

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 4日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592298

研究課題名（和文） ケロイド発生に関する IL23/IL-17 免疫経路の役割解明と新治療の確立

研究課題名（英文） Establishment of new molecular therapy of keloid and elucidation of mechanism of development by IL-23/IL-17 pathway

研究代表者

土佐 眞美子 (TOSA MAMIKO)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：30301568

研究成果の概要（和文）：

ケロイド患者の末梢血およびケロイド組織において、Th17細胞の分布は正常と比較して増加していた。ケロイドにおけるTh17関連サイトカイン(IL-22, IL-17)の発現解析結果は、正常皮膚と比較して増加していた。正常皮膚由来線維芽細胞(NF)にIL-17, IL-23を作用させると細胞増殖能は亢進し、コラーゲン産生も増加した。同様にケロイド由来線維芽細胞(KF)にIL-22, IL-17を作用させると、細胞増殖能およびコラーゲン産生は著明に増加した。次にKFにIL-17の抗体を作用させ、増殖能とコラーゲン産生能を検討すると、細胞増殖およびコラーゲン産生が抑制された。今回の結果より、ケロイドにおけるIL-17高発現状態がケロイド発生に関与し、これをターゲットとした抑制薬がケロイドの新治療薬になる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We have reported that IL-6 mediated inflammation is a key player and may be considered as a common causative factor for development of keloid. IL-17, a recently discovered pro-inflammatory cytokine, is secreted by a distinct subtype of activated CD4 T-cells known as Th17. We first examined the distribution of Th17 cells in peripheral blood and keloid tissues obtained from the patients. There was an increased in Th17 cells as compared with normal individuals. The expression of IL-17 gene in keloid derived fibroblasts (KF) was higher than in normal dermis derived fibroblasts (NF). We measured mRNA expressions of two principal ECM molecules, COL1A2 and FN1, in NF cultures after addition of IL-17A peptide or in KF cultures after inhibition of IL-17 with anti-IL-17 antibody at various concentrations. Addition of IL-17A in NF culture medium significantly and dose-dependently enhanced COL1A2 and FN1 mRNA expressions, whereas inhibition of IL-17 by anti-IL-17 antibody in KF culture medium lowered COL1A2 and FN1 mRNA expressions. Our results indicate that IL-17 signaling may play an integral role in keloid pathogenesis and provide clues for development of IL-17 blocking strategies for therapy or prophylaxis of keloid.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、IL-17、IL-23、ケロイドモデル

1. 研究開始当初の背景

ケロイドは太古の昔から存在しているが、原因不明であり、形成外科領域の難治性疾患の代表となっている。われわれはケロイド原因遺伝子を解明すべく、分子レベルの研究を行ってきた。その結果、ケロイドにおける IL-6 の過剰発現を明らかにし、ケロイド発生と IL-6 シグナルの関連性を報告してきた。

この研究成果を発展させ、ケロイドにおける慢性炎症の原因解明を目的として、Th17 細胞をターゲットとした研究を計画・実行した。

2. 研究の目的

ケロイド発生における IL-6 および IL-23/IL-17 免疫経路の役割を明らかにすることを本研究の目的とする。

ケロイド原因遺伝子の解明および新治療法の確立を最終目的とする。

3. 研究の方法

(1) 末梢血およびケロイド組織におけるヘルパーT(Th)細胞の分布解析：多発ケロイド患者の末梢血およびケロイド組織片よりリンパ球を培養し、CD4、INF- γ 、IL-4、IL-17 で標識して、フローサイトメトリー法にて Th1、Th2、Th17 細胞の分布を検討した。同様に正常人の末梢血および皮膚片よりリンパ球を培養して、多発ケロイド患者と比較検討した(N=10)。

(2) ケロイドにおける IL-17 関連遺伝子の発現解析：ケロイド組織および培養線維芽細胞(KF)における IL-23、IL-17、IL-22 の発現を RT-PCR 法、Western blot 法により解析した。

凍結標本を用いて免疫染色も行った。

同様に正常真皮、培養線維芽細胞(NF)においても解析を行い、ケロイドと比較検討した(N=30)。

(3) 血清中およびケロイド組織中の IL-17 関連サイトカインの測定：ケロイド患者の血清中およびケロイド組織中の IL-23、IL-17、IL-22 を ELISA 法により測定した。同様に、正常人の血清中および正常皮膚組織中の IL-23、IL-17、IL-22 も測定し、ケロイド患者の結果と比較検討した。

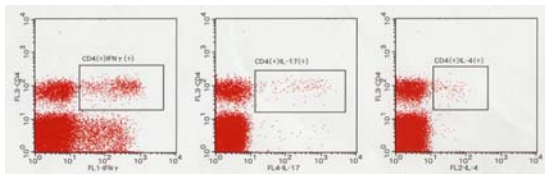
(4) ケロイドにおける IL-17 の機能解析：NF に IL-17 を作用させ、細胞外マトリックス関連遺伝子(Fibronectin、collagen type I $\alpha 2$)の発現を RT-PCR 法にて解析する。また、RIA 法を用いて procollagen type I 合成能を解析する。KF に抗 TNF- α 製剤、抗 IL-6 受容体抗体、抗 p40 抗体、SOCS3 などの IL-17 シグナルに対する各種ブロッカーを作用させ細胞外マトリックス関連遺伝(Fibronectin、collagen type I $\alpha 2$)の発現を RT-PCR 法にて解析する。また、RIA 法を用いて procollagen type I 合成能を解析する。

4. 研究成果

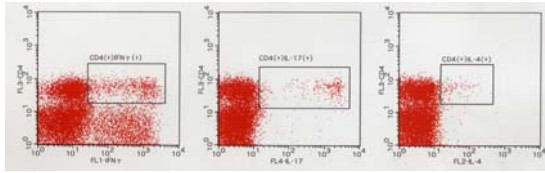
(1) 末梢血およびケロイド組織におけるヘルパーT(Th)細胞の分布解析

多発ケロイド患者の末梢血中のヘルパーT(Th)細胞の分布は、正常人と比較して Th17 細胞の割合が高かった。

健康人のヘルパーT細胞分布

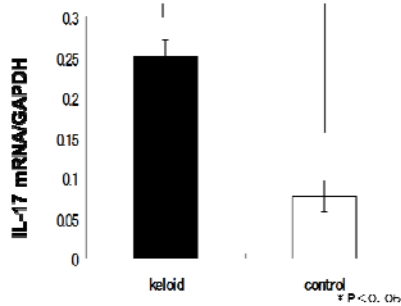


Th1 Th17 Th2
多発ケロイド患者のヘルパーT細胞分布



ケロイド組織においては、発赤部においてIL-17陽性細胞をも認め、正常皮膚と比較して増加していた。

(2) ケロイドにおけるIL-17関連遺伝子の発現解析



上記グラフに示すようにケロイド由来線維芽細胞におけるIL-17遺伝子発現は正常と比較して亢進していた。

(3) 血清中およびケロイド組織中のIL-17関連サイトカイン測定では、血清中では、ケロイド患者と正常人との有意差は認められなかった。

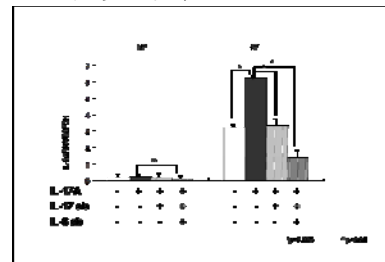
(4) ケロイドにおけるIL-17の機能解析
NFにIL-17Aを作用させると、IL-6遺伝子発

現および細胞外マトリックス関連遺伝子(COL1 α 2, FN1)発現は亢進した。

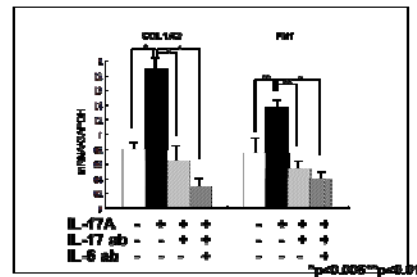
その反応は、抗IL-17抗体および抗IL-6抗体投与により抑制された。

また、コラーゲン産生能もIL-17A投与後増加し、抗IL-17抗体および抗IL-6抗体投与により抑制された。

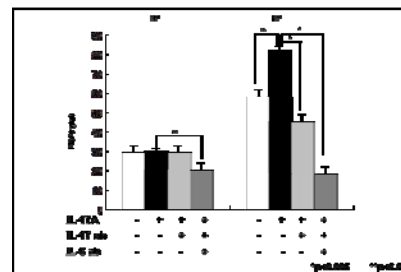
IL-17A投与および抗IL-17抗体投与後のIL-6発現の変化



KFにおけるIL-17A投与および抗IL-17抗体投与後の細胞外マトリックス関連遺伝子発現の変化



IL-17Aおよび抗IL-17抗体投与後のコラーゲン産生能の変化



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)

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 3 件）

1. 土佐眞美子、ガジザデ・モハマッド、村上正洋、百束比古：ケロイドにおけるTh17細胞のIL-6シグナル促進効果の検討
第 20 回日本形成外科基礎学術集会、2011, 10/6, 新宿.
2. 土佐眞美子、ガジザデ・モハマッド、村上正洋、百束比古：炎症的側面と腫瘍的側面を持つケロイドに対する基礎的アプローチ
第 19 回日本形成外科基礎学術集会、2010, 9/16, 横浜.
3. 土佐眞美子、ガジザデ・モハマッド、村上正洋、百束比古：ケロイド患者におけるヘルパーT細胞サブタイプの解析
第 18 回日本形成外科基礎学術集会、2009, 10/1, 東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土佐 眞美子 (TOSA MAMIKO)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：30301568

(2) 研究分担者

M GHAZIZADEH(MOHAMMAD GHAZIZADEH)
日本医科大学・老人病研究所・准教授
研究者番号：30190979

村上 正洋 (MURAKAMI MASAHIRO)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00239500

(3) 連携研究者

()

研究者番号：