

学位論文題名

ケロイドにおけるマクロファージ遊走阻止因子と
リゾフォスファチジン酸の相互作用に関する解析

学位論文内容の要旨

緒言

ケロイドは、線維芽細胞の増殖と細胞外基質の過剰産生を主体とする真皮の肥厚、持続する炎症、境界部での健常組織への浸潤性増殖などを特徴とし、創傷治癒過程の何らかの異常によって生じると考えられているが、成因のメカニズムについては不明な点が多い。

マクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF) は遅延型アレルギー反応に関与することで発見された液性因子として、リゾフォスファチジン酸 (lysophosphatidic acid, LPA) は炎症、創傷部位に見られる生理活性脂質として知られていたが、両者は近年発生や創傷治癒、癌細胞の増殖、浸潤などに関与していることが明らかにされ注目されている。MIFとLPAは共通した生理活性を有し、ケロイドの病態にも関わっていると推測されるが、これら2分子の相互作用やシグナル伝達経路に関する報告は少なく、ケロイドにおけるMIFとLPAの相互作用に関する報告はまだない。本研究では、ケロイド線維芽細胞の遊走性におけるMIFの関与と、LPA刺激によるシグナル伝達系におけるLPAとMIFの機能および相互作用について解析を行った。

材料と方法

1. 線維芽細胞の培養：インフォームドコンセントの得られた患者より手術時に採取されたケロイドおよび正常皮膚組織を用い線維芽細胞を得た。
2. Migration Assay：24穴の培養プレートを用い、membrane culture insertを上部チャンバーとして、各種条件下で正常線維芽細胞(NF)およびケロイド線維芽細胞(KF)を播種しMIFおよびLPA刺激を行いメンブレン下面に移動した細胞数をカウントし、NFとKFの比較を行った。
3. MIF蛋白およびmRNAの発現解析：NFとKFにおけるLPA刺激によるMIF蛋白およびmRNAの発現を検証した。LPAを添加し、24時間後にtotalRNAを抽出しNorthern blot解析を行なった。また48時間後の細胞からタンパクを抽出しWesternblot解析を行った。
4. RT-PCRによるLPA受容体の発現解析：培養細胞からtotal RNAを抽出し、RTにてcDNAを合成した。LPA受容体subtypeであるLPA1, LPA2, LPA3の特異的プライマーを設計し、PCR条件は94℃45秒間、58℃30秒間、72℃1分間で35cycleで増幅を行った。
5. siRNAによるMIF発現抑制：LPA刺激により惹起される細胞運動を制御する経路におけるMIFの関与を検証するため、siRNAによりMIFをknock downしsiRNA導入群および非導入群のKFにLPA刺激後48時間でタンパクを抽出し、Western blot解析を行った。
6. LPA刺激による活性型Rhoタンパク質の発現解析：Rhoは細胞骨格や細胞運動、細胞浸潤などを制御しており、LPAはRhoシグナル伝達系における主たるリガンドである。

LPA刺激によるケロイドでのRhoの活性化およびMIFの関与を検討するため、MIF抑制群および非抑制群の細胞抽出液から活性型Rhoを特異的に分離、検出した。

結果および考察

Migration AssayではNF、KFともに無刺激時およびMIF刺激時には有意差を認めなかった。しかし、LPA刺激時にはともに増加を示し、特にKFではNFの2倍の走化性を示した。この現象におけるMIFの関与を検索する為にLPA刺激後の細胞でNorthern blot解析、Western blot解析を行いNF、KFはmRNA、タンパクともに濃度依存性に発現の増強を示し特にKFでは高発現を示した。これによりLPAはMIFの発現に関与し、KFはNFより強い応答を示すことが明らかになった。

次いで、LPAの走化性亢進作用におけるMIFの関与を検証するためにMIF siRNAを導入しMIFの発現を抑制した線維芽細胞を用いてMigration Assayを行うとNFではMIF刺激時、LPA刺激時ともに非抑制時と同様の増加傾向を示した。しかし、KFではLPA刺激時の細胞数の増加はNFとほぼ同レベルにとどまった。これらの結果よりmigrationにおいてはMIFの発現量だけでなく、LPA刺激が加わることが重要であると考えられ、LPA受容体レベルや惹起される伝達系路においてもNFとKFでは違いがあることが示唆された。

種々の癌細胞においてLPA受容体サブタイプの異常発現を認めることが明らかにされており、浸潤、転移に関与していると考えられている。しかしケロイドのLPA受容体発現に関する報告は無いため、RT-PCRにてLPA受容体の発現検索を行い、KFに高発現が見られたことからNFとKFではまず受容体レベルでLPA刺激に対する応答に差があることが示唆された。

LPA刺激による細胞運動制御の主たる伝達系であるRhoシグナル伝達系におけるMIFの関与を検証するため、MIF siRNA非導入群および導入群の細胞に対しLPA刺激を加え、Rho Activation Assayを行なった。NFでは、siRNA導入群と非導入群では有意差が見られなかった。KFでは10分後に活性化が上昇し30分後には非導入群では活性化が持続したが、導入群では活性の低下を認めた。10分後30分後ともにsiRNA導入群は活性化が抑制された。これらの結果からも、無刺激時にはMIFの抑制は細胞の運動にあまり影響を与えないが、LPA刺激時にはMIF抑制により運動を制御するシグナルが強く抑制される傾向が見られた。

本研究においては、LPA刺激下では、ケロイド線維芽細胞は走化性においても癌細胞に近い性質を示すことが明らかになった。またケロイドの細胞増殖や細胞外基質の産生に加え、走化性の制御においても細胞質に存在するMIFが作用の主体となっていることが示唆され、MIFの生体内での機能や役割を検索する上でケロイドはユニークな存在であると考えられる。また、本研究での結果からは、MIFとLPAは非常に密接な相互作用を示し、互いに発現やシグナル伝達を制御していることから、今後の遺伝子レベルでのケロイドの治療戦略において、RNAiの応用によるsiRNAまたは類似の化合物によるMIFの抑制に加えてLPA受容体の特異的拮抗物質の併用療法なども臨床応用のターゲットになりうると考えられる。

結語

ケロイドの線維芽細胞は正常皮膚の線維芽細胞と比較し、LPA刺激により強い走化性の亢進を示し、LPAの濃度依存性にMIF mRNAおよびMIFタンパクの発現の増強が見られた。またRT-PCRによる解析において、ケロイドの線維芽細胞は正常皮膚の線維芽細胞とは異なったLPA受容体サブタイプの発現パターンを示すことが明らかになった。

さらにMIF siRNAの導入によりMIFをknock downすると、LPA刺激によっても線維芽細胞の走化性は顕著に抑制され、細胞運動を制御するタンパクであるRhoの活性化も抑制

された。以上よりケロイドではMIFは主として細胞質のMIFが作用し、LPAとの相互作用を持ちながら細胞の運動性の亢進に密接に関与していると考えられた

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 杉 原 平 樹

副 査 教 授 近 藤 哲

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

学 位 論 文 題 名

ケロイドにおけるマクロファージ遊走阻止因子と リゾフォスファチジン酸の相互作用に関する解析

ケロイドは、線維芽細胞の増殖と細胞外基質の過剰産生を主体とする真皮の肥厚、持続する炎症、境界部での健常組織への浸潤性増殖などを特徴とし、創傷治癒過程の何らかの異常によって生じると考えられているが、成因のメカニズムについては不明な点が多い。

マクロファージ遊走阻止因子（MIF）は遅延型アレルギー反応に関与することで発見された液性因子として、リゾフォスファチジン酸（LPA）は炎症創傷部位に見られる生理活性脂質として知られていたが、両者は近年創傷治癒や癌細胞の増殖、浸潤などにも関与していることが明らかにされてきている。MIFとLPAは共通した生理活性を有し、ケロイドの病態にも関与していると推測されるが、これら2分子の相互作用やシグナル伝達経路に関する報告は少ない。本研究ではケロイド線維芽細胞の走化性におけるLPAとMIFの機能および相互作用について解析を行った。

Migration Assayでは正常皮膚線維芽細胞（NF）、ケロイド由来線維芽細胞（KF）ともにLPA刺激により走化性が亢進し、特にKFではNFの2倍の走化性を示した。この現象におけるMIFの関与を検索するためLPA刺激後の細胞でNorthern blot解析、Western blot解析を行い、MIFのmRNAタンパクともにLPA濃度依存性に発現が増強し、特にKFでは高発現を示した。これによりLPAはMIFの発現に関与し、KFはNFより強い応答を示すことが明らかになった。次いで、LPAの走化性亢進作用におけるMIFの関与を検証するためMIF siRNAを導入しMIFの発現を抑制した線維芽細胞を用いてMigration Assayを行うと、KFではLPA刺激時の細胞数の増加はNFとほぼ同レベルにとどまったことから、LPAのシグナル伝達系におけるMIFの関与が示唆された。

種々の癌細胞においてLPA受容体サブタイプの異常発現を認めることが明らかにされているが、ケロイドのLPA受容体発現に関する報告は無いため、RT-PCRにてLPA受容体の発現検索を行い、KFに高発現が見られたことからNFとKFではまず受容体レベルでLPA刺激に対する応答に差があることが示唆された。

さらに、LPA刺激による細胞運動制御の主たる伝達系であるRhoシグナル伝達系におけるMIFの関与を検証するためMIF siRNA非導入群および導入群の細胞に対しLPA刺

激を加え、Rho Activation Assayを行なった。NFではsiRNA導入群と非導入群では有意差が見られなかった。KFではRhoの活性化のピークが早まるとともにsiRNA導入群は活性化が強く抑制された。この結果からMIFはLPA/Rhoシグナル伝達系に深く関与していることが明らかになった。

本研究においては、ケロイド線維芽細胞はLPA刺激に対する応答性が高まっており、その要因としてLPA受容体の異常発現が関与していることが示唆された。またケロイドの細胞増殖や細胞外基質の産生に加え、走化性の制御においても細胞質に存在するMIFが作用の主体となっていることが示唆され、MIFの生体内での機能や役割を検索する上でケロイドはユニークな存在であると考えられる。また、本研究での結果からMIFとLPAは非常に密接な相互作用を示し、互いに発現やシグナル伝達を制御していることが明らかにされた。

公開発表に当たり、副査近藤哲教授より、1) 臨床応用に向けてのRNAiと受容体拮抗剤の可能性、2) LPAレセプターをブロックする物質の有無、3) レセプターをブロックするin vivoの実験は行なったかについて質問があった。次いで、副査秋田弘俊教授より、1) LPAの細胞増殖に関する作用については解析されているか、2) 臨床応用を考える上で、今回明らかにされたpathwayのどの部分を抑えればよいのかについて質問とコメントがあった。次に主査杉原平樹教授より、1) ケロイドの活動性の異なる時期、部位からの検体では今回の実験系での結果が異なる可能性、2) ケロイドにおけるTGFとLPAの関連の有無、3) 臨床応用に向けた今後の研究の方向性についての質問とコメントがあった。いずれの質問に対しても申請者は自らの研究内容と文献を引用し、妥当な回答をした。

この論文は、ケロイドの主体である線維芽細胞の運動性の制御においてMIFとLPAが相互作用を示しながら深く関与していることを初めて明らかにした点で高く評価され、今後ケロイドの病態の解明や新たな治療法の開発につながることを期待される。

審査員一同、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。