



Title	In vitro and in vivo evidence of pathogenic roles of Hic-5/ARA55 in keloids through Smad pathway and profibrotic transcription
Author(s)	庄野, 文恵
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58192
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【24】

氏 名	庄 野 文 恵
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 4 1 7 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 22 年 9 月 22 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学 位 論 文 名	In vitro and in vivo evidence of pathogenic roles of Hic-5/ARA55 in keloids through Smad pathway and profibrotic transcription (ケロイド病態形成にHic-5/ARA55はSmad経路を介する線維化促進因子として関与する—in vitro及びin vivoにおける証明)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 細 川 互 (副査) 教 授 片 山 一 朗 教 授 高 田 章 好

論文内容の要旨

[目 的]

ケロイドは、疼痛や癢痒、ときに運動制限を伴う、皮膚の隆起性病変である。外傷や手術等、皮膚への侵襲が契機となり、創傷治癒過程における増殖期が持続している状態と考えられている。ケロイド組織では、TGF- β 1によって線維芽細胞が持続的にコラーゲン等の細胞外基質を産生している。

Hic-5 (hydrogen peroxide-inducible clone-5) / ARA55 (androgen receptor-associated protein 55) は、LIM domain protein superfamily に属し、主に細胞接着斑に局在しているが、核に移行してステロイドホルモンレセプターと共役し、転写調節にも関与する分子である。皮膚線維芽細胞において、Hic-5の発現はTGF- β 1によって増強し、Hic-5の抑制がTGF- β 1によるコラーゲン生成を抑制することが知られている。しかし、ケロイド組織や肥厚性瘢痕でのHic-5の発現はこれまでに確認されておらず、TGF- β 1によるHic-5の誘導が病態形成に関与するかどうかは明らかでなかった。

そこで本研究は、線維化促進因子としてのHic-5が、ケロイド形成に関与する機序を明らかにする目的で、以下の実験を行った。まず、ケロイド組織と正常組織においてHic-5の存在を確認した。次にケロイド線維芽細胞にHic-5を導入し、コラーゲンの生成量を調べた。さらに、ケロイド病態形成におけるHic-5の反応経路の特異性を検証した。

[方法ならびに成績]

ケロイド組織におけるHic-5の発現を調べるため、15例のケロイド組織および6例の正常皮膚組織について抗Hic-5抗体による免疫組織染色を行った。ケロイド組織は15例中8例で陽性、正常皮膚組織は6例全例で陰性であった。染色は、細胞質が弱く染色されるのに対し、核が強く染色され、Hic-5の核への局在が示された。

ケロイドにおいて、Hic-5がコラーゲン生成の促進に関与するかどうかを調べるため、Hic-5発現ベクターをケロイド線維芽細胞に導入してコラーゲン生成量の変化を調べた。その結果、RT-PCR法によりタイプIコラーゲンとタイプIIIコラーゲンのmRNAの増加がみられ、さらに、ELISA法により細胞表面に沈着するタイプIコラーゲン量が1.74倍 ($p < 0.05$) 増加していた。次いで、413番アミノ酸にAla > Thrのpoint mutationを有するLIM3-LIM4ドメインHic-5断片はアンドロゲン受容体共役活性を持たないことが報告されているが、この発現プラスミドをケロイド線維芽細胞に導入したところ、細胞表面に沈着するタイプIコラーゲン量は1.64倍増加し ($p < 0.05$)、Hic-5のコラーゲン産生促進にはアンドロゲン受容体共役活性は必要でないことが示された。また、正常皮膚線維芽細胞に野生型Hic-5を導入したが、ケロイド線維芽細胞で観察されたようなコラーゲン生成の増加は認めなかった。

Hic-5は前立腺腫瘍細胞株においてSmad2/3のリン酸化とSmad7の変性を促進する。ケロイド組織におけるHic-5の発現とSmad2/3のリン酸化およびSmad7の発現量が相関

するかどうかを調べるため、15例のケロイド組織を用いて抗p-Smad2/3抗体および抗Smad7抗体による免疫組織染色を行い、Hic-5の染色強度との相関を検討した。Hic-5とp-Smad2/3の染色の程度は、スピアマンの順位相関検定により、正に相関した ($r = 0.57$, $p = 0.03$) もの、Smad7の染色の程度とHic-5との間に相関関係はなかった。さらに、in vitroでもケロイド線維芽細胞へのHic-5 siRNAの導入により、pSmad2/3は減少したが、Smad7の発現量に変化はなく、免疫組織染色と合致する所見を得た。

[総 括]

以上のin vitroおよびin vivoの結果より、Hic-5はSmad7を介さない経路によりSmad2/3のリン酸化を促進し、コラーゲン合成を促進し、ケロイド病変の形成に関与することが示唆された。ケロイドの重要な病因分子であるTGF- β 1によってHic-5の発現は誘導されることが知られており、Hic-5はTGF- β 1の作用を媒介する新しいケロイドの病因分子であり、治療ターゲット分子であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

ケロイドの病態はコラーゲン等の過剰生成と不規則蓄積であるが、その病因については系統的な研究が遅滞している。創傷治癒過程で各種細胞から産生されるTGF- β 1は様々な生理学的活性を有するが、線維芽細胞に対してはコラーゲン生成を促進することが知られている。本研究は、TGF- β 1がSmad経路を活性化し、さらにHic-5の発現を誘導することから、ケロイド形成におけるHic-5の機能を検証したものである。Hic-5は細胞接着斑に存在し、細胞膜流動性や細胞間情報伝達を担う分子である。本研究では、Hic-5がケロイド線維芽細胞の核内に局在し、Smad3の作用を増強することでタイプIコラーゲン生成を促進することを明らかにした。さらに、ケロイド線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞はHic-5に対する反応性に差異があることを示した。本研究はケロイド病変での線維化促進因子というHic-5の新しい作用を見出すとともにケロイド線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞での差を示した点で新規性が高い。よって、本研究は学位に値すると考えられる。