

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659777

研究課題名(和文) 皮膚線条はケロイドの対極の病態である！～膠原線維とエストロゲンの知られざる関係

研究課題名(英文) Effects of estrogen and selective estrogen receptor modulators on normal and keloid fibroblasts

研究代表者

古川 洋志 (FURUKAWA, Hiroshi)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00399924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)： 選択的エストロゲン受容体調節薬(SERM、selective estrogen receptor modulator)はエストロゲン受容体に結合し作用するが、受容体の存在する組織によって作動薬または拮抗薬として作用する。SERMのケロイド線維芽細胞に対する効果を検討した。ケロイド線維芽細胞にエストロゲン受容体が存在することを確認し、ケロイド線維芽細胞をSERMで刺激した。SERMは薬剤の種類や濃度によってケロイド線維芽細胞の細胞増殖を抑制する可能性があった。

研究成果の概要(英文)： Selective estrogen receptor modulators (SERMs) bind to estrogen receptors acting as an agonist or an antagonist depending on the target tissue. First, we detected the expression of estrogen receptors in keloid fibroblasts. Second, we investigated the effects of SERMs on keloid fibroblasts. The effect is different depending on the concentration of SERMs. Some SERMs are suggested to inhibit cell proliferation of keloid fibroblasts.

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：創傷治癒学 ケロイド 選択的エストロゲン受容体調節薬

1. 研究開始当初の背景

(1) 選択的エストロゲン受容体調節薬とは

選択的エストロゲン受容体調節薬（以後、SERM とする）はエストロゲン受容体に結合し作用する薬剤であるが、受容体の存在する組織によって作動薬または拮抗薬として作用することが特徴である。代表的な SERM として閉経後女性の骨粗鬆症の治療に用いられる raloxifene や乳癌の治療に用いられるタモキシフェン tamoxifen が挙げられる。これらは骨のエストロゲン受容体に対しては作動薬として作用し骨新生を促すが、乳腺組織のエストロゲン受容体に対してはエストロゲンと競合的に結合し拮抗薬として作用する。すなわち、SERM は、従来のエストロゲン製剤投与時の乳癌のリスクの上昇や、抗エストロゲン製剤投与時の骨粗鬆症の発症といった副作用を起こすことなく、効率的に目的組織に作用を及ぼすことが可能である。

(2) エストロゲンとケロイド

妊娠中などに生じる皮膚線条の成因として、皮膚の急速な物理的な伸展の他に、エストロゲンやステロイドなどのホルモンのバランスの変化が考えられている。さらに近年では皮膚の伸展による機械的刺激により、皮膚線条部位にはエストロゲン受容体などのホルモン受容体が増加していることが判明している。

また、皮膚線条の病態、組織所見の一部に線維芽細胞の増殖抑制、膠原線維産生抑制などのケロイドと対極の所見がみられることがある。

(3) SERM と膠原線維

近年、raloxifene や tamoxifen などの SERM が線維芽細胞に作用しコラーゲン代謝に関与することが明らかになっている。閉経等によるエストロゲン不足は皮膚、骨、腱等の組織のコラーゲン代謝を低下させるが、raloxifene は皮膚や腱の正常線維芽細胞のコラーゲン代謝を高めるとの報告がある。また、tamoxifen はケロイド線維芽細胞に作用し、TGF- β 産生を抑制する、との報告も存在する。

エストロゲンや SERM は創傷治癒を促進する可能性が示されている。しかし、エストロゲンおよびエストロゲン受容体の過剰状態では皮膚線条のようにコラーゲン産生が抑制される可能性があり、線維芽細胞に対するエストロゲンの作用は未だ不明な点がある。同様に、tamoxifen のようにケロイド抑制効果が期待される SERM が存在するが、組織によってあるいは薬剤によって、エストロゲン作用（作動薬）または抗エストロゲン作用（拮抗薬）を示すため、SERM のケロイドに対する

効果や作用機序は現状では完全には解明されていない。

2. 研究の目的

ケロイド線維芽細胞におけるエストロゲン受容体の発現の有無、SERM のケロイド抑制効果の有無の検証等が本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 線維芽細胞の培養

ケロイド患者、正常人（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 法により線維芽細胞を培養した。組織の採取については患者より文書による同意を得た上で実施し、当研究機関の倫理委員会、自主臨床研究審査委員会の指針に従った。また、正常対照の一つとして市販の NHDF（正常ヒト線維芽細胞）を使用した。

(2) エストロゲン受容体の確認

① 免疫細胞染色

Chamber slide に線維芽細胞を 3×10^3 個播種した。培養液は 10%FBS (fetal bovine serum) + DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) とした。細胞の十分な増殖、安定を確認した後、エストロゲン受容体の免疫細胞染色を行った。

② ウェスタンブロット

培養した線維芽細胞よりタンパクを抽出した。ウェスタンブロットにてエストロゲン受容体のタンパクレベルでの発現の有無を確認した。

(3) 線維芽細胞のエストロゲン、SERM による刺激

① 細胞増殖率

正常及びケロイド線維芽細胞を 96 well プレートに 3.0×10^3 個/well 播種した。培養液は 10%FBS + DMEM とした。播種後 24 時間で 10 倍段階希釈した 0~10 μ M の各濃度の 17 β -estradiol、tamoxifen、raloxifene を添加した。添加後 24、48 時間の細胞数を MTS アッセイで測定し、細胞増殖率を算出した。

② I 型コラーゲン産生：

ケロイド線維芽細胞を 6 well プレートに 2.0×10^4 個/well 播種した。培養液は 10%FBS + DMEM とした。48 時間後に培養液を 1%FBS + DMEM に交換し、24 時間の starvation を行った。培養液中に 1 μ M の 17 β -estradiol、

tamoxifen、raloxifene を添加した。添加後72 時間で線維芽細胞、培養上清を回収し、I 型コラーゲン産生を radioimmunoassay で評価した。

4. 研究成果

(1)ケロイド線維芽細胞におけるエストロゲン受容体

①免疫細胞染色 (図 1)

ケロイド線維芽細胞の核に一致してエストロゲン受容体 α (ER α) 抗体および β (ER β) が確認された。

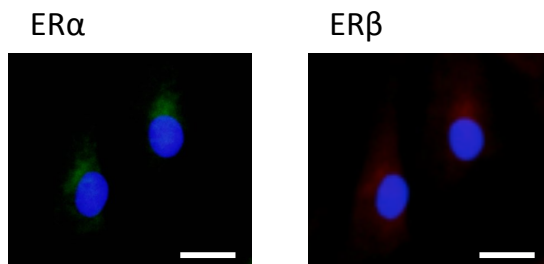


図 1:ケロイド線維芽細胞免疫細胞染色. ER α (緑)、ER β (赤)、核 (青) を染色した. Bar=20 μ m.

②ウェスタンブロット (図 2)

ケロイド線維芽細胞において ER α 、ER β がタンパクレベルで発現することが確認された。

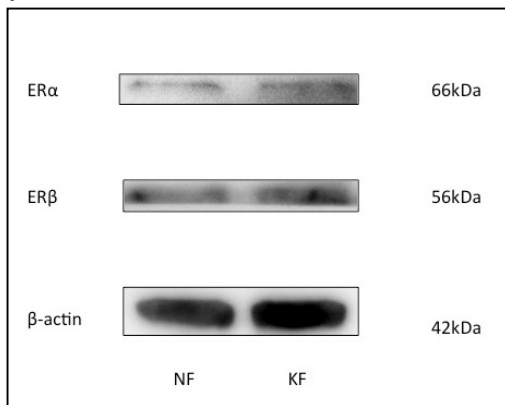


図 2: ウェスタンブロット. 左が正常線維芽細胞 (NF)、右がケロイド線維芽細胞 (KF). 内在性コントロールとして β -actin を用いた。

(2)エストロゲン、SERM 刺激後の細胞増殖

①17 β -estradiol (図 3)

1、10、100 nM の 17 β -estradiol は正常皮膚線維芽細胞を増殖させる傾向があった。17 β -estradiol のケロイド線維芽細胞に対する効果の明確な傾向は示せなかった。

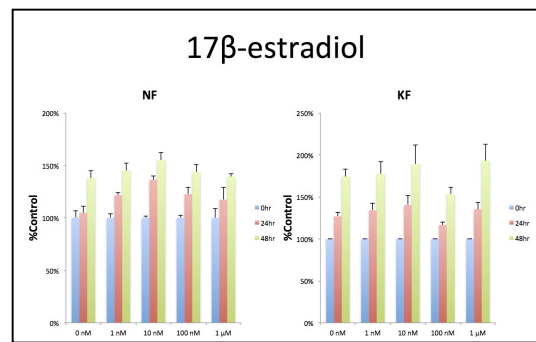


図 3: 17 β -estradiol 添加後の細胞増殖率. NF=NHDF, KF N=3.

②Tamoxifen (図 4)

100 nM の tamoxifen は正常皮膚線維芽細胞、ケロイド線維芽細胞を増殖させる傾向があったが、1 μ M ではケロイド線維芽細胞の増殖が抑制される傾向があった。

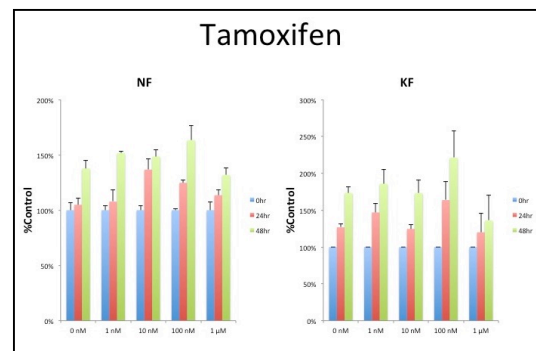


図 4: Tamoxifen 添加後の細胞増殖率. NF=NHDF, KF N=3.

③Raloxifene (図 5)

1 μ M の raloxifene は正常皮膚線維芽細胞の増殖を抑制する傾向があった。

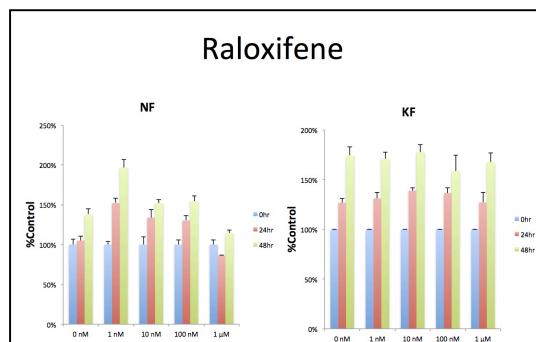


図 5: Raloxifene 添加後の細胞増殖率. NF=NHDF, KF N=3.

④その他

10 μ M の 17 β -estradiol、raloxifene を投与したところ、正常皮膚線維芽細胞、ケロイド線維芽細胞の一部が well より剥がれ死滅することが顕微鏡で確認された。10 μ M の 17 β -estradiol、raloxifene は細胞毒性があ

る可能性があった。同様のことから、 $1\mu\text{M}$ の tamoxifen がケロイド線維芽細胞に対して細胞増殖抑制ではなく細胞毒性を示す可能性も検討する必要がある。

本実験系では細胞増殖率、細胞毒性に対する培養液中の血清濃度や各薬剤の溶媒として用いたジメチルスルホキシドの影響の有無についても更に検証が必要と考えられた。

(3) エストロゲン、SERM 刺激後の I 型コラーゲン産生 (図 6)

(2) で得られた結果より、各薬剤の細胞毒性を示さない濃度の限界を $1\mu\text{M}$ と設定し、 $1\mu\text{M}$ 添加時のケロイド線維芽細胞のコラーゲン産生を検討した。培養液中の PINP (I 型プロコラーゲン N ペプチド、I 型コラーゲン産生を反映) 濃度より、 $1\mu\text{M}$ の raloxifene はコラーゲン産生を抑制する可能性があると考えられた。顕微鏡所見では $1\mu\text{M}$ の tamoxifen の細胞毒性は確認できなかった。

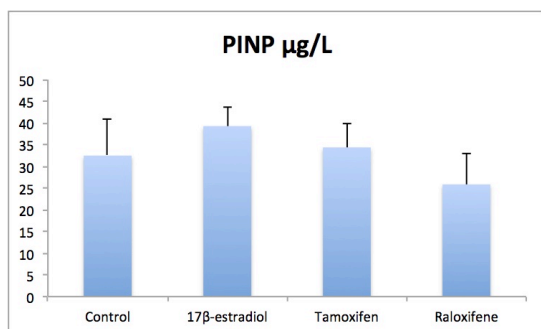


図 6 : 各薬剤添加後の PINP. N=2.

(4) 得られた成果の意義

本研究は乳癌や骨粗鬆症などで既に臨床使用されている SERM のケロイド線維芽細胞に対する効果を検討したことに意義がある。

まず、真皮線維芽細胞、特にケロイド線維芽細胞のエストロゲン受容体発現が確認できた。これまでの研究では乳腺等の他組織や表皮角化細胞でのエストロゲン受容体の存在が示されているが、真皮線維芽細胞におけるエストロゲン受容体については不明瞭であった。ケロイド線維芽細胞にエストロゲン受容体が発現することにより、SERM がケロイドに作用を及ぼす可能性が判明した。

次に薬剤や濃度によって線維芽細胞に及ぼす作用が異なる可能性があることが示された。また、正常線維芽細胞とケロイド線維芽細胞で薬剤に対する感受性の違いがある可能性があった。現時点で正常線維芽細胞とケロイド線維芽細胞との間でエストロゲン受容体の発現に明確な差を認めていない。しかし、TGF- β 刺激により線維芽細胞のエストロゲン受容体発現が亢進するという報告もあり、TGF- β を高産生するケロイド線維芽細胞とエストロゲン受容体の発現との関係について検討する必要がある。

SERM をケロイド治療に臨床応用する場合、至適薬剤濃度、薬剤の皮膚への移行性などを検討する必要がある。高濃度の SERM 投与は正常細胞に対しても毒性を示す可能性があり、現在臨床で使用されている SERM 内服薬を至適濃度で効果的にケロイド線維芽細胞に作用させることができるかが課題となる。

その他の今後の研究課題として、細胞増殖抑制以外の作用ならびにその機序の解明等がある。

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 1 件)

村尾尚規、佐藤千草、古川洋志、池田正起、林利彦、舟山恵美、小山明彦、堀内勝己、齋藤典子、山本有平

ケロイド線維芽細胞における選択的エストロゲン受容体調節薬の作用

第 87 回北海道・東北形成外科学会北海道地方会

2014 年 02 月 08 日

札幌市、北海道大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(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

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

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

堀内 勝己 (HORIUCHI, Katsumi)

北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員

研究者番号：60625028

齋藤 典子 (SAITO, Noriko)

北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員

研究者番号：80374487