The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Endothelial cell-derived endothelin-1 is involved in abnormal scar formation by dermal fibroblasts through RhoA/Rho-kinase pathway
Author(s)	木矢, 孝一郎
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61636
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

[Format-P02]

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	木矢　孝一郎
論文題名 Title	Endothelial cell-derived endothelin-1 is involved in abnormal scar formation by dermal fibroblasts through RhoA/Rho-kinase pathway （血管内皮細胞から分泌されるエンドセリン－1はRhoA/Rho-kinase経路を介して皮膚線維芽細胞による異常瘢痕形成に関与する）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

肥厚性瘢痕やケロイド組織では血管内皮細胞の過剰な増殖により、多くの微小血管が閉塞していることが報告されている。また、血管内皮細胞から分泌される代表的物質であるエンドセリン－1（ET-1）は、血管緊張の調節に中心的な役割を果たしている一方で、様々な臓器の線維化に関与することが示されている。しかし、皮膚線維化疾患の１つとも言える肥厚性瘢痕やケロイド形成に関する血管内皮細胞及びET-1の役割についてはほとんど不明である。そこで我々は、それらの病態生理学的な役割や関与について、RhoA/Rho-kinase（ROCK）経路を中心に研究を行った。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

まず、瘢痕修正術を受けた患者のうち、同意の得られた方から採取された肥厚性瘢痕とケロイド組織について、ET-1および血管内皮細胞の特異的マーカーであるCD31の免疫組織染色を行った。その結果、正常皮膚や成熟瘢痕と比べて、肥厚性瘢痕やケロイドでは真皮微小血管内皮（CD31陽性）におけるET-1の発現が増強していることが分かった。

次に、ヒト皮膚線維芽細胞（HDF）におけるET-1のRhoA/ROCK経路への影響について検討を行った。最初に、ET受容体（ETA receptor、ETB receptor）がHDFにおいて発現していることを、RT-PCR及びウエスタンブロット法にて確認した。RhoAの活性化は細胞骨格の変化として表れることから、アクチンの免疫細胞染色を行ったところ、HDFにET-1を投与するとアクチン形成が促進し、ET-1と同時にBosentan （ET受容体拮抗薬）を投与すると、アクチン形成は抑制された。また、RhoA活性をPull-down assay法により測定したところ、ET-1投与により活性化RhoAが増加し、ET-1と同時にBosentanを投与するとET-1で増加した活性化RhoAは低下した。これらのことから、HDFではET受容体を介してRhoAの活性化が誘導されることを確認した。

また、ケロイド・肥厚性瘢痕の形成においては、線維芽細胞が筋線維芽細胞へと分化することやコラーゲンなどの細胞外マトリックスを過剰に産生することが特徴的であるので、ET-1によりそのような変化が生じるかについて検討を行った。HDFにET-1を加えると、筋線維芽細胞への分化マーカーであるα-SMAや細胞外マトリックスの代表的物質であるＩ型コラーゲンの遺伝子発現やタンパク発現が増加した。さらに、ET-1と同時にBosentanやY27632（ROCK阻害剤）を加えると、いずれにおいてもET-1により増加した発現は抑制された。さらに、創収縮のin vitroモデルと考えられているコラーゲンゲル収縮アッセイを行ったところ、ET-1の投与によりコントロールと比べて有意にゲルが収縮し、ET-1と同時にBosentanやY27632を投与するとゲル収縮は抑制されていた。これらのことから、ET-1がRhoA/ROCK経路を介して筋線維芽細胞への分化やコラーゲン産生を促進することが示された。

最後に、肥厚性瘢痕やケロイドは肩部や前胸部のような機械的刺激にさらされる部位に生じやすいことから、ヒト皮膚微小血管内皮細胞に周期的伸展刺激を加えた時のET-1遺伝子発現および分泌について検討を行った。その結果、リアルタイムPCRにより遺伝子発現が、ELISA法によりタンパク分泌がそれぞれ有意に増加することが分かった。

〔総　括(Conclusion)〕

機械的刺激は皮膚微小血管内皮細胞からのET-1分泌を促進し、それが皮膚線維芽細胞に作用してRhoA/ROCK経路を活性化することで、筋線維芽細胞への分化ならびにコラーゲン産生を促進することが、肥厚性瘢痕やケロイドなどの異常瘢痕形成の一因になっている可能性が示唆された。

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　木矢　孝一郎

		（職）	氏　　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	細川　亘
	副　査	大阪大学教授	浜田一朗
	副　査	大阪大学教授	高田章好

論文審査の結果の要旨

皮膚損傷後には時として肥厚性瘢痕やケロイドという異常な瘢痕を形成するが、その詳細なメカニズムは未だ解明されていない。本研究は、異常瘢痕形成における血管内皮細胞やそこから分泌されるエンドセリン-1（ET-1）の病態生理学的な役割について調べたものである。免疫組織学的検討により、異常瘢痕組織では真皮微小血管内皮におけるET-1の発現が増強していることが分かった。また、皮膚線維芽細胞にET-1を投与するとRhoAが活性化し、α-SMAやⅠ型コラーゲンの遺伝子・タンパク発現が増加した。さらに、皮膚微小血管内皮細胞に機械的伸展刺激を加えるとET-1の遺伝子発現やタンパク分泌が増加した。これらのことから、機械的刺激により血管内皮細胞から過剰に分泌されたET-1が異常瘢痕形成の一因になっている可能性が示唆され、この経路を阻害することは新たな治療のアプローチとなる可能性があり、学位の授与に値すると考えられる。