や他からのシグナルといった *in vivo*の微小環境が消失することにより、ケロイドの形質を失った線維芽細胞

C ケロイドの形成に関与していない正常

な線維芽細胞

B細胞は、何らかのシグナル伝達によって転写状態が一時的に活性化 (transcriptional upregulation) していたのに対し、A細胞は、エピジェネティックな修飾によるほぼ不可逆的な転写状態の変化 (epigenetic silencing) によって活性化が持続していると考えられ、

ケロイドや肥厚性瘢痕における形質の個体差は、これらの細胞の比率によって全て説明可能である。すなわち、治療に抵抗性のケロイドには細胞Aが多く、経過観察のみで軽快するような肥厚性瘢痕はB細胞のみで構成されているのかも知れない。いずれにしる従来の方法で示されてきたのはこれら3種類の集合の結果でしかなく、不均一な細胞集団を解析するだけではケロイドの真の形質に迫ることは難しい。

本研究の目的は、hTERT 遺伝子 (細胞の形質を変えることなく不死化可能) の導入による細胞の不死化という手法を用いて、A細胞のみで構成される均一な細胞株を分離・解析することにより、ケロイドの真の原因を突き止めることである。

## 3. 研究の方法

ヒトケロイド由来線維芽細胞とヒト正常瘢痕由来線維芽細胞の初代培養株それぞれ10株におけるコラーゲン type1 の遺伝子発現を qRT-PCR にて解析し、発現の高いケロイド由来線維芽細胞と低い正常瘢痕由来線維芽細胞を同定した。

理化学研究所より hTERT 遺伝子を搭載した FLC Fm-hTERT vector を購入し、PCR にて hTERT 遺伝子の cDNA を増幅した。hTERT cDNA を InFusion Cloning を用いて、レンチウイルス発現ベクターである pLVSIN-Pur vector に挿入し、pLVSIN-hTERT Lentivirus vector を作製した。

作製した遺伝子組換えレンチウイルス発現ベクターをケロイド由来線維芽細胞と正常癬痕由来線維芽細胞に感染させた後、ピューロマイシンによる薬剤選択を施行した。生存した細胞を限界希釈法により各株 48 株ずつサブクロニングした。継代によって各細胞株を expand した後に、qRT-PCR にてコラーゲン type1 遺伝子の発現を解析した。

#### 4. 研究成果

ケロイド由来線維芽細胞初代培養株におけるコラーゲン type1 の発現は、細胞株によって様々であり、正常癬痕由来線維芽細胞における発現と同等のものから数倍の発現を有するものまで存在した。また、同一患者由来の初代培養株からクロニングしたケロイド由来線維芽細胞不死化細胞株も、株によってコラーゲン type1 の発現は大きく異なっていた。これらのことから、ケロイドを構成する線維芽細胞の形質はヘテロであり、ほとんどの研究において用いられている初代培養株はケロイドの形質を必ずしも有していない可能性が示唆された。

本研究では、最終的に hTERT 遺伝子によって不死化され、継代後もコラーゲン type1 の高発現を維持しているケロイド由来線維芽細胞不死化細胞株 5 株を確立できた。これらの細胞株は、真のケロイド形質を有していると考えられるため、今後の研究に有用であると考えられた。

#### 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 3 件)

須永中、菅原康志、宇田宏一、去川俊二、桂木容子、宮崎邦夫、加持秀明

異常癬痕の病理組織像についての再検討～不均一性についての考察

第 57 回日本形成外科学会総会・学術集会、2014/04/09、長崎

須永中、菅原康志、宇田宏一、去川俊二、加持秀明、阿部周作、山本崇弘 : Cre-loxP システムを用いた皮膚創傷治癒における細胞の運命追跡、第 23 回日本形成外科学会総会基礎学術集会、2014/10/09、松本

須永中、菅原康志、宇田宏一、去川俊二、加持秀明、阿部周作、山本崇弘 : Cre-loxP システムを用いた皮膚創傷治癒における細胞の運命追跡、第 44 回日本創傷治癒学会、2014/12/02、仙台

〔図書〕(計 1 件)

須永中 . 線維増殖性疾患としてのケロイド・肥厚性癬痕 . きずあと・ケロイドはここまで治せる . 克誠堂出版 . 60-64, 2015

〔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

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

須永 中 (Sunaga ataru)

自治医科大学・形成外科・助教

研究者番号：00406117

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：