



Title	ケロイドにおける炎症制御機構に関する検討
Author(s)	藤田, 宗純
Description	配架番号 : 2404
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13025号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13025
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/72741
Type	doctoral thesis
File Information	Munezumi_Fujita.pdf



学 位 論 文

ケロイドにおける炎症制御機構に関する検討

(Studies on the mechanism for regulating inflammation in keloid)

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

藤 田 宗 純

学 位 論 文

ケロイドにおける炎症制御機構に関する検討

(Studies on the mechanism for regulating inflammation in keloid)

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

藤 田 宗 純

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	3 頁
略語表	6 頁
実験方法	8 頁
実験結果	19 頁
考察	47 頁
総括および結論	53 頁
謝辞	55 頁
引用文献	56 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の学術雑誌に現在投稿中である。

1. Munezumi Fujita, Yuhei Yamamoto, Jing-Jing Jiang, Toru Atsumi, Yuki Tanaka, Naoki Murao, Emi Funayama, Toshihiko Hayashi, Masayuki Osawa, Taku Maeda, Daisuke Kamimura, and Masaaki Murakami

NEDD4 is involved in inflammation development during keloid formation

Nature Medicine (2017 年 11 月 投稿済み)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 藤田宗純、村尾尚規、林 利彦、山本有平

ケロイドにおけるIL-10/IL-6バランスによる炎症制御機構の解明

第25回日本形成外科学会基礎学術集会、2016年9月15日・大阪市北区

2. Munezumi Fujita, Jing-Jing Jiang, Ikuma Nakagawa, Haruka Higuchi, Mitsutoshi Ota, Momoko Okawara, Yuki Tanaka, Shigeto Hiratsuka, Ken Muramatsu, Yasunobu Arima, Toru Atsumi, Daisuke Kamimura, Masaaki Murakami

The inflammation amplifier is associated with chronic inflammation in keloid

第45回日本免疫学会学術集会、2016年12月5日・沖縄県宜野湾市

3. 藤田宗純

ケロイドにおける炎症制御機構に関する研究

第33回北大形成外科アカデミー、2016年12月12日・札幌市中央区

4. 藤田宗純、蔣 菁菁、田中勇希、中川育麿、樋口はるか、太田光俊、大河原桃子、熱海 徹、有馬康伸、上村大輔、山本有平、村上正晃

ケロイドにおける慢性炎症と炎症回路活性化の解析

第2回北大・部局横断シンポジウム、2017年3月14日・札幌市北区

5. 藤田宗純、村上正晃、村尾尚規、林 利彦、山本有平

ケロイドにおける慢性炎症と炎症回路活性化の解析

第26回日本形成外科学会基礎学術集会、2017年10月19日・大阪市北区

緒言

【ケロイドの成因と慢性炎症について】

ケロイドは、炎症後、外傷や手術後、あるいは特別な誘因なく発生し、一定の傾向をもって周囲に浸潤、増大する線維増殖性の慢性炎症性皮膚疾患である¹。創傷治癒過程における炎症期、増殖期の遷延がケロイドの成因と考えられている^{2,4}が、現時点では、ケロイドの病態は未だ不明な点が多い。ケロイドの本態は線維芽細胞の増殖と細胞外基質の過剰な増生であり⁵、I型コラーゲン産生やTransforming growth factor beta (TGF- β)の亢進のみならず、Interleukin (IL)-1 α 、IL-1 β 、IL-6、腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor ; TNF) α といった炎症性サイトカインの産生が恒常的に亢進しているが、炎症期が遷延する機序は解明されていない⁶⁻¹⁰。また、ケロイドは、ヒトの皮膚にのみ発症し、ケロイドの病態を良好に再現した動物モデルの作成には至っていない¹¹⁻¹³。そのため、その発症機序や病態に関して不明な点が多く、決定的な治療法は確立されていない。

ケロイドの現状の治療においては、抗炎症、線維芽細胞の増殖抑制、コラーゲンの生合成のコントロールが主目的となる。保存的治療法としては、圧迫療法、ステロイド局所投与、トラニラスト内服、レーザー治療など、複数の治療法を組み合わせることが一般的である¹⁴。特に、ステロイドは抗炎症作用や抗アレルギー作用を主として用いられる^{15,16}。外科的切除による再発率は高く、切除後に電子線照射あるいはステロイド局所注射を必要とする。このように、しばしば治療抵抗性を認めるため、患者は長期的に治療を要することも多々あり、生活の質を著しく低下させる。

【炎症回路および炎症回路関連遺伝子について】

局所における慢性炎症の病態を誘導する分子機構として、IL-6を中心として形成されるケモカインの過剰産生機構；『炎症回路』がこれまでに見出されている¹⁷。本機構は、IL-6や免疫細胞を引き寄せるケモカインの産生を増幅する炎症誘導機構である。すなわち、免疫系のT細胞から産生されたIL-17あるいはTNF α が非免疫系の角化細胞・線維芽細胞や血管内皮細胞のIL-6産生を誘導し、そのIL-6がIL-17あるいはTNF α と共に非免疫系細胞に働いて相乗的にIL-6やケモカインの産生を亢進する現象である。角化細胞・線維芽細胞・血管内皮細胞などで、NF- κ B (Nuclear factor-kappa B kinase) 経路とSTAT3 (Signal transducers and activator of transcription 3) 経路の二つの転写因子が同時に活性化すると、NF- κ Bが過剰に活性化され、炎症性サイトカイン・ケモカインや増殖因子を含む炎症回路の標的遺伝子群が局所で大量に発現し、免疫細胞浸潤により恒常性が破綻し、慢性炎症を引き起こす病態が明らかにされた¹⁸。さらに、ゲノムワイド解析 (Genome-wide association study ; GWAS)にて炎症回路を正に制御する1200

以上の遺伝子群がすでに同定されており、これらの遺伝子の中には、実際に多くのヒト慢性炎症性疾患の関連遺伝子が含まれることが証明されている¹⁹。慢性炎症性疾患と考えられるケロイドと炎症回路との関連についてはこれまで研究されたことはなかった。

【ケロイド体質とケロイド関連遺伝子について】

ケロイドの発症には人種差があり、黒色人種が最も多く、次いで黄色人種に多く、白色人種に発症することは稀である^{20,21}。臨床現場において、日本人においても、特別な誘因なくケロイドを発症し、多発性、家族性に生じるケロイド患者に遭遇することがあり、「ケロイド体質」という用語が長く使用され広く知られている²²が、ケロイド体質を説明できる詳細な機序は未だ不明である。ケロイドではこうした遺伝的要因が一因として考えられていた²³が、それを示唆する根拠として、理化学研究所グループによって日本人のケロイド患者におけるゲノムワイド解析 (GWAS)が行われ、2010 年に結果が報告された。すなわち、「オーダーメイド医療実現化プロジェクト」のバイオバンク・ジャパンに登録されている日本人のケロイド患者 824 例と一般集団 3,205 例のサンプルを用いて GWAS を行い、4 つの一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism; SNPs) ; rs873549 (1 番染色体), rs1511412 (3 番染色体), rs940187 (3 番染色体), rs8032158 (15 番染色体) がケロイドの発症と関連することが報告された²⁴。3 番染色体上の rs1511412 は FOXL2 (Forkhead box L2) と LOC389151 との遺伝子間に存在し、15 番染色体上の rs8032158 は NEDD4 (Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4) のイントロン部分に存在する。rs873549 (1 番染色体) と rs940187 (3 番染色体) はコードする遺伝子が存在しない。SNPs のリスク多型を持つ場合、rs1511412 で 1.87 倍、rs8032158 で 1.51 倍、rs873549 と rs940187 でそれぞれ 1.77 倍および 1.98 倍ケロイド発症のリスクが高くなっていることが明らかにされた。4 つの SNPs のうち、rs8032158 が存在する NEDD4 と、rs1511412 の近位に存在する FOXL2 がケロイド関連遺伝子として注目された。さらに、日本人のケロイド患者 204 例で行われた追試にて、NEDD4 上に存在する rs8032158 がケロイドの重症度のバイオマーカーとして重要性を示すと報告されている²⁵。また、中国人 (漢民族) やアフリカ系アメリカ人においても、NEDD4 上の 15 番染色体上の特定領域がケロイドの発症に関与していることが報告されている^{26,27}が、現在のところ NEDD4 とケロイド発症との関連や「ケロイド体質」への関与については明らかにされていない。

【本研究の目的】

本研究では、既報において日本人における GWAS にて報告されている一塩基多型 (rs8032158 SNP) を含む、ケロイド関連遺伝子・NEDD4 が、炎症回路の正の制御遺伝

子である可能性について、さらにはケロイド内で炎症回路の活性化を引き起こし、ケロイドの慢性炎症および病態形成、「ケロイド体質」に関与している可能性について説明することを目的とした。すなわち、ケロイドの炎症病態形成において炎症回路が重要な役割を担っているという仮説のもと、ケロイド関連遺伝子である NEDD4 がどのようにケロイドの炎症病態を制御するかを rs8032158 SNP の関与を含めて明らかにすることを本研究目的とした。

【本研究の結論】

本研究では、NEDD4 のリスク多型 SNP を有するケロイドサンプルでは、リスク多型 SNP の無い正常皮膚サンプルと比較して、炎症回路の活性化がより強く見られること、NEDD4 スプライスバリエント 3 の発現がより高くなっていることが明らかとなった。さらには NEDD4 スプライスバリエント 3 によって、NF- κ B が活性化することを明らかにできた。以上のことから、ケロイド関連遺伝子 NEDD4 のリスク多型 SNP を有すると、NEDD4 スプライスバリエント 3 の発現が高くなり、NF- κ B が活性化されることで局所における炎症回路の活性化につながり、ケロイドの慢性炎症の遷延および「ケロイド体質」の一因となることが示唆された。すなわち、NEDD4 のリスク多型 SNP により発現の高くなった NEDD4 スプライスバリエント 3 によって、創傷治癒過程において局所的な慢性炎症の遷延が引き起こされ、ケロイド発症に至る起因となることが示された。NEDD4 の SNP がスプライスバリエントに与える影響およびスプライスバリエントの機能を詳細に解析することにより、今後のケロイド研究において、ケロイドの診断マーカーとしての有用性や、治療における外科的治療の可否や将来における治療標的となる可能性が示唆された。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ANOVA	Analysis of variance
CCL	CC chemokine ligand
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
FBS	Fetal bovine serum
FOXL2	Forkhead box L2
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GWAS	Genome-wide association study
HE	Hematoxylin and eosin
HECT	Homologous to E6-AP COOH terminus
HRP	Horseradish peroxidase
I κ B	Inhibitor of κ B
IKK	I κ B kinase
IL	Interleukin
IB	Immunoblot
IP	Immunoprecipitation
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NEDD4	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B kinase
NS	Not significant
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate buffered saline
PEI	Polyethyleneimine
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RING	Really interesting new gene
RIP	Receptor-interacting protein
RNA	Ribonucleic acid
RT	Reverse transcription
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SEM	Standard error of the mean

SD	Standard deviation
SDS	Sodium dodecyl sulfate
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
SNP	Single nucleotide polymorphism
STAT3	Signal transducers and activator of transcription 3
SV	Splice variant
TGF- β	Transforming growth factor beta
TNF α	Tumor necrosis factor α
Ub	Ubiquitin

実験方法

1. 組織の採取、病理標本作製、表皮角化細胞、線維芽細胞の培養

臨床検体の採取、取扱いについて北海道大学医学部医の倫理委員会に申請し承認を得た(承認番号：医 15-004、医 16-058)。同委員会の規定に沿って研究を実施した。本研究に用いた検体の患者情報を表 1 に示す。

表 1. 本研究に用いた検体の患者情報

Sample No.	年齢	性別	部位
ケロイド			
K1	57	F	右耳垂
K2	27	F	右耳輪
K3	62	M	前胸部
K4	33	M	右肩部
K5	26	F	右耳輪
K6	25	F	左耳輪
K7	29	F	右耳輪
K8	25	M	左耳輪
K9	66	M	左腋窩
K10	62	M	前胸部
K11	73	M	左背部
K12	20	M	左耳垂
K13	28	M	左後頸部
K14	53	F	右耳垂
K15	64	F	下腹部
K16	32	F	右耳輪
K17	27	F	左耳輪
K18	67	M	前胸部
K19	26	F	左耳輪
K20	63	M	左背部
正常皮膚			
C1	1	M	右崠径
C2	45	F	腹部
C3	45	M	左肩甲下部
C4	63	F	左下腹部
C5	33	F	右肩
C6	26	F	上腹部
C7	12	M	左耳後部
C8	56	M	右頬部
C9	54	F	腹部
C10	50	F	腹部

ケロイド患者 20 例／非ケロイド患者 10 例より手術時にそれぞれケロイド組織／正常皮膚組織を採取した。組織の 4%パラホルムアルデヒド固定、凍結保存の他、表皮角化細胞および線維芽細胞の初代培養を行った。実験には、2 継代までの表皮角化細胞、3 継代までの線維芽細胞を使用した。また、同様に非ケロイド患者から組織を採取し、表皮角化細胞、線維芽細胞の培養や組織の保存を行った。

表皮角化細胞の初代培養は以下の方法で行った。採取した皮膚組織を 80%エタノール、ペニシリン、ストレプトマイシン (Pen Strep, Gibco)、phosphate buffered saline (PBS) で洗浄した後、真皮成分を可及的に除去し、表皮側の組織片を 5×10 mm 大程度に細分化した。細分化した組織をデイスパーゼ I (和光純薬工業)溶液に入れて 4℃で一晩インキュベートした。組織片から表皮を基底膜層下で剥がし、残存した真皮成分を分離除去した後、0.25%トリプシン (和光純薬工業)に入れて 37℃で 10 分間インキュベートした。トリプシン活性を止めた後、40 μm のメッシュに通し、1000 rpm で 10 分遠心後、KGM-Gold (Clonetics, Lonza)で構成した培養液を入れた 100 mm dish に細胞を播種した。以降、表皮角化細胞が 80%コンフルエント程度に達した時点で継代した。細胞はインキュベーター内で 37℃、5%CO₂ の環境で培養した。

線維芽細胞の初代培養は以下の explant 法にて行った²⁸。組織を 80%エタノール、ペニシリン、ストレプトマイシン (Pen Strep, Gibco)、PBS で洗浄した後、組織を 3×3 mm 大程度に細分化した。表皮成分を鋭的に除去した後、10%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum ; FBS) (Thermo Scientific) + Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM ; Life Technologies) + ペニシリン、ストレプトマイシンで構成した培養液を入れた 100 mm dish に組織を静置した。初代培養開始後 1 週間はペニシリン、ストレプトマイシンの濃度はそれぞれ 1000 IU/ml、1000 μg/ml とし、1 週間以降は 100 IU/ml、100 μg/ml とした。培養開始後 2 週間で組織を破棄し、線維芽細胞を 0.05%トリプシン (Gibco)で剥がし、新しいプレートに移した。以降、線維芽細胞が 80%コンフルエント程度に達した時点で継代した。細胞はインキュベーター内で 37℃、5%CO₂ の環境で培養した。

2. NEDD4 の rs8032158 SNP genotyping シークエンス

実施に際して、北海道大学医学部医の倫理委員会に申請し承認を得た上で行った(承認番号：医 15-004、医 16-058)。すべての患者検体は、1.組織の採取、病理標本作製、表皮角化細胞、線維芽細胞の培養と同様、同意の得られたケロイド患者／非ケロイド患者より手術時に採取したケロイド組織／正常皮膚組織を使用した。

摘出された皮膚組織の一部を分割切除し、速やかに PAXgene[®] Tissue Container (QIAGEN) の中に投入して一晩、4℃で反応させた。その後皮膚組織を取り出し PAXgene Tissue Stabilizer (QIAGEN)の中に投入し使用するまで-20℃で保存した。

Stabilizer の中に保存された組織の一部 (10 mg 相当量)を、AllPrep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて RNA (Ribonucleic acid)、ゲノム DNA (Deoxyribonucleic acid)として抽出した。

抽出されたゲノム DNA に対して、NEDD4 遺伝子内のイントロン領域に存在する rs8032158 SNP の有無を確認する目的で PCR (polymerase chain reaction)ダイレクトシーケンスを施行した。使用したプライマーの配列は表 2 に示す。PCR の増幅条件は、98°C/10 秒間の熱変性、60°C/30 秒間のアニーリング、72°C/30 秒間の cDNA (Complementary deoxyribonucleic acid)複製反応を 35 回繰り返した(RT-PCR ; Reverse transcriptase-PCR)。

表 2. SNP genotyping シークエンスに用いたプライマーの配列

SNP	Primer sequence (5' to 3')		amplicon size (bp)
rs8032158	Forward	CGACTGCATGGTGGCTTTAT	499
	Reverse	TCCTGACTAGCGGCGATTAC	

ゲノム DNA 20 ng に対して、Taq DNA Polymerase (Sigma Aldrich) を用いて RT-PCR を行い SNP 前後 499 bp の塩基長を増幅させた後、PCR 産物を Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて精製した。精製した PCR 産物 10 ng に対して BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンス PCR を行った。シーケンス PCR の増幅条件は、96°C/10 秒間の熱変性、50°C/5 秒間のアニーリング、60°C/4 分間の cDNA 複製反応を 25 回繰り返した。PCR 産物はエタノール沈殿にて精製後、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にてシーケンス解析を行った。

3. 細胞株及びマウス

本研究で用いたヒト表皮角化細胞株 HaCaT cell^{29,30}、ヒト神経膠腫細胞株 H4 cell はそれぞれ ScienCell Research Laboratories、ATCC® (住商ファーマインターナショナル) より購入した。いずれの細胞も DMEM (Life Technologies) に 10%FBS (Thermo Scientific)を添加したものをを用いて、37°Cかつ 5%CO₂ の条件下において継代、培養した。

関節炎モデルマウスは、ヒト gp130 の 759 番目のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異型 gp130 (F759)を全身で発現する F759 マウス (gp130^{F759/F759} ノックインマウス)を使用した³¹。マウスは、北海道大学遺伝子病制御研究所において室温管理

された specific-pathogen-free ルームで飼育した。動物の取り扱いについては「北海道大学動物実験に関する規程」に則り、北海道大学の動物実験倫理審査の承認を受けて行った。実験には 6-8 週齢のマウスを用いた。

4. 免疫組織化学染色、Hematoxylin and eosin (HE)染色

4%パラホルムアルデヒド固定、パラフィン包埋した組織より 4 μ m の切片を作成した。Hematoxiline and eosin (HE)染色の他、以下の方法で免疫組織学的染色（高分子ポリマー法）を行った。脱パラフィン化、抗原の賦活化、ブロッキングは VECTASTAIN ABC KIT (Vector Laboratories)を用いた標準プロトコールで行った。一次抗体には抗リン酸化 STAT3 抗体、抗リン酸化 p65 抗体、抗 NEDD4-all variant 抗体：全バリエント識別、抗 NEDD4-splice variant 3 抗体（コスモバイオ）：NEDD4 スプライスバリエント 3 エクソン 1 識別（アミノ酸 431-455；CQININGELERPHSQMNKNHGILRR）を使用し、二次抗体にはビオチン標識抗ウサギ IgG モノクローナル抗体を使用した。発色基質としては DAB (ImmPACT™ DAB Peroxidase Substrate Kit、Vector Laboratories) を用いた。使用した抗体、ならびに希釈倍率は表 3 の通りである。

表 3. 免疫組織化学染色に使用した抗体一覧

抗体	メーカー	型番	由来	希釈倍率
Phospho-Stat3 (Tyr705) (D3A7)	Cell Signaling	#9145	Rabbit monoclonal	1/200
Phospho-NF-kappaB p65 (pSer276)	Cell Signaling	#3037	Rabbit polyclonal	1/500
NEDD4-all variant	Sigma Aldrich	HPA039883	Rabbit polyclonal	1/1,000
NEDD4-splice variant 3	Cosmo Bio Co.		Rabbit polyclonal	1/4,000
Rabbit (DA1E) mAb IgG Isotype Control	Cell Signaling	#3900		1/200

5. 抗体及び試薬

以下に示す抗体は Western Blotting、免疫沈降法 (Immunoprecipitation ; IP)に用いた。抗 p65 抗体 (C-20、Santa Cruz)、抗リン酸化 p65 (Ser536) 抗体 (93H1、Cell Signaling Technology)、抗 RIP 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 α -tubulin 抗体 (Sigma-Aldrich)、抗 HA 抗体 (Sigma-Aldrich)、HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Southern Biotech)、HRP 標識抗ラビット IgG 抗体 (Southern Biotech)

使用した抗体、ならびに希釈倍率は表 4 の通りである。

表 4. Western Blotting、IP に使用した抗体一覧

抗体	メーカー	型番	由来	希釈倍率
p-65 (C-20)	Santa Cruz	sc-372	Rabbit polyclonal	1/3,000
P-p-65 (S536) 93H1	Cell Signaling	#3033	Rabbit monoclonal	1/3,000
RIP (D94C12)	Cell Signaling	#3493	Rabbit monoclonal	1/1,000
α -Tubulin Clone B-5-1-2	Sigma Aldrich	T5168	Mouse monoclonal	1/2,000
HA HRP, Clone HA-7 039K4751	Sigma Aldrich	H6533	Mouse monoclonal	1/4,000
Goat Anti-Mouse IgG (H+L) HRP	Southern Biotech	1036-05		1/5,000
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP	Southern Biotech	4050-05		1/10,000

6. quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

表皮角化細胞 (ケロイド由来および正常皮膚由来) と線維芽細胞 (ケロイド由来および正常皮膚由来) を 12 well plate に 1×10^5 cells/well で播種した。播種後 24 時間培養後に 2 時間の血清飢餓処理の後、ヒト IL-6 (Toray Industries) 100 ng/mL、可溶性 IL-6 受容体 (R&D Systems) 100 ng/mL、ヒト IL-17 (R&D Systems) 100 ng/mL あるいは TNF α (PeproTech) 50 ng/mL で 1 時間および 3 時間刺激した後に messenger ribonucleic acid (mRNA) を抽出した。Small interfering RNA (siRNA) によるノックダウン細胞においては、後述する方法により siRNA による遺伝子ノックダウンを行った後、同様にヒト IL-6、可溶性 IL-6 受容体、及びヒト IL-17 あるいは TNF α を添加し 3 時間インキュベートした後に mRNA を抽出した。表皮角化細胞および線維芽細胞からの RNA 抽出は ISOSPIN[®] Cell & Tissue RNA Kit (NIPPON GENE) を用いてスピнкаラム法による標準プロトコールで行った。siRNA 法での HaCaT 細胞または H4 細胞 (96 well plate) からの RNA 抽出は SuperPrep[®] Cell Lysis & RT Kit for qPCR (東洋紡ライフサイエンス) を用いて標準プロトコールによって行った。皮膚全層組織からの RNA 抽出は AllPrep[®] DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて標準プロトコールによって行った。cDNA の合成は M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) を用いて標準プロトコール (42°C 60 分, 95°C 5 分, 4°C ∞) で行った。標的遺伝子の mRNA、及び内在性コントロールとして、ヒト由来細胞では glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。測定するにあたり、7300 fast real-time PCR システム (Applied Biosystems) と SYBR Green PCR master mix (Kapa Biosystems) を使用し、初期熱変性 94°C・10 分、熱変性 94°C・15 秒、アニーリング／伸長反応 60°C・60 秒×40 サイクルのプロトコールでリアルタイム PCR を行った。qPCR で用いたプライマーの配列は表 5 の通りである。

表 5. qPCR で用いたプライマーの配列一覧

Gene	Primer sequence (5' to 3')	
human GAPDH	Forward	GAGTCAACGGATTTGGTCGT
	Reverse	CGCTCCTGGAAGATGGTG
human IL-6	Forward	GGTACATCCTCGACGGCATCT
	Reverse	GTGCCTCTTTGCTGCTTTTAC
human CCL2	Forward	CAGCCAGATGCAATCAATGCC
	Reverse	TGGAATCCTGAACCCACTTCT
human CCL20	Forward	GCGACCAAGAGGCC
	Reverse	CGCACACAGACAACC
human NEDD4 all variants	Forward	ATGGCAAAGTGTGGATGGT
	Reverse	GGTCCAATTCTGTTGGGTCA

7. 関節炎誘導モデルと関節炎のスコア評価

F759 マウスを用いた関節炎モデルを既報のとおりに行った¹⁸。NEDD4 全バリエーションに特異的な short hairpin RNA ; shRNA (NEDD4 sh-1-RNA: TRCN0000092433; NEDD4 sh-2-RNA: TRCN0000092435、Sigma Aldrich)あるいはコントロールとして scrambled sequence (nontarget sh-RNA: SIGMA mission SHC002V、Sigma-Aldrich)を搭載した shRNA (3.6×10⁵ TU/dose) を Polybrene (40 ug/dose) と共に 6-8 週齢の F759 マウスの後肢踵関節腔に 1 日間隔で 3 回注入した。関節炎の誘導には、マウス IL-6 (100 ng/dose) 及び IL-17 (100 ng/dose) を 3 日間連続で注射した(図 1)。関節炎の重症度は踵関節の可動性を指標として、0 点(正常)、1 点(わずかな可動制限)、2 点(軽度の可動制限)、3 点(中程度の可動制限)、及び 4 点(重度の可動制限)として点数化した。

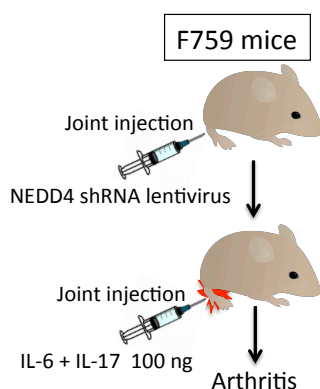


図 1. 関節炎モデルの作製方法

8. ヒト NEDD4 に対する human small interfering RNA (siRNA) を用いた遺伝子ノックダウン

ヒト表皮角化細胞株 HaCaT cell あるいはヒト神経膠腫細胞株 H4 cell を 96 well plate に 7×10^3 cells/well で播種し、siRNA (5 μ M) 0.5 μ l を Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)によりトランスフェクションした。37°C 5%CO₂ 下で二昼夜インキュベートした細胞を回収し、qPCR に用いた。

使用した siRNA ; human si-NEDD4 for all variants (1. s9415:

GAUCACCUCUCUUACUUCAt, 2. s9516: GGAAGAUCCAAGAUUGAAAt, 3. s9417: GGCGAUUUGUAAACCGAAUtt, Ambion Silencer Select siRNA, Thermo Fisher Scientific)、human si-nontarget (Ambion Negative Control #1 siRNA, Thermo Fisher Scientific)、human si-NEDD4 splice variant 3 特異的 (Sense: GCAAGACAAGAGAUGAUUUtt, Ambion Silencer Select siRNA, Thermo Fisher Scientific)

9. Western Blotting

Western Blotting に用いる細胞は、H4 細胞は 12 well plate または 24 well plate に播種、培養し、HEK293T 細胞は 100 mm dish に播種、培養した。必要に応じて刺激試薬 (TNF α 50 ng/mL)を添加した後、細胞を氷上に置き、培養液を吸引除去し氷冷した PBS で洗浄し、1 ml の PBS とセルスクレーパー (住友ベークライト)を用いて細胞を回収した。4°Cで5分間 1500 rpm、4°Cで5分間 3500 rpm の遠心により上清を除去し、細胞ペレットを適切な細胞融解バッファーで処理した。全細胞成分分画の抽出には高塩濃度の細胞融解バッファー (NaCl 600 mM) を用いて細胞を融解し、十分に vortex を行った後、4°Cで30分間緩徐に転倒混和して攪拌し、高速 (15000 rpm)で30分間遠心し、細胞残渣を除いた上清を全細胞成分分画として回収した。すべての工程において、細胞融解バッファーには 1/100 量の protease inhibitor (Sigma Aldrich)を添加した。得られたサンプルは全て 2-メルカプトエタノールを含む SDS sample buffer で 95°C5分間煮沸させた後、5-12%濃度勾配の SDS-PAGE ゲル (和光純薬工業)で Bio-Rad のウェットウエスタンブロットシステムを用いてポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)を行った。Immobilon[®]-P (Millipore)に SDS-PAGE により分離したゲルタンパク質を転写した。内部コントロールとして、全細胞分画として α -tubulin を用いた。二次抗体には horseradish peroxidase (HRP)標識抗体を用い、Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher)によって化学発光したものを、現像機 FPM100 (富士メディカルフィルム)でフィルムに感光し検出した。

10. Luciferase Reporter Assay

レポーター活性の測定は、Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて標準プロトコールに従って行った。96 well plate に 2×10^4 cells/well で播種した HEK293T 細胞を一昼夜培養した後、コントロールとして empty vector である pEF-BOS と、NEDD4 スプライスバリエーション 3 を 100 ng/well で導入、加えて pGL4.32[luc2P/ NF- κ B -RE/Hygro] (4.5 ng/well、Promega)、pGL4.32[luc2P/ IL-6 -RE/Hygro] (4.5 ng/well、Promega) 及び pGL4.74[hRluc/TK] (0.5 ng/well、Promega) を導入した。細胞への遺伝子導入はリン酸カルシウム法を用いた。24 時間培養後に培養液を除去し、刺激試薬 (TNF α 50 ng/mL) を添加した培養液で 5 時間インキュベートした。PBS で細胞を洗浄し、Passive lysis buffer (50 μ L/well) を加えて室温下で 20 分間穏やかに振盪して細胞を融解した。その後、その細胞溶解液 5 μ L と発光基質 25 μ L を混合し、ホタルルシフェラーゼ活性をルミノメータ (GloMax[®]-Multi Detection System、Promega) で測定した。なお、遺伝子導入の際に同時に導入した pGL4.32 由来のウミシイタケルシフェラーゼ活性を内部コントロールとして細胞間の導入効率を補正し、算出した比を NF- κ B luciferase 活性とした。

11. 免疫沈降法 (Immunoprecipitation Assay : IP)

IP に用いる細胞は、H4 細胞は 12 well plate に播種、培養し、HEK293T 細胞は 100 mm dish に播種、培養した。バッファーで溶解されたサンプルはプロテイン G セファローズビーズ (Pharmacia) をサンプル 1 mg タンパク質相当量に対して 10 μ g を添加し 4°C 下で 1 時間緩徐に転倒混和しプレクリアを行った。その後、9000 rpm、3 分間 4°C で遠心した後に上清を回収し、目的に応じて HA ビーズ (Sigma Aldrich) を加えて 2 時間 4°C 下で緩徐に転倒混和した。サンプルを細胞溶解バッファーで 5 回洗浄した後に、免疫沈降された HA 融合タンパクは 2-メルカプトエタノールを含む SDS sample buffer で 95°C 5 分間煮沸させ、15000 rpm、3 分間 4°C で遠心した後に上清を回収したものを Western Blotting に用いた。

12. human NEDD4 の splice variant (SV) 発現の解析

患者サンプルは、患者検体より得られた組織から初代培養を行った表皮角化細胞を使用した。RNA 抽出は 5. qPCR で示した方法と同様に、ISOSPIN[®] Cell & Tissue RNA Kit (NIPPON GENE) を用いてスピンカラム法による標準プロトコールで行った。cDNA の合成は M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) を用いて標準プロトコール (42°C 60 分, 95°C 5 分, 4°C ∞) で行った。

電気泳動による各 splice variant (SV)の発現確認は、以下の通りに行った。

合成された cDNA を用いた PCR 増幅産物のサイズの確認を行う目的で、各 SV を識別するプライマーセットを作製した。PCR の増幅条件は、98°C/10 秒間の熱変性、60°C/30 秒間のアニーリング、72°C/30 秒間の cDNA 複製反応を 30 回繰り返した (RT-PCR)。RT-PCR で用いたプライマーセットと各 SV のサイズは表 6 の通りである。

PCR 反応液 10 µl を 2%アガロースゲル (アガロース, A9539、Sigma-Aldrich)にアプライし、トリス-酢酸-EDTA 緩衝液にて室温下で 30 分間電気泳動を行った。DNA サイズマーカーとして、100 bp DNA Ladder (タカラバイオ)を同時に泳動した。泳動後のゲルを透過式 UV 照射装置 (WUV-M20 型、アトー)で撮影した。

表 6. 電気泳動で用いたプライマーの配列一覧

Target Gene	Primer sequence (5' to 3')	
NEDD4 SV 2, 3, 4, 5	Forward	GAAGTATTTTCATTGGGAGGAGC
	Reverse	TATCCTGCCTCTCTTCCCACC
NEDD4 SV 1, 7	Forward	ATAGGCCTTGCCAAGAAGGATA
	Reverse	GTGCTGCTGAGGATGAACTCTG
human GAPDH	Forward	GAGTCAACGGATTTGGTCGT
	Reverse	CGCTCCTGGAAGATGGTG

各 Amplicon size (bp)

NEDD4 SV2=285, NEDD4 SV3=501, NEDD4 SV4=453, NEDD4 SV5=450,
NEDD4 SV1=171, NEDD4 SV7=196,
GAPDH=220

さらに、NEDD4 の各 splice variant (SV 1、2、3、4、5、7) を特異的に認識するプライマーを用いて real time TaqMan qPCR を行い、NEDD4 のそれぞれの splice variant (SV) の発現を検量線法により算出した。測定するにあたり、7300 fast real-time PCR システム (Applied Biosystems)と KAPA PROBE FAST qPCR master mix (Kapa Biosystems)を使用し、初期熱変性 94°C・3 分、熱変性 94°C・3 秒-アニーリング/伸長反応 60°C・30 秒×40 サイクルのプロトコールでリアルタイム PCR を行った。qPCR で用いたプライマーの配列は表 7 の通りである。

表 7. TaqMAN qPCR で用いたプライマーの配列一覧

Gene	Primer sequence (5' to 3')	
NM_7007.6 (GAPDH)	Probe	GATGCCAGCCCCAGCGTCAAAGGT
	Forward	CTCCTCTGACTTCAACAGCGA
	Reverse	CCAAATTCGTTGTCATACCAGGA
NM_006154 (NEDD4 SV1)	Probe	CGTCACTCTCACGTAAGGATCACTAGCTCC
	Forward	ATAGGCCTTGCCAAGAAGGATA
	Reverse	ACTTTGGATTCAAACCTCTTTTAAATGG
NM_198400 (NEDD4 SV2)	Probe	GTCTAATTCTTGCAAGCCTGGCTGGGTTGT
	Forward	GCATCTGGAAATGAAGGTAAAGTGG
	Reverse	TGGCAAGCAGCATCTGGTTG
NM_001284338 (NEDD4 SV3)	Probe	ATCCATTACCGACAGAAAATCCAAGATTGGAGAGA
	Forward	GGATAATTTATCAAGAGACAGCAACA
	Reverse	CAAAACAACCCAGCCAGGCT
NM_001284339 (NEDD4 SV4)	Probe	ATATCCTGCCTCTCTTCCCACCCTGGAG
	Forward	TGAGGAATTAGAGCAACAACAAGAA
	Reverse	CATGGTTTACATAATAGGTCCTTCCA
NM_001284340 (NEDD4 SV5)	Probe	ACAGCAACAGAGATTGCACAAATGAACTGT
	Forward	TCTGGAAATGAAGGTAAAGTGGATAA
	Reverse	CTCCAATCTTGGATTTTCTGTCTTG
NM_001329212 (NEDD4 SV7)	Probe	CGTCACTCTCACGTAAGGATCACTAGCTCC
	Forward	ATAGGCCTTGCCAAGAAGGATA
	Reverse	AGTATAACTTTTTAATGGTTTTTGTTC

13. 統計学的解析

実験データは平均値±標準偏差 (Mean±SD) あるいは平均値±標準誤差 (Mean±SEM)で示した。本研究では、2群間の有意差検定に Student's *t* 検定、3群間の有意差検定に ANOVA (Analysis of variance)を用いた。*p* 値は 0.05 未満のものを有意とし、**p* < 0.05、***p* < 0.01、及び****p* < 0.001 で示した。

実験結果

1. 患者検体における NEDD4 の rs8032158 SNP genotypes の結果

1-1 ケロイド患者では、非ケロイド患者と比較してリスク多型（C）を有する割合が高かった。

rs8032158 SNP は NEDD4 のイントロン部分に存在し、T/C (リスク多型 C) の一塩基多型に対して、ケロイド患者では、リスク多型 (C) を有する割合が、非ケロイド患者と比較して 1.51 倍高いことが既報において示された²⁴。本研究において、ケロイド患者及び非ケロイド患者の皮膚組織から抽出した核酸を用いて、15 番染色体上の rs8032158 SNP のリスク多型の有無を確認した。ケロイド患者 20 例／非ケロイド患者 10 例で実施した結果を表 2 に示す。

表 2. 本研究に用いた検体の rs8032158 SNP genotypes

Sample No.	年齢	rs8032158 Genotype
ケロイド		
K1	57	C/C
K2	27	C/C
K3	62	C/C
K4	33	C/C
K5	26	T/C
K6	25	C/C
K7	29	C/C
K8	25	C/C
K9	66	C/C
K10	62	C/C
K11	73	T/C
K12	20	T/C
K13	28	C/C
K14	53	C/C
K15	64	C/C
K16	32	C/C
K17	27	T/T
K18	67	C/C
K19	26	C/C
K20	63	T/T
正常皮膚		
C1	1	T/T
C2	45	T/T
C3	45	T/T
C4	63	T/C
C5	33	T/T
C6	26	T/C
C7	12	T/C
C8	56	T/C
C9	54	T/T
C10	50	T/T

ケロイド患者及び非ケロイド患者のDNAシーケンスにより、それぞれの genotype (T/T、C/T、C/C)を確認した(図 2)。ケロイド患者では、リスク多型 (C)を有する割合が非ケロイド患者と比較して顕著に高いことが明らかとなった(図 3)。

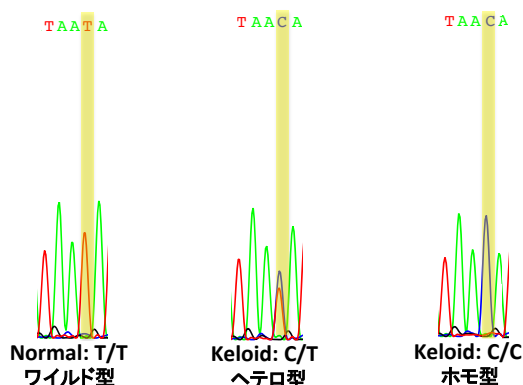


図 2. 患者検体の DNA シーケンスにおける rs8032158 SNP genotypes
リスク多型の無い非ケロイド患者のワイルド型 (T/T)と、リスク多型を有するケロイド患者のヘテロ型 (C/T)、ホモ型 (C/C)の DNA シーケンス結果を示す。

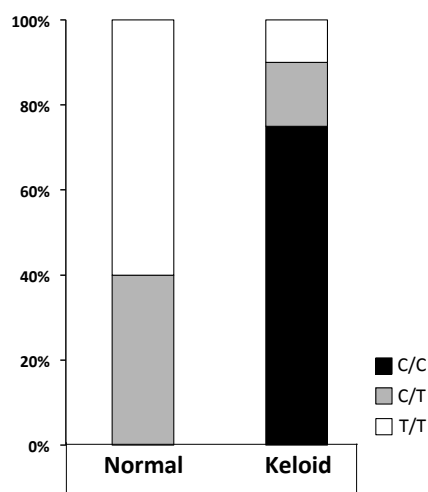


図 3. 患者検体（正常皮膚 n=10、ケロイド組織 n=20）における
rs8032158 SNP の頻度

ケロイド患者では、リスク多型 (C)を有する割合が非ケロイド患者と比較して顕著に高かった。

2. ケロイドにおける炎症回路の活性化の確認

2-1 ケロイド皮膚組織においてリン酸化 p65 およびリン酸化 STAT3 が高発現する

炎症回路とは、非免疫系の I 型コラーゲン陽性細胞での『局所炎症の誘導機構』で、

分子的には NF- κ B と STAT3 の同時活性化、機能的にはケモカインの過剰発現機構である^{17,18}。すなわち、NF- κ B と STAT3 が同時に活性化する、線維芽細胞、表皮角化細胞、血管内皮細胞などの I 型コラーゲン陽性の非免疫系細胞が存在するかを確認する必要がある^{32,33}。

そこで、ケロイド多発病変を有し、臨床上ケロイド体質と考えられるケロイド患者のケロイド病変部組織(図 4)において、NF- κ B と STAT3 の発現を手術による切除後に処理を行った皮膚組織の免疫組織学的染色で確認した。結果、ケロイドにおいて STAT3 と NF- κ B の同時活性化が見られる非免疫細胞は、表皮角化細胞および、線維芽細胞であると考えられた(図 5)。

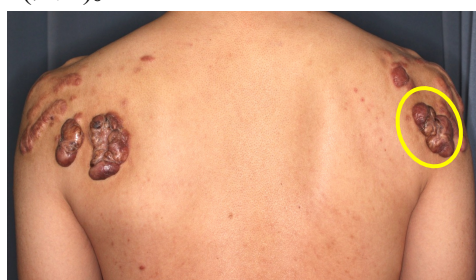


図 4. 患者検体 (K4)の臨床写真とケロイド採取部

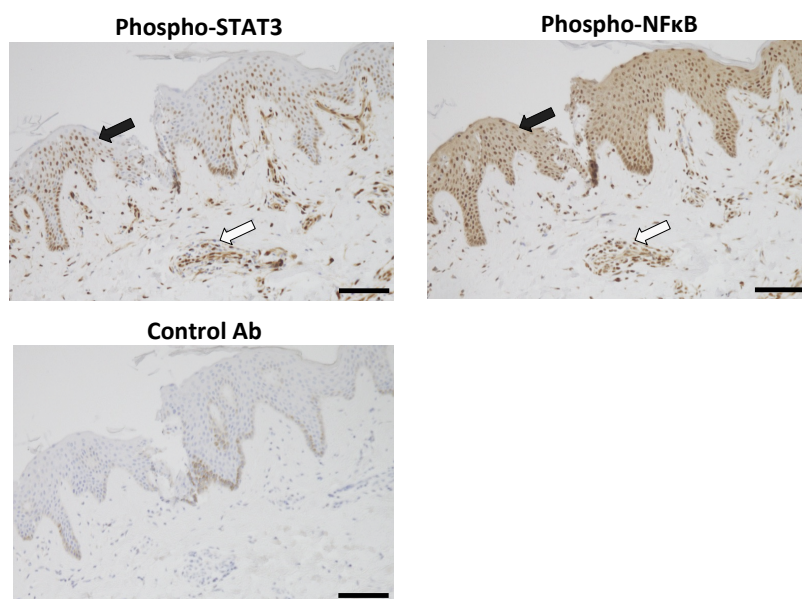


図 5. ケロイド組織 (K4)の免疫組織化学染色 (Scale bars=100 μ m)

リン酸化 STAT3 (Phospho-STAT3)、リン酸化 NF- κ B (Phospho-NF κ B)を免疫組織化学染色により検出した。表皮角化細胞 (黒矢印)、線維芽細胞 (白矢印) で、リン酸化 STAT3、リン酸化 NF- κ B がいずれも核内で染色される細胞が見られ、特に表皮角化細胞で多く見られた。

そこで、リスク多型 SNP のみ有するケロイド患者 (C/C) のケロイド病変部組織および、対照としてリスク多型 SNP の無い非ケロイド患者 (T/T) の正常皮膚組織において、HE 染色で確認後、NF- κ B と STAT3 の発現を免疫組織学的染色で検証した(図 6.(a), (b))。

結果、ケロイド患者 (C/C) 由来のケロイド組織内では、NF- κ B と STAT3 の両者がリン酸化した細胞が表皮角化細胞に多く見られた。数は少ないが、線維芽細胞においても、両者が染色される細胞が見られた。ケロイドで多くの陽性細胞が見られた表皮角化細胞において、非ケロイド患者由来 (T/T) の正常皮膚組織と比較すると、NF- κ B と STAT3 のリン酸化した細胞の割合がケロイド組織で有意に高いことが示された(図 7)。

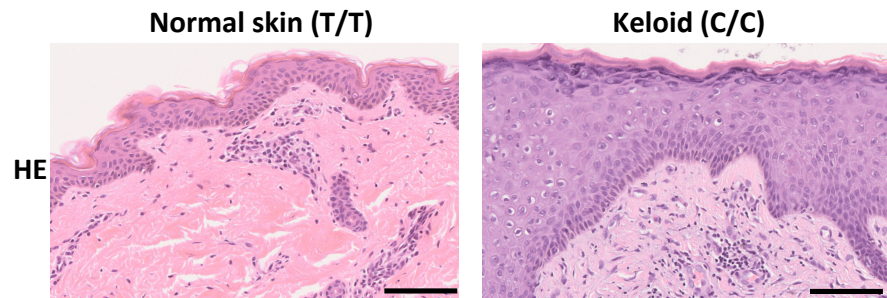


図 6. (a) 正常皮膚 (T/T)とケロイド組織 (C/C)の HE 染色 (Scale bars=100 μ m)

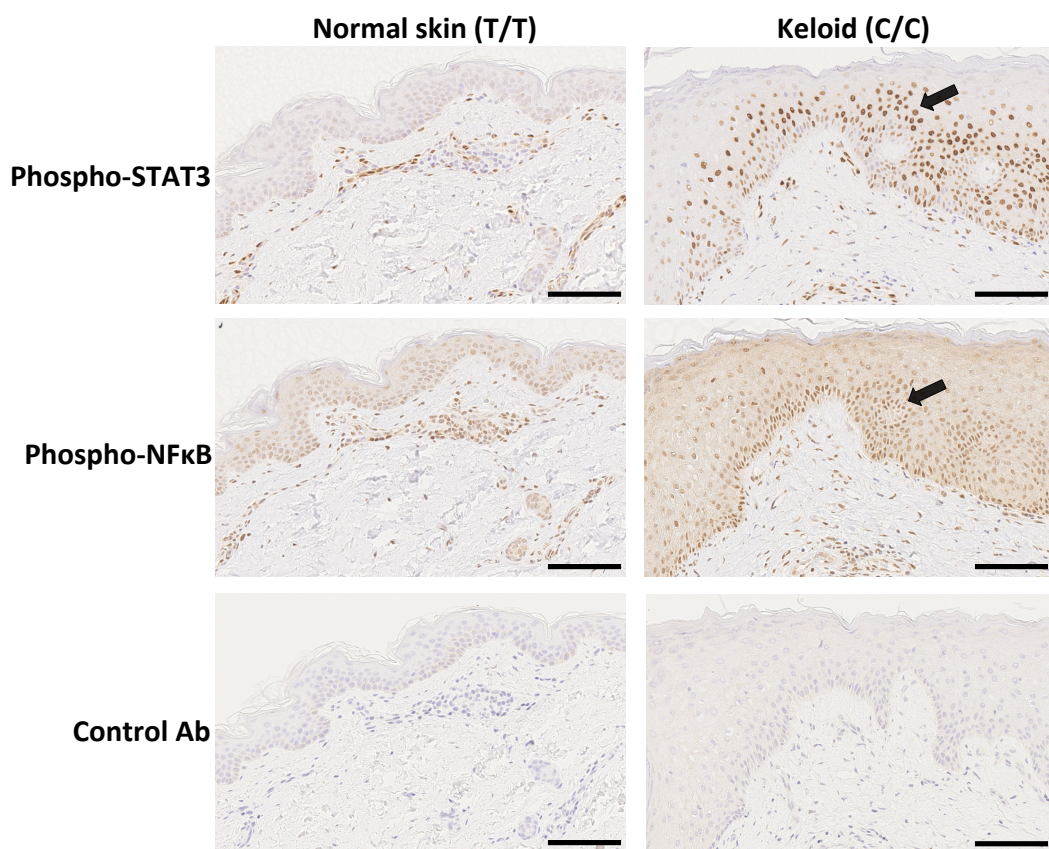


図 6. (b) 正常皮膚 (T/T)とケロイド組織 (C/C)の 免疫組織化学染色 (Scale bars=100 μ m)

ケロイド組織および正常皮膚において、リン酸化 STAT3 (Phospho-STAT3)、リン酸化 NF- κ B (Phospho-NF κ B)を免疫組織化学染色により検出した。ケロイド組織では表皮角化細胞（矢印）で、リン酸化 STAT3、リン酸化 NF- κ B がいずれも核内で染色される細胞が多く見られた。

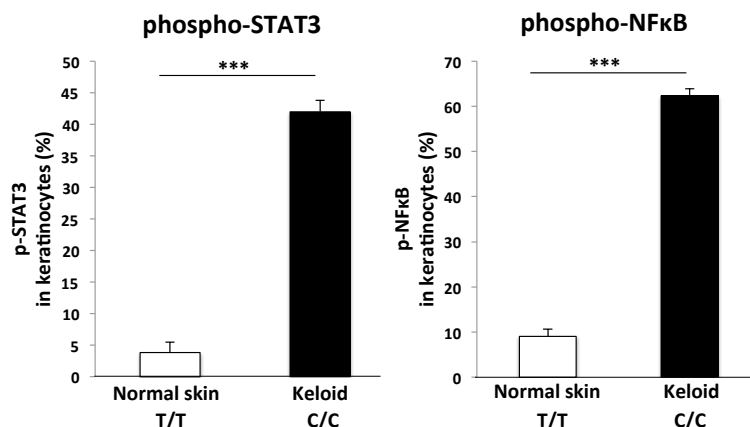


図7. 正常皮膚（非ケロイド患者 T/T）とケロイド組織（ケロイド患者 C/C）の表皮角化細胞におけるリン酸化 STAT3、及びリン酸化 NF-κB の陽性細胞の比率

免疫組織化学染色を行った皮膚組織中の表皮角化細胞における、リン酸化 STAT3、及びリン酸化 NF-κB の陽性細胞の数を計測し、定量化した。各々の切片において少なくとも 200 個以上の細胞を任意の 3 部位以上で計測した (Mean±SEM, ***, $P < 0.001$). 正常皮膚 $n=5$ 、ケロイド組織 $n=5$). 非ケロイド患者由来 (T/T) の正常皮膚組織と比較して、NF-κB と STAT3 のリン酸化した細胞の割合がケロイド患者由来 (C/C) のケロイド組織で有意に高かった。

2-2 ケロイド由来表皮角化細胞及び線維芽細胞は *in vitro* の条件において、サイトカイン刺激により炎症回路の活性化ターゲットである炎症性ケモカイン、サイトカインを高発現する

In vitro の条件において、初代培養後の表皮角化細胞に対して、サイトカイン刺激によって炎症性サイトカイン、ケモカイン活性の増幅が見られるかを検証した。まず、炎症性サイトカイン IL-6、炎症性ケモカイン CCL2、CCL20 の発現を確認した。単一のサイトカイン刺激と比較して、複数のサイトカイン刺激が加わることで、炎症性ケモカイン CCL2 活性の有意な増幅が見られた(図 8)。

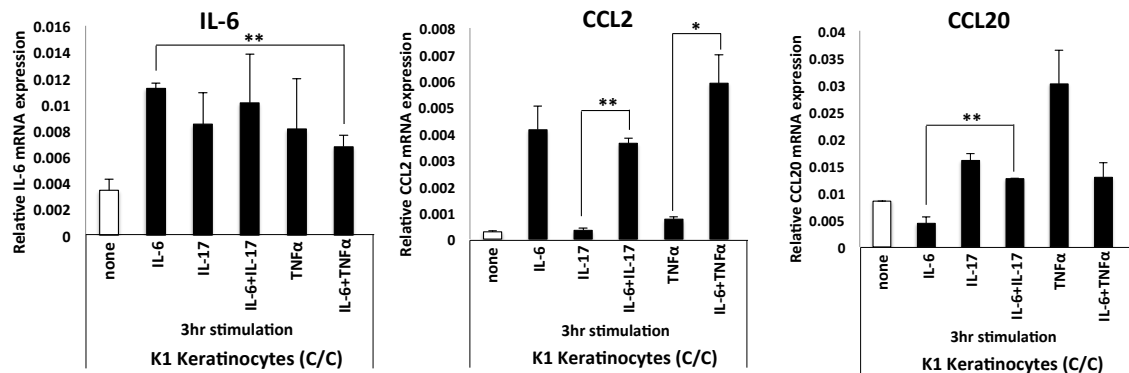


図 8. ケロイド由来表皮角化細胞 (K1)のサイトカイン刺激後の
IL-6、CCL2、CCL20 の mRNA 発現

データはハウスキーピング遺伝子 GAPDH に対する相対量で示す。Mean±SD, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ 。リスク多型を有する (C/C)ケロイド由来表皮角化細胞 (K1)において、単一のサイトカイン刺激と比較して、複数のサイトカイン刺激が加わることで、炎症性ケモカイン CCL2 活性の有意な増幅が見られた。

炎症回路の活性化により、高発現する NF- κ B ターゲットとなる炎症性サイトカイン、炎症性ケモカインの中でも、表皮角化細胞では、CCL2 の活性化が特に顕著であることがわかった。

次に、サイトカインの刺激時間を検証するため、サイトカイン刺激を 1 時間、3 時間で実験を行った結果、表皮角化細胞では、サイトカイン刺激後の CCL2 の活性化は、3 時間よりも 1 時間の刺激で有意に高発現することが明らかとなった(図 9)。

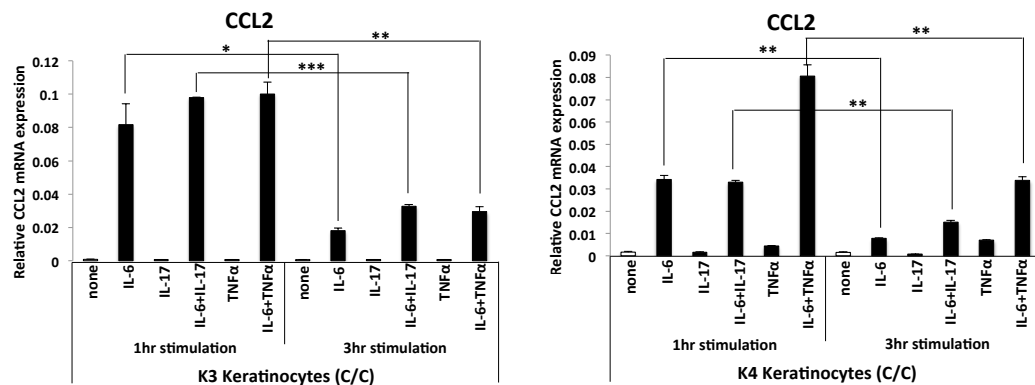


図9. ケロイド由来表皮角化細胞 (K3, K4)のサイトカイン1時間および3時間刺激後のCCL2のmRNA発現

データはハウスキーピング遺伝子 GAPDH に対する相対量で示す。Mean±SD, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ 。リスク多型を有する (C/C)ケロイド由来表皮角化細胞 (K3, K4)において、サイトカイン刺激後のCCL2の活性化は、3時間よりも1時間で有意に高発現した。

上記の検証結果を受け、初代培養で細胞が十分に増殖した複数のサンプルで、NEDD4のリスク多型SNPの無い正常皮膚由来の表皮角化細胞 (T/T)とNEDD4のリスク多型SNPを有するケロイド由来の表皮角化細胞 (C/C)でそれぞれサイトカイン1時間刺激後のCCL2のmRNAの発現を評価し、炎症回路の活性化の有無を検討した。結果、*in vitro*の条件下では、正常皮膚由来、ケロイド由来の表皮角化細胞いずれも炎症回路の活性化が見られたが、リスク多型SNPを有するケロイド由来の表皮角化細胞 (C/C)の方が、リスク多型SNPの無い正常皮膚由来の表皮角化細胞 (T/T)と比較して、炎症回路の活性が有意に高かった(図10)。

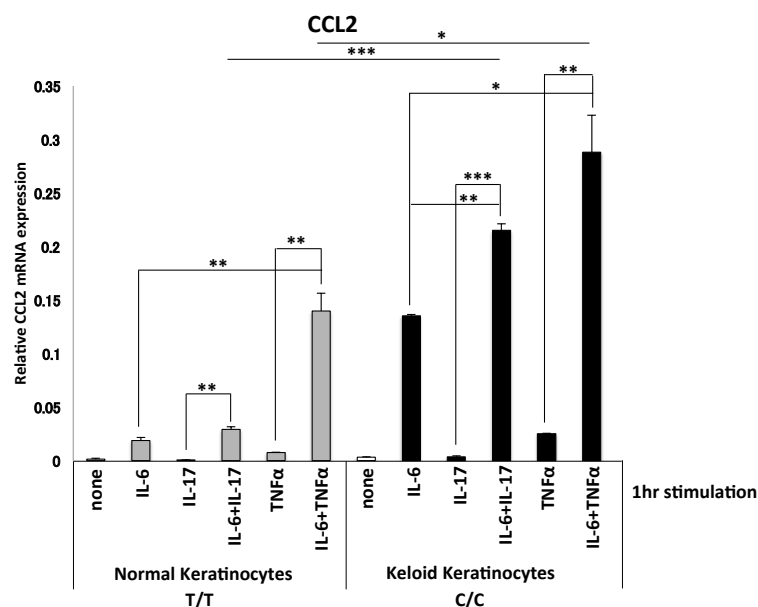


図 10. 正常皮膚由来 (T/T)およびケロイド由来表皮角化細胞 (C/C)のサイトカイン 1 時間刺激後の CCL2 の mRNA 発現

データはハウスキーピング遺伝子 GAPDH に対する相対量で示す。*In vitro* の条件下では、正常皮膚由来の表皮角化細胞 (T/T)、ケロイド由来の表皮角化細胞 (C/C)いずれも複数サイトカイン刺激により、CCL2 の著明な上昇が見られ、炎症回路の活性化が見られたが、ケロイド由来の表皮角化細胞で有意に高かった (Mean±SD, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ 。正常皮膚由来表皮角化細胞 $n=5$ 、ケロイド由来表皮角化細胞 $n=5$)。

線維芽細胞においても同様に、初代培養で細胞が十分に増殖した複数のサンプルで、NEDD4 のリスク多型 SNP の無い正常由来の線維芽細胞 (T/T)と NEDD4 のリスク多型 SNP を有するケロイド由来の線維芽細胞 (C/C)でそれぞれサイトカイン 3 時間刺激後の IL-6 の mRNA の発現を評価し、炎症回路の活性化の有無を検討した。*In vitro* の条件下では、正常皮膚由来、ケロイド由来のいずれも炎症回路の活性化が見られたが、リスク多型 SNP を有するケロイド由来の線維芽細胞 (C/C)の方が、リスク SNP の無い正常皮膚由来の線維芽細胞 (T/T)と比較して、炎症回路の活性が有意に高かった(図 11)。

正常皮膚由来とケロイド由来で、表皮角化細胞の検討結果と同様の傾向を示した。

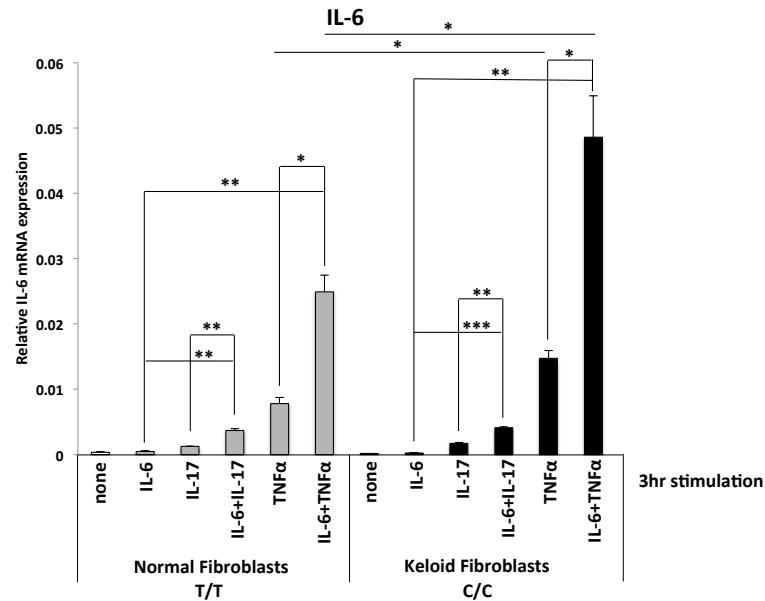


図 11. 正常皮膚由来 (T/T)およびケロイド由来線維芽細胞 (C/C)のサイトカイン 3 時間刺激後の IL-6 の mRNA 発現

データはハウスキーピング遺伝子 GAPDH に対する相対量で示す。*In vitro* の条件下では、正常皮膚由来の線維芽細胞 (T/T)、ケロイド由来の線維芽細胞 (C/C)いずれも複数サイトカイン刺激により、IL-6 の著明な上昇が見られ、炎症回路の活性化が見られたが、ケロイド由来の線維芽細胞で有意に高かった (Mean±SD, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ 。正常皮膚由来線維芽細胞 $n=5$ 、ケロイド由来線維芽細胞 $n=5$)。

3. NEDD4 の炎症回路への関与についての検討

3-1 ヒト NEDD4 は *in vitro* の条件において、炎症回路を正に制御する

既報の GWAS の結果と同様²⁴、本研究の患者検体においても、NEDD4 上の rs8032158 SNP は、ケロイド検体において、リスク多型 SNP (C)を有する頻度が正常皮膚検体と比べて高かった(図 3)。したがって、NEDD4 が炎症回路の正の制御遺伝子としてケロイドの慢性炎症に関与しているという仮説を立てた。まず、NEDD4 が炎症回路の正の制御遺伝子であるかを検証するため、ヒト表皮角化細胞株 HaCaT cell あるいはヒト神経膠腫細胞株 H4 cell を用いて、siRNA による NEDD4 のノックダウンを行い、各種炎症性サイトカイン、ケモカインの mRNA の発現を確認した。いずれの細胞株で行った実験でも、siRNA による NEDD4 の全バリエーションのノックダウンで炎症性サイトカイン IL-6 の mRNA 発現が有意に抑制された(図 12、図 13)。これらの結果は、NEDD4 が炎症回路に強く関与する遺伝子であり、かつ正に制御することを示唆する。

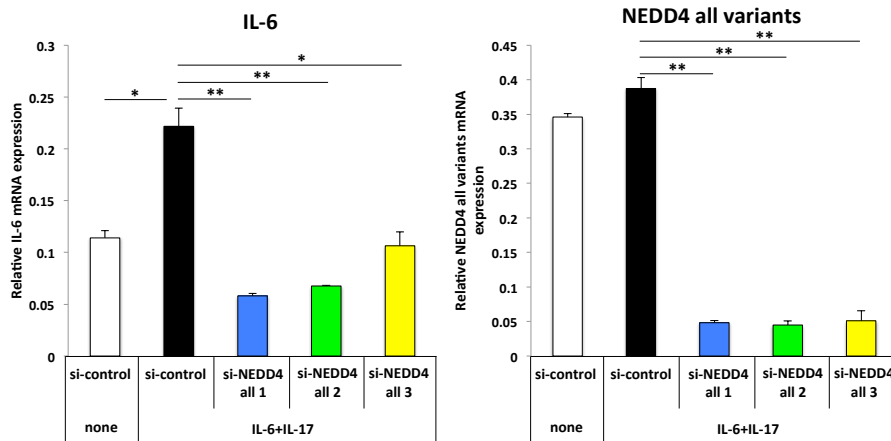


図 12. ヒト表皮角化細胞株 (HaCaT cell) における炎症性サイトカイン IL-6 の mRNA の発現変化と NEDD4 の全バリエントの mRNA のノックダウン

ヒト表皮角化細胞株 (HaCaT cell) に NEDD4 の siRNA (全バリエントをノックダウンする 3 種類の siRNA; all 1、all 2、all 3) 及び scramble siRNA をトランスフェクションし NEDD4 の一過性ノックダウン細胞を作出した。コントロール細胞と NEDD4 ノックダウン細胞に対して IL-6 + IL-17 で刺激した後、IL-6 の mRNA 発現を qPCR により測定した (データはハウスキーピング遺伝子 GAPDH に対する相対量を表す)。3 回の独立した実験の Mean±SD, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ 。3 種類の siRNA による NEDD4 の全バリエントのノックダウンで炎症性サイトカイン IL-6 の mRNA 発現が有意に抑制された。

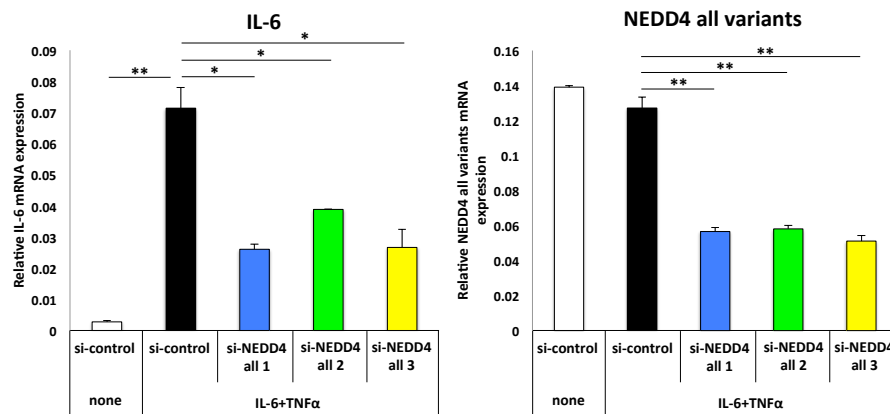


図 13. ヒト神経膠腫細胞株 (H4 cell) における炎症性サイトカイン IL-6 の mRNA の発現変化と NEDD4 の全バリエントの mRNA のノックダウン

ヒト神経膠腫細胞株 (H4 cell) に NEDD4 の siRNA (全バリエントをノックダウンする 3 種類の siRNA; all 1、all 2、all 3) 及び scramble siRNA をトランスフェクションし NEDD4 の一過性ノックダウン細胞を作出した。コントロール細胞と NEDD4 ノックダウン細胞に対して IL-6 + TNFα で刺激した後、IL-6 の mRNA 発現を qPCR により

測定した (データはハウスキーピング遺伝子 GAPDH に対する相対量を表す)。3 回の独立した実験の Mean $\pm$ SD, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ 。3 種類の siRNA による NEDD4 の全バリエントのノックダウンで炎症性サイトカイン IL-6 の mRNA 発現が有意に抑制された。

3-2 NEDD4 は *in vivo* の条件においても、炎症回路を正に制御する

In vivo においても NEDD4 のノックダウンで炎症が抑制されるか、F759 マウスにおける関節炎誘導実験を行って検討した。すなわち、NEDD4 shRNA あるいはコントロール shRNA (scrambled sequence) を F759 マウスの関節腔に投与後、炎症回路を活性化させる IL-6 および IL-17 を同様に関節腔に投与することでサイトカイン誘導性関節炎を発症させた。その結果、NEDD4 shRNA を投与したマウスにおいて、関節炎の病態が有意に抑制された(図 14)。

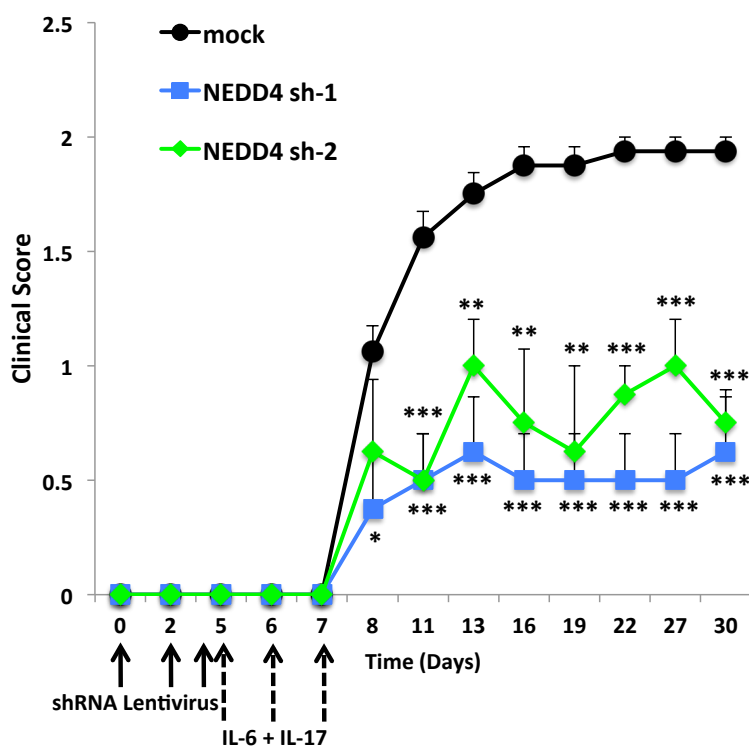


図 14. NEDD4 shRNA 関節注射による関節炎の抑制

F759 マウスの後肢踵関節腔に non-target shRNA 及び異なる 2 種類の NEDD4 shRNA (sh-1, sh-2) を day 0, day 2 および day 4 に注入し、引き続いて day 5, day 6, 及び day 7 に IL-6 及び IL-17 を同関節腔に注入し、各個体について関節炎スコア (Clinical Score) を評価した (Mean $\pm$ SEM, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, $n=3$)。2 種類の shRNA による NEDD4 の全バリエントのノックダウンで Clinical Score が有意に低下した。

4. ケロイド患者における NEDD4 の解析

4-1 ケロイド組織および正常皮膚組織両者で、NEDD4 の発現が見られる

まず、リスク多型 SNP を有するケロイド患者由来のケロイド組織 (C/C) とリスク多型 SNP の無い非ケロイド患者由来の正常皮膚組織 (T/T) における NEDD4 の発現 (全スプライスバリエントを認識する抗体を使用) を免疫組織化学染色で確認した。結果、ケロイドでは、表皮角化細胞で多く陽性細胞が見られた。一方で、正常皮膚においても、同様に表皮角化細胞に陽性細胞が見られた(図 15)。複数のサンプルで、ケロイド組織 (C/C) と正常皮膚 (T/T) の間で表皮角化細胞中の陽性細胞の割合を比較すると、ケロイド組織で多い傾向は見られたが、有意差には至らなかった(図 16)。

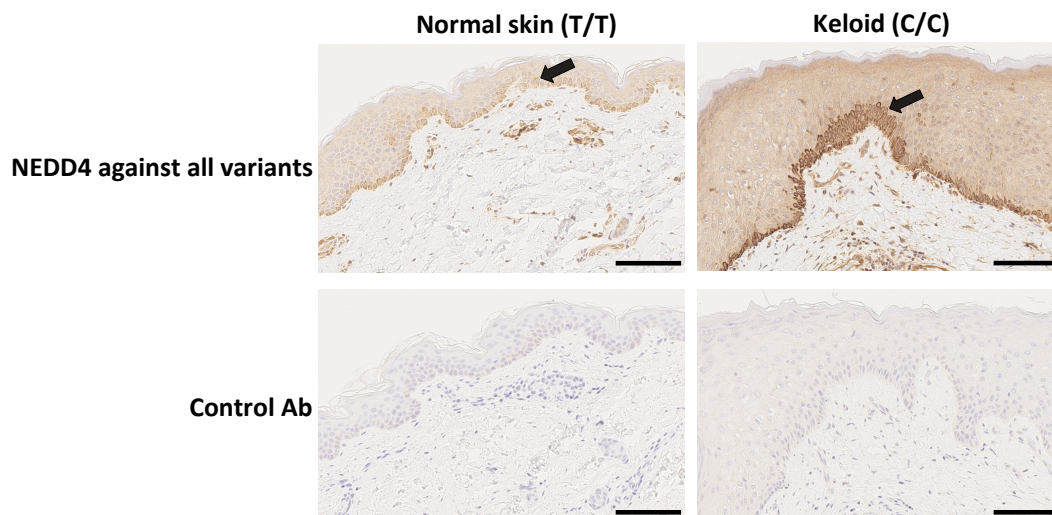


図 15. 正常皮膚 (T/T) とケロイド組織 (C/C) の NEDD4 全バリエント認識抗体による免疫組織化学染色 (Scale bars=100 μ m)

ケロイド組織、正常皮膚ともに、表皮角化細胞 (矢印) で、NEDD4 陽性の細胞が見られた。

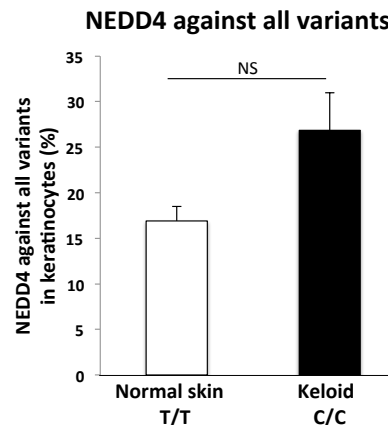


図 16. 正常皮膚（非ケロイド患者 T/T）とケロイド組織（ケロイド患者 C/C）の表皮角化細胞における NEDD4 全バリエントの陽性細胞の比率

免疫組織化学染色を行った皮膚組織中の表皮角化細胞における、NEDD4 の陽性細胞の数を計測し、定量化した。各々の切片において少なくとも 200 個以上の細胞を任意の 3 部位以上で計測した (Mean±SEM, NS: not significant。正常皮膚 n=5、ケロイド組織 n=5)。ケロイド組織 (C/C) と正常皮膚 (T/T) の間で表皮角化細胞中の陽性細胞の割合は、ケロイド組織で多い傾向は見られたが、有意差は見られなかった。

次に、リスク多型 SNP を有するケロイド由来の表皮角化細胞 (C/C) とリスク多型 SNP の無い非ケロイド患者由来の表皮角化細胞 (T/T) の NEDD4 の mRNA 発現（全スプライスバリエントを認識するプライマーを使用）を qPCR で確認した(図 17)。ケロイド由来の表皮角化細胞の方が高い傾向は見られたが、有意差には至らなかった。

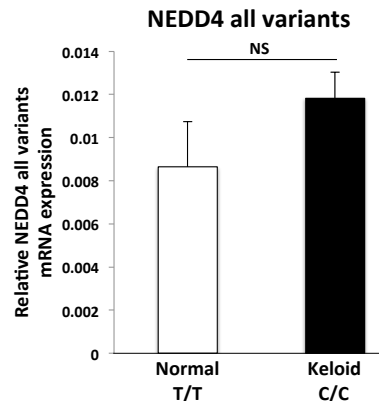


図 17. 正常皮膚由来 (T/T)およびケロイド由来 (C/C)の表皮角化細胞の NEDD4 全バリエーションの mRNA 発現

リスク多型の無い正常皮膚由来 (T/T)の表皮角化細胞、リスク多型を有するケロイド由来 (C/C)の表皮角化細胞の NEDD4 全バリエーションの mRNA 発現は、ケロイド由来の方が高い傾向は見られたが、有意差は認めなかった (Mean±SD, NS: not significant. 正常皮膚由来表皮角化細胞 n=5、ケロイド由来表皮角化細胞 n=7)。

NEDD4 とは、HECT (homologous to E6-AP COOH terminus)型の E3 ユビキチンリガーゼである(図 18)。ヒト NEDD4 は、30 のエクソンから形成され、タンパク質をコードする 6 つのスプライスバリエーションが存在することがわかっている(NCBI database)³⁴。WW ドメインから HECT 型は共通の構造で、C2 ドメインを含む N 末端にバリエーションが見られる³⁴。それぞれのスプライスバリエーションの詳細な機能については十分に明らかにされていない。

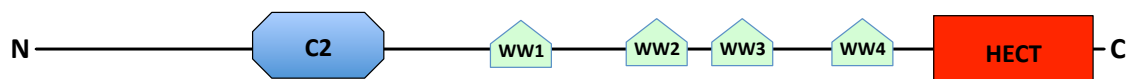


図 18. ヒト NEDD4 のタンパク質構造 (模式図)

C2: Calcium/phospholipid binding domain,

WW: Protein/protein interaction domains,

HECT: Catalytic ubiquitin ligase domain

ケロイド患者 (C/C)と非ケロイド患者 (T/T)で、NEDD4 の全スプライスバリエーションの発現は、ケロイド患者で高い傾向は見られたが、タンパク質レベル、mRNA レベルにおいて、いずれも有意差は見られなかった。そこで、NEDD4 の各スプライスバリエーションの発現や差について詳細に検証していくこととした。

4-2 ヒト NEDD4 にはタンパク質を合成する 6 つのスプライスバリエントが存在し、リスク多型 SNP を有するケロイドサンプル (C/C)ではスプライスバリエント 3 の発現が高い

NCBI database (NCBI build 38,2013)において、ヒト NEDD4 には 7 つの転写バリエントが存在することがこれまでに報告されており、そのうちの 6 つがタンパク質をコードするスプライスバリエント (splice variant; SV)である。すなわち、主なスプライスバリエントである SV1 (NM_006154)と、SV2 (NM_198400)、SV3 (NM_001284338)、SV4 (NM_001284339)、SV5 (NM_001284340)、SV7 (NM_001329212)である。SV6 (NR_104302)は non-coding RNA である。

ケロイドにおいて、それぞれのスプライスバリエントの発現を示した報告はこれまでにない。そこで、まず、SV1 と SV7 にのみ存在するエクソン 1～5 と、SV2、SV3、SV4、SV5 を識別するエクソン部位にそれぞれ RT-PCR primer を設計し、電気泳動で amplicon size を識別し、発現を確認することとした。各スプライスバリエントの模式図と、RT-PCR primer の設計図を示す(図 19)。

結果、リスク多型 SNP の無い正常皮膚サンプル (T/T)と比較して、リスク多型 SNP を有するケロイドサンプル (C/C)では、SV3 の発現が高かった。SV2、SV4、SV5 の発現は正常皮膚サンプル、ケロイドサンプルともに発現が低い、ケロイドサンプルの方が高い傾向が見られた。SV1、SV7 は、正常皮膚サンプル、ケロイドサンプル両方で発現が高かったが、明らかな差は見られなかった(図 20)。

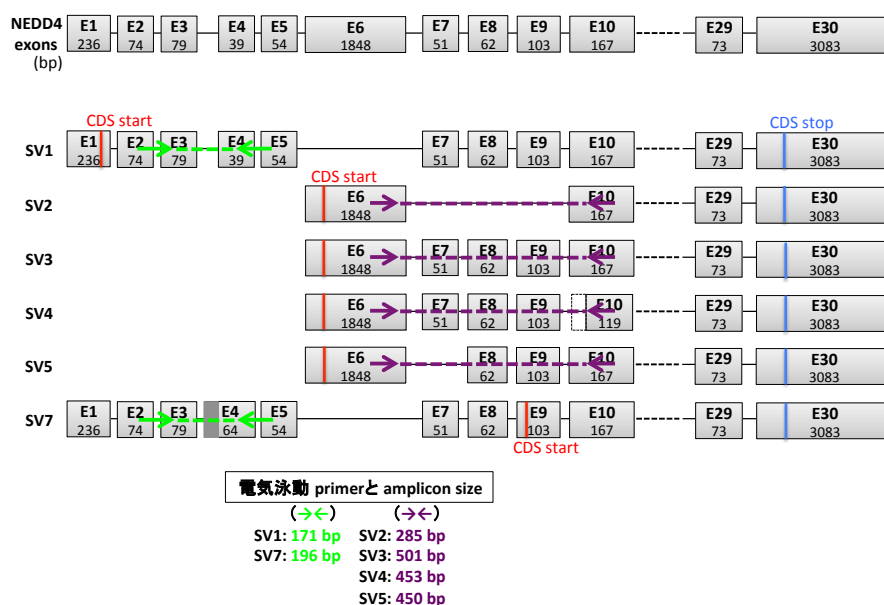


図 19. 6つのスプライスバリエントと電気泳動に使用した PCR primer の設計図
 NEDD4 の 30 すべてのエクソンを有するスプライスバリエントは存在しない。電気泳動のバンドサイズの相違から SV1 と SV7 を識別する primer（黄緑矢印）と、SV2、SV3、SV4、SV5 を識別する primer（紫矢印）を設計した。

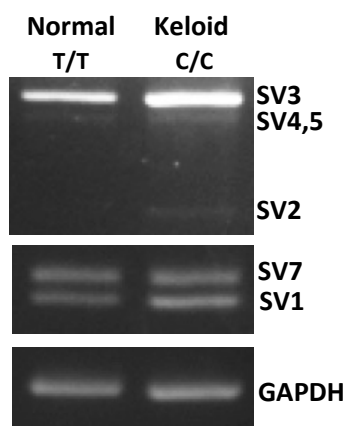


図 20. 電気泳動の結果

正常皮膚由来 (T/T)の表皮角化細胞、ケロイド由来 (C/C)の表皮角化細胞より抽出した RNA より cDNA を合成し、RT-PCR 後に PCR 産物の電気泳動を行った。内在性コントロールとして、GAPDH の PCR 産物の電気泳動も行った。それぞれにつき、n=3 のサンプルで行った。リスク多型 SNP の無い正常皮膚サンプル (T/T)と比較して、リスク多型 SNP を有するケロイドサンプル (C/C)では、SV3 の発現が高かった。SV2、SV4、SV5 の発現は正常皮膚サンプル、ケロイドサンプルともに発現が低かった。SV1、SV7 は、正常皮膚サンプル、ケロイドサンプル両方で発現が高かったが、明らかな差は見られなかった。

リスク多型 SNP を有するケロイドサンプル (C/C) で NEDD4 の mRNA レベルで SV3 の発現が高いことが明らかとなったが、電気泳動のみの結果では確証は得られないと考えた。そこで、それぞれのスプライスバリエントに特異的な TaqMan qPCR primer を図 21 のように設計し、real-time qPCR にて mRNA レベルでの各スプライスバリエントの発現を検証した。

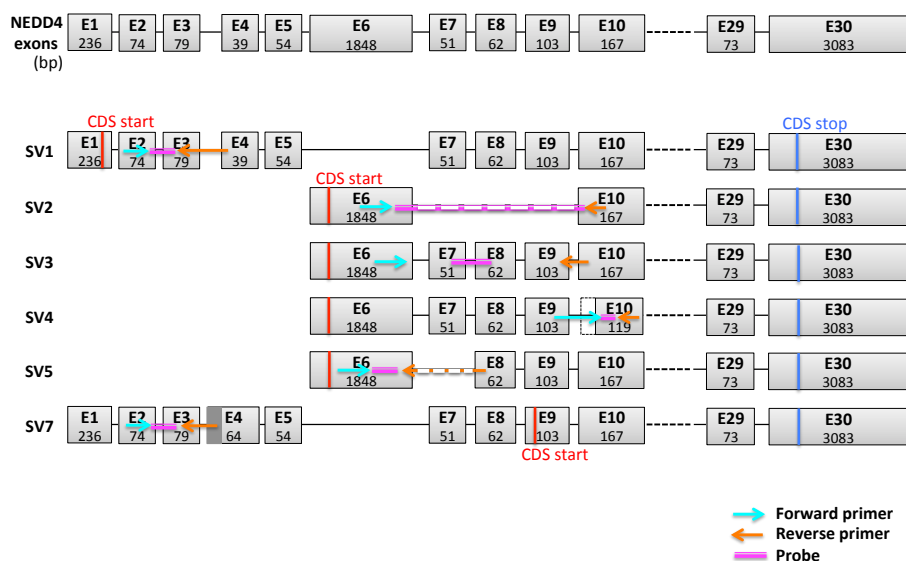


図 21. 6つのスプライスバリエントと real-time TaqMan qPCR に使用した各スプライスバリエントに特異的な primer と probe の設計図

Real-time TaqMan qPCR を行った結果、mRNA レベルでは、電気泳動の結果(図 20)と同様に、ケロイドサンプル (C/C)では、NEDD4 SV3 の発現が正常皮膚サンプル (T/T)と比較して有意に高くなっていることが示された。NEDD4 の主なスプライスバリエントである SV1 は、ケロイドサンプル、正常皮膚サンプルともに高発現を認め、両者に有意差は見られなかった。また、SV4、SV5 の mRNA 発現は、ケロイドサンプル、正常皮膚サンプルともに発現が低かった。SV2 の発現はケロイドサンプルで高い傾向は見られたが、正常皮膚サンプルと有意差はなかった。ケロイドサンプル (C/C)で SV3 の発現が正常皮膚サンプル (T/T)と比較して顕著に高いことが示され、電気泳動の解析結果と同様の傾向を示し、確証が得られた(図 22)。

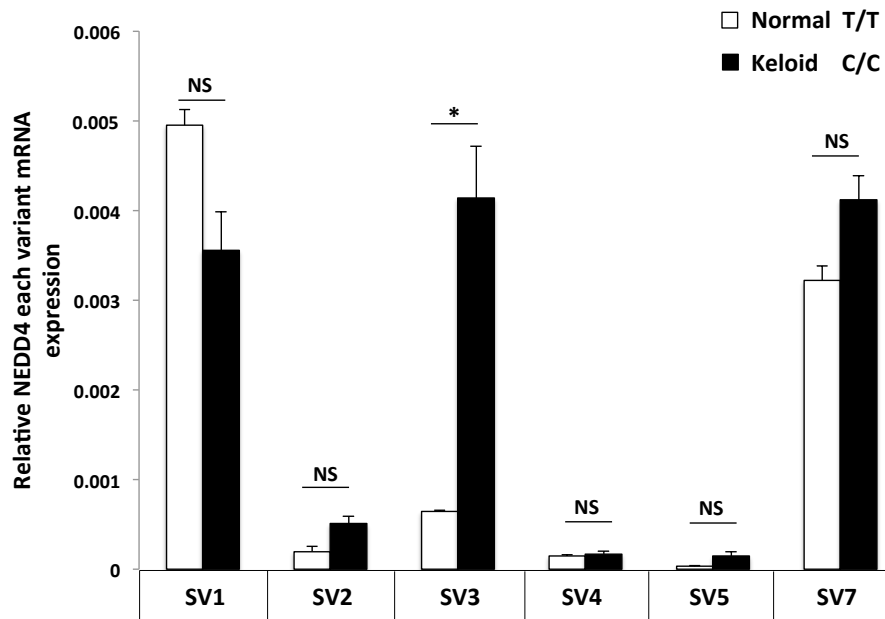


図 22. Real-time TaqMan qPCR による各スプライスバリエントの mRNA 発現

正常皮膚由来 (T/T) の表皮角化細胞、ケロイド由来 (C/C) の表皮角化細胞の NEDD4 の各スプライスバリエントの mRNA 発現は、ケロイドサンプルで、SV3 の発現が著明に高かった (データはハウスキーピング遺伝子 GAPDH に対する相対量を表す。Mean±SEM, NS: not significant; *, $P < 0.05$ 。正常皮膚由来表皮角化細胞 $n=5$ 、ケロイド由来表皮角化細胞 $n=7$)。

4-3 NEDD4 SV3 はケロイド組織においてタンパク質レベルで高発現する

mRNA レベルだけでなくタンパク質レベルでも、NEDD4 SV3 の発現が、リスク多型 SNP を有するケロイド組織 (C/C) でリスク多型 SNP の無い正常皮膚 (T/T) と比較して高くなっているかを確認するため、NEDD4 SV1 および SV7 を認識しないよう、NEDD4 SV1 および SV7 には存在しないエクソン 6 (E6) 部分に作製した NEDD4 SV3 識別抗体を使用して免疫組織学的染色を行った。NEDD4 SV3 識別抗体の設計図を示す(図 23)。E6 は、SV2、SV4、SV5 と共通であるが、ケロイドサンプル、正常皮膚サンプル両者とも、SV2、SV4、SV5 の発現が低いことは、mRNA および PCR 産物で確認している。結果、ケロイド組織 (C/C) では SV3 を主とするタンパク質の発現が正常皮膚 (T/T) と比較して有意に高いことが示された(図 24、図 25)。

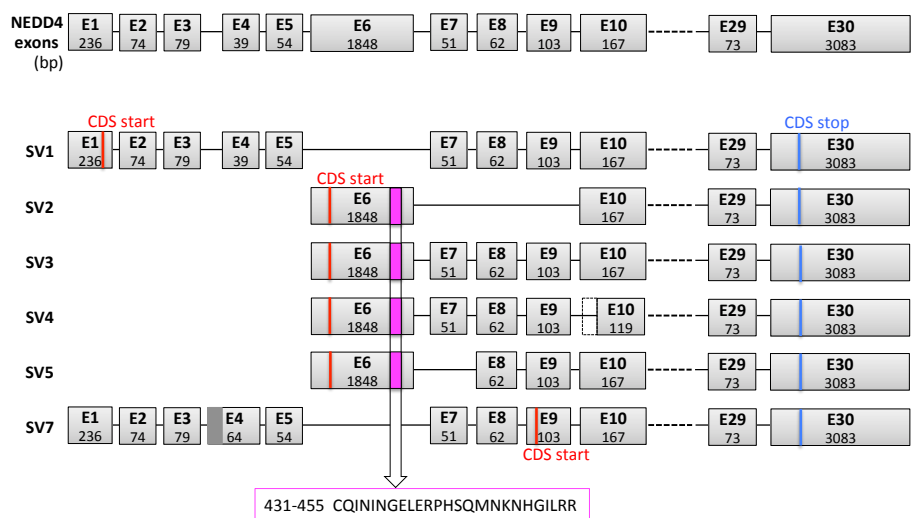


図 23. NEDD4 SV3 識別抗体の設計図とアミノ酸配列
エクソン 6 (E6)部分の 431-455 番目のアミノ酸を識別する抗体を作製した。

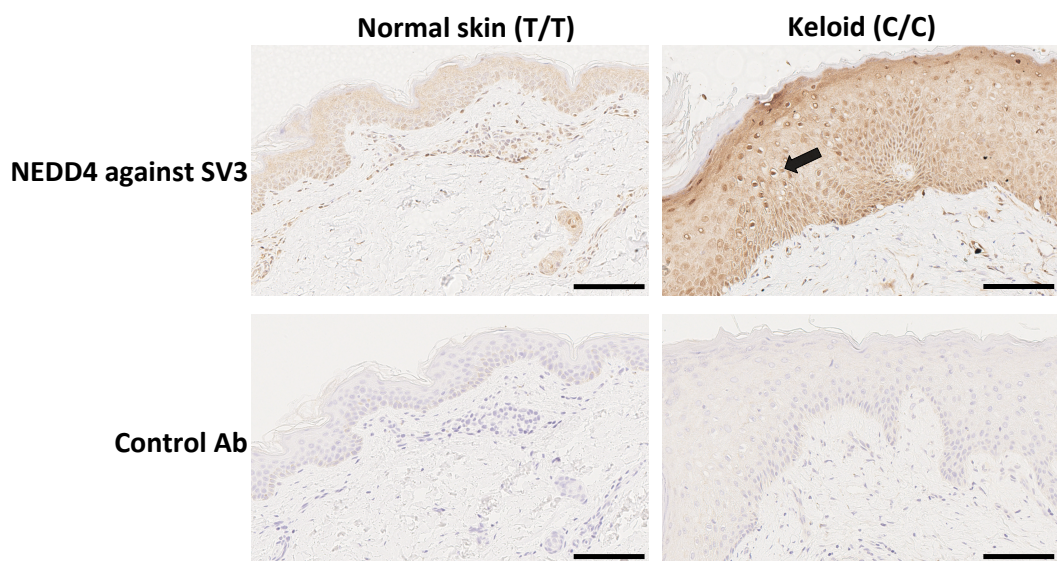


図 24. 正常皮膚 (T/T)とケロイド組織 (C/C)の NEDD4 SV3 認識抗体による
免疫組織化学染色 (Scale bars=100 μm)

ケロイド組織では、表皮角化細胞 (矢印) で、NEDD4 SV3 陽性の細胞が多く見られたが、正常皮膚では、SV3 陽性の細胞は少なかった。

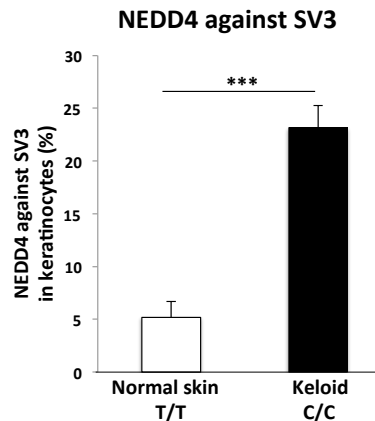


図 25. 正常皮膚（非ケロイド患者 T/T）とケロイド組織（ケロイド患者 C/C）の表皮角化細胞における NEDD4 SV3 の陽性細胞の比率

免疫組織化学染色を行った皮膚組織中の表皮角化細胞における、NEDD4 SV3 の陽性細胞の数を計測し、定量化した。各々の切片において少なくとも 200 個以上の細胞を任意の 3 部位以上で計測した (Mean±SEM, ***, $P<0.001$ 。正常皮膚 $n=5$ 、ケロイド組織 $n=5$)。ケロイド組織 (C/C) と正常皮膚 (T/T) の間で表皮角化細胞中の陽性細胞の割合は、ケロイド組織で有意に高かった。

5. NEDD4 スプライスバリエント (SV) 3 の機能解析

5-1 NEDD4 SV3 は NF- κ B 経路を強く活性化する

次に、NEDD4 SV3 は、NF- κ B 経路に影響を与えているかを検証した。そこで、まず NEDD4 SV3 の cDNA を含んだプラスミドを構築した。その各々を HEK293T 細胞へトランスフェクションし、過剰発現させ、NF- κ B 経路により活性化する、NF- κ B (p65) および IL-6 のプロモーター活性の変化をルシフェラーゼアッセイにより確認した。その結果、NEDD4 SV3 は Mock と比べて NF- κ B プロモーター、IL-6 プロモーター活性いずれも有意に上昇させることが明らかとなった(図 26)。これらの結果は、NEDD4 SV3 が NF- κ B 経路に強く関与していることを示唆する。

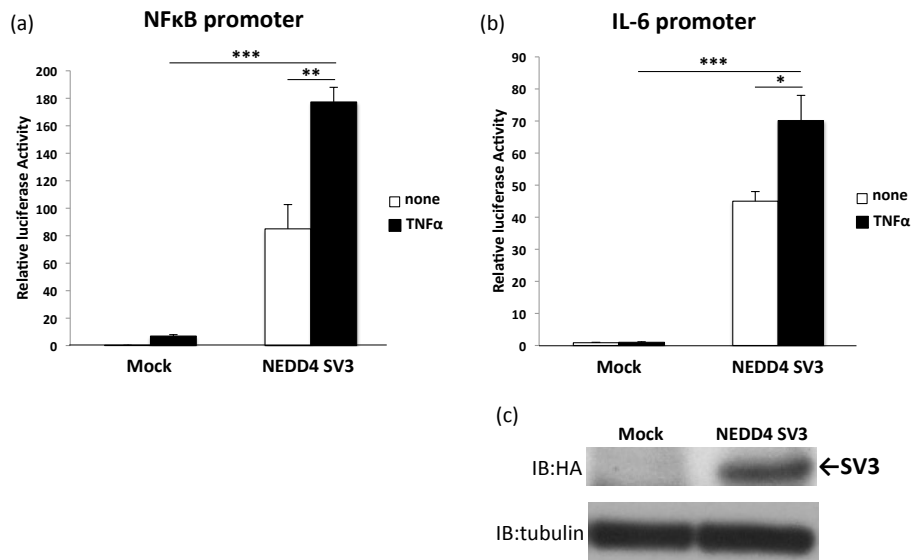


図 26. NEDD4 SV3 の強制発現下におけるルシフェラーゼアッセイおよび western blotting による NEDD4 SV3 過剰発現の検証

- (a) HEK293T 細胞へ NEDD4 SV3 をトランスフェクションし、NF-κB プロモーター活性のプロモーター活性の変化を dual luciferase assay により評価した。ルシフェラーゼ活性は、ホタルルシフェラーゼ反応を測定後に、コントロールとしてウミシイタケルシフェラーゼで補正した。縦軸は補正後の蛍光強度を示す。3 回の独立した実験の Mean±SD, **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ 。NEDD4 SV3 は Mock と比べて NF-κB プロモーター活性を有意に上昇させた。
- (b) HEK293T 細胞へ NEDD4 SV3 をトランスフェクションし、IL-6 プロモーター活性の変化をデュアルルシフェラーゼアッセイにより評価した。縦軸は補正後の蛍光強度を示す。3 回の独立した実験の Mean±SD, *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$ 。NEDD4 SV3 は Mock と比べて IL-6 プロモーター活性を有意に上昇させた。
- (c) ルシフェラーゼアッセイを行った、NEDD4 SV3 を過剰発現した HEK293T 細胞及び Mock 細胞を融解し、SDS-PAGE でタンパク質を分離したのち PVDF 膜へ転写し、抗 HA 抗体、及び内在性コントロールとして抗 tubulin 抗体を用いてそれぞれのタンパク質を検出した。3 回の独立した実験結果のうち、代表的なデータを示す。NEDD4 SV3 を過剰発現した HEK293T 細胞で、NEDD4 SV3 のタンパク質の発現が確認された。

5-2 NEDD4 SV3 は *in vitro* の条件において、炎症回路を正に制御する

ヒト神経膠腫細胞株 H4 cell に対して、NEDD4 SV1 および SV7 をノックダウンせず、SV3 をノックダウンする siRNA を作製し、siRNA による特異的な SV3 のノックダウンを行い、炎症性サイトカイン IL-6 の発現を確認した。特異的 siRNA の設計図を示す(図 27)。ノックダウンする塩基配列は、SV3、SV4 と共通であるが、ケロイドサンプル、正常皮膚サンプル両者とも、SV4 の発現が低いことは、mRNA および PCR 産物で確認している。その結果、SV3 のノックダウンにより IL-6 の mRNA の発現が有意に抑制された (図 28)。また、SV3 をノックダウンする siRNA により、SV1 および SV7 はノックダウンされないことを各スプライスバリエント (SV1、SV7) の mRNA 発現を real-time TaqMan qPCR で測定することで確認した(図 29)。これらの結果は、NEDD4 SV3 が炎症回路に強く関与する遺伝子であり、かつ正に制御することを示唆する。

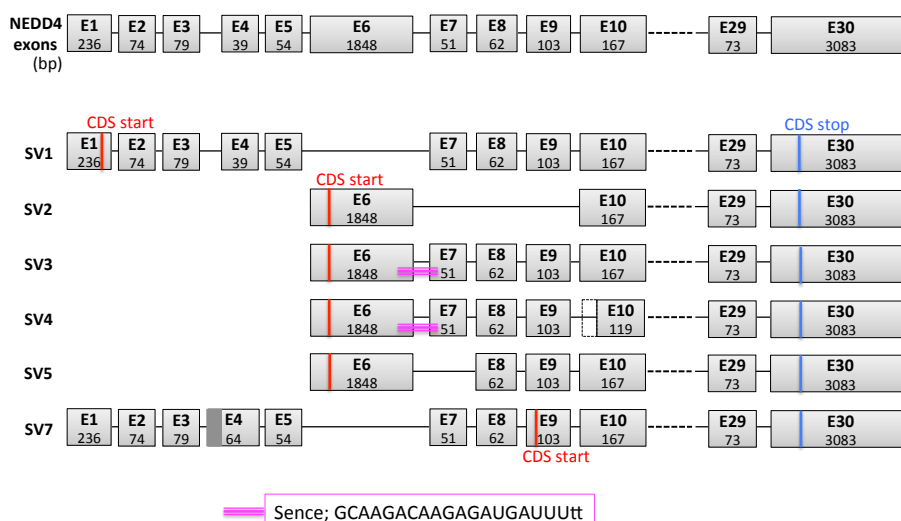


図 27. 特異的 siRNA の設計図と塩基配列
エクソン 6 (E6) とエクソン 7 (E7) のジャンクションを含むように設計した。

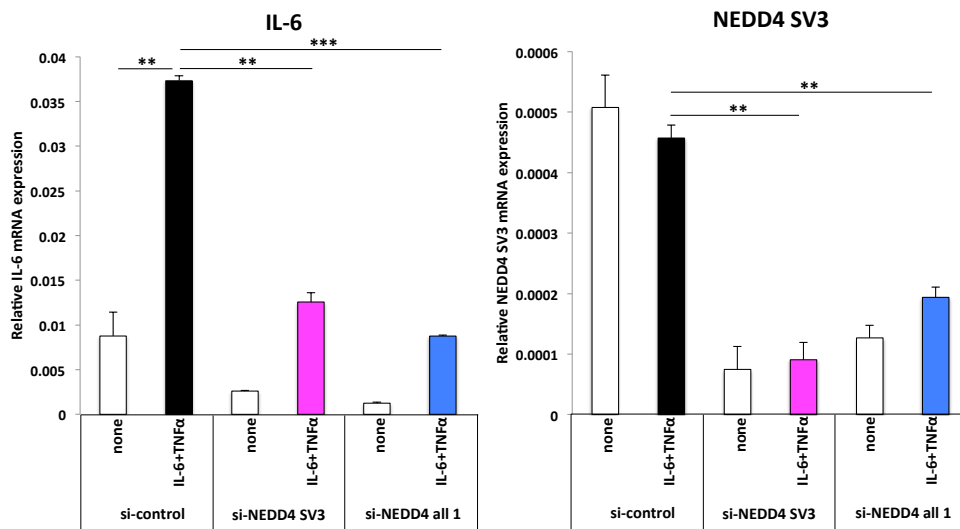


図 28. ヒト神経膠腫細胞株 (H4 cell) における、NEDD4 SV3 および全バリエントノックダウン後の炎症性サイトカイン IL-6 の mRNA の発現変化と NEDD4 SV3 の mRNA のノックダウン

ヒト神経膠腫細胞株 (H4 cell) に NEDD4 SV3 に対する siRNA 及び scramble siRNA をトランスフェクションし、NEDD4 SV3 の一過性ノックダウン細胞を作出した。ポジティブコントロールとして NEDD4 全バリエントに対する siRNA (all 1) の一過性ノックダウン細胞も作出した。コントロール細胞とノックダウン細胞に対して IL-6 + TNFα で刺激した後、IL-6 の mRNA 発現を qPCR により測定した (データはハウスキーパー遺伝子 GAPDH に対する相対量を表す)。3 回の独立した実験の Mean±SD, **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ 。

NEDD4 SV3 のノックダウン (si-NEDD4 SV3) により IL-6 の mRNA の発現が有意に低下した (左図)。NEDD4 SV3 のノックダウン (si-NEDD4 SV3) で NEDD4 SV3 の mRNA 発現が有意に低下しており、NEDD4 SV3 がノックダウンされていることを real-time TaqMan qPCR で確認した (右図)。ポジティブコントロールである NEDD4 全バリエントノックダウン (si-NEDD4 all 1) も同様の結果であった。

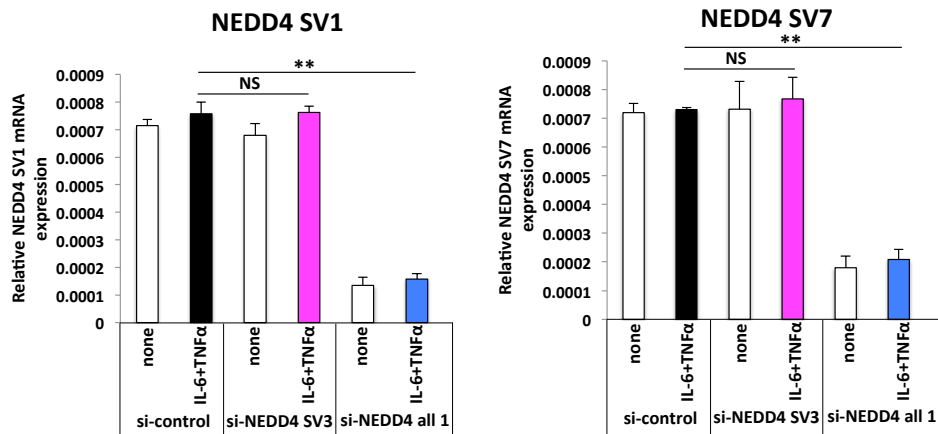


図 29. ヒト神経膠腫細胞株 (H4 cell) における、NEDD4 SV3 および全バリエーションノックダウン後の NEDD4 SV1 および SV7 の mRNA の発現変化

ヒト神経膠腫細胞株 (H4 cell) において NEDD4 SV3 ノックダウンにより、NEDD4 SV1 および SV7 はノックダウンされておらず、特異的に NEDD4 SV3 がノックダウンされたことが確認された。ポジティブコントロールである NEDD4 全バリエーションノックダウン (si-NEDD4 all 1) では、NEDD4 SV1 および SV7 はいずれもノックダウンされた。3 回の独立した実験の Mean±SD, NS: not significant; **, $P < 0.01$ 。

5-3 NEDD4 SV3 は NF-κB 経路において、p65 ser536 のリン酸化に関与している

NF-κB 経路は、細胞生存決定、免疫反応、炎症、発がん、器官形成などにおいて重要な役割を果たしている転写因子である^{35,36}。NF-κB 経路は IL-1 や IL-17 や TNFα、あるいは LPS などさまざまな炎症性サイトカインやストレスにより活性化することが知られている³⁷。NF-κB 経路において転写活性を有する分子として重要なものの一つが p65 分子である。p65 は細胞質では Inhibitor of κB (IκB) α と結合し非活性化した状態で存在するが、先述したような刺激により IκB kinase (IKK) 複合体のリン酸化を経て IκBα がリン酸化を受け、その結果プロテアソーム系により分解される。IκB が分解された p65 分子はリン酸化により活性化し、核局在シグナルが露出することにより核内へ移行し転写活性を有するようになる³⁷⁻³⁹。そこで、まず H4 cell に対して、SV3 に特異的な siRNA により SV3 のノックダウンを行い、TNFα による刺激を加え、p65 のリン酸化について経時的に評価した。その結果、NEDD4 SV3 のノックダウンは、p65 ser536 のリン酸化に影響を及ぼすことが確認された (図 30)。これらの結果から、NEDD4 SV3 は NF-κB 経路において、細胞質内で TNFα のアダプター分子に関与することで、p65 ser536 のリン酸化に影響を及ぼすことが考えられた。

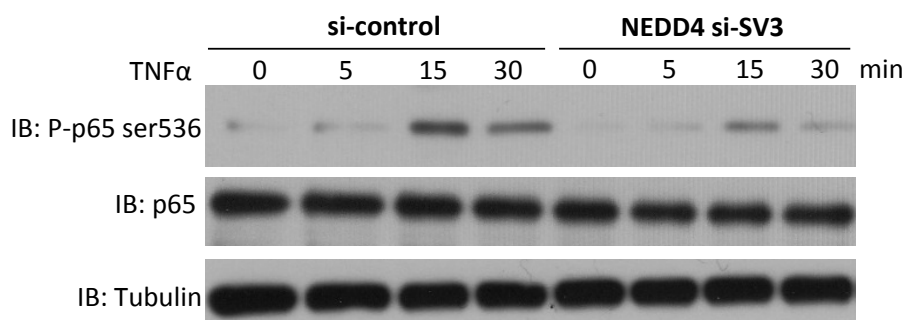


図 30. NEDD4 SV3 ノックダウンによる p65 のリン酸化の変化

ヒト神経膠腫細胞株 (H4 cell) に NEDD4 SV3 に対する siRNA 及び scramble siRNA をトランスフェクションし NEDD4 SV3 の一過性ノックダウン細胞を作出した。コントロール細胞と NEDD4 SV3 ノックダウン細胞に対して TNFα (50 ng/ml) で刺激を加えた。刺激後 0、5、15、及び 30 分に細胞を溶解し、全細胞分画を回収した。それらのサンプルについて、western blotting により、p65 のリン酸化状態を評価した。抗リン酸化 p65 (Ser536) 抗体、抗 p65 抗体、及び内在性コントロールとして抗 tubulin 抗体を用いてそれぞれのタンパク質を検出した。3 回以上の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す。NEDD4 SV3 のノックダウンにより、p65 ser536 のリン酸化 (P-p65 ser536) は TNFα 刺激性に低下した。

5-4 NEDD4 SV3 は Receptor-interacting protein (RIP) の活性化に関与することで、NF-κB 経路を活性化する

NF-κB 経路において、ユビキチン化修飾系は重要な役割を果たしている⁴⁰⁻⁴³。NEDD4 は HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼとして知られており、5-3 の実験結果から NEDD4 SV3 は、NF-κB 経路において細胞質内で TNFα 刺激によってユビキチンされる分子に関与している可能性が考えられた。NF-κB 経路におけるユビキチン化分子として、TNFα のアダプター分子である Receptor-interacting protein (RIP) が考えられた^{44,47}。そこで、H4 cell に対して、NEDD4 SV3 に特異的な siRNA により SV3 のノックダウンを行い、TNFα による刺激を加え、RIP の切断、発現量について経時的に評価した。その結果、NEDD4 SV3 のノックダウンにより、RIP の切断量 (Cleaved-RIP) が減少し、full length-RIP は増加することが確認された(図 31)。これらの結果から、NEDD4 SV3 は RIP の活性化に関与することで、p65 ser536 のリン酸化に影響を及ぼすことが考えられた。

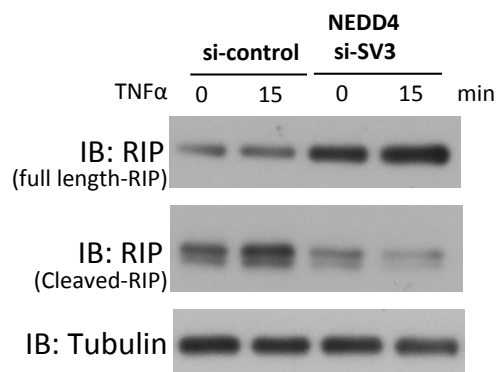


図 31. NEDD4 SV3 ノックダウンによる RIP の切断量の変化

ヒト神経膠腫細胞株 (H4 cell) に NEDD4 SV3 に対する siRNA 及び scramble siRNA をトランスフェクションし NEDD4 SV3 の一過性ノックダウン細胞を作出した。コントロール細胞と NEDD4 SV3 ノックダウン細胞に対して TNFα (50 ng/ml) で刺激を加えた。刺激後 0、15 分に細胞を溶解し、全細胞分画を回収した。それらのサンプルについて、western blotting により、抗 RIP 抗体、及び内在性コントロールとして抗 tubulin 抗体を用いて RIP の切断量を評価した。3 回以上の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す。NEDD4 SV3 のノックダウンにより、RIP の切断量 (Cleaved-RIP) が TNFα の刺激前に減少しており、さらに刺激により経時的に減少し、full length-RIP は TNFα の刺激で経時的に増加した。

この結果を受け、NEDD4 SV3 は、RIP と結合するか、さらには正常皮膚サンプル (T/T)、ケロイドサンプル (C/C) のいずれにおいても発現の高かった NEDD4 SV1 と比較して RIP との結合に差があるかを免疫沈降法 (IP) で検証することとした。HEK293T に HA タグ融合 NEDD4 SV1 および SV3 をトランスフェクションし、HA ビーズで免疫沈降し、抗 RIP 抗体で western blotting を行うことで、NEDD4 SV3 は、実際に RIP と結合し、さらに NEDD4 SV1 と比較して、RIP との結合が強いことが明らかとなった(図 32)。

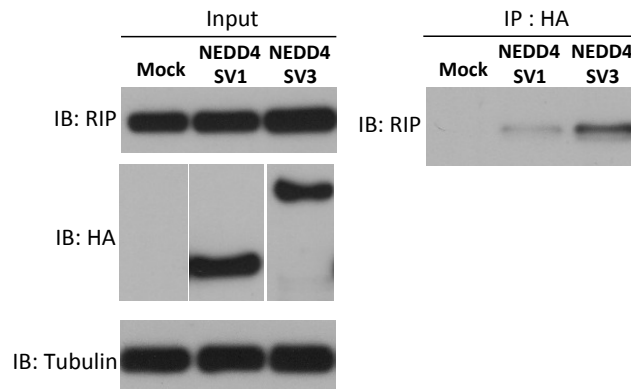


図 32. NEDD4 SV1, SV3 と RIP の結合

HEK293T 細胞に Mock、HA タグ融合 NEDD4 SV1、あるいは HA タグ融合 NEDD4 SV3 をトランスフェクションした細胞を溶解し全細胞分画を回収し、細胞溶解液を protein G でプレクリアした後、HA ビーズで免疫沈降 (IP)を行った。得られたサンプルを SDS-PAGE によりタンパク質を分離し、切断された RIP を抗 RIP 抗体で検出し、NEDD4 SV1 あるいは SV3 との結合の有無を確認した。Input では、IP のサンプルで RIP 量、内在性コントロールである tubulin、および、強制発現した NEDD4 SV1 と NEDD4 SV3 のタンパク質量に差がないことを示す。3 回の独立した実験結果のうち、代表的なデータを示す。NEDD4 SV3 は、RIP と結合し、さらに NEDD4 SV1 と比較して、RIP との結合が強かった。

考察

ケロイドは、創傷治癒過程における炎症期、増殖期の遷延がその成因と考えられているが、現時点では、ケロイドの病態は未だ不明な点が多く、有効な治療法は確立されていない。また、日本人のケロイド患者におけるゲノムワイド解析 (GWAS)²⁴で明らかにされた SNP および疾患関連遺伝子 NEDD4 とケロイド発症の病態についての詳細も不明であった。本研究では、ケロイドの慢性炎症の成因、疾患関連遺伝子 NEDD4 とケロイド発症の病態、炎症回路との関連について、NEDD4 のイントロンバリエーションである intronic SNP (rs8032158)の関与に着目して検証した新たな試みである。

【ケロイド疾患関連遺伝子 NEDD4 とリスク多型 SNP】

本研究では、既報の GWAS の結果と同様²⁴、ケロイド患者では、非ケロイド患者と比較して、NEDD4 上の SNP (rs8032158)のリスク多型 (C)を有する頻度が高く、かつ本研究のケロイド検体では顕著に高いことが明らかとなった。そこで、ケロイド患者でもリスク多型をホモ接合型で有する (C/C)ケロイド患者サンプルと、非ケロイド患者の半分以上を占めた、リスク多型の無い (T/T)非ケロイド患者サンプルで比較することで、検証を行っていくこととした。

【ケロイドにおける慢性炎症と炎症回路活性化】

ケロイドは創傷治癒過程に異常をきたした結果生じる。通常の創傷治癒過程では、炎症性サイトカイン IL-6 は皮膚の損傷後速やかに発現し、数日間高発現を続け、その後徐々に低下していく⁴⁸。ケロイド線維芽細胞では、IL-6 およびその受容体が恒常的に高発現していることが報告されている^{7,8,10}。IL-6 は炎症細胞の誘導、活性化に寄与し、線維芽細胞のコラーゲン産生を増加させるため、IL-6 の産生増加が継続すると癬痕形成が強まると考えられている。このため、ケロイドでは、炎症期が遷延し、慢性炎症の病態を呈した結果として増殖期の遷延、異常を引き起こすと考えられる。

ケロイドの慢性炎症は局所的に起こるため、局所の慢性炎症を引き起こす炎症誘導機構である『炎症回路』に注目した¹⁷。すなわち、免疫細胞ではなく表皮角化細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞などの I 型ラーゲン陽性の非免疫系細胞において、NF- κ B と STAT3 が同時に活性化することで、炎症性サイトカイン、ケモカインが相乗的に発現することが明らかとなった¹⁸。

そこで、ケロイド組織内で NF- κ B と STAT3 が同時に活性化しているかをリスク多型 SNP を有するケロイド患者由来 (C/C)のケロイド組織およびリスク多型 SNP の無い

非ケロイド患者由来 (T/T)の正常皮膚組織の免疫組織学的染色で確認した。結果、ケロイド患者由来 (C/C)のケロイド組織内では、NF- κ B と STAT3 の両者がリン酸化した細胞が表皮角化細胞および線維芽細胞に存在すること、非ケロイド患者由来 (T/T)の正常皮膚組織と比較して NF- κ B と STAT3 のリン酸化した細胞の割合が有意に高いことが示された。

次に、*in vitro* の条件において、初代培養後の表皮角化細胞、線維芽細胞に対して、サイトカイン刺激によって炎症性サイトカイン活性の増幅が見られるかを検証した。ケロイド組織由来 (C/C)および、正常皮膚組織由来 (T/T)のいずれの細胞もサイトカイン刺激によって炎症性サイトカイン、ケモカイン活性の増幅が見られたが、ケロイド組織由来 (C/C)の細胞でより強く活性化することが明らかとなった。そこで、ケロイドおよび正常皮膚組織でケロイド疾患関連遺伝子 NEDD4 の発現の差が影響していることを考え、実験を進めることとした。

【ケロイド疾患関連遺伝子 NEDD4 と炎症回路の制御機構】

ケロイド疾患関連遺伝子 NEDD4 はユビキチンリガーゼ E3 として知られている遺伝子である^{34,49,50}。ユビキチン化は真核生物に存在するタンパク質翻訳後修飾の一つである。ユビキチン化修飾系の中で、ユビキチンリガーゼ E3 は標的タンパク質の認識を司る酵素サブユニットある。ユビキチンリガーゼはこれまでに、ヒトゲノム中に数百以上（全ゲノムの数%以上）存在していることが知られており、その構造によって、HECT (homologous to E6-AP COOH terminus)型、RING (really interesting new gene)型、そして U-box 型に分類される。NEDD4 は HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼとして、さまざまな細胞機能に関わることが知られており、がん細胞における細胞生存決定、免疫反応、炎症などにおいて重要な役割を果たしていることが報告されている^{51,52}。一方で、ケロイドにおける NEDD4 の詳細な機構については不明であった。

ヒト NEDD4 には NCBI database 上、7つの転写バリエントがこれまでに報告されており、そのうちの6つがタンパク質をコードするスプライスバリエント (splice variant ; SV)である。すべての SV で C 末端の HECT ドメインが共通となっており、それぞれ C2 ドメインを含む N 末端にバリエントが生じる構造となっている³⁴。主なバリエントである SV1 (NM_006154)以外のタンパク質の機能については不明な点が多い。

ケロイド組織 (C/C)および正常皮膚組織 (T/T)で NEDD4 の全バリエントのタンパク質レベルおよび mRNA レベルの発現に有意な差が見られなかったことから、NEDD4 の各バリエントに差が生じている可能性、NEDD4 のイントロンバリエントである intronic SNP (rs8032158 ; 15 番染色体 Position 55,902,679)が選択的スプライシングに影響を及ぼしている可能性を考えた。そこで、NEDD4 の各 SV の発現を検証していくこ

とした。

結果、NEDD4 SV3 の mRNA 発現がケロイド組織 (C/C)では正常皮膚組織 (T/T)と比較して有意に高くなっていることが示された。NEDD4 SV1 は、ケロイド組織 (C/C)、正常皮膚組織 (T/T)ともに高発現を認め、両者に有意差は見られなかった。また、タンパク質レベルにおいても、ケロイド組織 (C/C)では、正常皮膚組織 (T/T)と比較して NEDD4 SV3 が有意に高発現していることが示された。

NEDD4 の炎症回路に対する機能解析の結果、NEDD4 は炎症回路を正に制御することが *in vitro* および *in vivo* での実験により明らかとなったが、いずれも NEDD4 の全バリエーションのノックダウンによる検証結果である。そこで、リスク多型 SNP を有するケロイド組織 (C/C)で高発現を認めた NEDD4 SV3 の機能解析を行った。結果、NEDD4 SV3 は、炎症回路の正の制御遺伝子であること、NF- κ B 経路の活性化に作用すること、NF- κ B 経路において、TNF α のアダプター分子である RIP の活性化に関与することで、NF- κ B 経路の中心的な分子である p65 のリン酸化を活性化することが明らかとなった。また、NEDD4 SV3 は、NEDD4 SV1 と比較して RIP との結合が強いことも明らかとなった。今後、NEDD4 SV3 のより詳細な作用機序を解明することで、NEDD4 SV3 の発現の高いケロイド組織において、炎症を制御する治療ターゲットとなり得る可能性が示唆された。

【NEDD4 のリスク多型 SNP rs8032158 が選択的スプライシングに及ぼす影響】

ケロイド患者でもリスク多型を有する (C/C)患者では、リスク多型の無い (T/T)非ケロイド患者と比較して、NEDD4 SV3 の発現が高くなっていることが明らかとなった。リスク多型 SNP rs8032158 と 6 つのスプライスバリエーションの位置関係を示す(図 32)。rs8032158 は、NEDD4 の全 30 エクソンのうち、エクソン 6 とエクソン 7 のイントロン部位に存在する。注目すべき点として、エクソン 6 とエクソン 7 のいずれも有するスプライスバリエーションは SV3 と SV4 のみであることが挙げられる。mRNA レベルにおいて、ケロイド組織を含む皮膚組織においては、SV4 の発現は非常に低いことが明らかとなった。したがって、ケロイド患者で多く見られたリスク多型 C/C の場合、何らかの選択的スプライシングが働き、ケロイド組織では SV3 が重要な働きをしている可能性が考えられる。rs8032158 SNP は、intronic SNP であるため、mRNA 前駆体の選択的スプライシングに関与していることが考えられる⁵³⁻⁵⁵。NEDD4 のスプライシング制御機構を研究していくことで、SNP rs8032158 のリスク多型により NEDD4 SV3 の発現が増える機序解明につながると考えられる。

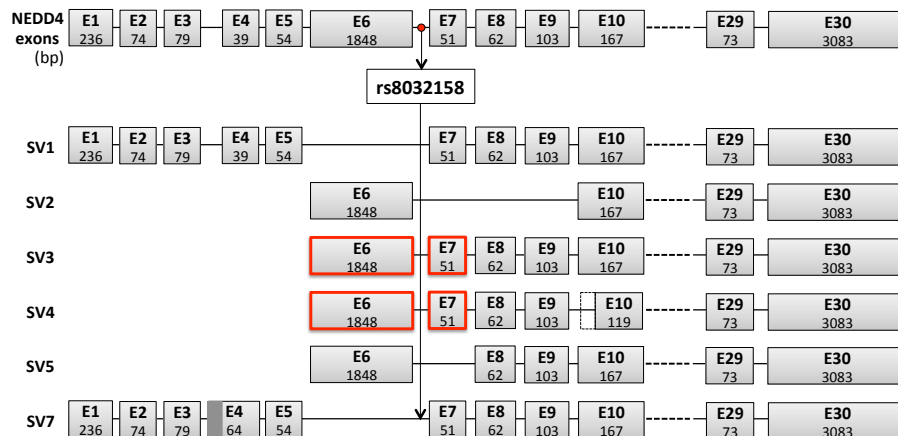


図 32. NEDD4 の 6 つのスパイスバリエーションと rs8032158 SNP の位置関係

rs8032158 SNP は、NEDD4 の全 30 エクソンのうち、エクソン 6 (E6) とエクソン 7 (E7) 間のイントロン部位 (E6 により近位) に存在する。E6 と E7 のいずれも有するスパイスバリエーションは SV3 と SV4 のみである。

【ケロイドの新たな診断・治療法】

本研究では、ケロイド関連遺伝子 NEDD4 SV3 の高発現によって、局所的な慢性炎症が引き起こされ、ケロイド発症につながる起因が示された(図 33)。NEDD4 のスパイスバリエーションの解析により、今後のケロイド研究において、ケロイドの診断マーカーとしての有用性や、治療における外科的治療の可否や将来における治療標的となる可能性が示唆された。

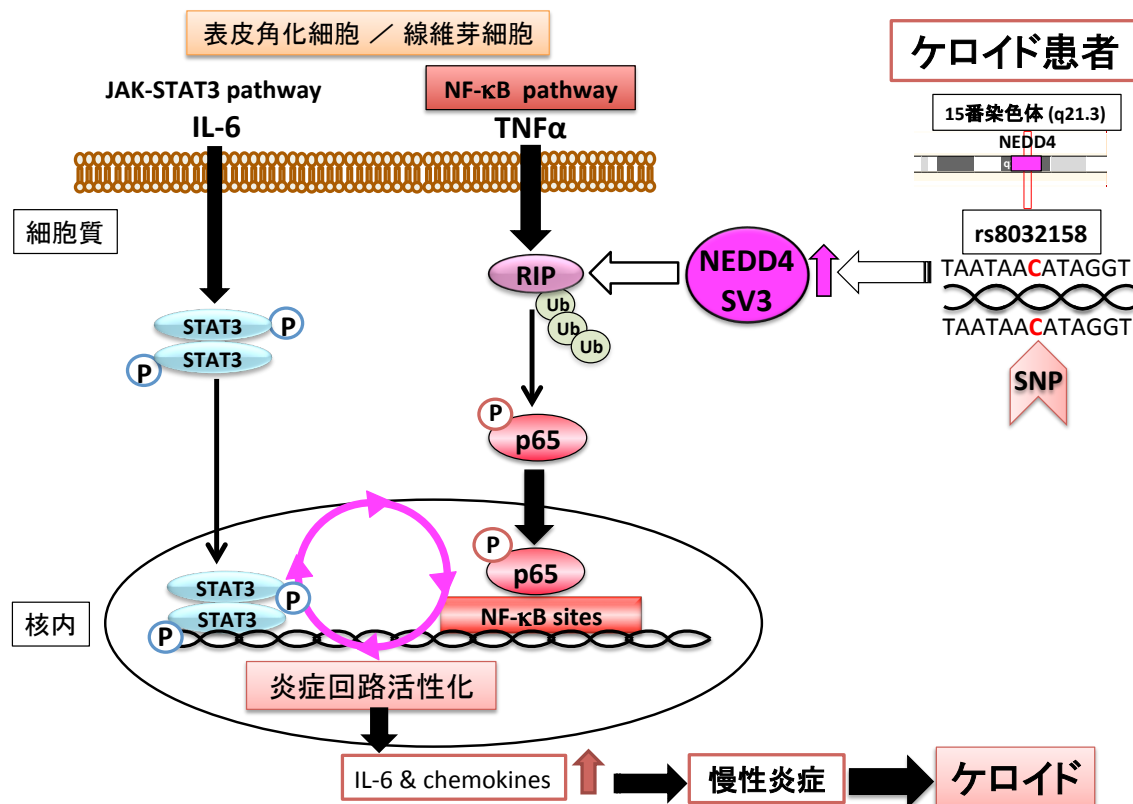


図 33. NEDD4 によるケロイドの炎症制御機構のシェーマ

(SV: Splice variant, Ub: Ubiquitin)

15 番染色体の遺伝子 NEDD4 上の rs8032158 SNP においてリスク多型 (C/C) を有することにより表皮角化細胞や線維芽細胞において、NEDD4 SV3 の発現が高まる。炎症刺激が加わることで、NEDD4 SV3 が細胞質内で RIP の活性化に関与し、NF-κB 経路を活性化する。その結果、炎症回路活性化につながり、IL-6 をはじめとした炎症性サイトカイン、ケモカインの産生が亢進し、ケロイドにおける慢性炎症病態を惹起すると考えられる。

【本研究の問題点】

我々の検討では、NEDD4 のリスク多型 SNP を有する (C/C) ケロイド患者由来のケロイド皮膚組織ではリスク多型 SNP の無い (T/T) 非ケロイド患者由来の正常皮膚組織と比べて NEDD4 のスプライスバリエント 3 (SV3) が高発現しており、NEDD4 のリスク多型 SNP の存在と NEDD4 SV3 の関与が考えられたが、その詳細なメカニズムの解明には至っていない。さらに、リスク多型 SNP をヘテロ接合型で有する (C/T) ケロイド患者及び非ケロイド患者や、リスク多型 SNP の無い (T/T) ケロイド患者、本研究の検体には存在しなかったが、リスク多型 SNP をホモ接合型で有する (C/C) 非ケロイド

患者と比較することが必要であると考え。また、肥厚性瘢痕の患者や他の皮膚炎症性疾患の患者検体とも比較することで、rs8032158 SNP と NEDD4 SV3 の関係性、他疾患の炎症にも関与するかなど、さらなる研究が広がっていくと考えられる。

本研究で得られた検体では、ケロイドが手術適応となる症例に限られることと同時に、対照となる正常皮膚組織の確保がケロイド以外の手術治療を行う患者由来であり、症例数が少なかったこと、これまでケロイドを発症したことがない患者で、ケロイド体質など何らかの素因を有している可能性を否定できないことも考えられる。手術治療を行わない患者であっても、ケロイド患者および健常人から血液や口腔粘膜組織など幅広い検体を確保していき、今後、さらなる検討を行っていくことが必要である。

また、ケロイドの最近の研究では、ケロイド発症には、遺伝的要因のみならず、物理的刺激⁵⁶などの局所因子と妊娠⁵⁷や高血圧⁵⁸などの全身因子が複雑に絡み合って発症する、多因子疾患であることが報告されている⁴。数ある原因の中でも、「ケロイド体質」と考えられる患者は特に重症化しやすい。ケロイド体質を考える上では、こうした多因子の影響についても考慮すべき点である。

今後、ケロイドにおける NEDD4 の制御機構を解明していくことで、ケロイド体質の診断マーカーの開発や治療ターゲットとして創薬化の可能性も期待される。

総括および結論

【本研究から得られた新知見】

- NEDD4 のリスク多型 SNP rs8032158 を有する (C/C)ケロイド組織では、表皮角化細胞、線維芽細胞において、炎症回路の活性化が存在し、NEDD4 のリスク多型 SNP の無い (T/T)正常皮膚組織由来の表皮角化細胞、線維芽細胞と比較して、*in vitro* の条件下でより強く炎症回路が活性化した。
- ケロイド疾患関連遺伝子・NEDD4 は NF- κ B 経路を介して炎症回路を正に制御する遺伝子である。
- NEDD4 のリスク多型 SNP を有する (C/C)ケロイド患者由来のサンプルでは、NEDD4 のリスク多型 SNP の無い (T/T)非ケロイド患者由来のサンプルに比べて、NEDD4 のスプライシングバリエント 3 (SV3) の発現が mRNA レベル、タンパク質レベルのいずれにおいても有意に高かった。
- NEDD4 SV3 は NF- κ B 経路において、RIP の活性化に関与し、p65 ser536 のリン酸化に働くことによって炎症回路を正に制御している。

【新知見の意義】

現時点では、ケロイドの病態は未だ不明な点が多く、有効な治療法は確立されていない。過去の論文において、ケロイドと炎症回路の関連について報告したものはない。また、日本人のケロイド患者の GWAS で明らかにされた SNP および疾患関連遺伝子 NEDD4 とケロイド発症の病態についての詳細も不明であった。

本研究では、ケロイドの慢性炎症の成因、疾患関連遺伝子 NEDD4 とケロイド発症の病態、炎症回路との関連について、NEDD4 の SNP (rs8032158)の関与に着目して検証した新たな試みである。

NEDD4 のリスク多型 SNP を有する (C/C)ケロイド患者と NEDD4 のリスク多型 SNP の無い (T/T)非ケロイド患者を比較検討することで以下のことが明らかとなった。

リスク多型 SNP を有する (C/C)ケロイドサンプルでは、NEDD4 SV3 の発現が高くなっていること、皮膚組織の非免疫細胞である表皮角化細胞、線維芽細胞において、炎症回路の活性化がより強いこと、その原因として、NEDD4 SV3 が NF- κ B 経路の RIP 分子の活性化に関与することで NF- κ B 経路を介して炎症回路を正に制御していることを発見した。

以上のことから、ケロイドの慢性炎症病態が惹起され、ケロイドを発症しやすくなることが示唆された。すなわち、ケロイド体質を説明する一つの原因と考えられた。

【今後の課題と展開】

今後は、患者検体を増やしてさらなる解析を行い、NEDD4 SV3 がケロイド体質の診断マーカーや病態の重症度マーカーとして有用であるかの検討を行いたいと考えている。また、NEDD4 の SNP (rs8032158) によるスプライシング制御機構や NEDD4 SV3 による炎症回路のより詳細な分子メカニズムの解析、さらには他の皮膚炎症性疾患における rs8032158 SNP の genotype や NEDD4 SV3 の発現の比較検討を行うことで、ケロイド体質の診断マーカーや病態の重症度マーカーとしての可能性と治療応用を目指した研究進展が望まれる。

謝辞

本研究の機会をくださり、ご指導・ご協力・ご支援いただいた北海道大学大学院医学研究科機能再生医学講座形成外科学分野・山本有平教授、古川洋志准教授、舟山恵美講師、村尾尚規助教、大澤昌之助教、同教室員・教室秘書の皆様、北海道大学歯学部歯学研究科・林利彦准教授、および福島県立医科大学形成外科学講座・小山明彦教授に深く感謝申し上げます。

また、本研究全般にわたりご指導ご鞭撻賜りました北海道大学遺伝子病制御研究所・分子神経免疫学の村上正晃教授に謝意を表します。

最後に、手術検体の取得をはじめ本研究を遂行するにあたり、ご協力・ご援助頂きました各施設の諸先生、スタッフの方々ならびに北海道大学遺伝子病制御研究所・分子神経免疫学のすべての皆様に心より御礼申し上げます。

(順不同)

引用文献

- 1 Tredget, E. E. The molecular biology of fibroproliferative disorders of the skin: potential cytokine therapeutics. *Ann. Plast. Surg.* 33, 152-154 (1994).
- 2 Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. & Longaker, M. T. Wound repair and regeneration. *Nature* 453, 314-321 (2008).
- 3 Shih, B., Garside, E., McGrouther, D. A. & Bayat, A. Molecular dissection of abnormal wound healing processes resulting in keloid disease. *Wound Repair Regen.* 18, 139-153 (2010).
- 4 Ogawa, R. Keloid and hypertrophic scars are the result of chronic inflammation in the reticular dermis. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 606 (2017).
- 5 Marneros, A. G. & Krieg, T. Keloids-clinical diagnosis, pathogenesis, and treatment options. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 2, 905-913 (2004).
- 6 Chen, W., Fu, X., Sun, X., Sun, T., Zhao, Z. & Sheng, Z. Analysis of differentially expressed genes in keloids and normal skin with cDNA microarray. *J. Surg. Res.* 113, 208-216 (2003).
- 7 Ghazizadeh, M., Tosa, M., Shimizu, H., Hyakusoku, H. & Kawanami, O. Functional implications of the IL-6 signaling pathway in keloid pathogenesis. *J. Invest. Dermatol.* 127, 98-105 (2007).
- 8 Uitto, J. IL-6 signaling pathway in keloids: a target for pharmacologic intervention? *J. Invest. Dermatol.* 127, 6-8 (2007).
- 9 Dong, X., Mao, S. & Wen, H. Upregulation of proinflammatory genes in skin lesions may be the cause of keloid formation (Review). *Biomed. Rep.* 1, 833-836 (2013).
- 10 Tosa, M., Watanabe, A. & Ghazizadeh, M. IL-6 Polymorphism and Susceptibility to Keloid Formation in a Japanese Population. *J. Invest. Dermatol.* 136, 1069-1072 (2016).
- 11 Harrison, C. A. & MacNeil, S. The mechanism of skin graft contraction: an update on current research and potential future therapies. *Burns* 34, 153-163 (2008).
- 12 Butler, P. D., Ly, D. P., Longaker, M. T. & Yang, G. P. Use of organotypic coculture to study keloid biology. *Am. J. Surg.* 195, 144-148 (2008).
- 13 van den Broek, L. J., Limandjaja, G. C., Niessen, F. B. & Gibbs, S. Human hypertrophic and keloid scar models: principles, limitations and future challenges from a tissue engineering perspective. *Exp. Dermatol.* 23, 382-386 (2014).
- 14 Durani, P. & Bayat, A. Levels of evidence for the treatment of keloid disease. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 61, 4-17 (2008).

- 15 Berman, B. & Flores, F. The treatment of hypertrophic scars and keloids. *Eur. J. Dermatol.* 8, 591-595 (1998).
- 16 Roques, C. & Teot, L. The use of corticosteroids to treat keloids: a review. *Int. J. Low. Extrem. Wounds* 7, 137-145 (2008).
- 17 Ogura, H., Murakami, M., Okuyama, Y., Tsuruoka, M., Kitabayashi, C., Kanamoto, M., Nishihara, M., Iwakura, Y. & Hirano, T. Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction. *Immunity* 29, 628-636 (2008).
- 18 Murakami, M., Okuyama, Y., Ogura, H., Asano, S., Arima, Y., Tsuruoka, M., Harada, M., Kanamoto, M., Sawa, Y., Iwakura, Y., Takatsu, K., Kamimura, D. & Hirano, T. Local microbleeding facilitates IL-6- and IL-17-dependent arthritis in the absence of tissue antigen recognition by activated T cells. *J. Exp. Med.* 208, 103-114 (2011).
- 19 Murakami, M., Harada, M., Kamimura, D., Ogura, H., Okuyama, Y., Kumai, N., Okuyama, A., Singh, R., Jiang, J. J., Atsumi, T., Shiraya, S., Nakatsuji, Y., Kinoshita, M., Kohsaka, H., Nishida, M., Sakoda, S., Miyasaka, N., Yamauchi-Takahara, K. & Hirano, T. Disease-association analysis of an inflammation-related feedback loop. *Cell Rep.* 3, 946-959 (2013).
- 20 Kelly, A. P. Keloids. *Dermatol. Clin.* 6, 413-424 (1988).
- 21 Marneros, A. G., Norris, J. E., Olsen, B. R. & Reichenberger, E. Clinical genetics of familial keloids. *Arch. Dermatol.* 137, 1429-1434 (2001).
- 22 Van Den Brenk, H. A. & Minty, C. C. Radiation in the management of keloids and hypertrophic scars. *Br. J. Surg.* 47, 595-605 (1960).
- 23 Shih, B. & Bayat, A. Genetics of keloid scarring. *Arch. Dermatol. Res.* 302, 319-339 (2010).
- 24 Nakashima, M., Chung, S., Takahashi, A., Kamatani, N., Kawaguchi, T., Tsunoda, T., Hosono, N., Kubo, M., Nakamura, Y. & Zembutsu, H. A genome-wide association study identifies four susceptibility loci for keloid in the Japanese population. *Nat. Genet.* 42, 768-771 (2010).
- 25 Ogawa, R., Watanabe, A., Than Naing, B., Sasaki, M., Fujita, A., Akaishi, S., Hyakusoku, H. & Shimada, T. Associations between keloid severity and single-nucleotide polymorphisms: importance of rs8032158 as a biomarker of keloid severity. *J. Invest. Dermatol.* 134, 2041-2043 (2014).
- 26 Zhu, F., Wu, B., Li, P., Wang, J., Tang, H., Liu, Y., Zuo, X., Cheng, H., Ding, Y., Wang, W., Zhai, Y., Qian, F., Wang, W., Yuan, X., Wang, J., Ha, W., Hou, J., Zhou, F., Wang, Y., Gao, J., Sheng, Y., Sun, L., Liu, J., Yang, S. & Zhang, X. Association study

- confirmed susceptibility loci with keloid in the Chinese Han population. *PLoS One* 8, e62377 (2013).
- 27 Velez Edwards, D. R., Tsosie, K. S., Williams, S. M., Edwards, T. L. & Russell, S. B. Admixture mapping identifies a locus at 15q21.2-22.3 associated with keloid formation in African Americans. *Hum. Genet.* 133, 1513-1523 (2014).
 - 28 Tucci-Viegas, V. M., Hochman, B., Franca, J. P. & Ferreira, L. M. Keloid explant culture: a model for keloid fibroblasts isolation and cultivation based on the biological differences of its specific regions. *Int. Wound J.* 7, 339-348 (2010).
 - 29 Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. & Fusenig, N. E. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106, 761-771 (1988).
 - 30 Boukamp, P., Popp, S., Altmeyer, S., Hulsen, A., Fasching, C., Cremer, T. & Fusenig, N. E. Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT. *Genes Chromosomes Cancer* 19, 201-214 (1997).
 - 31 Atsumi, T., Ishihara, K., Kamimura, D., Ikushima, H., Ohtani, T., Hirota, S., Kobayashi, H., Park, S. J., Saeki, Y., Kitamura, Y. & Hirano, T. A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis. *J. Exp. Med.* 196, 979-990 (2002).
 - 32 Lee, J., Nakagiri, T., Oto, T., Harada, M., Morii, E., Shintani, Y., Inoue, M., Iwakura, Y., Miyoshi, S., Okumura, M., Hirano, T. & Murakami, M. IL-6 amplifier, NF-kappaB-triggered positive feedback for IL-6 signaling, in grafts is involved in allogeneic rejection responses. *J. Immunol.* 189, 1928-1936 (2012).
 - 33 Lee, J., Nakagiri, T., Kamimura, D., Harada, M., Oto, T., Susaki, Y., Shintani, Y., Inoue, M., Miyoshi, S., Morii, E., Hirano, T., Murakami, M. & Okumura, M. IL-6 amplifier activation in epithelial regions of bronchi after allogeneic lung transplantation. *Int. Immunol.* 25, 319-332 (2013).
 - 34 Boase, N. A. & Kumar, S. NEDD4: The founding member of a family of ubiquitin-protein ligases. *Gene* 557, 113-122 (2015).
 - 35 Richmond, A. Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 664-674 (2002).
 - 36 Christian, F., Smith, E. L. & Carmody, R. J. The Regulation of NF-kappaB Subunits by Phosphorylation. *Cells* 5, 12 (2016).
 - 37 Moynagh, P. N. The NF-kappaB pathway. *J. Cell Sci.* 118, 4589-4592 (2005).
 - 38 Hoffmann, A., Natoli, G. & Ghosh, G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB

- signaling module. *Oncogene* 25, 6706-6716 (2006).
- 39 Gilmore, T. D. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25, 6680-6684 (2006).
- 40 Chen, Z. J. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat. Cell Biol.* 7, 758-765 (2005).
- 41 Iwai, K. & Tokunaga, F. Linear polyubiquitination: a new regulator of NF-kappaB activation. *EMBO Rep.* 10, 706-713 (2009).
- 42 Wertz, I. E. & Dixit, V. M. Signaling to NF-kappaB: regulation by ubiquitination. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a003350 (2010).
- 43 Harhaj, E. W. & Dixit, V. M. Deubiquitinases in the regulation of NF-kappaB signaling. *Cell Res.* 21, 22-39 (2011).
- 44 Festjens, N., Vanden Berghe, T., Cornelis, S. & Vandenabeele, P. RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. *Cell Death Differ.* 14, 400-410 (2007).
- 45 Ofengeim, D. & Yuan, J. Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 727-736 (2013).
- 46 Humphries, F., Yang, S., Wang, B. & Moynagh, P. N. RIP kinases: key decision makers in cell death and innate immunity. *Cell Death Differ.* 22, 225-236 (2015).
- 47 Witt, A. & Vucic, D. Diverse ubiquitin linkages regulate RIP kinases-mediated inflammatory and cell death signaling. *Cell Death Differ.* 24, 1160-1171 (2017).
- 48 Profyris, C., Tziotzios, C. & Do Vale, I. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics Part I. The molecular basis of scar formation. *J. Am. Acad. Dermatol.* 66, 1-10; quiz 11-12 (2012).
- 49 Anan, T., Nagata, Y., Koga, H., Honda, Y., Yabuki, N., Miyamoto, C., Kuwano, A., Matsuda, I., Endo, F., Saya, H. & Nakao, M. Human ubiquitin-protein ligase Nedd4: expression, subcellular localization and selective interaction with ubiquitin-conjugating enzymes. *Genes Cells* 3, 751-763 (1998).
- 50 Ingham, R. J., Gish, G. & Pawson, T. The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene* 23, 1972-1984 (2004).
- 51 Ye, X., Wang, L., Shang, B., Wang, Z. & Wei, W. NEDD4: a promising target for cancer therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* 14, 549-556 (2014).
- 52 Zou, X., Levy-Cohen, G. & Blank, M. Molecular functions of NEDD4 E3 ubiquitin ligases in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1856, 91-106 (2015).
- 53 Matlin, A. J., Clark, F. & Smith, C. W. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 386-398 (2005).

- 54 Wang, Z. & Burge, C. B. Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA* 14, 802-813 (2008).
- 55 Xiong, H. Y., Alipanahi, B., Lee, L. J., Bretschneider, H., Merico, D., Yuen, R. K., Hua, Y., Gueroussov, S., Najafabadi, H. S., Hughes, T. R., Morris, Q., Barash, Y., Krainer, A. R., Jovic, N., Scherer, S. W., Blencowe, B. J. & Frey, B. J. RNA splicing. The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. *Science* 347, 1254806 (2015).
- 56 Ogawa, R., Okai, K., Tokumura, F., Mori, K., Ohmori, Y., Huang, C., Hyakusoku, H. & Akaishi, S. The relationship between skin stretching/contraction and pathologic scarring: the important role of mechanical forces in keloid generation. *Wound Repair Regen.* 20, 149-157 (2012).
- 57 Park, T. H. & Chang, C. H. Keloid recurrence in pregnancy. *Aesthetic Plast. Surg.* 36, 1271-1272 (2012).
- 58 Arima, J., Huang, C., Rosner, B., Akaishi, S. & Ogawa, R. Hypertension: a systemic key to understanding local keloid severity. *Wound Repair Regen.* 23, 213-221 (2015).