

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592637

研究課題名(和文)ケロイド治療への新たな視点 ～皮膚に対する抗線維化薬の応用～

研究課題名(英文)A New Perspective Of Therapies For Keloids: Application Of An Antifibrotic Medicine

研究代表者

林 利彦(HAYASHI, TOSHIHIKO)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00432146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：ピルフェニドンは特発性肺線維症の治療薬として現在使用されている新しい抗線維化薬である。一方、ケロイドは線維芽細胞の過剰な増殖や $\alpha$ -Smooth muscle Actin( $\alpha$ -SMA)や1型コラーゲンなどの過剰な産生といった特徴を持つ皮膚疾患である。本研究では、このケロイド由来の線維芽細胞に対して、ピルフェニドンのような作用を持つか実験と検討を行い、新たなケロイド治療薬の可能性を探った。

実験結果からピルフェニドンはケロイド線維芽細胞の細胞増殖と1型コラーゲン産生、 $\alpha$ -SMA発現を抑制することが示された。これらの所見からピルフェニドンはケロイド治療に有用である可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Pirfenidone is a novel anti-fibrotic agent used in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. Keloid is a cutaneous fibrotic disease characterized by fibroblast overproliferation and fibrogenesis such as the abnormally high production of alpha smooth muscle actin and collagen in keloid-derived fibroblasts. The effects of pirfenidone on cell proliferation, type I collagen production, and alpha-smooth muscle actin expression in keloid-derived fibroblasts were investigated in this study. Results showed that pirfenidone significantly inhibited cell proliferation, type I collagen production, and alpha-smooth muscle actin expression in keloid-derived fibroblasts. Our study highlights the potential use of pirfenidone in the treatment of keloids.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：ケロイド 創傷治癒学 抗線維化薬 ピルフェニドン

## 1. 研究開始当初の背景

ケロイドは結合組織の増殖を主体とした境界明瞭な紅色あるいは褐色の隆起として観察される良性の病変である。一般的には外傷などに続発して発生するとされ、しばしば原因となった創部をこえて周囲に拡大する。

治療法としては圧迫、シリコンゲルシート、ステロイド注射といった保存的療法と手術、および術後放射線照射といった外科的治療が行われている。しかしケロイドは再発を来しやすく難治性であり、これらの治療法にも治療効果や副作用の面でそれぞれの限界がある。

ケロイド組織では真皮線維芽細胞の増殖やコラーゲン線維の不規則な増殖がみられ、TGF- $\beta$ のような線維化に関係するサイトカインの影響なども指摘されている。しかしながら、その発症原因と病態についてはいまだ不明な点が多い。

2006年に発売された特発性肺線維症 (IPF) の治療薬であるピルフェニドンは化学名 5-Methyl-1-phenyl-1H-pyridin-2-one と表記される分子量 185.22 の物質である。ピルフェニドンは Interleukin-6 (IL-6) などの炎症性サイトカインや線維化に關与する Transforming growth factor-beta1 (TGF- $\beta$ 1) などの増殖因子の産生抑制、線維芽細胞の増殖抑制作用、コラーゲン産生抑制作用などを通じて抗線維化作用を持つとされている。これらの作用から、肝 (Zhao et al. Pharmacol Physiol. 2009) や腎 (Declèves et al. Nat Rev Nephrol. 2010) など肺以外の臓器、またテノン膜 (Lin et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009) といった組織に対する抗線維化作用について近年研究が進められている。

以前に我々は、拡大傾向にあるケロイドの辺縁部や表層部には  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin) の産生が亢進したケロイド線維芽細胞が存在することを示している。

ケロイドは皮膚の線維化疾患であり、ケロイド線維芽細胞の異常増殖、周囲への浸潤を抑制することはケロイド治療に直結する。

## 2. 研究の目的

ケロイドの治療にはしばしば困難を伴う。圧迫やシリコンゲルシート治療では根治を期待できないため、外科的切除が可能な部位であれば手術を考慮する。しかし手術単独では再発率が高く、一般的には電子線を用いた放射線治療やステロイド局所注射を併用する。放射線照射は発がんリスクの問題や線量に上限が存在し、ステロイドであれば皮膚の萎縮、菲薄化などの副作用がある。

一方でピルフェニドンの作用は複数の臓器、組織においても証明されつつあり、我々はケロイドにも有効である可能性が高いと考えた。そこでピルフェニドンがケロイド線維芽細胞に対して増殖抑制作用、コラーゲンや  $\alpha$ -SMA の産生抑制作用を持つと仮説を立てた。また、前述のようにピルフェニドンの作用は証明されつつあるがその作用機序について未だ不明な点が多いことから、ケロイド線維芽細胞を用いてこの作用機序の解明を試みる方針とした。

すなわち、本研究はケロイド線維芽細胞に対して特発性肺線維症治療薬ピルフェニドンが示す作用とその作用機序を解明し、新たなケロイド治療を検討することを目的としている。

## 3. 研究の方法

検体の採取、取扱いについて北海道大学病院自主臨床研究審査委員会に申請し承認を得た。同委員会の規定に沿って研究を実施し、ヘルシンキ宣言に基づき、対象となった患者には十分な説明を行い、同意を得た上で検体の採取を行った。

(1) ケロイド組織の採取、線維芽細胞の培養  
臨床検体はケロイド9例 (体幹6例、耳介

3例),正常皮膚3例(体幹2例,頭部1例),  
またコマーシャルベースのCell Lineである  
Normal Human Dermal Fibroblast (NHDF,  
LONZA)を使用した。

## (2) ピルフェニドンの調製

ピルフェニドン(東京化成,CAS番号:  
53179-13-8,純度98%以上)を使用した。溶  
液を作成,使用する際はシリンジフィルター  
(Minisart 0.20 μm, Sartorius stedim  
biotec)を用いて濾過滅菌を行った。

## (3) ピルフェニドンによる線維芽細胞増殖 抑制作用の検討

MTS 試薬 (CellTiter 96 AQueous One  
Solution Cell Proliferation Assay,  
Promega)を用いた MTS assay によりピルフ  
ェニドン添加時,非添加時の吸光度測定を行  
った。また,ピルフェニドンの細胞毒性を  
Trypan Blue を用いて評価した。

## (4) ピルフェニドンによる線維化に 関与する mRNA 発現の抑制作用の検討

ピルフェニドン添加・非添加の細胞を培養  
し,スピカラム法で抽出した total RNA を  
用いて RT-qPCR 法にて α-SMA, COL1A1 の mRNA  
発現の評価を行った。

## (5) ピルフェニドンの α-SMA タンパク発現抑 制の解析

ピルフェニドン添加・非添加の細胞を培養  
し,細胞から抽出したタンパク中の α-SMA タ  
ンパクを Western Blot 法を用いて測定した。

## (6) ピルフェニドンの 1 型コラーゲン産生抑 制作用の検討

ピルフェニドンと TGF-β1 について添加・  
非添加の細胞を培養し,細胞上清中の intact  
procollagen type I N-terminal peptide  
(PINP) を Radioimmuno Assay (RIA) 法で測  
定した。

## 4. 研究成果

### (1) ケロイド線維芽細胞と正常皮膚線維芽 細胞の特徴

検体より作成したホルマリン固定標本に

ついて HE 染色,α-SMA 染色を行い弱拡大で観  
察した代表的な 2 例について図 1 に示す。ケ  
ロイドにおいては間質に α-SMA の発現が亢進  
している部位がみられた。

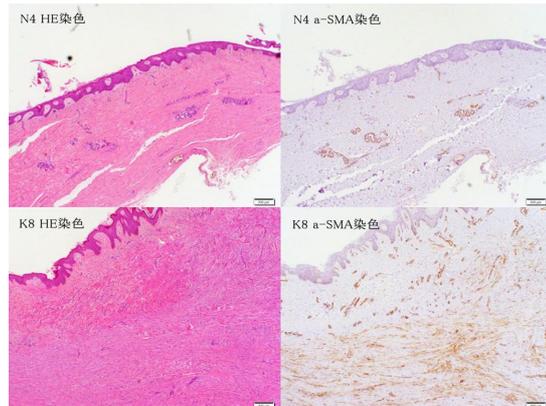


図 1: 正常皮膚(N4)とケロイド(K8)にお  
ける HE 染色および α-SMA 染色を示す。各写  
真の右下のスケールバーは 200 μm である。

### (2) ピルフェニドンによる線維芽細胞増殖 抑制作用の検討

結果を図 2 に示す。正常皮膚およびケロイ  
ド線維芽細胞を用いてピルフェニドン投与  
後 24 時間の時点における吸光度について統  
計学的検討 (Two-way ANOVA) を行った。ピ  
ルフェニドンは 24 時間の培養において正常  
皮膚およびケロイド線維芽細胞の細胞数を  
減少させることが示された。

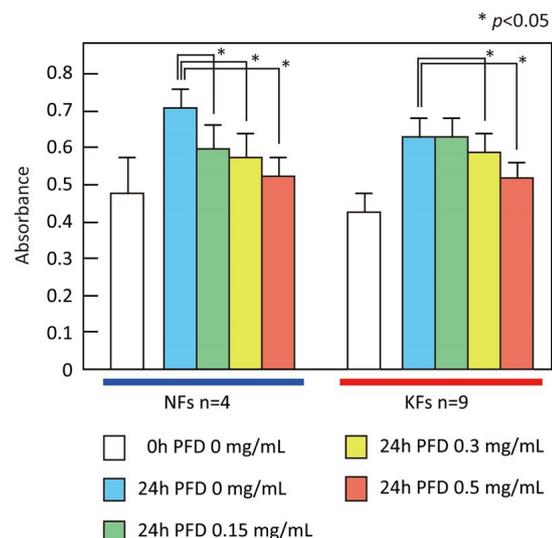


図 2: 正常皮膚線維芽細胞 (NFs), ケロイド  
線維芽細胞 (KFs) を異なるピルフェニドン

濃度で 24 時間培養した際の吸光度の変化を示す (mean+SE)。

また、正常皮膚線維芽細胞、ケロイド線維芽細胞においてピルフェニドン投与による細胞生存率の有意な変化は認められなかった (図 3)。

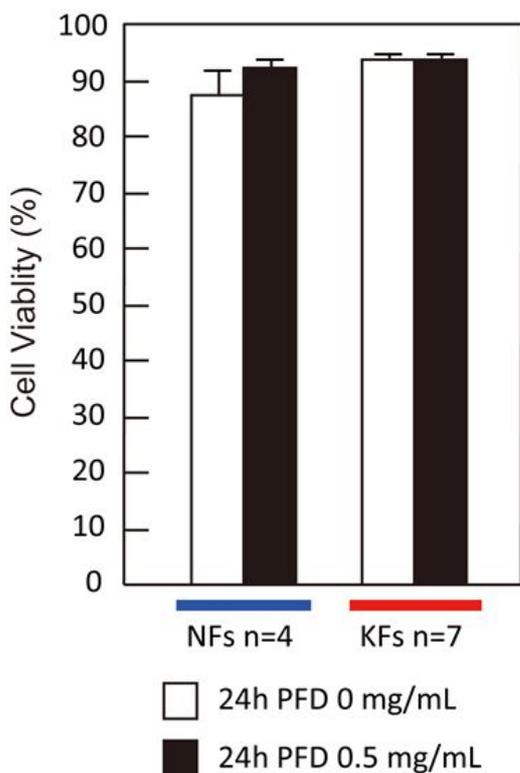


図 3: 正常皮膚線維芽細胞 (NFs), ケロイド線維芽細胞 (KFs) に対して 0.5 mg/ml のピルフェニドンが細胞生存率に与える影響を示す (mean+SE)。

### (3) ピルフェニドンによる線維化に関する mRNA 発現の抑制作用の検討

結果を図 4 に示す。統計学的解析の結果、有意な抑制を認めたのは a-SMA の mRNA 発現であった。

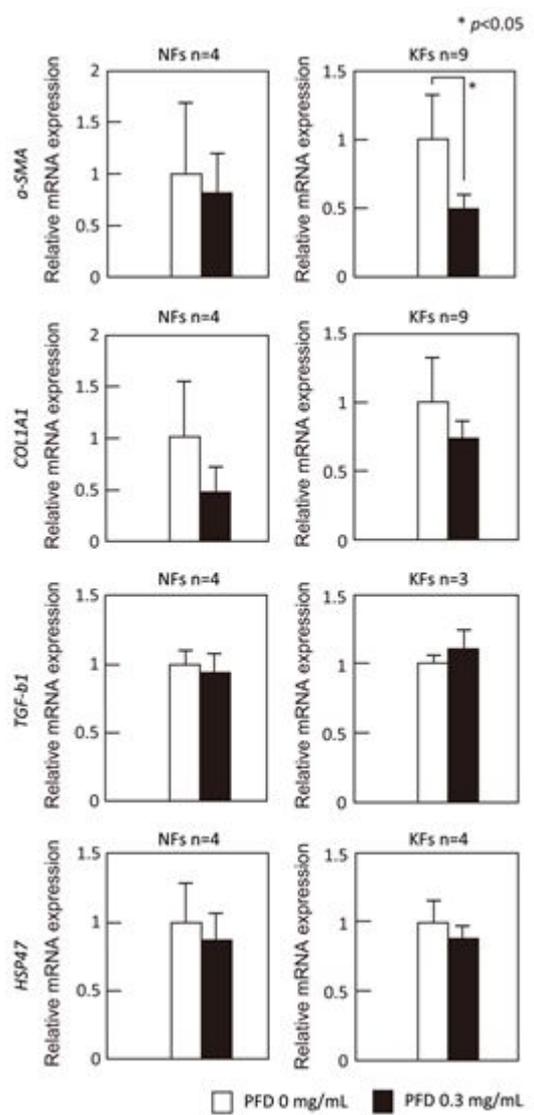


図 4: RT-qPCR による正常皮膚線維芽細胞 (NFs) とケロイド線維芽細胞 (KFs) の mRNA 発現の定量的解析 (mean+SE)。データは Two-way ANOVA による統計学的解析を行った。

### (4) ピルフェニドンの a-SMA タンパク発現抑制の解析

結果を図 5 に示す。正常皮膚線維芽細胞とケロイド線維芽細胞の双方で a-SMA タンパクはピルフェニドン添加によって発現の低下を認めた

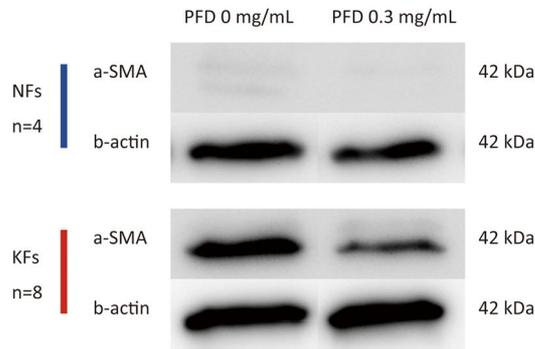


図 5: 正常皮膚線維芽細胞 (NFs), ケロイド線維芽細胞 (KFs) における a-SMA タンパクの発現について, それぞれの細胞株の代表的な結果を示す。内在性コントロールとして -actin を用いた。

(5) ピルフェニドンの 1 型コラーゲン産生抑制作用の検討

ケロイド線維芽細胞については TGF- $\beta$ 1 添加群を作成し, TGF- $\beta$ 1 添加時においてもピルフェニドンが作用を示すか検討した。結果を図 6 に示す。正常皮膚線維芽細胞においてはピルフェニドンの添加によって P1NP 濃度は低下傾向であったが, 有意差は認めなかった。ケロイド線維芽細胞では TGF- $\beta$ 1 を添加していない 2 群の間, そして TGF- $\beta$ 1 を添加した 2 群の間で Two-way ANOVA による統計学的解析を行ったところ, ピルフェニドン添加によって有意な P1NP の低下を認めた。

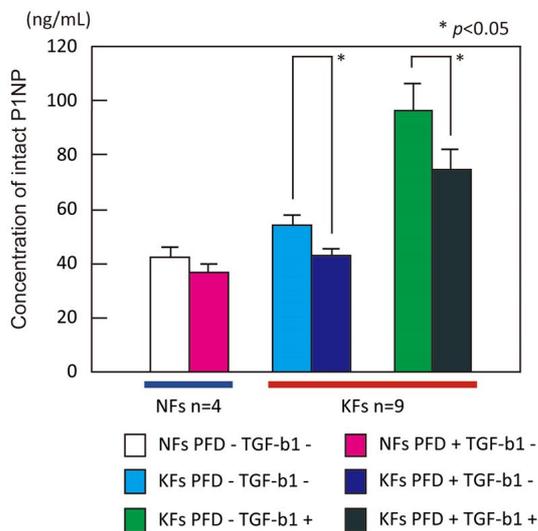


図 6: 正常皮膚線維芽細胞 (NFs), ケロイド

線維芽細胞 (KFs) の培養上清中 intact P1NP 濃度の結果を示す。(mean+SE)

以上の結果から, ピルフェニドンはケロイド線維芽細胞に対して以下の作用を持つ。

細胞毒性を伴わない細胞増殖抑制作用

-SMA の mRNA, タンパク発現の抑制作用

1 型コラーゲン産生抑制作用

また, 作用機序に関しては TGF/Smad シグナル伝達に対する阻害作用を示唆する実験結果もあるが, さらに検討を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

村尾尚規, 林 利彦, 池田正起, 舟山恵美, 小山明彦, 山本有平, 「我が教室のケロイド研究史~ケロイドを腫瘍, 炎症, 線維化疾患として捉える~」, 癩痕・ケロイド治療ジャーナル 第 8 号, 2014 (掲載決定・掲載頁未定・査読あり)

〔学会発表〕(計 14 件)

村尾尚規, 池田正起, 林 利彦, 山本有平, 「ケロイド治療の UP to DATE ~制御性 T 細胞の役割と抗線維化薬のケロイドへの応用~」, 第 43 回日本創傷治癒学会 (2013.11.14), 別府湾ロイヤルホテル (別府)

池田正起, 村尾尚規, 林 利彦, 舟山恵美, 小山明彦, 古川洋志, 山本有平, 「ケロイド治療への新たな視点~皮膚に対する抗線維化薬の応用~ (第 3 報)」, 第 22 回日本形成外科学会基礎学術集会 (2013.11.07), 新潟コンベンションセンター (新潟)

村尾尚規, 林 利彦, 池田正起, 舟山恵美, 小山明彦, 山本有平, 「わが教室のケロイド研究史-ケロイドを腫瘍, 炎症, 線維化疾患として捉える-」, 第 8 回癩痕・ケロイド治療研究会 (2013.08.31), かでる 2・7 (札幌)

林 利彦, 村尾尚規, 池田正起, 山本有平, 「ケロイド・肥厚性癩痕の外科的治療: 保存的あるいは外科的治療の選択について」, 第 8

回癬痕・ケロイド治療研究会(2013.08.31),  
かでの2・7(札幌)

池田正起,村尾尚規,林 利彦,山本有平,  
「ケロイドに対する特発性肺線維症治療薬  
の応用(第2報)」,第5回日本創傷外科学会  
(2013.07.11),ホテルグランヴィア京都(京  
都)

林 利彦,村尾尚規,池田正起,小山明彦,  
舟山恵美,山本有平,「次世代のケロイド・  
肥厚性癬痕治療 基礎研究の成果から新治  
療法の可能性について」,第5回日本創傷外  
科学会総会・学術集会(2013.7.11),ホテル  
グランヴィア京都(京都)

池田正起,村尾尚規,林 利彦,山本有平,  
「ケロイドに対する肺線維症治療薬の応用」,  
第85回日本形成外科学会北海道地方会  
(2013.02.16),札幌医科大学(札幌)

村尾尚規,「多角的アプローチによるケロ  
イド・肥厚性癬痕の基礎的研究～ケロイドを  
腫瘍、炎症、線維化疾患として捉える～」,  
第42回日本創傷治療学会(2012.12.03),か  
での2・7(札幌)

池田正起,村尾尚規,林 利彦,山本有平,  
「ケロイドに対する抗線維化薬の応用(第2  
報)」,第7回癬痕・ケロイド治療研究会  
(2012.11.23),日本青年館(東京)

池田正起,村尾尚規,林 利彦,舟山恵美、  
小山明彦,古川洋志,山本有平,「ケロイド  
治療への新たな視点～皮膚に対する抗線維  
化薬の応用～(第2報)」,第21回日本形成  
外科学会基礎学術集会(2012.10.05),ホテ  
ルリステル猪苗代(福島県)

池田正起,村尾尚規,林 利彦,舟山恵美、  
小山明彦,古川洋志,山本有平,「ケロイド  
に対する特発性肺線維症治療薬の応用」,第4  
回日本創傷外科学会(2012.07.26),ホテル  
ニューオータニ博多(福岡)

池田正起,村尾尚規,林 利彦,舟山恵美、  
小山明彦,古川洋志,山本有平,「ケロイド  
に対する肺線維症治療薬の応用」,第83回日

本形成外科学会北海道地方会(2012.02.25),  
北海道大学(札幌)

池田正起,村尾尚規,林 利彦,舟山恵美、  
小山明彦,古川洋志,山本有平,「ケロイド  
治療への新たな視点～皮膚に対する抗線維  
化薬の応用～(第1報)」,第20回日本形成  
外科学会基礎学術集会(2011.10.07),ハイ  
アットリージェンシー東京(東京)

池田正起,村尾尚規,林 利彦,山本有平,  
「ケロイドに対する抗線維化薬の応用」,第6  
回癬痕・ケロイド治療研究会(2011.08.28),  
パレスサイドビル・マイナビルーム(東京)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

林 利彦(HAYASHI Toshihiko)  
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号:00432146

### (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・北海道大学病院・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

斎藤亮(SAITO Akira)  
北海道大学・大学院医学研究科・客員研究  
員  
研究者番号:70507574

村尾尚規(MURAO Naoki)  
北海道大学・北海道大学病院・助教  
研究者番号:90706558