

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 4 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2010～2012

課題番号：22591988

研究課題名（和文） ケロイド線維芽細胞の起源を探る－ケモカインに誘導される fibrocyte－

研究課題名（英文） The role of circulating fibrocytes in keloid diathesis.

研究代表者：

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

研究成果の概要（和文）：

- (1) 免疫組織科学を用いたケロイド組織内のケモカイン CXCL12 の同定
- (2) PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) を用いたマウス皮膚炎症モデルの作成
- (3) ヒト fibrocyte の分離とマウスへの移入

研究成果の概要（英文）：

- (1) Identification of chemokine (CXCL12) in human keloid tissue using immunohistochemistry
- (2) Development of a mouse dermal inflammation model using PMA
- (3) Isolation of human fibrocyte and transfer of human fibrocytes to mice

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 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

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：創傷治癒学

1. 研究開始当初の背景

1994年、Bucalaらが血中に存在する骨髄由来の間葉系細胞が創傷治癒の過程で組織に浸潤することを示し、この細胞を fibrocyte と名付けた (Bucala R, Mol Med. 1994)。fibrocyte は、組織中に浸潤し myofibroblast 様の細胞に分化する。また、各種の細胞外基質やサイトカインを放出することなどから、創傷治癒、肺線維症、喘息における気道の線維化など各種疾患への関与が指摘されている (Moore B. B, Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 2006., Nihlberg K, Respir. Res. 2006., Mehrad B, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007)。また、fibrocyte は細胞表面には CCR3, CXCR4, CCR5, CCR7 などのケモカインレセプターを発現しており、特にリガンドであるケモカイン (CXCL12, MCP-1, SLC1 など) によって局所に誘導されることが報告されている (Robet M, J. Clin. Invest. 2007)。この中で CXCR4 (レセプター) と CXCL12 (ケモカイン) のペアは CXCR4 - CXCL12 axis と呼ばれ、肺の線維化に重要な因子であることが最近の研究で報告された (Phillips R. J, J. Clin. Invest. 2007)。

われわれは、皮膚の組織修復の過程で最初にケモカインに誘導された fibrocyte が局所に定着し、そこで myofibroblast 様の細胞に分化し、その細胞が産生するサイトカインなどの生理活性物質が trigger となり、局所の皮膚線維芽細胞のケロイド線維芽細胞への分化が促進されるという可能性を考え、ケロイド線維芽細胞の起源として、骨髄由来の

間葉系細胞である fibrocyte がその鍵をにぎる細胞であるという仮説を提唱した。

2. 研究の目的

われわれは、拡大傾向にあるケロイド辺縁部あるいは表層部には α -SMA (α -smooth muscle actin) の産生が亢進した線維芽細胞が存在することをすでに証明している。その活動性の高いケロイド線維芽細胞を浸潤型ケロイド線維芽細胞と名付け、この浸潤型ケロイド線維芽細胞が常に維持され、その維持・増殖には周囲の免疫細胞が重要な役割を担っていると考えた。そして浸潤型ケロイド線維芽細胞の起源を探求することがケロイドの成因を明らかにすると推論した。そこで浸潤型ケロイド線維芽細胞は正常皮膚線維芽細胞が単純に myofibroblast 様に変異した細胞だけではなく、骨髄由来の fibrocyte が関与していると考えた。本研究は、ケロイド組織内の fibrocyte の存在を証明し、fibrocyte の誘導に重要なケモカインの同定およびその作用機序について詳細に研究することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) ケロイド組織内でのケモカインの同定

しかしながら、染色でケモカインを同定したとしても、fibrocyte がケモカインにより局所に誘導されることの証明にはならない。そのため実際にケモカインに対して fibrocyte が誘導、遊走することを示す必要性がある。このため以下の実験を計画した。

(2) マウスの背部皮膚に炎症性物質 (PMA) を注入することで皮膚炎症モデルを作成

炎症を起こした皮膚から RNA を抽出し、RT-qPCR を用いてケモカイン・ケモカインレセプターの発現を評価する。

(3) マウスの背部皮膚に皮膚欠損創を作成した創傷モデルを作成し、ヒト血液より分離した fibrocyte をモデルマウスへ移入する。

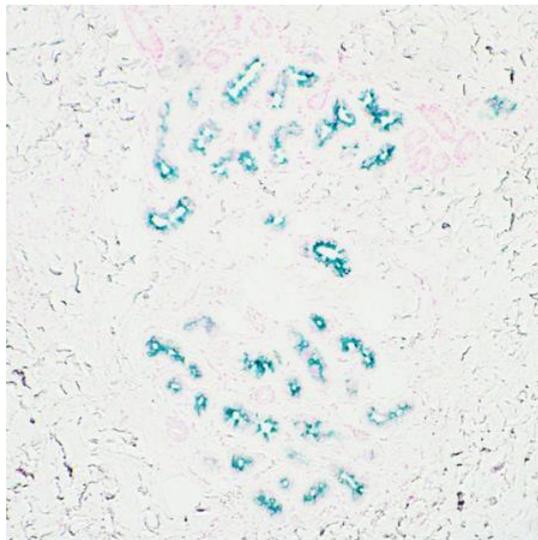
(2), (3)により、背部の創傷あるいは炎症によって発現したケモカインに対する fibrocyte の局所への遊走を免疫組織化学、FACS 等で評価する。

4. 研究成果

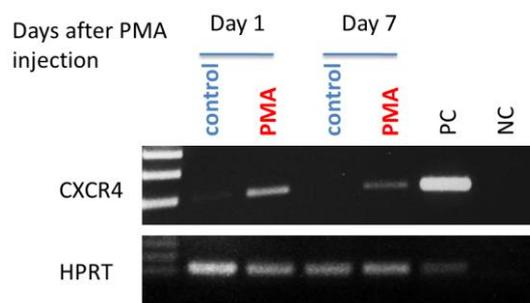
(1) 免疫組織科学を用いたケロイド組織内のケモカイン CXCL12 の同定

抗ヒト CXCL12 抗体と HistoGreen を用いてケモカイン CXCL12 を染色したところ、ケロイド組織内に一部残存している腺管構造を中心に染色した部位を認めた。これにより、実際にケロイド組織内にケモカイン CXCL12 が発現していることが確認された。以下に実際の免疫組織化学で得られた画像 (弱拡大) を供覧する。

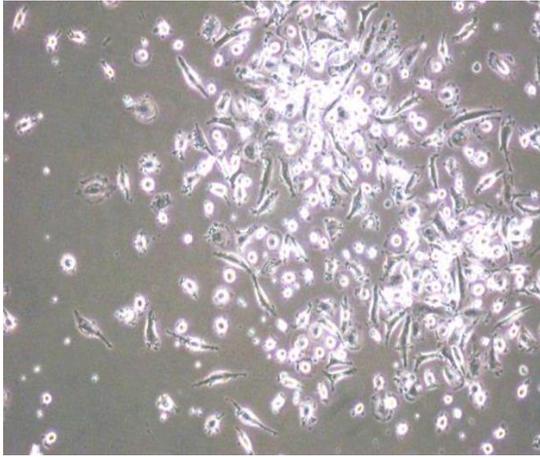
(2) PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) をマウス背部皮膚へ注入した後、皮膚より RNA を抽出した。RT-PCR を用いて CXCL12 に



対応するケモカインレセプター CXCR4 の発現を確認したところ、以下のごとく、PMA 注射群において値の上昇が認められた。(HPRT : 内在性コントロール, PC : ポジティブコントロール, マウスリンパ球, NC : ネガティブコントロール)



(3) ヒト fibrocyte の分離は Bucala の方法に準じて行った (Bucala R, Mol Med. 1994)。



培養された fibrocyte (紡錘形, 弱拡大)

分離した細胞を蛍光色素で染色し、(2)で作成した皮膚炎症マウスへ移入することで、fibrocyte が局所へ移行するのを免疫組織化学で評価することを検討した。

実際に蛍光色素で fibrocyte を染色し、移入を行ったが、適切な評価を行うことは困難であった。

これについては大きく以下の2つの理由が考えられた。

①fibrocyte の生存率

もともと継代が困難な細胞であり、培養された fibrocyte を剥離して移入する際の細胞の死亡率が高い。

②マウスの肺におけるトラッピング

fibrocyte を血管内に移入した場合に肺を通過する場合は非常に多くの細胞がトラップされてしまうため創部局所への移行率が低い。

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)

池田正起, 「ケロイド線維芽細胞の起源を探るーケモカインに誘導される f i b r o c y t e ー」

北大形成外科アカデミー2011 (2011. 12. 10)

京王プラザホテル札幌

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(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

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

林 利彦 (HAYASHI TOSHIHIKO)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号: 00432146

(3)連携研究者

()

研究者番号: