

学位論文題名

ケロイドにおける制御性T細胞

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

ケロイドは真皮線維芽細胞の増殖、コラーゲン産生を主体とする皮膚良性腫瘍である。ケロイドは炎症性疾患、線維化疾患としての側面を持ち、T細胞などの炎症細胞が病態に関与すると考えられている。ケロイド真皮内にはCD4+ T細胞が多く浸潤しているが、ケロイド線維芽細胞との相互作用の詳細は不明である。

CD4+ T細胞は制御性T細胞 (regulatory T cell : Treg) とTh1、Th2、Th17のeffector T細胞 (Teff) に分類される。Teffは免疫反応を亢進し、Tregは免疫反応を制御する。Tregは他のTeffを抑制し、両者の持続的バランスが炎症、アレルギー性疾患の発症、病態を決定する。TregはTGF- β の刺激により特異的な転写因子であるforkhead box P3 (FOXP3)が誘導され分化が促進するが、TGF- β とIL-6で同時に刺激された場合、FOXP3の誘導が抑制され、Th17の誘導が促進される。したがって、Treg、Th17の両者の関係が特に免疫バランスに反映される。Tregの減少による免疫バランスの破綻は全身性自己免疫疾患を発症させるが、近年、自己免疫疾患、炎症性の皮膚病変においても同様の免疫バランスの破綻が見られることが明らかになっている。また、Tregの増加が線維化を抑制するとの報告もある。

炎症性疾患、線維化疾患であるケロイド局所においても免疫バランスが破綻している可能性がある。また、ケロイド線維芽細胞はTGF- β やIL-6を高産生することが明らかとなっており、免疫バランスに影響を与える可能性がある。本研究ではケロイドにおける免疫バランスと、ケロイド線維芽細胞とTregの相互作用を解明することを目的とした。

【対象と方法】

ケロイド (n=14, 体幹7, 耳介7), 正常皮膚 (n=7, 体幹4, 頭頸部3), 癬痕 (n=8, 体幹4, 頭頸部2, 上肢1, 下肢1), 浅達性II度熱傷 (n=6, 体幹3, 上肢2, 下肢1), 表皮嚢腫 (n=6, 体幹4, 頭頸部1, 下肢1)の組織を採取した。浅達性II度熱傷は上皮化後の組織を、表皮嚢腫は嚢腫上の皮膚を炎症性のサンプルとして検討対象とした。免疫染色により真皮に浸潤するTregを同定しCD4+ T細胞に占めるTregの比率やTh17/Treg比率を比較検討した。また、IL-6染色により、各サンプルのIL-6発現を比較した。

ケロイド患者 (n=5), 正常人 (n=5)より得られた末梢血CD4+ T細胞をTGF- β で刺激しTregを誘導し、FOXP3誘導効率の差を検討した。また、CD4+ T細胞をTGF- β , IL-6で同時に刺激し、FOXP3の誘導抑制の有無について検討した。

採取した組織から培養したケロイド線維芽細胞と同一個体の末梢血から誘導、活性化したCD4+ T細胞またはTreg-enriched CD4+ T細胞を間接共培養し (n=8), 両者の相互作用を検証した。共培養後のケロイド線維芽細胞および培養上清中のI型コラーゲン, TGF- β , IL-6産生をmRNA, タンパクレベルで評価した。

【結果】

ケロイド内の CD4+ T 細胞浸潤は真皮浅層の血管周囲に多く見られた。ケロイド、浅達性Ⅱ度熱傷、表皮嚢腫のサンプルの真皮に浸潤する CD4+ T 細胞数は同程度であった。ケロイドの Treg/CD4+ T 細胞比率は正常、癍痕と同程度で、浅達性Ⅱ度熱傷、表皮嚢腫と比較して低下していた。Th17/Treg 比率はケロイドでは浅達性Ⅱ度熱傷、表皮嚢腫と比較して増加していた。ケロイド真皮に IL-6 の高発現を認めたが、他の炎症性皮膚病変でも IL-6 の発現を認めるものがあつた。正常皮膚、癍痕では IL-6 の発現を認めなかつた。

TGF-β で刺激したケロイド患者の末梢血 CD4+ T 細胞は正常人と同様に FOXP3 が発現し、FOXP3 の発現低下はなかつた。CD4+ T 細胞を TGF-β, IL-6 で同時に刺激した場合、ケロイド患者、正常人ともに FOXP3 の発現が低下した。

ケロイド線維芽細胞のコラーゲン産生は Treg-enriched CD4+ T 細胞との共培養では mRNA, タンパクレベル, CD4+ T 細胞との共培養では mRNA レベルで低下した。Treg-enriched CD4+ T 細胞および CD4+ T 細胞はケロイド線維芽細胞の TGF-β mRNA 発現を抑制した。一方、CD4+ T 細胞と共培養したケロイド線維芽細胞の IL-6 産生は mRNA, タンパクレベルで増加し、Treg-enriched CD4+ T 細胞との共培養においても同様の結果であつた。

【考察】

同程度の炎症の皮膚病変と比較してケロイド真皮内の Treg/CD4+ T 細胞比率が低下していたことから、ケロイド内で免疫バランスの破綻が生じていると考えられた。ケロイド真皮内の Th17/Treg 比が他の皮膚炎症病変と比較して高いことから、免疫バランスの破綻に IL-6 が関与することが推測された。ケロイド患者 CD4+ T 細胞の FOXP3 誘導効率の低下はないため、免疫バランスの破綻は全身ではなくケロイド局所で生じていると考えられた。

Treg の抗線維化作用により、ケロイド線維芽細胞のコラーゲン産生を低下させることができた。免疫バランスの破綻により、実際のケロイド組織では線維化が亢進していると考えられた。一方、CD4+ T 細胞によって高まるケロイド線維芽細胞の IL-6 活性は、Treg を増加させても抑制することはできなかつた。ケロイド線維芽細胞の IL-6 異常産生性、Treg 抵抗性が免疫バランスの破綻を生じさせる可能性がある。

局所で Treg を増加、活性化させ免疫バランスを維持することはケロイドに対する新たな治療アプローチとなる。免疫抑制剤や抗 IL-6 抗体薬などがケロイドに応用できる可能性がある。

【結論】

ケロイド内では Treg が減少し免疫バランスが破綻していると考えられた。免疫バランスの破綻は局所で生じており、ケロイド線維芽細胞が産生する IL-6 が関与している可能性がある。Treg はケロイド線維芽細胞の I 型コラーゲン産生を抑制する作用があり、免疫バランスを改善することはケロイドの予防や治療に応用できる可能性がある。

学位論文審査の要旨

主査	教授	笠原	正典
副査	教授	瀬谷	司
副査	教授	山本	有平
副査	教授	清水	宏

学位論文題名

ケロイドにおける制御性T細胞

ケロイド内に浸潤する制御性 T 細胞のケロイド病態への関与を検証することを目標として研究を行い、免疫組織学的染色により、ケロイド内に浸潤する CD4 陽性 T 細胞に占める制御性 T 細胞の比率が他の炎症性病変と比較して低下しており、ケロイド組織局所内で免疫バランスが破綻している可能性を示した。また、ケロイド患者と正常人の末梢血 CD4 陽性 T 細胞から制御性 T 細胞を誘導したところ、ケロイド患者の制御性 T 細胞誘導効率の低下はなかったが、ケロイド患者、正常人共に TGF- β (transforming growth factor beta)、IL-6 (インターロイキン) 6 の同時刺激下で誘導が抑制されたことから、ケロイド局所の免疫バランスの破綻には、局所の TGF- β や IL-6 が原因となる可能性を示唆した。CD4 陽性 T 細胞とケロイド線維芽細胞の共培養により両者の相互作用について検証したところ、制御性 T 細胞含有率を高めた CD4 陽性 T 細胞との共培養でケロイド線維芽細胞の I 型コラーゲン産生が低下したが、IL-6 産生は抑制されなかった。したがって、制御性 T 細胞の抗線維化作用が示された一方で、ケロイド線維芽細胞の IL-6 異常産生性が免疫バランスの破綻に関与する可能性が示された。

発表後、瀬谷教授からは、ケロイドにおいて増殖する細胞の由来や幹細胞の病態への関与、ケロイド病態への免疫の関与を示した過去の報告の有無、IL-6 のケロイド病態への関与、制御性 T 細胞とケロイド線維芽細胞の直接の関連について質問があった。増殖細胞の由来については、血液中の fibrocyte が関与する可能性があるが、同細胞が局所で線維芽細胞に分化したとしても実際のケロイド線維芽細胞内に占める割合が低く、病態にどの程度寄与するかは現状では不明であり、幹細胞の関与についても不明であると回答した。ケロイド病態への免疫の関与を示した報告の有無に関しては、ケロイド内では CD4 陽性細胞が CD8 陽性細胞より多いことを示した報告はあるが、それ以外の報告はなく、本研究は、CD4 陽性細胞、制御性 T 細胞のケロイド病態への関与を免疫バランスの観点から考察し、CD4 陽性細胞-ケロイド線維芽細胞共培養モデルを用いて実際に両者の相互作用を検証した世界で初めての試みであると答えた。IL-6 のケロイド病態への関与については、ケロイドと

正常な創傷治癒の終末像である癒痕とで線維芽細胞のコラーゲン産生を増加させる IL-6 の発現に差があることから、通常の創傷治癒過程では発現した IL-6 がいずれ低下するが、免疫バランスの破綻が原因でケロイドでは IL-6 の高発現が持続する可能性がある」と回答した。制御性 T 細胞とケロイド線維芽細胞の関連については、制御性 T 細胞の産生する IL-10 がケロイド線維芽細胞のコラーゲン産生を低下させる可能性がある」と答えた。

清水教授はケロイド内における制御性 T 細胞に着眼したことを評価した上で、ケロイドは体質が関与するため血液中の免疫バランスを検証する必要性を指摘した。申請者は、ケロイドでは発症しない部位があり体質以外に局所的な要因も発症に大きく関与することを説明し、血液中の制御性 T 細胞については今後の検討課題とする考えを示した。

山本教授からは、他の臓器の炎症性疾患、線維化疾患と比較した際の制御性 T 細胞の皮膚病変における作用の特異性の有無について質問があった。申請者は、明らかな特異性はないが、免疫バランスの破綻が皮膚のみで生じている場合、免疫バランスを是正する治療を局所のみで行う方法を検討する必要がある」と回答した。

笠原教授からは、ケロイド動物モデルが成立しない理由、ケロイド微小環境の実験的再現の今後の展望について質問があった。申請者はケロイド動物モデルについて、免疫不全モデル動物にヒトケロイド線維芽細胞を移植しケロイド様組織を再現した報告はあるが、実験動物自身にケロイドを作製することは不可能であり詳細な原因は不明であると回答し、実験動物とヒトとの life span の差や創傷にかかる緊張の有無等を例示し、ケロイドに類似した肥厚性癒痕で、創傷に持続的緊張を与えることでモデル作製に成功した報告を説明した。In vitro での微小環境の再現には限界があり、実験動物に作製した創傷モデルで通常の創傷治癒過程における制御性 T 細胞の意義の詳細を検証した上で、in vitro や臨床の研究結果と合わせて考察することになると回答した。

この論文は、これまで内容を発表した国内の学会で高く評価され、ケロイドの病態解明、治療法開発に関する基礎および臨床研究結果に有用な新知見を付与するものと期待される。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。