

| | |
|------------------|--|
| Title | 表皮細胞の抗張力反応の解析 |
| Sub Title | Analysis of the tensile strength response in epidermal cell |
| Author | 加藤, 達也(Kato, Tatsuya) |
| Publisher | |
| Publication year | 2017 |
| Jtitle | 科学研究費補助金研究成果報告書 (2016.) |
| JaLC DOI | |
| Abstract | <p>マウス持続的抗張力負荷モデルにおけるケロイド様組織においてTissue inhibitor of metalloprotease-2(TIMP2)の低下を認めた。また表皮細胞においてはsmooth muscle actin(SMA)が抗張力負荷により表皮細胞において発現していた。塩基性線維芽細胞増殖因子を投与したところ、SMA発現は抑制される一方で、TIMP2の発現の低下は認められなかった。すなわち抗張力を受けた細胞はその力に拮抗するために、SMAを発現させ、さらに組織として強固なものとするために線維芽細胞がコラーゲンを生成する可能性が示唆された。</p> <p>A decrease in Tissue inhibitor of metalloprotease-2 (TIMP2) was observed in keloid-like tissues in a mouse persistent tensile loading model. In epidermal cells, smooth muscle actin (SMA) was expressed by tensile strength. Administration of basic fibroblast growth factor suppressed expression of SMA, but decreased expression of TIMP2 was observed. In other words, epidermal cells subjected to tensile strength expressed SMA to antagonize the force. Furthermore, it was suggested that fibroblasts produced collagen to obtain further strengthen.</p> |
| Notes | 研究種目：若手研究(B) 研究期間：2013～2016 課題番号：25861704 研究分野：形成外科 |
| Genre | Research Paper |
| URL | https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25861704seika |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861704

研究課題名(和文)表皮細胞の抗張力反応の解析

研究課題名(英文)Analysis of the tensile strength response in epidermal cell

研究代表者

加藤 達也(Tatsuya, Kato)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：60641321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス持続的抗張力負荷モデルにおけるケロイド様組織においてTissue inhibitor of metalloprotease-2(TIMP2)の低下を認めた。また表皮細胞においてはsmooth muscle actin(SMA)が抗張力負荷により表皮細胞において発現していた。塩基性線維芽細胞増殖因子を投与したところ、SMA発現は抑制される一方で、TIMP2の発現の低下は認められなかった。すなわち抗張力を受けた細胞はその力に拮抗するために、SMAを発現させ、さらに組織として強固なものとするために線維芽細胞がコラーゲンを生成する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A decrease in Tissue inhibitor of metalloprotease-2 (TIMP2) was observed in keloid-like tissues in a mouse persistent tensile loading model. In epidermal cells, smooth muscle actin (SMA) was expressed by tensile strength. Administration of basic fibroblast growth factor suppressed expression of SMA, but decreased expression of TIMP2 was observed. In other words, epidermal cells subjected to tensile strength expressed SMA to antagonize the force. Furthermore, it was suggested that fibroblasts produced collagen to obtain further strengthen.

研究分野：形成外科

キーワード：抗張力反応

1. 研究開始当初の背景

生体内の様々な細胞は、外部環境(「場」)から与えられる張力により細胞内のシグナル伝達経路が活性化され、その張力により細胞が適応するとともに、張力の組織全体に与える影響を緩和させる。このシステムの代表として、血流・血圧に対する血管内皮細胞・動脈平滑筋細胞の応答がよく知られている。これらの細胞は発生期だけでなく後天的にも(動脈硬化時など)、血圧の上昇、血流のずり応力を感じ、その血圧・血流に耐えうる動脈としての頑丈な表現型を呈する適応能力を持つ。皮膚においては特に皮膚損傷時や皮膚欠損縫縮時、周囲組織(「場」)からの張力がかかるが、皮膚深層に存在する真皮細胞が筋線維芽細胞(SMA陽性)へ分化することにより外部からの張力を緩和し、損傷部位の離開を防ぐために癒痕を生じる。つまり真皮細胞が皮膚組織としての張力応答を担っていると考えられている。この癒痕を生じるメカニズムの解明は十分ではなく、いまだ scarless wound healing には至っていない。

2. 研究の目的

申請者のグループは独自の骨延長術のデバイスをマウスに適用し、新規マウス皮膚持続的張力負荷モデルを確立した。このモデルにより、再現性の高い定量的な張力を皮膚に負荷することが可能であることが判っている。申請者はこれまでの予備実験で伸展刺激を与えた皮膚の組織学的解析において、真皮線維芽細胞だけではなく表皮細胞にも張力応答反応が存在するという、これまでの皮膚張力応答メカニズムの理解に関して全く新しい知見を示唆する所見を得ている。

今回はさまざまな視点から表皮細胞の変化を解析し、その張力応答細胞としての表現

型を明確にする。また網羅的遺伝子解析により、表皮細胞の変化において変動する遺伝子をピックアップし、その機能を明らかにし『表皮細胞の抗張力反応』という全く新しい視点により皮膚の張力応答メカニズムを理解することを目的とする。すなわち当該領域は動く・ゆらぐ細胞がそれを囲む「場」からの拘束を受けて組織全体の調和がもたらされるメカニズムを明らかにすることを目的としている。本研究は皮膚に特化し、表皮細胞が張力と言う「場」からの影響による細胞の挙動変化、皮膚という組織全体の調和へのメカニズムを解明することを目的とした。

このメカニズムの解析はケロイド・肥厚性癒痕の治療にもつながる。有効な新規治療戦略が見出されれば、ケロイド・肥厚性癒痕の患者に希望を与えることができ、scarless wound healing につながることを期待され、かなりの臨床的波及効果が見込まれる。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織学的解析

マウス背部皮膚に広範囲欠損創(3cm幅)を作成、縫縮する。縫合創作成4日後、臨床において頭蓋骨・顎骨の骨延長術において用いられる骨延長器を装着し、持続的に創縁に張力を加えて免疫組織学的検討を行った。

(2) 培養表皮細胞、線維芽細胞による解析

上記モデルにより作成された持続的張力負荷後の皮膚組織を採取し、免疫組織学的解析を行う。その *in vivo* で得られた表現型が表皮細胞の cell autonomous な反応であるかどうか(真皮細胞の張力応答反応の二次的現象か)否かを確認すべく、*in vitro* において培養表皮細胞シート系をシリコン膜伸展培養装置と組み合わせ、表皮細胞の張力負荷時

の細胞の挙動を詳細に観察した。

(3) ノックアウトマウスによる解析

以上により得られた結果から、関連するノックアウトマウスを用いたときの表皮構造につき詳細に観察し、その意義について検討する。

4. 研究成果

(1) 免疫組織学的解析

マウス背部に創を作成し、持続的張力負荷をかけると、表皮細胞は著しい過形成を起こすことが分かった。このとき真皮内筋線維芽細胞が抗張力を発揮すべく張力と同方向に走行するのと対照的に、表皮構造は垂直方向に成長していくことが分かった。

そして動脈平滑筋細胞などが張力に応じて発現する Smooth muscle actin (SMA) の発現を調べた結果、真皮筋線維芽細胞のみならず、表皮細胞にも強く発現していた。そして、この SMA の発現は表皮基底層より上層、つまり終末分化に近い表皮細胞(Keratin5 陰性)で強く発現していた。これらの知見は真皮筋線維芽細胞だけではなく表皮細胞にも張力応答反応が存在することを示唆している。

そして同組織における発現しているタンパク質を網羅的に解析した結果、細胞外マトリックスの代謝に関与する Matrix Metalloproteinase2(MMP2)の発現増加を認める一方でその阻害因子である Tissue inhibitor of metalloproteinase2(TIMP2)の発現低下を認めた。TIMP2 は MMP2 を阻害する作用があることが知られている。

(2) 培養表皮細胞、線維芽細胞による解析

創部から表皮細胞、ならびに線維芽細胞をそれぞれ回収・培養し、抗張力を負荷させた

in vitro における検討を行った。このときにリコンビナント TIMP2(rhTIMP2)の投与・非投与群の 2 群の比較を行った。その結果、rhTIMP2 投与を行った細胞群においてはコラーゲンの生成、蓄積が抑制されていることが確認できた。

また作成した創部と同様に SMA の発現を認めた。SMA は通常線維芽細胞の活性化の指標であり、通常創収縮に関与するとされている。すなわち表皮細胞において発現していた SMA は抗張力に拮抗して収縮しようとするために分泌されていることが予測できた。そこで SMA 発現を抑制するとされる塩基性線維芽細胞増殖因子を投与したところ、SMA と MMP2 の発現は抑制される一方で、TIMP2 の発現の低下は認められなかった。すなわち抗張力を受けた細胞はその力に拮抗するために、SMA を発現させ、さらに組織として強固なものとするために細胞がコラーゲンを生成する可能性が示唆された。

(3) ノックアウトマウスによる解析

これまでの検討は表皮細胞と線維芽細胞を個別に培養し検討している状態であるために、in vivo での検討が今後必要であると考えた。そこで TIMP2 ノックアウトマウスを用いて背部の創傷を作成し進展刺激を加え、rhTIMP2 の投与を行った。

その結果、TIMP2 ノックアウトマウスにおいては表皮細胞の著しい過形成と SMA の発現を認めたが、rhTIMP2 の投与を行った群においては SMA、MMP の発現も抑えられて、表皮細胞の過形成も認められなかった。

この著しい過形成はケロイド・肥厚性瘢痕に告示する病態であり、ケロイドにおいては TGF- β 1 が高発現していることが報告されている。また MMP には TGF- β 1 を活性化する

作用を持ち、その活性化されて TGF- β 1 によって SMA 発現は上昇する。rhTIMP2 を投与することにより MMP の発現を押さえることで、SMA の発現までの一連の発現をおさえることができたと考えられる。臨床においてケロイドの予防として TIMP 製剤が使用できる可能性が示唆された。

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〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 達也 (KATO Tatsuya)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60641321