

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号： 31201

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2011 ~ 2012

課題番号： 23792051

研究課題名 “ケロイド体質” を考える—Fibrocyte とケロイド病態との関連性の探求—

研究課題名 “What is the keloid diathesis?” -Role of Fibrocytes in Keloids-

研究代表者

長尾 宗朝 (NAGAO MUNETOMO)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号： 00364349

研究成果の概要（和文）：

“ケロイド体質”という言葉があるように、ケロイド患者では病変が多発・再発し、拡大していく傾向がある。われわれはケロイドの成因には、局所のみならず全身的な影響があると考え、循環血液中の線維芽細胞前駆細胞、つまりCirculating fibrocytes（以下、CFs）の性質解析を行ってきた。その結果、ケロイド多発患者において、CFsの性質異常を認めていることをつきとめた。本研究の目的は、そのような循環細胞であるCFsの性質異常が実際にどこまでケロイドの成因に関わっているかを検討することにある。

実験は、臨床において説明・同意のもとにケロイド体質患者から10~20mlの採血を行う。得られた末梢血から末梢血単核球(PBMC)を分離したのちにCFsを培養する。ケロイド組織からは線維芽細胞の培養を行い、免疫不全マウス(NOD scid mice)において、背部に培養しておいた線維芽細胞の移植を行い、循環血液中へは尾静脈注射によりCFsの移植を行う。そうして移植後の局所における組織の変化につき観察を行うことで計画した。

その前段階として、免疫不全マウスの背部に創を作成し、尾静脈から移植を行ったCFsの創部移行の観察から始めた。CFsの創傷治癒にかかわる影響につき、創閉鎖の観察、組織学的変化、各種サイトカインの変化について検討を行い、創傷治癒とCFsとの関わり、さらにはケロイド成因との関わりにつき検討を行った。

まとめとして、免疫不全マウスを用いたヒトCFs移植併用創傷モデルを作成した。CFs移植による創治癒への影響は認めなかった。しかし創局所にはヒトCFsの局在、動員が認められた。遺伝子レベルでは、ヒトGAPDH、ヒトTGF- β の発現を認め、移植後14日目で増加する傾向を認めた。これらの結果を第56回日本形成外科学会総会で発表した。

研究成果の概要（英文）：

Keloids are often difficult to treat. The mechanisms underlying keloid formation are only partially understood. Because multiple and recurrent lesions frequently occur in patients with keloids, we hypothesize that systemic abnormalities are involved in the pathogenesis. We analyzed fibroblast progenitor cells, called “circulating

fibrocytes(CFs)”, in the peripheral blood of keloid patients. The altered characteristics of CFs from patients with keloids may have an important role in the pathogenesis of keloids. The aim of this study,

Blood samples were obtained from the patients with keloids, and the healthy volunteers. To isolate CFs from peripheral blood, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated from whole blood (10ml~20ml) by Ficoll Hypaque density-gradient centrifugation, and cultured in DMEM. On the other hand, the tissue from keloids patients were cultured with previous methods and isolated fibroblasts. Before that time, we made experiment in vivo for the relation between the wound healing and fibrocytes using NOD scid mice.

We injured for the back of NOD scid mice, making the ϕ 5mm skin defects, and then injected the human CFs from the tail vein. Immunohistochemistry was performed from the back scar tissue of the mice. CFs stained human HLA-a, b, c antibody from the scar tissue after 7days. The mRNA expression of humanGAPDH, humanTGF- β 1 were increased after 14days, compared with normal skin.

CFs were migrate in the wound site with expression of the various cytokines. And influence on wound healing. We will able to control of the abnormal CFs, its might be useful for the treatment for scar formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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・ケロイド

1. 研究開始当初の背景

“ケロイド体質”という言葉があるように、ケロイド患者では病変が多発・再発し、拡大していく傾向がある。

われわれはケロイドの成因には、局所のみならず全身的な影響があると考え、循環血液中の線維芽細胞前駆細胞、つまり Circulating fibrocytes (以下、CFs)の性質解析を行ってきた。その結果、ケロイド多発患者において、CFsの性質異常を認めていることをつきとめた。

CFsは、“fibroblast like cell”として1994年にBucalalにより報告された線維芽

細胞の前駆細胞である (Bucala R., et al.; Mol Med;1994)。末梢血中を循環し、創傷治癒への重要な役割が報告されている。特に筋線維芽細胞の構成に関わり、細胞外基質や各種サイトカイン産生などに働く。ケロイド組織局所においても、その存在が確認されており (Aiba S. &Tagami H., J Cutan Pathol. 1997)、ケロイドとの関わり合いに我々は着目し、研究を進めてきた。

近年、肺線維症(Pilling D. et al., J Immunol. 2007ほか)、皮膚硬化症 (Katebi M. et al., Inflammation. 2008, Quan T E. et al., Int J Biochem Cell Biol. 20

04ほか)などの各臓器や全身の線維性疾患や、気管支喘息(Wang J. et al., Am J Respir Crit Care Med. 2008ほか)などのアレルギー性疾患においても、研究報告例が散見され始めている。しかし、ケロイドや肥厚性瘢痕などにおいては、細胞の性質および作用に関する研究報告例はない。

ケロイドの成因としては、局所のみならず末梢血からのCFsの影響もあるものと考えられ、それらを検討するための実験計画を立案した。

2. 研究の目的

CFsの性質異常が、実際にどこまでケロイドの成因に関わっているかを検討する。

CFsを用いた動物実験系によってこれらを明らかにすることで、現在行われているような、ケロイドに対する局所的治療のみならず、発展的に新たな体質治療への可能性などを見出す。

3. 研究の方法

実験は、臨床において説明・同意のもとにケロイド体質患者から10~20mlの採血を行う。得られた末梢血から末梢血単核球(PBMC)を分離したのちにCFsを培養する。ケロイド組織からは線維芽細胞の培養を行い、免疫不全マウス(NOD scid mice)において、背部に培養しておいた線維芽細胞の移植を行い、循環血液中へは尾静脈注射によりCFsの移植を行う。そうして移植後の局所における組織の変化につき観察を行うことで計画した。

その前段階として、免疫不全マウスの背部に創を作成し、尾静脈から移植を行ったCFsの創部移行の観察から始めた。CFsの創傷治癒にかかわる影響につき、創閉鎖の観察、組織学的変化、各種サイトカインの変化について検討を行い、創傷治癒とCFsとの関わり、さらには

ケロイド成因との関わりにつき検討を行った。

4. 研究成果

免疫不全マウスを用いたヒトCFs移植併用創傷モデルを作成した。

・CFs移植による創治癒速度の観察

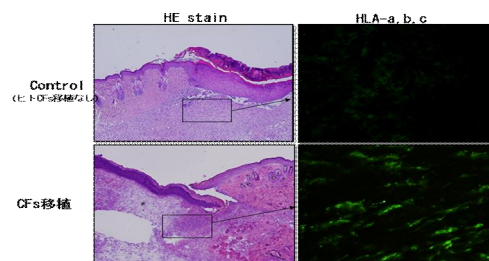
免疫不全マウスの背部に直径5mmの全層皮膚欠損創を作成(下図)し、CFs移植群とコントロール群における創治癒速度の観察を行った。今回の実験におけるCFs移植は5mmの欠損創において、明らかな差は認めなかった。



・免疫組織学的検討

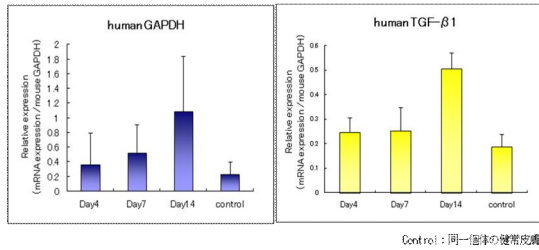
背部に創を作成した免疫不全マウスへ尾静脈よりヒトCFsを移植注射。その7日後、背部創を採取して組織学的検討を行った。

HE染色およびhumanHLAによる免疫染色を行った所、CFs移植群に創部へのCFsの動員が確認できた。



・Real time RT-PCRによる検討

遺伝子レベルでは、ヒトCFsを移植後4, 7, 14, 21daysにおいて各背部創を採取してhomogenateし、totalRNAを採取。cDNAからReal time RT-PCRを施行した。その結果、マウス皮膚においてヒトGAPDH、ヒトTGF- β の発現を認め、移植後14日目以增加する傾向を認めた。



これらの結果においては、少しデータのばらつきがみられ、再現性が課題であった。尾静脈注射の手技により、ヒトCFs移植が肺循環でトラップされている可能性等も考えられた。しかし、移植を行った循環細胞が約2週間をピークに創部へ動員される傾向が確認されたことは興味深い結果であった。

今後の展望として、ケロイドや肥厚性瘢痕の予防や治療において循環細胞 (CFs) をターゲットにした治療戦略というものがあると考えられる。瘢痕治療において薬剤投与を行うなどした場合に、本実験結果は薬剤投与を行う指摘時期などの決定に反映できるものと考えられた。さらに具体的な臨床への発展としては、ケロイド体質患者の予定手術を組む時、2週間前からケロイド治療薬を投与することで、CFsを代表とする循環細胞の瘢痕形成に対する悪影響を制御できる可能性が考えられた。

以上を第56回日本形成外科学会総会で報告した。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕 (計 4 件)

- (1) ケロイド・肥厚性瘢痕の分類・評価 ケロイド・肥厚性瘢痕分類・評価表 2011 JSW Scar Scale 2011 : 小川令, 赤石諭史, 秋田定伯, 土佐泰祥, 山脇聖子, 岡部圭介, 長尾宗朝, 山本純, 疵痕・ケロイド治療研究会ケロイド・肥厚性傷跡分類・評価表作成ワーキンググループ : 疵痕・ケロイド治療ジャーナル, 査読無 6号 2012、19-22
- (2) 小陰唇嚢胞状リンパ管奇形の1例 : 石川耕資, 石山誠一郎, 長尾宗朝, 齋藤典子, 佐々木 了 : 日本形成外科学会誌 査読有 32巻6号 2012、401-405
- (3) 粟粒結核を併発し長期間の保存的治療を余儀なくされた胸骨骨髓炎の1例 : 岩寄大輔, 佐々木了, 長尾宗朝, 石山誠一郎, 山本有平 : 創傷査読有 2巻4号 2011、171-176
- (4) ケロイドと肥厚性瘢痕の分類と評価 疵痕・ケロイド治療研究会の試み ケロイド・肥厚性瘢痕分類表を用いて 現状と課題 : 長尾宗朝, 佐々木了, 小林誠一郎 : 疵痕・ケロイド治療ジャーナル査読無 5号 2011、48-50

〔学会発表〕 (計 7 件)

- 1, ケロイド体質の予測は可能か！ - Fibrocyte とケロイド病態との関連性 - 第56回日本形成外科学会総会 ; 2013年4月5日. 於東京 (招待講演)
- 2, Successful Treatment of Intractable Pyogenic Granulomas on the First Toe Caused by an Arteriovenous Malformation

With Transarterial Emolization and Surgical Resection. The 4th WUWHS, 2012.9.2, Yokohama, JAPAN.

3, AVM を伴った足趾難治性爪周囲肉芽腫の治療経験. 第4回日本創傷外科学会 ; 2012年7月26日. 於福岡市.

4, Evaluating the arteriovenous malformation in the left preauricular area using 7.0 tesla magnetic resonance angiography. The16th ISSVA, 2012.6.16, Malmo, SWEDEN.

5, 右腋窩・胸部に生じた巨大嚢胞性リンパ管奇形の治療経験. 岩手医学会例会 ; 2012年4月9日. 於盛岡市.

6, Circulating fibrocytes に対するケロイド治療薬の効果の検討-第2報. 第20回日本形成外科学会基礎学術集会 ; 2011年10月7日 ; 於東京

7, パネルディスカッション「ケロイド・肥厚性瘢痕の分類・評価」第6回瘢痕・ケロイド治療研究会 ; 2011年8月28日, 於東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長尾 宗朝 (NAGAO MUNETOMO)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 00364349

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号 :