

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25年5月14日現在

機関番号：32661
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590321
 研究課題名(和文) 線維性皮膚炎における骨髄由来間葉系前駆細胞の分化異常と過剰癒痕の形成機序
 研究課題名(英文) Fibrocytes differentiation and fibrosis during the process of excess scarring in human fibrotic dermatitis
 研究代表者
 赤坂 喜清 (AKASAKA YOSHIKIYO)
 東邦大学・医学部・教授
 研究者番号：60202511

研究成果の概要(和文)：

ヒト皮膚修復組織における骨髄由来間葉系前駆細胞 Fibrocyte の発現性を皮膚修復肉芽組織 49 例で検討した。Pro-collagen I/CD34 と Pro-collagen I/LSP-1 陽性の血管内 Fibrocyte は血管外に比べて高度に減少し、血管外のものに比べて各修復期で増減が乏しかった。よって血管内外で Fibrocyte の由来が異なることが示唆された。血管内 Pro-collagen I/CD34 陽性 Fibrocyte は細小動静脈に特異的に増加し、本血管の内皮細胞は CXCL12 発現増加から CXCR4 陽性の Fibrocyte の分化誘導に関与していると考えられた。線維性皮膚炎の検体は多くが癒痕期であり Fibrocyte 検出不能から同病態発生初期の Fibrocyte 発現性を検討する必要性が判明した。

研究成果の概要(英文)：

In order to investigate the distributional relationship between circulating and resident fibrocytes in relation to vessel formation, double-staining was performed in 49 human skin tissues samples, with CD34 or leukocyte-specific protein-1 (LSP-1) plus pro-collagen I. A considerable difference in the numbers of fibrocytes between extra- and intra-vascular regions was evident, with obviously fewer circulating, than resident fibrocytes. The expression of resident, but not of circulating fibrocytes, changed as healing advanced, suggesting that the different cellular properties of fibrocytes between extra- and intra-vascular regions. The specific distribution of pro-collagen I+/CD34+ circulating fibrocytes was evident in arterioles/venules, with the obviously increased expression of CXCL12 in the endothelial cells. Based on the relatively specific distribution of circulating fibrocytes within arterioles/venules, CXCL12-positive arterioles might provide a microenvironment that promotes CXCR4-mediated fibrocyte chemotaxis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
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：基礎医学・人体病理学

キーワード：創傷治癒、間葉系前駆細胞、組織修復、癒痕、Fibrocyte

1. 研究開始当初の背景

| 線維芽細胞の誘導メカニズムは殆ど解明さ

れていない。近年骨髄由来の間葉系前駆細胞 Fibrocyte から一部の線維芽細胞が分化し線維化に関与することが実験的に証明された。よって修復過程後期で遂行される線維化に血液細胞由来の Fibrocyte の分化増殖が想定されるが、個々の修復過程における Fibrocyte の発現誘導機構は解明されていない。

2. 研究の目的

- (1) ヒト正常皮膚の修復過程における Fibrocyte の発現性とその subtype を同定し、それぞれの特異的な発現様式を明らかにする。
- (2) 骨髄から Fibrocyte の分化誘導メカニズムをケモカイン発現性から検討し、皮膚修復期における Fibrocyte の微小環境を明らかにする。
- (3) Fibrocyte と線維芽細胞、筋線維芽細胞との相互関係を解析し、線維芽細胞の分化過程の全体像を明らかにする。
- (4) ケロイド肥厚性癬痕において Fibrocyte 発現性を検討し、病態発症における同細胞の役割を検討する。

3. 研究の方法

(1) 材料：正常皮膚修復組織の蒐集は東邦大学医学部倫理委員会の承認で実施された。

① 皮膚組織：正常皮膚の肉芽組織や癬痕組織は治療目的で外科切除された非病変部の組織から蒐集した。東邦大学において2007年から2009年まで49名の患者からインフォームドコンセントを得た後に採取された非病変部の皮膚組織を用いた。

採取部位としては頭部(3例)、顔面(8例)、耳(2例)、頸部(5例)、腋窩(5例)、胸部(11例)、背部(4例)、腹部(1例)、臀部(4例)、腕(3例)、足(3例)。採取した組織は Hematoxylin-eosin 染色を行い、修復期の組織学的に判定した。

② 修復期分類：正常創傷治癒過程の組織分類に基づき炎症期、炎症/増殖期、増殖期、組織再改築期、癬痕期に分類した。1つの切片に1あるいは2個の治癒期を含むもののみを使用した。検索切片は全部で147個であり、炎症期が15領域、炎症/増殖期が47領域、増殖期が32領域、組織再改築期が38領域、癬痕期が15領域であった。 α -SMA 免疫染色陽性の血管平滑筋の有無により毛細血管、細小動脈と動脈に分類した。

(2) 蛍光染色：Pro-collagen I/CD34, Pro-collagen I/LSP-1 と CD34/LSP-1 の蛍光二重染色で Fibrocyte を同定した。一次抗体は Pro-collagen I, CD34 と LSP-1 抗体 (SantaCruz, California, U.S.A.)。Biotin 化抗マウス、ウサギとヤギ二次抗体は DAKO (Glostrup, Denmark)。Avidin 化 fluorescein isothiocyanate (FITC) と Texas red は VECTOR (Burlingame, California, U.S.A.)社のものを使用した。核染後 AX80 microscope (Olympus, Tokyo, Japan)で観察した。共発現の判定は GraphicConverter Universal Binary 6.1.2J

software (Lemke Software GmbH, Peine, Germany)で判定した。

(3) 免疫染色：上記の二重染色に α -SMA 免疫染色を加えた三重染色を施行し Fibrocyte と血管との組織学的相互関係を判定した。具体的には Pro-collagen I/CD34/ α -SMA, Pro-collagen I/LSP-1/ α -SMA と CD34/LSP-1/ α -SMA の一次抗体で反応後、二次抗体と反応させ、その後 PermaBlue/AP (Diagnostic Biosystems, Pleasanton, California, U.S.A) と Vulcan Fast Red Chromogen kit 2 (Biocare Medical, Concord, California, U.S.A) で発色させた。その後 α -SMA 抗体を一昼夜反応させた二次抗体と反応させ、その後 DAB (DAKO)で発色させた。毛細血管、細小動脈と動脈におけるケモカイン陽性細胞を検討するため CXCL12 (LIFESPAN BIOSCIENCES, Seattle, Washington, U.S.A.)/ α -SMA, 6Ckine (R&D systems, Minneapolis, Minnesota, U.S.A.)/ α -SMA, and MCP-1 (R&D systems)/ α -SMA の組み合わせで二重染色を施行した。

(4) 組織学的判定：血管外 Fibrocyte の発現頻度は、倍率80倍で8視野観察した組織の陽性細胞数を総細胞数で割った値にした。なお総細胞数の判定には DAPI 染色陽性の核を Adobe Photoshop Element 7.0 で色素変化後 Image J 1.41 に取り込み陽性細胞を算定した。また血管内 Fibrocyte の発現頻度は、倍率80倍で8視野観察した CD34 陽性や α -SMA 陽性血管内の陽性細胞数を血管数で割ることで算定した。また Pro-collagen I/CD34, Pro-collagen I/LSP-1 と CD34/LSP-1 陽性の血管内 Infiltrating fibrocyte の局在する毛細血管、細小動脈と動脈の数をそれぞれの組織型の血管総数で割って判定した。ケモカイン陽性血管の発現頻度は CXCL12, 6Ckine, MCP-1 陽性の内皮細胞が発現する毛細血管、細小動脈と動脈を組織別に判定し、それぞれの組織別の血管総数で割った。

4. 研究成果

(1) Fibrocyte の発現特異性：血管外 Pro-collagen I/CD34 陽性細胞は炎症/増殖期で最も増加し、組織再改築期や癬痕期より有意に増加していた。血管外 Pro-collagen I/LSP-1 陽性細胞も炎症/増殖期で最も増加し、増殖期や癬痕期より有意に増加していた。血管外 CD34/LSP-1 陽性細胞も炎症/増殖期で最も増加し、増殖期や癬痕期より有意に増加していた。しかし血管内の Pro-collagen I/CD34 および Pro-collagen I/LSP-1 陽性の Fibrocyte は癬痕期以外では同反応性を示す血管外 Fibrocyte に比して発現頻度が高度に減少し、その頻度は各期において増減が乏しく有意差はなかった (図1)。

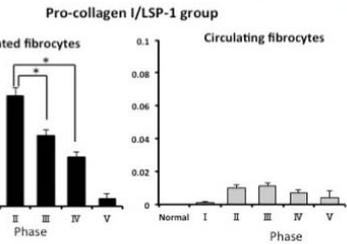
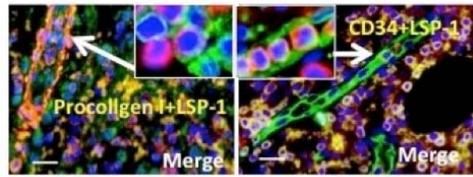


図1 Fibrocyte組織像と分布

(2) 血管特異性: 組織別血管における血管内 Fibrocyte の分布を α -SMA との三重染色で判定した。血管内 Pro-collagen I/CD34 と CD34/LSP-1 陽性の血管内 Fibrocyte は毛細血管に比べて細小動静脈では有意に増加していた。Pro-collagen I/LSP-1 陽性の Fibrocyte でも同様な変化がみら

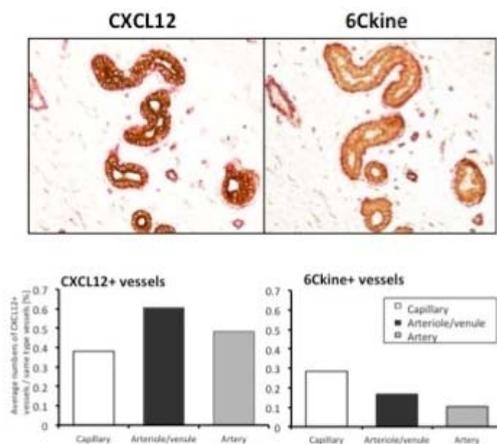


図2 ケモカインの発現性と血管

れたが、有意差はなかった。したがって血管内 Pro-collagen I/CD34 と CD34/LSP-1 陽性の血管内 Fibrocyte は細小動静脈に特異的に発現することが示唆された。

(3) ケモカインの発現性: 血管組織別におけるケモカインの発現性を検討した。血管内皮細胞は CXCL12 と 6Ckine のみ発現がみられたが、MCP-1 の発現は認められなかった。CXCL12 陽性の毛細血管は組織改築期で減少したが同じ反応を示す細小動静脈は増加傾向を示し、この細小動静脈は同陽性の毛細血管や動脈に比して 1.59 から 1.26 倍増加した。CXCL12 のリガンドである CXCR4 は細小動静脈内の CD34 陽性細胞で発現が確認され CXCL12 陽性の細小動静脈では Fibrocyte が CXCR4 発現から誘導されることが示唆された。6Ckine は毛細血管で増加して

いたが発現頻度は全体的に低かった (図 2)。

(4) 考察

① 二重染色で同定される血管内 Fibrocyte は血管外のものに比べて明らかに少なく、血管内外で Fibrocyte の発現頻度が全く異なることが判明した。血管外 Fibrocyte は修復過程で増減し炎症増殖期で最も増加した。しかし血管内 Fibrocyte は増減が乏しく、同じ反応性を示す Fibrocyte は血管内外でその由来が異なることを示唆した。血管外 Fibrocyte は血管内から侵入し筋線維芽細胞に分化する以外に別の Phenotype から誘導される可能性が他の研究から示唆された。ここでは成熟 Fibrocyte が形質転換し (Reprogrammed fibrocyte)、これが再び成熟した Fibrocyte や線維芽細胞に分化することが実験的に証明されている。したがって今回検出された血管外 Fibrocyte の集団には成熟 Fibrocyte 以外に血管外の微小環境により形質転換し Reprogam された Fibrocyte も含まれ、全体としての血管外 Fibrocyte 数が血管内より高度に増加している可能性が示唆された。

② 線維化のピークを示す組織再改築期以前の炎症/増殖期で pro-collagen I/LSP-1 陽性の血管外 Fibrocyte がピークを示した。したがって同陽性 Fibrocyte は治癒過程が進行すると Fibroblast や Myofibroblast に分化して修復組織の線維化に寄与していると考えられた。

③ 動脈や毛細血管と比較して細小動静脈で Pro-collagen I/CD34, Pro-collagen I/LSP-1 陽性の血管内 Fibrocyte が有意に増加していた。この有意な増加から同血管では骨髄細胞から血管内 Fibrocyte への分化誘導に重要な役割を果たしていると考えられた。今回は細小動静脈の内皮細胞で CXCL12 発現増加が判明した。CXCR4 陽性細胞の遊走には CXCL12 の発現が重要である。したがって CXCL12 の発現増加する細小動静脈では CXCR4 陽性の血管内 Fibrocyte の分化誘導を促進していると考えられた。今後肉芽組織の細小動静脈における内皮細胞と Fibrocyte 間における CXCR4 と CXCL12 を介した細胞間相互作用の解析は病的な創傷治癒による難治性潰瘍や肥厚性瘢痕・ケロイドの病態機序の解明に今後貢献すると考えられた。

④ 線維性皮膚炎である肥厚性瘢痕・ケロイドの検体は多くが瘢痕期であり Fibrocyte 検出不能から同病態発生初期の組織における Fibrocyte 発現性を検討する必要性が判明した。

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 12 件)

- ① Ishikawa Y, Akasaka Y, Ishii T (他24名, 2番目). Histopathologic profiles of coronary atherosclerosis by myocardial bridge underlying myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 査読有. 226巻. 2013: 118-123. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.11.036.
- ② Kinoshita K, Akasaka Y (他9名, 8番目). Coronary arterial complications after percutaneous coronary intervention in Behcet's disease. *Research Report in Clinical Cardiology*. 査読有. 4巻. 2013: 9-12. <http://www.dovepress.com/coronary-arterial-complications-after-percutaneous-coronary-intervention-peer-reviewed-article-RRCC>
- ③ Iuchi A, Akasaka Y, Ishii T (他3名, 5番目). Association of variance in anatomical elements of myocardial bridge with coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 査読有. 227巻. 2013: 153-158. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.11.036. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.10.037.
- ④ Inomata N, Akasaka Y (他3名, 2番目): Fibrocyte behavior relative to blood vessels under skin wound healing. *Jpn J Plast Reconstr Surg*. 査読有. 32巻. 2012: 645-659.
- ⑤ 猪俣直美, 赤坂喜清 (他5名, 2番目): 皮膚創傷治癒におけるFibrocyteの発現誘導とその微小環境の解析. *癬痕・ケロイド治療ジャーナル*. 査読無. 6巻. 2012: 25-28.
- ⑥ Fujita K, Akasaka Y(他9名, 2番目), Ishii T: Pathogenesis of lupus-like nephritis through autoimmune antibody produced by CD180-negative B lymphocytes in NZBWF1 mouse. *Immunol Lett*. 査読有. 144巻. 2012: 1-6. doi: 10.1016/j.imlet.2012.02.012.
- ⑦ Saito T, Kimura S, Akasaka Y (他9名, 7番目): Evidence of intravenous immunoglobulin as a critical supportive therapy against *Clostridium difficile* toxin-mediated lethality in mice. *J Antimicrob Chemother*. 査読有. 66巻. 2011: 1096-1099. doi: 10.1093/jac/dkr027.
- ⑧ Akishima-Fukasawa Y, Akasaka Y (他7名, 6番目): Malignant Adrenal Rest Tumor of the Retroperitoneum Producing Adrenocortical Steroids. *Endocr Pathol*. 査読有. 22巻. 2011:112-117. doi: 10.1007/s12022-011-9152-0.
- ⑨ Nonaka T, Inamori M, Akasaka Y (他11名, 14番目): A case of rectal cancer arising from long-standing prolapsed mucosa of the rectum. *Intern Med*. 査読有. 50巻. 2011: 2569-2573. https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/50/21/50_21_2569/_article
- ⑩ Akishima-Fukasawa Y, Ishikawa Y, Akasaka Y (他16名, 3番目): Histopathological predictors

of regional lymph node metastasis at the invasive front in early colorectal cancer. *Histopathology*. 査読有. 59巻. 2011: 470-481. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.03964.x.

- ⑪ Akasaka Y (他 12 名, 1 番目), Ono I: The mechanisms underlying fibroblast apoptosis regulated by growth factors during wound healing. *J Pathol*. 査読有. 221 巻. 2010: 285-299. doi: 10.1002/path.2710.
- ⑫ Gocho K, Akasaka Y(他7名, 6番目): Malignant Pleural Mesothelioma Presenting as an Acute Surgical Abdomen due to Metastatic Jejunal Perforation. *Intern Med*. 査読有. 49巻. 2010: 597-601. https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/49/6/49_6_597/_article

〔学会発表〕 (計 7 件)

- ① 小竹遥香, 赤坂喜清 (他 7 名, 2 番目): ケロイド線維芽細胞における Smad と MMP の発現異常とその意義. 第 42 回日本創傷治癒学会. 2012 年 12 月 4 日. 札幌
- ② 赤坂喜清 (他 7 名, 1 番目), 小野一郎: 創傷治癒の線維芽細胞アポトーシスによる組織修復促進のメカニズム. 第 42 回日本創傷治癒学会. 2012 年 12 月 2 日. 札幌
- ③ 赤坂喜清 (他 7 名, 1 番目), 石川由起雄: 創傷治癒期の線維芽細胞アポトーシスによる組織修復の実行メカニズム. 第 101 回日本病理学会総会. 2012 年 4 月 26 日. 東京.
- ④ 赤坂喜清(他 6 名, 1 番目), 小野一郎: サイトカイン制御による線維芽細胞アポトーシス発現の意義. 第 100 回日本病理学会総会. 2011 年 4 月 28 日. 横浜.
- ⑤ 猪俣直美, 赤坂喜清 (他 5 名, 2 番目): 血球由来間葉系前駆細胞(Fibrocyte)の発現誘導とその微小環境の解析. 第 40 回日本創傷治癒総会. 2010 年 12 月 2 日. 東京
- ⑥ 赤坂喜清, 小野一郎 (他 6 名, 2 番目): 創傷治癒の線維芽細胞アポトーシスにおける FAK キナーゼの関与とサイトカイン制御の意義. 第 99 回日本病理学会総会. 2010 年 4 月 27 日. 東京.
- ⑦ 岡田恵美, 赤坂喜清 (他 4 名, 5 番目): ケロイドにおける抗真菌薬の血管新生抑制作用に関する検討. 第 53 回日本形成外科学会総会・学術集会. 2010 年 4 月 4 日. 金沢.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤坂 喜清 (AKASAKA YOSHIKIYO)

東邦大学・医学部・教授
研究者番号：60202511

(2) 研究分担者

石川 由起雄 (ISHIKAWA YUKIO)
東邦大学・医学部・准教授
研究者番号：30276894

小野 一郎 (ONO ICHIRO)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20125298