

Circulating fibrocyte の性質異常と ケロイド病態との関連性

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

ケロイドは疼痛や搔痒を伴う皮膚の腫瘍性病変であり、多発や再発を繰り返すことが多く、しばしば治療が困難であり、QOLを障害する疾患である。ケロイドは前胸部、肩、下腹部などに好発し、手術や瘻瘻などに伴う慢性炎症部位に生ずることが多いことから、発生には局所的因子が重要な役目を担っていることが推定されている。しかしその一方で、ケロイド病変は多発し、主病巣から離れた部位にも発生を認めることから、そのようなケロイドを発生しやすい素因をもった患者では、ケロイドの発生には全身的な因子が重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

一方、全身の末梢血中を循環する線維芽細胞前駆細胞 (circulating fibrocyte, 以下 CF と略す) は、“fibroblast like cell”として1994年に Bucala らにより報告された細胞である。CFは骨髄間葉系幹細胞由来であり、創部局所へ動員され、そこで細胞外基質や TGF- β をはじめとする各種サイトカインを産生することで、創傷治癒を調節する重要な役割を担っていることが報告されている。

これまでにケロイド発生における CF の関与について検討した研究はなく、本研究では、ケロイド発生に関わる全身的因子を明らかにする目的で CF に着目し、その性質をケロイド患者と健常コントロールで比較した。また、現在臨床応用されているケロイド治療薬剤の CF に対する影響を検討し、CF をターゲットとした今後のケロイド治療の可能性について考察を行った。

【材料と方法】

- 1、患者および健常サンプル：ケロイド患者のうち、病変が多発、あるいは再発歴のある患者で薬剤内服治療が行われていない4例と、健常コントロールは6名で、CFの性質を比較検討した。薬剤反応性の検討は、健常人3名で行った。
- 2、CFの分離：末梢血をPBMCに分離後、DMEM培地で培養を行い、7日後に非接着細胞として上清を回収し、培養14日目の紡錘形接着細胞をCFとして分離した。
- 3、蛍光染色：1次抗体としてcollagen type IとCD34を用いて反応させた。コントロールに正常ヒト線維芽細胞を用いた。
- 4、cDNA, mRNAの作成とReal time RT-PCR：分離培養を行ったCFより、プロトコールに従ってmRNAを抽出し、それをもとにcDNAに変換した。各特異的プライマーペアを用いてreal time PCRを行い、健常コントロールとの比較検討を行った。
- 5、薬剤反応性の検討：CFの細胞分化や増殖・性質に対して薬剤が与える影響を評価するために、ケロイド治療薬として使用されているトリアムシノロンアセトニド(ケナコルト® プリストル・マイヤーズ)、トラニラスト(リザベン® KISSEI)、および免疫抑制剤であるFK-506をCF培養液中に添加し、分化・増殖するCFの細胞数と各種遺伝子の発現を検討した。薬剤の添加は3段階の時期に分けて行い、採血後にPBMCを分離した時点から培養

7日目まで薬剤を添加したものを実験群①、実験群②では7日目から14日目まで、実験群③では14日目より21日目まで薬剤添加培地で薬剤刺激を行った。21日目に培養シャーレを直視下で観察し、細胞の分化や増殖の状態を評価した。さらにその細胞を回収して total RNA を抽出し、解析に用いた。

【結果および考察】

ケロイドの病態には病変部の炎症反応や線維芽細胞の性質異常など局所的な異常が存在することが報告されてきたが、“ケロイド体質”と言われるような、ケロイドを発生しやすい素因と関連した全身的因子については解明が進んでいなかった。CFは末梢血中を循環する線維芽細胞の前駆細胞であり、創傷治癒過程を調節するが、本研究では、ケロイド患者由来CFでは健常者に比べてTGF- β 1やTGF- β receptor I, α -SMA, CXCR4の発現が亢進していることを示した。CFのような全身を循環する前駆細胞に性質異常が認められたことは、本現象がケロイド発生に関連する全身的因子の一因となっている可能性が考えられた。

さらに、今回の検討で得られた結果が非常に興味深いのは、ケロイド患者由来CFのTGF- β 1, TGF- β receptor I, TGF- β receptor II, α -SMAの発現プロファイルの変化が、これまで多施設で報告されているケロイド患者の病変部局所から採取した線維芽細胞 (resident fibroblast, 以下RFと略す)の性質異常と非常に類似している点である。そのような性質異常が共通して見られることは、CFが局所に遊走してRFの一部を構成していることを考えても、この性質異常がケロイド患者に特徴的に見られるものであることを支持する。また、本研究からは、CFはその細胞自体の増殖能は高くないと考えられたが、代表的なケモカインレセプターであるCXCR4の亢進を認めたことから、ケロイド患者では病変局所へはより多くの細胞が動員されていることが推察できる。そのため、今後はCFをターゲットとした治療法や予防法の確立がケロイドの新たな治療戦略として重要であると考えられる。

次に、ケロイド治療薬剤であるトリアムシノロンアセトニド、トラニラストおよびケロイドに対する効果が不明な薬剤として免疫抑制剤であるFK-506を用い、CFに与える影響を検討した。トリアムシノロンアセトニドとトラニラストはCFのTGF- β 1発現には影響を示さなかったが、 α -SMA発現を抑制した。実験群①(採血後～培養7日目まで薬剤添加)、実験群②(7日目～14日目まで薬剤添加)、実験群③(14日目～21日目まで薬剤添加)で比較した場合には、トリアムシノロンアセトニドは実験群①②③のすべてに抑制効果があったことから、CFが成熟した段階でも α -SMAの発現抑制効果があると考えられる。トラニラストは実験群①でのみ抑制効果が認められ、より幼弱な段階でCFへの効果が認められた。CFの分化段階により薬剤反応性が異なっていることは、薬剤によってCFに与える作用点が異なっていることを示唆するものであり興味深い。FK-506では、いずれも有意な変化は観察されなかった。そのため健常人由来CFを用いた検討であるものの、ケロイド患者由来CFでは α -SMAの過剰発現が性質異常として認められることから、トリアムシノロンアセトニドとトラニラストの α -SMA発現抑制効果がケロイドに対して有用である可能性が考えられる。

ケロイド研究の難しさは、ケロイドがヒトに特異的な疾患であり動物モデルが存在しない点にある。ケロイド病態の解析をするためには皮膚切除片を用いて局所の線維芽細胞の性質異常を解析する実験が多く行われてきたが、侵襲性があるために研究が限られてきた。今後はCFを用いた解析により、ケロイド病態に関する研究や新規薬剤の開発にむけた研究がより効果的に推進できると考えられる。

【結語】

今回の検討により、末梢血中に存在する線維芽細胞の前駆細胞であるCFの性質異常がケロイド患者において認められ、それがケロイド病態に関わる全身的因子の一因になっている可能性が考えられた。さらにケロイド患者由来CFで認められた性質異常が、これまで多施設で報告されてきたRFの性質異常と類似していることなど、ケロイドの病態にCFが関

与している可能性を示した研究としては初めての報告であり、CFをターゲットとした研究は、今後ケロイド体質の有無を把握するといった臨床検査的応用や新しい治療法の開発など、臨床応用への発展も期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 本 有 平

副 査 教 授 笠 原 正 典

副 査 教 授 三 浪 明 男

学 位 論 文 題 名

Circulating fibrocyte の性質異常と ケロイド病態との関連性

ケロイドは疼痛や搔痒を伴う皮膚の腫瘍性病変であり、多発や再発を繰り返すことが多く、しばしば治療が困難であり、QOL を障害する疾患である。その発生には局所的因子が重要な役目を担っていることが推定されているものの、ケロイド体質と言った言葉があるように、全身的な因子も重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

一方、全身の末梢血中を循環する線維芽細胞前駆細胞 (Circulating fibrocytes, 以下 CF と略す) は、“fibroblast like cell”として 1994 年に Bucala らにより報告された細胞である。骨髄間葉系幹細胞由来であり、創部局所へ動員され、そこで細胞外基質や TGF- β をはじめとする各種サイトカインを産生することで、創傷治癒を調節する重要な役割を担っていることが報告されている。

これまでにケロイド発生における CF の関与について検討した研究はなく、本研究では、ケロイド発生に関わる全身的因子を明らかにする目的で CF に着目し、その性質をケロイド患者と健常コントロールで比較した。また、現在臨床応用されているケロイド治療薬剤の CF に対する影響を検討し、CF をターゲットとした今後のケロイド治療の可能性について考察を行った。

患者および健常サンプルは、ケロイド患者 6 名と、健常コントロールは 9 名で、CF の性質を Real time PCR 法を用いて比較検討した。次に CF の細胞分化や増殖・性質に対して薬剤が与える影響を評価するために、ケロイド治療薬として使用されているトリアムシノロンアセトニド(ケナコルト® ブリストル・マイヤーズ)、トラニラスト(リザベン® KISSEI)、および免疫抑制剤である FK-506 を CF 培養液中に添加し、分化・増殖する CF の細胞数と各種遺伝子の発現を検討した。サンプルは健常人 3 名の末梢血を用いた。

その結果、ケロイド患者由来 CF では健常者に比べて TGF- β 1 や TGF- β receptor I, α -SMA, CXCR4 の発現が亢進していることがわかった。また、トリアムシノロンアセトニド、トラニラスト刺激により、CF の細胞数を減少させる作用や CF の筋線維芽細胞への分化や増殖抑制作用の薬効が期待された。

CF のような全身を循環する前駆細胞に性質異常が認められたことは、本現象がケロイド発生に関連する全身的因子の一因となっている可能性が考えられた。さらに、ケロイド患者由来 CF の遺伝子発現プロファイルの変化が、これまで多施設で報告されているケロイド患者の病変部局所から採取した線維芽細胞 (resident fibroblast, 以下 RF と略す) の性質異常と非常に類似していた。そのような性質異常が共通して見られることは、CF が局所に遊走して RF の一部を構成していることを考えても、この性質異常がケロイド患者に特徴的に見られるものであることを支持する。そのため、薬剤刺激実験で得られたように、CF をターゲットとした治療法や予防法の確立はケロイドの新たな治療戦略として重要であると考

えられる。

公開発表にあたり、副査三浪明男教授から、1) CFの定義と局所への供給のメカニズムについて、2) CFの循環血液中に存在する量や局所での割合について、3) CFのケロイド患者における性質異常は、原因なのか結果なのか、4) デュピイトレン拘縮との関連性について質問およびコメントがあった。次いで、副査笠原正典教授より1) トラニラストによる薬剤刺激の結果で、TGF- β 1の発現の変化について、2) 薬剤刺激実験におけるCollagen type Iの発現に関して、質問とコメントがあった。最後に、主査山本有平教授より、1) CFと局所線維芽細胞との違いについて、2) CFの局所動員後の変化について、3) 本研究の結果から、臨床応用に向けた今後の展望につき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、末梢血中に存在する線維芽細胞の前駆細胞であるCFの性質異常がケロイド患者において認められ、それがケロイド病態に関わる全身的因子の一因になっている可能性が考えられた。さらにケロイド患者由来CFで認められた性質異常が、これまで多施設で報告されてきたRFの性質異常と類似していることなど、ケロイドの病態にCFが関与している可能性を示した研究としては初めての報告であり、CFをターゲットとした研究は、今後ケロイド体質の有無を把握するといった臨床検査的応用や新しい治療法の開発など、臨床応用への発展も期待される。

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と取得単位なども合わせ申請者が博士(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。