

機関番号：10101

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390454

研究課題名 (和文) 浸潤型ケロイド細胞は存在するのか！
—効率的なケロイド治療を目指して—研究課題名 (英文) Can we detect the invasive keloid fibroblasts
for the effective treatment?

研究代表者

林 利彦 (HAYASHI TOSHIHIKO)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：00432146

研究成果の概要 (和文)：活性化し周囲に浸潤するケロイド線維芽細胞周囲には T リンパ球が浸潤している。活性化したケロイド線維芽細胞は 1 型コラーゲン産生、TGF- β 発現、 α -SMA 発現が高まっている。よって、ケロイド線維芽細胞と T リンパ球の共培養によりケロイド病態の再現を試みた。結果、T リンパ球の存在下でケロイド線維芽細胞の 1 型コラーゲン産生、TGF- β 発現はむしろ低下する傾向にあった。T リンパ球のサブセットによってはケロイド線維芽細胞に対して抑制的にはたらく可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：In a keloid lesion, T lymphocytes are found around activated and invasive keloid fibroblasts whose levels of type 1 collagen production, transforming growth factor-beta expression and α -SMA expression are very high. So we co-cultured keloid fibroblasts with T lymphocytes to establish the keloid in vitro model. But the levels of type 1 collagen and transforming growth factor-beta of the keloid fibroblasts co-cultured with T lymphocytes tended to rather decrease. Some subset of T lymphocytes might suppress keloid fibroblasts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2009 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：ケロイド ケロイド線維芽細胞 免疫細胞 共培養

1. 研究開始当初の背景

ケロイドの発生・拡大機序の解明は、ケロイド研究において最も重要な課題であるが、いまだその核心部分は明らかにされていない。そこで我々は、拡大傾向にあるケロイド辺縁

部には活動性の高いケロイド線維芽細胞（浸潤型ケロイド線維芽細胞）が常に維持され、その維持・増殖には周囲の免疫細胞が重要な役割を担っているという新しい仮説を提唱した。ケロイドに強い炎症を伴うことがあるが、

この炎症所見はケロイドが周囲皮膚に浸潤拡大する部位に一致して認められる。事実、組織学的にケロイド周囲へTリンパ球を中心とした浸潤が認められている。すなわちケロイドの病勢と炎症症状には強い相関が認められる。実際に、我々は免疫組織化学染色によってケロイドの辺縁部あるいは表層部において α -SMA(α -smooth muscle actin)の産生が亢進した線維芽細胞が存在することを示した。この浸潤型ケロイド線維芽細胞が強い細胞運動性やI型コラーゲンの産生およびTGF- β を代表とする各種サイトカインの産生が亢進した性質を維持しながら周囲に拡大浸潤していくことでケロイドが拡大すると考えた。

以上のことから、かねてよりケロイドの病態成立およびその持続には、線維芽細胞と周囲の免疫細胞との相互作用がきわめて重要であると推察してきた。言い換えれば、ケロイドの治療には浸潤型ケロイド線維芽細胞と周囲の免疫細胞の両者の活動性を低下させることが大切であると考えられる。

これまでのケロイド研究報告は、ケロイド線維芽細胞のみを対象としたものばかりであり、それを取り囲む周囲環境との相互作用を解明した報告は少ない。ケロイドは腫瘍性および反応性の両側面をもっているが、ケロイドには動物モデルがないなどの研究の障害から反応性疾患としてのケロイド研究はほとんどなされていない。そこで、ケロイド線維芽細胞とその周囲に存在する免疫担当細胞との相互作用を明らかにすることは、本疾患の病態を解明する大きな突破口となると考えられる。そこで、我々はこの仮説を証明するため正常/ケロイド線維芽細胞と免疫細胞の共培養モデルを考案するにいたった。

2. 研究の目的

正常/ケロイド線維芽細胞と免疫細胞の共培養系を確立し、ケロイドモデルの構築を試みる。また、線維芽細胞と免疫細胞の相互作用を明らかにし、ケロイドの成因として免疫細胞の関与を証明する。

3. 研究の方法

(1)線維芽細胞の分離培養：

ケロイド患者、非ケロイド患者より、ケロイド組織、正常皮膚組織を採取した。Explant法により初代培養を行い、実験には主として第3～第5継代の細胞を使用した。なお、組織や血液の採取については当研究機関の医倫理委員会の指針に従い、患者より文書による同意を得た。

(2)Tリンパ球の分離培養：

ケロイド患者、非ケロイド患者より末梢血

を採取し、濃度勾配を用いて単核球を分離した。単核球より磁気ビーズを用いたネガティブソーティングによりTリンパ球を分離した。

(3)病理組織学的、免疫組織学的検討：

採取したケロイド組織、正常皮膚組織についてHE染色、免疫染色を行った。 α -SMA陽性線維芽細胞の有無、浸潤する炎症細胞の有無など各組織の正常について検討した。

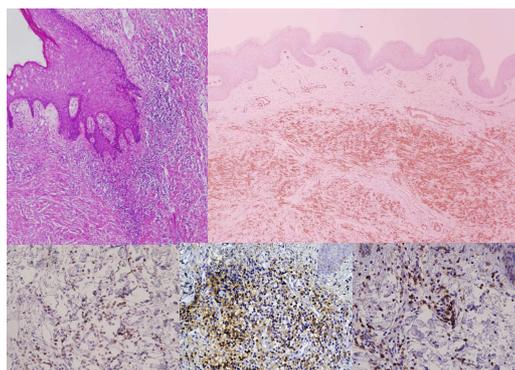
(4)線維芽細胞、Tリンパ球共培養下での線維芽細胞の増殖、I型コラーゲン産生、TGF- β 発現、 α -SMA発現の検討：

共培養の方法は、線維芽細胞とTリンパ球の間を0.4 μ m micropore membraneで隔て両者間の接触がなく液性因子のみ往来可能な間接的共培養と、同一ディッシュ内で線維芽細胞とTリンパ球を培養し両者の直接的接触が可能な直接的共培養とした。培養液はDMEMとした。細胞増殖はMTSアッセイにて検討した。また、ウェスタンブロットやリアルタイムRT-PCRにてI型コラーゲン産生、TGF- β 発現、 α -SMA発現を検討した。

4. 研究成果

(1)ケロイドの病理組織学的、免疫組織学的検討(図1)：

辺縁部に α -SMA陽性の筋線維芽細胞を多数認めた。ケロイド辺縁部に浸潤する炎症細胞はTリンパ球(CD3陽性細胞)、マクロファージ、単球、Bリンパ球などであった。中でもTリンパ球(CD3陽性細胞)はケロイドの炎症所見が強いほど多く見られた。また、Tリンパ球サブセットでは、CD4陽性Tリンパ球数がケロイドの病勢により増減する傾向があったが、CD8陽性Tリンパ球数はケロイドの病勢に関わらずほぼ変化がなかった。



[図1]ケロイド組織

上段左：HE染色。ケロイド辺縁部皮下に炎症細胞の浸潤を認める。

上段右： α -SMA染色。ケロイド辺縁部に筋線維芽細胞を多数認める。

下段左：CD3染色。Tリンパ球の浸潤が明らかである。

下段中央、右：CD4染色。炎症所見の強いケロイド組織(中央)にてCD4陽性細胞を多数

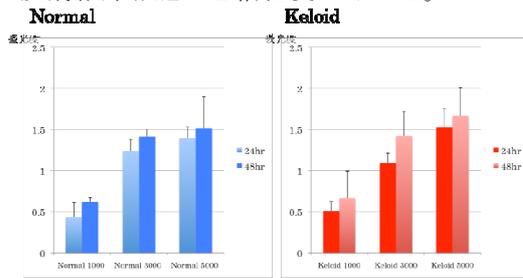
認める。炎症所見が弱いケロイド組織（右）では CD4 陽性細胞数が減じている。

(2)ケロイド線維芽細胞、正常皮膚線維芽細胞間の性状比較（図2～3）：

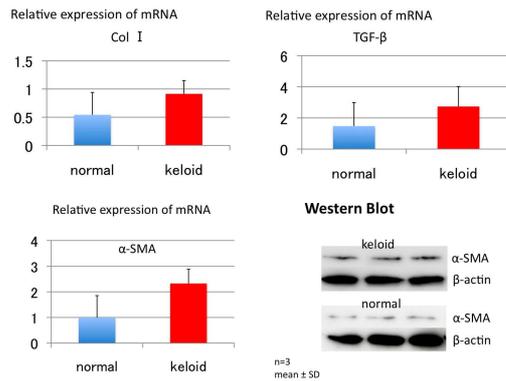
使用するケロイド線維芽細胞、正常皮膚線維芽細胞間の性状比較を行った。

ケロイド線維芽細胞、正常皮膚線維芽細胞間で細胞増殖率に差はなかった（図2）。

1型コラーゲン産生、TGF-β発現、α-SMA発現については、ケロイド線維芽細胞は正常皮膚線維芽細胞の2倍程度であった。



[図2] MTS アッセイ：細胞数 1000、3000、5000 の条件で 24、48 時間後の細胞増殖率を検討した。



[図3]：1型コラーゲン産生、TGF-β発現、α-SMA発現をウェスタンブロットやリアルタイム RT-PCR で検討した。

(3)ケロイド線維芽細胞、正常皮膚線維芽細胞と MOLT-4 リンパ球共培養下での検討（図5～6）：

Co-culture

0

- 3 × 10⁴/well fibroblast in 10%FBS+DMEM, 6 well culture plate

70-80% confluent

- Starvation 10%FBS→1%FBS

24hr後

- T cell との共培養開始 (fibroblast: T cell = 1:10)

24-48hr後

- MTS assay, Western blot, Real time PCR

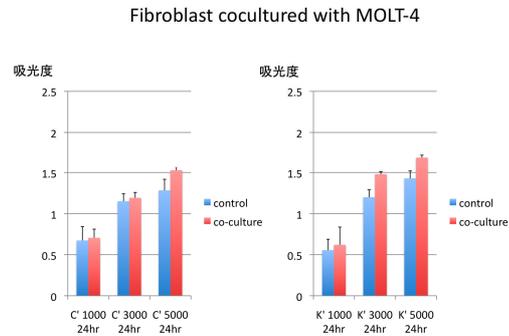
triplicate, 37°C, 5% CO₂

[図4] 共培養条件

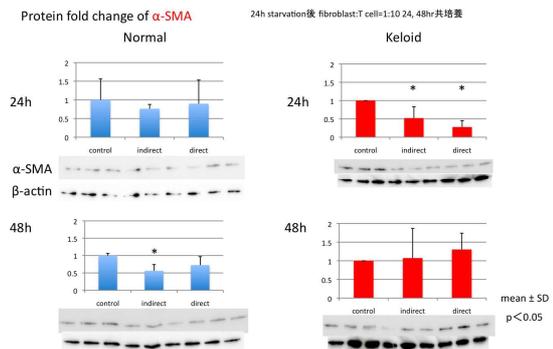
先に、10%FBS+DMEM 下で正常ヒト皮膚線維

芽細胞 NHDF と非ケロイド患者由来末梢血単核球の 48 時間共培養を試行し、線維芽細胞の 1型コラーゲン産生、TGF-β発現、α-SMA発現をリアルタイム RT-PCR で検討した。結果、非共培養群と比較して共培養群では3項目いずれも低下する傾向にあった。同条件下でケロイド線維芽細胞とケロイド患者由来末梢血単核球との 48 時間共培養を行ったところ、前述の NHDF-非ケロイド患者由来末梢血単核球と比較してコラーゲン産生抑制の度合いが低い傾向があった。

これらを参考に、図4条件下で T リンパ球を MOLT-4 (T リンパ球系白血病細胞) で一定とし共培養を行い、ケロイド線維芽細胞、正常皮膚線維芽細胞の細胞増殖率、α-SMA発現の変化を検討した。MOLT-4 との共培養下でケロイド線維芽細胞、正常皮膚線維芽細胞ともに減じることなく増加傾向を示したが、両者間での有意差はなかった。α-SMA発現は共培養群では条件によっては低下することがあった。



[図5] MTS アッセイ

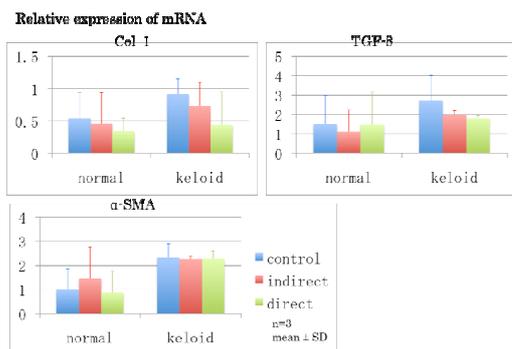


[図6] ウェスタンブロット：化学発光検出法にて蛍光検出し、画像解析ソフトにより解析

(4)ケロイド線維芽細胞、正常皮膚線維芽細胞と個体の一致した T リンパ球共培養下での検討（図7）：

図4 共培養条件下でケロイド線維芽細胞、正常皮膚線維芽細胞と個体の一致した T リンパ球を共培養し線維芽細胞の 1型コラーゲン産生、TGF-β発現、α-SMA発現をリアルタイム RT-PCR で検討した。ケロイド線維芽細胞

胞において1型コラーゲン産生、TGF- β 発現が低下する傾向が見られたが、 α -SMAについては変化がなかった。



[図7]リアルタイム RT-PCR

(5)得られた成果の意義：

本研究は他臓器の線維芽細胞では報告のある線維芽細胞とTリンパ球との共培養をケロイド線維芽細胞に対して行ったこと、またこれによりケロイド病態モデルの構築を試みたことに大きな意義がある。

当初の仮説としてTリンパ球との相互作用でケロイド線維芽細胞がより活性化される結果を予想していたが、今回の結果ではTリンパ球はケロイド線維芽細胞に対してむしろ抑制的に作用する傾向があった。Tリンパ球との共培養下でケロイド線維芽細胞が細胞数を減らすことなく1型コラーゲン産生、TGF- β 発現、 α -SMA発現が低下することは、Tリンパ球のサイトカインによる作用がケロイド線維芽細胞の性状に変化を及ぼしうることを示唆する。

Tリンパ球がケロイド線維芽細胞に対して抑制的に作用する可能性については更なる検討を要する。ケロイドの病勢によって浸潤するTリンパ球の組成に差があるため、Tリンパ球のサブセットによってはケロイド線維芽細胞に与える作用が異なる可能性がある。他臓器の線維芽細胞については、CD4陽性Tリンパ球によってコラーゲン産生を増加するという報告がなされている。Tリンパ球のサブセットによってケロイド線維芽細胞に対して促進的にはたらくもの、抑制的にはたらくものがあるとすれば、線維芽細胞周囲に浸潤するTリンパ球サブセットの比率等の線維芽細胞を取り巻く環境によってケロイドの病勢が決定されるとも考えられる。

今後の課題としては、CD4、CD8陽性細胞との共培養や、CD4陽性細胞についてもさらにTh1、Th2、Th17などによる作用の違いを検討する必要がある。これらのTリンパ球が局所で活性化する状態を再現することによりケロイド病態モデルの確立を目指す。

また、一方でTリンパ球によるTGF- β に拮抗するようなサイトカイン産生の有無など

の検証も必要である。ケロイド線維芽細胞に対する抑制効果を持つサイトカインを同定し活性を高めることができれば、ケロイド治療に応用することも可能ではないかと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計2件)

(1) 村尾尚規, 林利彦, 齋藤亮, 舟山恵美, 小山明彦, 古川洋志, 山本有平, 「Tリンパ球とケロイド線維芽細胞の相互作用についての検証」, 第81回日本形成外科学会北海道地方会, 2011年2月19日, 札幌市

(2) 村尾尚規, 林利彦, 小山明彦, 舟山恵美, 山本有平, 「ケロイド線維芽細胞とTリンパ球共培養モデル構築の試み」, 第19回日本形成外科学会基礎学術集会, 2010年9月16日, 横浜市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 利彦 (HAYASHI TOSHIHIKO)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：00432146
(H20研究分担者→
H21～H22研究代表者)

佐々木 了 (SASAKI SATORU)
北海道大学・大学院医学研究科・
非常勤講師
研究者番号：40301907
(H20)

(2) 研究分担者

山本 有平 (YAMAMOTO YUHEI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70271674

古川 洋志 (FURUKAWA HIROSHI)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：00399924

小山 明彦 (OYAMA AKIHIKO)
北海道大学・大学病院・講師
研究者番号：70374486

舟山 恵美 (FUNAYAMA EMI)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：10533630
(H21～H22)

関堂 充 (SEKIDO MITSURU)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
教授

研究者番号：40372255
(H20)

堤田 新 (TSUTSUMIDA ARATA)
国立がん研究センター中央病院・
皮膚腫瘍科・医長

研究者番号：00374489
(H20)

齋藤 亮 (SAITO AKIRA)
北海道大学・大学院医学研究科・
非常勤講師

研究者番号：70507574
(H20)