

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09858

研究課題名(和文)低酸素応答システムからケロイド病態を斬る！～局所免疫の正常化と炎症・線維化の抑制

研究課題名(英文) Roles of the hypoxia response system in keloids: Normalization of local immunity and suppression of inflammation and fibrosis

研究代表者

村尾 尚規 (Murao, Naoki)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：90706558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ケロイドは創傷治癒過程の異常により炎症と線維化が亢進した状態である。ケロイド内は低酸素状態であると報告されており、本研究において、生体の低酸素応答がケロイド病態、特に、制御性T細胞とTh17細胞による免疫バランスにどのような影響を有するかを検証することを目的とした。結果として、病理組織学的評価では、ケロイド組織内では低酸素応答因子であるHIF-1の発現増強を認める一方で、制御性T細胞の転写因子であるFOXP3の発現は低下していた。ケロイド線維芽細胞の低酸素下培養において、HIF-1とCOL1、VEGF等のケロイドが産生するタンパクのmRNA発現の増加を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、生体の低酸素応答がケロイド病態に与える影響に関して、制御性T細胞とTh17細胞による免疫バランスの観点から検証することを目的とした。今回の研究成果からは、ケロイド線維芽細胞の低酸素下培養において、低酸素応答因子であるHIF-1の発現とケロイド線維芽細胞のコラーゲン産生に相関を認めた。低酸素応答と制御性T細胞/Th17細胞による局所免疫バランスの詳細の解明には至らなかった。今後はケロイド線維芽細胞とCD4陽性T細胞の共培養系による検証を行うことで、ケロイド病態に対するさらなる知見につながると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Keloid is a condition in which inflammation and fibrosis are excessively enhanced due to abnormalities in the wound healing process. It has been reported that the center of keloid tissue is in a hypoxic state. In this study, we aimed to examine how the hypoxic response of the organism has an impact on keloid pathogenesis, particularly on the immune balance by Th17 cells and regulatory T cells. As a result, histopathological evaluation showed enhanced expression of HIF-1, a hypoxic response factor, in keloid tissues, while expression of FOXP3, a transcriptional factor of regulatory T cells, was decreased. In hypoxic cultures of keloid fibroblasts, increased mRNA expression of HIF-1 and COL1, VEGF was observed.

研究分野：形成外科学

キーワード：ケロイド 低酸素応答 線維芽細胞 制御性T細胞 HIF-1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ケロイドは、創傷治癒過程の異常により炎症と線維化が亢進した状態である。抗原とサイトカインの刺激を受けた CD4 陽性 T 細胞は免疫反応を抑制する制御性 T 細胞 (Treg) や免疫反応を亢進する Th17、Th1、Th2 の effector T cells に分化する。Treg と Th17 は相互に制御しバランスを保っており、炎症性疾患の発症や病態は、Treg/Th17 バランスにより決定される。当研究室では、これまでの研究において、ケロイド内では Treg の発現が低下し、免疫バランスの破綻により炎症が遷延し線維化が亢進することを示した。一方、酸素供給が滞った組織の細胞内では、低酸素誘導因子 (Hypoxia-inducible factor: HIF) が発現し、低酸素環境への適応応答を促進する。

HIF は、酸素供給が滞った組織内の細胞で活性化し、様々な遺伝子の発現を誘導し、生体の環境への適応を促す転写因子である。HIF は、低酸素応答だけではなく、炎症や悪性腫瘍の病態にも関与する。炎症部位、腫瘍内では免疫細胞の浸潤、代謝の亢進、脆弱な血管により酸素が消費され低酸素状態である。ケロイド内では、HIF のサブタイプのひとつである HIF-1 の発現が亢進しており、低酸素状態であると考えられる。HIF-1 は Th17 の分化を促進するが、Treg の分化を抑制し、免疫バランスを破綻させることが示されており、ケロイドにおいても、持続的な HIF-1 の発現亢進が Treg/Th17 バランスを破綻させることで病態を悪化させている可能性があると考え、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ケロイド患者から採取したケロイド皮膚組織と、同患者末梢血より分離した CD4 陽性 T 細胞を用いて、HIF-1 の発現や低酸素状態がケロイドの炎症と線維化を亢進させるかを検討すること、さらに、低酸素応答シグナルを抑制することで、ケロイド内局所免疫の正常化や線維化の抑制をもたらすことを示すことである。ケロイド局所において HIF-1 が免疫バランスを破綻させていることを証明できれば、ケロイドの病態解明や治療法の開発に役立つ可能性がある。また、免疫バランスの破綻がケロイド病態に影響を与えているのであれば、ケロイド内の酸素状態のコントロールが、新たな治療アプローチとなりうると考えられた。

3. 研究の方法

(1) 検体の採取

北海道大学病院生命・医学系研究倫理審査委員会による倫理審査の承認を受けた自主臨床研究自 020-0197 「ケロイドの病態解明と細胞レベルでの抑制効果の実証研究」に基づき、自由意志により同意を得られた患者の正常皮膚 (対照群)、成熟癒痕、肥厚性癒痕、熱傷皮膚、ケロイド組織、およびそれぞれの患者の血液検体を採取した。得られた組織から explant 法にて線維芽細胞を分離し、初代培養を行い、継代を行った後、液体窒素内に凍結保存した。また、血液検体から Leucosep 管および Ficoll-Paque™ を用いた密度勾配遠心法により、末梢血単核球細胞を分離し、液体窒素内に保管した。

(2) ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色、免疫組織学的染色

得られた組織を 4%パラホルムアルデヒド固定し、パラフィン包埋組織標本を作成し、HE 染色、HIF-1 (BD Biosciences, 610958)、CD4 (Dako, M7310)、FOXP3 (Cell Signaling, 12653)、IL-17 (proteintech, 13082-1-AP) に対する免疫組織学的染色を行った。

(3) ケロイド線維芽細胞の培養、real time PCR

ケロイド組織、正常皮膚から得られた液体窒素内に保管済みの線維芽細胞を、マルチガスインキュベーターを用いて低酸素濃度 (37 °C、O₂ 濃度 1%、CO₂ 濃度 5%) 下、通常酸素濃度 (37 °C、O₂ 濃度 20%、CO₂ 濃度 5%) 下で培養した。培養細胞を回収し、細胞のホモジナイズを行い、QIAshredder、RNeasy Mini Kit、RNase-Free DNase Set (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。逆転写酵素 High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) を用いて cDNA を作成し、HIF-1、COL1、VEGF-A 等のサイトカイン産生に関し、real time PCR を行った。

(4) CD4 陽性 T 細胞の培養

ケロイド患者、対照群から得られた液体窒素内に保管済みの血液検体を用いて、磁気ビーズ法にて CD4 陽性 T 細胞を分離した。得られた CD4 陽性 T 細胞を低酸素濃度下、通常酸素濃度下で培養した。

4. 研究成果

(1) 検体の採取

文書による同意を得て、19例(男性5例、女性14例)のケロイド患者からケロイド組織の採取を行い、そのうち16例から血液サンプルを採取した。採取した組織の部位別内訳は、耳垂7例、耳介7例、頸部1例、肩部1例、下腹部1例、臍部2例であった。また、対照群として6例(男性1例、女性5例)の患者から手術時の余剰皮膚(正常皮膚、成熟瘢痕、肥厚性瘢痕、熱傷皮膚)および血液サンプルを採取した。パラフィン包埋組織標本の作成および線維芽細胞の初代培養を行い、線維芽細胞を凍結保存した。COVID-19の流行による2020年度の手術件数の減少から、当初予定した検体採取数よりも少数となった。

(2) HE染色、免疫組織学的染色

HE染色において、正常皮膚と比較し、ケロイド組織では、真皮膠原線維の増加と、炎症細胞浸潤を認めた。ケロイド組織においてHIF-1の発現増強を認めた。また、ケロイド組織内のCD4陽性T細胞のうち、FOXP3を発現する細胞の割合が低下していた(図1)。

IL-17は炎症を反映し、ケロイド全体および熱傷皮膚において発現増強を認めた(図2)。

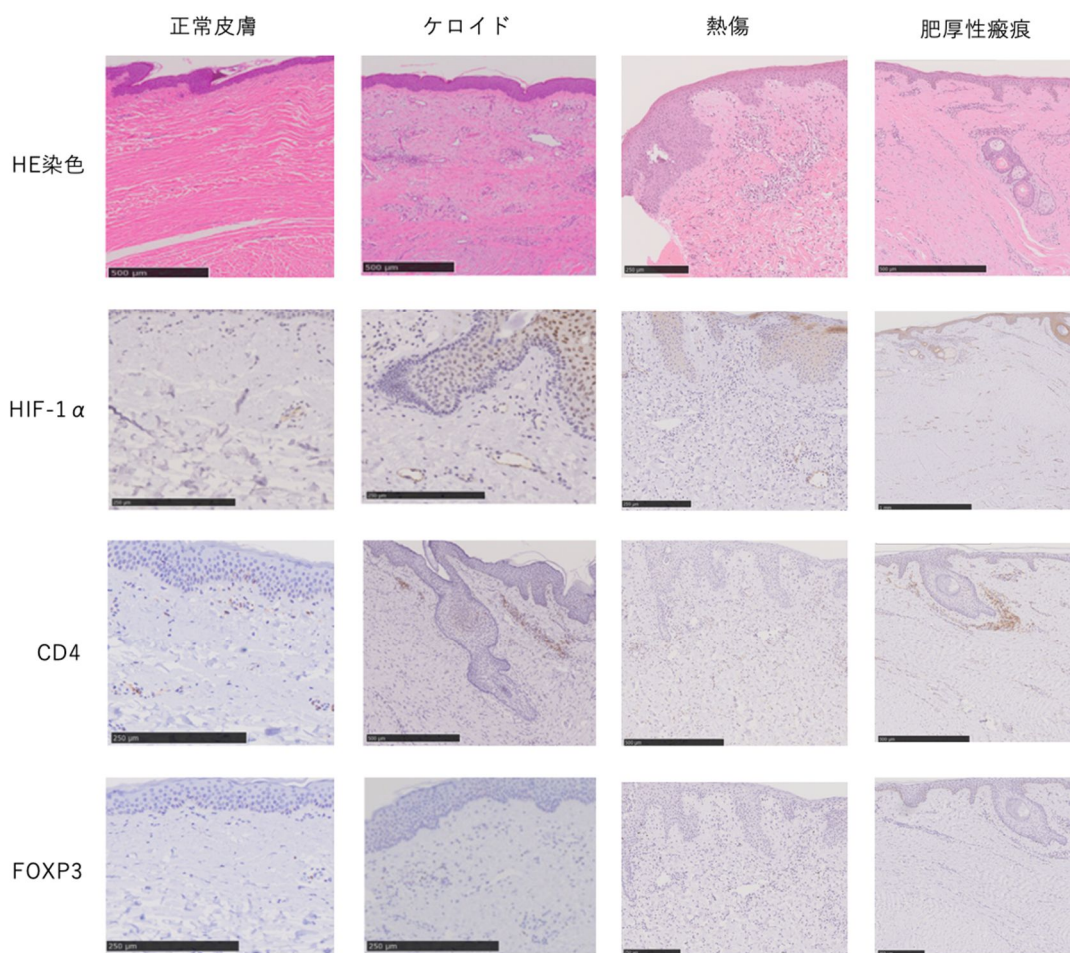


図1. 正常皮膚、ケロイド、熱傷、肥厚性瘢痕のHE染色、免疫組織学的染色

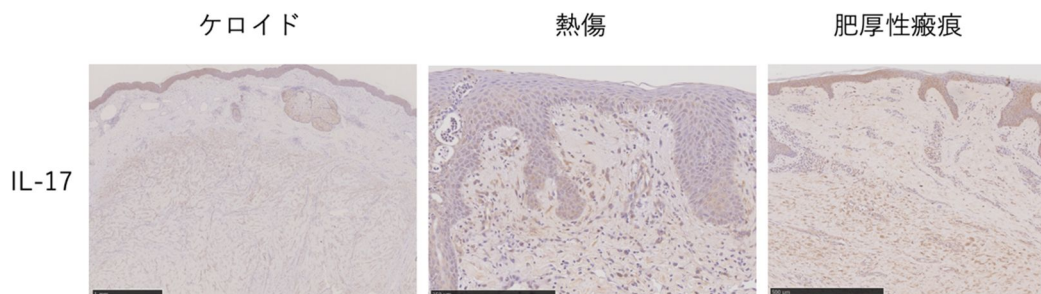


図2. ケロイド、熱傷、肥厚性瘢痕の免疫組織学的染色(IL-17)

(3) ケロイド線維芽細胞の培養、real time PCR

ケロイド線維芽細胞の低酸素下培養において、対照群と比較し、HIF-1、COL1、VEGF-A の発現の増加を認めた (図3)。

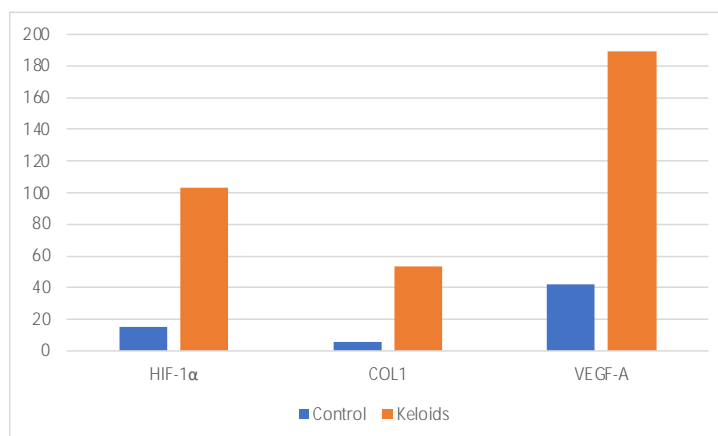


図3. 正常皮膚、ケロイドにおける相対 mRNA 発現量

(4) CD4 陽性 T 細胞の培養

上記方法を用いて CD4 陽性 T 細胞の低酸素下培養を試みた。通常酸素濃度下培養では CD4 陽性 T 細胞の増殖を認めたが、低酸素下培養において CD4 陽性 T 細胞は増殖を示さなかった。そのため、当初、制御性 T 細胞、Th17 細胞のそれぞれの転写因子である FOXP3、RORC2、およびそれらが産生する TGF- β や IL-17 等の mRNA 発現を real time PCR を用いて評価することを予定していたが困難であった。

(5) 考察

我々は先行研究において、ケロイド線維芽細胞と CD4 陽性 T 細胞共培養モデルを用いて、Treg と Th17 細胞による免疫バランスの破綻が、ケロイド内での炎症の遷延に關与している可能性を示した¹。動物モデルにおいて、HIF-1 により Treg と Th17 細胞のバランスが制御されていること示されている²。一方、ケロイド中央部は、豊富なコラーゲン産生を反映し、重度の虚血状態に陥っていると報告されており³、ケロイド内での低酸素状態と Treg/Th17 細胞バランスの解明を試みた。

HE 染色、免疫組織学的染色において、ケロイド内で HIF-1 の発現増加を認める一方、Treg の転写因子である FOXP3 の発現低下を認めた。また、ケロイド線維芽細胞の低酸素下培養において、HIF-1、COL1、VEGF-A の発現増加を認め、低酸素下ではケロイド線維芽細胞がより生体内と近似し、コラーゲン産生が活性化されると考えられた。

上記結果より、ケロイド内では恒常的な低酸素状態が HIF-1 の増加と、それに伴う Treg/Th17 バランスの破綻を引き起こし、線維化が遷延する可能性が示唆された。実際に低酸素下において、CD4 陽性 T 細胞がケロイド線維芽細胞に与える影響を共培養系を用いて検討することを今後の課題とした。

<参考文献>

1. Naoki Murao, Ken-ichiro Seino, Toshihiko Hayashi, Masaki Ikeda, Emi Funayama, Hiroshi Furukawa, Yuhei Yamamoto and Akihiko Oyama. Treg-enriched CD4+ T cells attenuate collagen synthesis in keloid fibroblasts. *Exp.Dermatol.*,2014,23,266-271
2. Eric V. Dang, Joseph Barbi, Huang-Yu Yang, Dilini Jinasena, Hong Yu, Ying Zheng, Zachary Bordman, Juan Fu, Young Kim, Hung-Rong Yen, Weibo Luo, Karen Zeller, Larissa Shimoda, Suzanne L. Topalian, Gregg L. Semenza, Chi V. Dang, Drew M. Pardoll, and Fan Pan. Control of TH17/Treg Balance by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Cell*,2011,146,772-784
3. Ryoma Touchi, Koichi Ueda, Norifumi Kurokawa, Motomu Tsuji. Central regions of keloids are severely ischaemic. *J.Plast.Reconstr.Aesthet.Surg.*,2016,69,e35-41
4. Xiaolong Wu. Expression of HIF-1 in keloids and its correlation with inflammatory responses and apoptosis. *Eur.J.Inflammation*,2018,16,1-5

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村尾 尚規
2. 発表標題 キズ・キズあとをきれいに治す～炎症を制御し、ケロイド・肥厚性瘢痕を制御する～
3. 学会等名 第29回日本熱傷学会北海道地方会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石井 浩子、村尾 尚規、石川 耕資、前田 拓、林 利彦、舟山 恵美、山本 有平
2. 発表標題 低酸素応答システムとケロイド～炎症・線維化への影響～
3. 学会等名 第44回北大形成外科アカデミー
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山本 有平 (Yamamoto Yuhei) (70271674)	北海道大学・医学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	林 利彦 (Hayashi Toshihiko) (00432146)	旭川医科大学・大学病院・教授 (10107)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	舟山 恵美 (Funayama Emi) (10533630)	北海道大学・医学研究院・准教授 (10101)	
研究分担者	前田 拓 (Maeda Taku) (80813542)	北海道大学・大学病院・講師 (10101)	
研究分担者	石川 耕資 (Ishikawa Kosuke) (60791374)	北海道大学・医学研究院・助教 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関