

学位論文題名

ケロイドにおけるアラキドン酸代謝と
コラーゲン産生に関する解析

学位論文内容の要旨

緒言

ケロイドは持続する炎症、境界部での健全組織への浸潤性増殖などの特徴をもつ皮膚の良性腫瘍性病変である。ケロイドの病態は線維芽細胞の増殖と細胞外基質の過剰な増生を主体とした真皮の肥厚を特徴としており、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る。

マクロファージ遊走阻止因子macrophage migration inhibitory factor (MIF)は、炎症反応のイニシエータとして重要な役割をもっている。また、アラキドン酸代謝において重要な役割をもつcytosolic phospholipase A2 (cPLA2)やcyclooxygenase-2 (COX-2)を活性化する。アラキドン酸代謝産物のひとつであるprostaglandin E₂ (PGE₂)は線維芽細胞の増殖とコラーゲンの産生を抑制することが知られており、PGE₂はcAMPをsecond messengerとしてコラーゲンの産生を制御する。

本研究では、MIFを投与した場合のケロイド由来線維芽細胞 (KF)と正常皮膚由来線維芽細胞 (NF)のcPLA2やCOX-2の発現を解析し、また、両細胞におけるPGE₂の産生について検討した。また、KFとNFにおいてコラーゲン産生の抑制因子であるPGE₂を反応させたときのコラーゲンの抑制効果の解析を行った。

材料と方法

1. 検体：同意の得られた患者より手術によって採取したケロイド (6例)、成熟瘢痕 (4例) および正常皮膚 (6例)を用いた。
2. 免疫組織化学染色：正常皮膚、瘢痕およびケロイドにてMIFの発現を比較した。
3. cPLA2の活性化の評価：NFとKFをMIFで刺激後、³Hでラベルしたアラキドン酸の遊離量を解析することでcPLA2の活性化を評価した。
4. RT-PCR解析：NFとKFをMIFまたはIL-1βで刺激後、cPLA2とCOX-2のmRNAの発現をRT-PCRにて解析した。
5. ウェスタンブロット解析：NFとKFをMIFで刺激後、リン酸化ERKの発現と無刺激時のEP2の発現をウェスタンブロットにて解析した。
6. PGE₂またはcAMPによるコラーゲン産生に対する抑制効果の検討：NFとKFにPGE₂またはcAMPを濃度別に添加後、procollagen type I C-peptide (PICP)を測定することでI型コラーゲンの産生量を比較した。
7. PGE₂産生量の検討：NFとKFをMIFまたはIL-1βで刺激後、PGE₂産生をELISAにて解析した。
8. cAMPレベルの解析：NFとKFをPGE₂で刺激後、cAMP産生をELISAにて解析した。

結果および考察

PGE₂ は線維芽細胞における細胞増殖とコラーゲン産生を抑制し、また、線維芽細胞自体も PGE₂ を産生する。そこでわれわれは、KF における PGE₂ の産生能の低下が、ケロイドにおける細胞外基質のコラーゲン過剰産生の原因のひとつであると考えた。

MIF は炎症性サイトカインとしてのみならず、細胞の分化、増殖に関わる重要なタンパクである。また、MIF は extracellular signal-regulated kinase (ERK) をリン酸化することで cPLA2 を活性化し、COX-2 の RNA レベルの発現を促進することでアラキドン酸代謝を活性化することが報告されている。また、本研究において、免疫組織化学染色によりケロイドの線維芽細胞に過剰の MIF の発現を認めることを示した。以上のことから、本研究ではアラキドン酸代謝の刺激因子として MIF を選択した。

MIF の反応に対する cPLA2 の活性化を検討した結果、MIF は cPLA2 の活性化を NF より KF において促進した。MIF は ERK のリン酸化を促進し、また、リン酸化した ERK は cPLA2 を活性化する。MIF 添加 15 分後の ERK のリン酸化を NF と KF で比べると、KF においてより強い増強が認められた。すなわち、アラキドン酸の遊離量の差は、cPLA2 を活性化するために必要な ERK のリン酸化の程度が関与していると考えられた。

MIF または IL-1 β で刺激すると、KF より NF で PGE₂ の産生が増加した。PGE₂ はアラキドン酸から COX-2 の作用によって生成される。そこで、MIF または IL-1 β 刺激後、COX-2 の mRNA の発現を RT-PCR にて解析した結果、KF より NF で強い COX-2 の mRNA の発現を認めた。すなわち、MIF に対する PGE₂ の産生量の差は、MIF によって誘導される COX-2 の mRNA のレベルの差を反映していると考えられた。

免疫組織化学染色では MIF は KF で強く染色された。しかし、KF においては、MIF が強く発現しているにもかかわらず、MIF の刺激による PGE₂ 産生の促進作用に対する感受性が低下していた。すなわち、ケロイドにおける過剰なコラーゲン産生は、KF におけるコラーゲン抑制因子である PGE₂ 産生の低下が原因のひとつであると考えた。

以上の結果から、NF と KF 両細胞における炎症性サイトカインの刺激によって増加する PGE₂ 量の差は、原料となるアラキドン酸量よりも COX-2 activity の差が重要であることが示唆された。しかし、MIF 刺激によって NF より KF において ERK のリン酸化が増強するという知見は、ケロイドにおいて MIF が過剰発現しているという結果と合わせて、KF の増殖およびアポトーシス耐性に MIF が深く関与している可能性を示唆している。また、KF においてアラキドン酸産生が促進しているという結果は、アラキドン酸自体あるいはプロスタノイド以外の代謝産物であるロイコトリエンがケロイドの成因に何らかの関わりをもつ可能性も推察される。今後は、これらの点をより詳細に検討する必要があると考える。

本研究において、PGE₂ のコラーゲン抑制作用は NF に比べて KF で低下していることを明らかにした。これは、NF に比べて KF において PGE₂ のレセプターである EP2 (E prostanoïd receptor 2) の発現が低下していることが原因であることを示した。しかし、レセプター非依存性に cAMP レベルを上昇させると、NF, KF 両細胞ともにコラーゲンの産生が濃度依存性に低下した。すなわち、cAMP はコラーゲン産生の重要な制御因子になり得ることが示唆された。

結語

ケロイド線維芽細胞と正常皮膚線維芽細胞のアラキドン酸代謝を比較検討したところ、ケロイド線維芽細胞において炎症性サイトカイン刺激に対するコラーゲン抑制因子である PGE₂ の産生が低下していた。また、PGE₂ のコラーゲン抑制効果は、正常皮膚線維芽細胞に比較してケロイド線維芽細胞で減弱していた。しかし、PGE₂ の second messenger である cAMP レベルを上昇させると両線維芽細胞においても同じようにコラーゲン抑制効果を示した。以上の結果より、ケロイド線維芽細胞における PGE₂ の産生と PGE₂ に対する感受性の低下がケロイ

ドの成因に関与していること、また、今後は cAMP のコラーゲン産生に対する抑制作用を用いることで新しいケロイドの治療法の開発につながる可能性が期待されると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 本 有 平

副 査 教 授 三 浪 明 男

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

学位論文題名

ケロイドにおけるアラキドン酸代謝と コラーゲン産生に関する解析

ケロイドは持続する炎症、境界部での健常組織への浸潤性増殖などの特徴をもつ皮膚の良性腫瘍性病変である。ケロイドの病態は線維芽細胞の増殖と細胞外基質の過剰な増生を主体とした真皮の肥厚を特徴としており、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る。

PGE₂は線維芽細胞における細胞増殖とコラーゲン産生を抑制し、また、線維芽細胞自体もPGE₂を産生する。そこでわれわれは、ケロイド線維芽細胞におけるPGE₂の産生能の低下が、ケロイドにおける細胞外基質のコラーゲン過剰産生の原因のひとつであると考えた。

マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) は炎症性サイトカインとしてのみならず、細胞の分化、増殖に関わる重要なタンパクである。また、MIFは extracellular signal-regulated kinase (ERK) をリン酸化することで cPLA2 を活性化し、COX-2 の RNA レベルの発現を促進することでアラキドン酸代謝を活性化することが報告されている。また、本研究において、免疫組織化学染色によりケロイドの線維芽細胞に過剰の MIF の発現を認めることを示した。以上のことから、本研究ではアラキドン酸代謝の刺激因子として MIF を選択した。

MIF、IL-1 β 刺激によるPGE₂の産生量は正常線維芽細胞と比較してケロイド線維芽細胞において低下していた。また、その原因は、MIF、IL-1 β 刺激によるCOX-2のmRNAの発現量の相違によると考えられた。

さらに、PGE₂のコラーゲン抑制効果は正常線維芽細胞と比較してケロイド線維芽細胞で低下していた。その原因は、PGE₂のReceptorのひとつであるEP2の発現が、ケロイド線維芽細胞で低下しているためと考えられた。しかし、cAMP activator であるForskolinで刺激した場合、正常線維芽細胞とケロイド線維芽細胞においてコラーゲン抑制効果に有意な差は認めなかった。すなわち、cAMPより下流のシグナル伝達には正常線維芽細胞とケロイド線維芽細胞とも違いがないと考えられた。

本研究においては、ケロイド線維芽細胞はコラーゲン抑制因子であるPGE₂の産生が低下しており、また、PGE₂のコラーゲン抑制効果が減弱していることが、ケロイドにおけるI型コラーゲンの過剰産生の原因に関与していることが示唆された。また、cAMP activatorであるForskolinは、ケロイド線維芽細胞においてもコラーゲン抑制効果が認められたことより、今後、cAMP製剤はケロイド治療に応用できる可能性があると考えられた。

ケロイド線維芽細胞におけるアラキドン酸代謝とコラーゲン産生に関する解析を行い、ケ

ロイド線維芽細胞において正常線維芽細胞と比較してPGE₂の産生量が低下していることや、その原因がCOX-2のmRNAの発現量の相違によることが明らかとなった。また、PGE₂のコラーゲン抑制効果は正常線維芽細胞と比較してケロイド線維芽細胞で低下していることや、その原因がEP2 Receptorの発現がケロイド線維芽細胞で低下しているためであることが明らかとなった。

公開發表に当たり、副査三浪明男教授より、1) ケロイドと肥厚性瘢痕におけるMIFの発現やコラーゲン産生の違いについて、2) ケロイドに好発部位がある原因を本研究の知見から説明できる可能性について、3) MIFがアラキドン酸カスケードに作用する機序について質問があった。次いで、副査秋田弘俊教授より、1) 正常線維芽細胞とケロイド線維芽細胞においてCOX-2の発現が異なる原因について、2) ケロイドにおいてEP2の発現が低下している原因について、3) 本研究の知見から今後の臨床応用の方向性について質問があった。次に、主査山本有平教授より、1) 肺線維芽細胞とケロイド線維芽細胞において無刺激の状態におけるPGE₂の産生量が異なる原因について、2) 肺線維症およびケロイド治療にcAMP製剤を用いる場合の具体的な投与方法などについて質問があった。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、妥当な解答をした。

この論文は、ケロイドにおけるコラーゲンの過剰産生が、PGE₂の産生と感受性の低下が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。