

学 位 論 文 題 名

ケロイド由来線維芽細胞における細胞増殖因子
の影響に関する研究

学位論文内容の要旨

【緒言】

肥厚性瘢痕とケロイドは、ともに線維芽細胞および細胞外基質の増生を主体とする皮膚の良性腫瘍性疾患である。両疾患の臨床症状は酷似しているが、治療に対する抵抗性や再発の程度には大きな相違がある。ケロイドの発生機序や分子生物学的性質については未だ解明されていない。本研究では、増殖因子刺激に対する細胞増殖の動態を検討し、細胞内増殖刺激伝達に関与するタンパク質として注目されているMAPキナーゼのリン酸化についての解析を行った。

【材料と方法】

Informed consentを得た後に摘出したケロイド5例、肥厚性瘢痕5例、および正常皮膚5例の検体を用いて線維芽細胞の初代培養を行った。継代数5～8代の各々の細胞を 5×10^4 cells/dishになるよう播種し、24時間スタベーションを行った後、EGF 10, PDGF 10, TGF- β 1, EGF 10 + TGF- β 1, PDGF 10 + TGF- β 1ng/mlで刺激した。96時間後改良型ノイバウアー細胞計数板を用いて細胞を計数した。得られたデータはunpaired t testを用いて検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

MAPK2は細胞増殖に深く関与している点より、MAPK2のリン酸化についてウェスタンブロット法による解析を行った。dishでサブコンフルエントになるよう細胞を培養し、72時間FBS(-)DMEMでスタベーションを行った。その後、EGF 20, PDGF 20, TGF- β 5, EGF 20 + TGF- β 5, PDGF 20 + TGF- β 5ng/mlを用いて刺激した。刺激後special RIPA bufferで反応させ、細胞を可溶化しタンパク質を抽出した。抽出したタンパク質はBradford法により定量し、10% SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。分離されたタンパク質をニトロセルロース膜に転写し、スキムミルクでブロックし、1次抗体として1:10000 anti-MAP Kinase 2抗体、2次抗体として1:10000 HRP anti-mouse IgG抗体で反応させた後、抗体との特異的結合はECL法により検出を行い、MAP Kinaseのリン酸化について解析を行った。

【結果】

正常皮膚線維芽細胞（以下NSF）に対し増殖因子刺激後96時間の細胞数を検討した結果は、対照群では 8.18×10^4 で、EGF 11.98×10^4 , PDGF 10.86×10^4 , TGF- β 10.80×10^4 Cells/dishであった。EGF刺激による細胞の増殖は対照群との間に有意差が認められたが、PDGF, TGF- β では有意差がなかった。TGF- β との同時刺激の場合、EGF単独刺激では細胞数が 11.98×10^4 であり、EGF + TGF- β 刺激による細胞数は 9.64×10^4 Cells/dishで、両者間には有意差が認められた。PDGF刺激による細胞数は 10.86×10^4 、PDGF + TGF- β では 9.62×10^4 Cells/dishであり、両者間には統計学的有意差は認められなかった。

肥厚性瘢痕由来線維芽細胞（以下HDF）における結果は、対照群 10.10×10^4 、EGF

13.18x10⁴, PDGF 12.70x10⁴, TGF-β 12.18x10⁴ Cells/dishであり、EGF, PDGFの刺激で対照群に比べ有意差が認められたが、TGF-β刺激では有意差はなかった。TGF-βとの同時刺激による細胞数は、EGF単独刺激では13.18x10⁴、EGF + TGF-β刺激では10.62x10⁴、また、PDGF刺激では12.70x10⁴、PDGF + TGF-β刺激では10.54x10⁴ Cells/dishであった。TGF-βとの同時刺激による細胞数にはEGF, PDGF単独刺激時との間に有意差は認められなかった。

ケロイド由来線維芽細胞（以下KDF）における結果は、対照群で9.66x10⁴、EGF 13.62x10⁴、PDGF 13.16x10⁴、TGF-β 10.54x10⁴ Cells/dishであり、EGF, PDGFの刺激時のみ対照群に比べ有意差が認められた。TGF-βとの同時刺激における細胞数は、EGF単独では13.62x10⁴、EGF + TGF-β刺激で17.40x10⁴ Cells/dishであり、両者間に統計学的有意差が認められた。また、PDGFによる刺激後の細胞数は13.16x10⁴、PDGF + TGF-β刺激では11.04x10⁴ Cells/dishで、両者間に有意差はなかった。

NSF, HDF, KDFをEGF, PDGF, TGF-βで刺激し、MAPキナーゼのリン酸化について検討を行った結果、EGF, PDGF, TGF-β単独刺激では、NSF, HDF, KDFともに各々の対照群に比べMAPキナーゼの強いリン酸化が認められた。NSFとHDFにおけるEGFとTGF-βの同時刺激による各細胞のMAPキナーゼのリン酸化はEGF単独刺激時より抑制されていた。一方、KDFではEGFとTGF-βの同時刺激によりEGF単独刺激より強いリン酸化が認められた。PDGFとTGF-βの同時刺激の結果は、NSF, HDF, KDFともにPDGF単独刺激時と同程度のリン酸化が認められ、TGF-βによる影響は認められなかった。

【考察】

細胞増殖因子刺激による細胞増殖信号の伝達系のうち、EGFやPDGFは、チロシンキナーゼ型の受容体を介して、細胞膜にあるその直下のGDP-RasをGTP-Rasに変換することによってRasを活性化する。このRasの活性化により下流のRaf, MEK, MAPキナーゼが順次にリン酸化され信号を伝達することが知られている。活性化されたMAPキナーゼは、さらに細胞核内のDNAに作用し、細胞の増殖や分化、タンパク質の合成など多様な細胞活動が行われる。

EGFによる細胞増殖促進およびMAPキナーゼのリン酸化促進が報告されており、本実験においてもEGF刺激によりNSF, HDF, KDF共に細胞増殖およびMAPキナーゼのリン酸化が認められた。一方、PDGFは、EGFと同じチロシンキナーゼ型受容体を介して細胞増殖信号を伝達していることが報告されている。KDFではPDGF受容体の親和性がNSFより大きいとの報告もあるが、本研究におけるPDGFによる細胞増殖刺激の結果ではNSF, HDFと比較して有意な増殖促進は認められなかった。これらの結果は、PDGFペプチドが分解されやすく、刺激作用の持続時間が短いため一定した結果が出にくいことに起因するものと考えられる。TGF-βに対する反応は、KDFのDNA合成をNSFに比べ促進するとの報告がある一方、NSFと同程度の増殖反応を示すとの報告もあり、見解が異なっている。本実験では、TGF-β単独刺激による細胞増殖ではKDFとNSFの間に有意差が認められず、またMAPキナーゼのリン酸化にも差がなかった。従って本実験の結果からも、TGF-βは、用いた濃度や細胞の種類および株、培養の条件、細胞の分化の程度などによってその反応が異なるためと推定され、その明確な機序は現在のところ明らかではない。

細胞周期の停止期のヒト線維芽細胞をEGFとTGF-βで同時に刺激した場合、EGF単独の刺激よりDNA合成が促進されること、またEGF刺激前後にTGF-βを加えた場合にはDNA合成が抑制されることが報告されている。この結果は、同一細胞でもEGF刺激による信号に干渉するTGF-βの信号伝達経路が複数存在することを示唆している。今回、NSFやHDFではKDFと異なり、EGF刺激による増殖信号がTGF-βを添加することにより抑制されることが示された。これらの相反する結果はセリン・スレオニン系の信号伝達とチロシンキナーゼ系の信号伝達の相互作用による複雑な調節機構が存在することを示唆し、これらの機序を解明することによりケロイドの成因をより明確にすることができるものと思われる。

【結語】

本研究により，KDFではNSFやHDFと異なり，EGF刺激による細胞増殖およびMAPキナーゼリン酸化がTGF- β を添加することによりさらに促進されることが明かになり，KDFにおける細胞増殖信号伝達の調節機構はNSF, HDFと異なることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大河原 章
副 査 教 授 葛 巻 暹
副 査 教 授 杉 原 平 樹

学 位 論 文 題 名

ケロイド由来線維芽細胞における細胞増殖因子 の影響に関する研究

ケロイドと肥厚性瘢痕は、共に線維芽細胞および細胞外基質の増生を主体とする皮膚の良性腫瘍性疾患である。両疾患は臨床的には類似しているが、治療に対する抵抗性や再発の程度に大きな差異がある。

本研究は両疾患ならびに正常皮膚から線維芽細胞を得、培養株を樹立し、細胞増殖関連因子の刺激に対して、それぞれの細胞の増殖動態を検討すると共に、細胞内増殖刺激伝達に関与するタンパク質として注目されているMAPキナーゼのリン酸化についての解析をおこなったものである。

ケロイド、肥厚性瘢痕各5例と正常皮膚5例の検体から線維芽細胞を分離し、5～8代継代の各々の細胞を培養、24時間スターベーションした後、増殖関連因子であるEGF10, PDGF10ならびにTGF- β 1を単独、またはEGF10+TGF β 1, PDGF10+TGF β 1で刺激し、96時間後に細胞数を計測した。

またMAPK2のリン酸化についてウエスタンブロット法により解析した。細胞をサブコンフルエントに培養し、72時間FBS(-)DMBAでスターベーションし、その後増殖関連因子で刺激し、刺激後タンパク質を抽出した。抽出したタンパク質を電気泳動した後、一次抗体、二次抗体と反応させ、MAPキナーゼのリン酸化を解析した。

正常皮膚線維芽細胞(NSF)では、EGF単独刺激による細胞の増殖は、対照群との間に有意な亢進が認められたが、PDGF, TGF- β 単独刺激では有意差はなかった。EGFとTGF- β とで同時に刺激すると、細胞増殖はEGF単独刺激時より抑制された。しかしPDGF+TGF- β の同時刺激では有意の差はなかった。

肥厚性瘢痕由来線維芽細胞(HDF)では、EGF, PDGF共に、対照に比べ有意の増殖を示したが、TGF β では有意な差異はなかった。TGF- β との同時刺激においても、単独刺激群との間に有意な差異はなかった。

ケロイド由来線維芽細胞(KDF)では、EGF, PDGFの単独刺激で細胞の有意な増殖亢進が認められた。また、EGF+TGF β においては有意な増殖亢進が

みられたが、PDGF+TGF β では有意な増殖は認められなかった。NSF, HDF, KDFをEGF, PDGF, TGF β で刺激し、MAPキナーゼのリン酸化について検討した結果は、それぞれの因子が単独で強いリン酸化を示した。しかし、NSFとHDSにおいては、EGFとTGF β の同時刺激におけるMAPキナーゼのリン酸化は、EGF単独刺激時より抑制された。一方KDFでは、EGFとTGF β の同時刺激でEGF単独刺激時に比べ、より強いリン酸化が認められた。PDGFとTGF β の同時刺激では、NSF, HDF, KDF共にPDGF単独刺激時と同程度のリン酸化が認められ、TGF β の影響はなかった。

公開発表に際し、副査の葛巻教授より、1) ケロイド局所での増殖因子の産生に関する報告、2) 細胞外基質の動態、3) ケロイド由来線維芽細胞と正常皮膚由来線維芽細胞との異同、杉原教授からは1) 増殖因子の作用機序の詳細、2) ケロイド形成の遺伝的背景究明の方法論、また主査の大河原より、1) ケロイド患者の正常皮膚由来線維芽細胞の増殖因子に対する反応性、2) 増殖因子の濃度の選択根拠等についての質問があった。申請者は最新の情報を混じえ、概ね適切な解答をなし得た。

以上本研究は、KDFではNSFやHDFと異なり、EGF刺激による細胞の増殖およびMAPキナーゼのリン酸化がTGF β を添加することにより更に亢進することを明かにし、KDFにおける細胞増殖信号伝達の調節機構は、正常皮膚や肥厚性瘢痕皮膚とは異なることを明らかにした貴重な研究であり、審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位などとも併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。