

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670745

研究課題名(和文) 免疫抑制剤による新しいケロイド治療を目指して ～共培養モデルを用いた検討～

研究課題名(英文) Effect of immunosuppressive agents on the interaction between keloid fibroblasts and CD4+ T cells in a coculture model

研究代表者

山本 有平 (YAMAMOTO, Yuhei)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70271674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ケロイドは慢性炎症性線維化疾患であり、炎症を抑制することは重要な治療アプローチの一つである。Rapamycinやtacrolimusなどの免疫抑制剤がケロイドに抑制的に作用する可能性があるが、ケロイドは適切な動物モデルがないため実際の作用の詳細は不明である。ケロイド線維芽細胞、CD4陽性T細胞共培養モデルを用いて、より生体に近い条件で免疫抑制剤のケロイドに対する作用を検証した。免疫抑制剤がケロイドを抑制する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Keloid is an inflammatory and fibrotic disease. To modulate inflammation is an important approach for the treatment of keloids. We investigated the effect of immunosuppressive agents on the interaction between keloid fibroblasts and CD4+ T cells in a coculture system. Our results suggest that the agents may affect keloid formation by modulating inflammation and directly affecting keloid fibroblasts.

研究分野：創傷治癒学

キーワード：ケロイド 免疫抑制剤

1. 研究開始当初の背景

(1)慢性炎症性線維化疾患としてのケロイド

ケロイドは、線維芽細胞の増殖と細胞外基質の過剰な増生を主体とした真皮の肥厚、と定義される。創傷治癒過程で生じた炎症性シグナルの持続と線維化の亢進がケロイドの成因と考えられ、ケロイドは慢性炎症性線維化疾患と捉えることができる。

(2)免疫抑制剤のケロイドに対する効果

炎症を抑制することはケロイド治療の重要なアプローチの一つと考えられる。炎症を抑制する薬物治療の具体的な候補として免疫抑制剤が挙げられる。実際に代表的な免疫抑制剤である rapamycin や tacrolimus (FK506) が実験的にはケロイド線維芽細胞に抑制的に作用するという報告がある。しかし、ケロイドは適切な動物モデルがないため、これらの研究報告は免疫抑制剤の線維芽細胞に対する効果の検証に留まる。実際の生体内、ケロイド組織内では CD4 陽性 T 細胞などの炎症細胞、免疫担当細胞が存在するが、ケロイド線維芽細胞-炎症細胞の相互作用の存在下での免疫抑制剤の効果は不明である。

(3)ケロイド線維芽細胞-CD4 陽性 T 細胞共培養モデル

我々は適切な動物モデルが存在しないというケロイド研究の難点を克服するため、ケロイド線維芽細胞-角化細胞、あるいはケロイド線維芽細胞-CD4 陽性 T 細胞共培養モデルなどを確立し、「ケロイド環境」の再現に注力してきた。今回、ケロイド線維芽細胞-CD4 陽性 T 細胞共培養モデルを用いることで、ケロイド線維芽細胞-炎症細胞の相互作用の存在下での免疫抑制剤の効果を検証可能となる。

2. 研究の目的

我々が開発したケロイド線維芽細胞-CD4 陽性 T 細胞 *in vitro* 間接共培養モデルを用いて、より生体に近い条件で免疫抑制剤のケロイドに対する効果を検証する。

3. 研究の方法

(1)検体の採取

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、末梢血を採取した。Explant 法により線維芽細胞を培養した。末梢血より濃度勾配を用いて単核球を分離し、更に磁気ビーズを用いてネガティ

ブソーティングにより単核球から CD4 陽性 T 細胞を分離した。検体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の指針に従った。

(2)CD4 陽性 T 細胞の活性化

24-well プレートに 3×10^5 個/well の CD4 陽性 T 細胞を播種し、抗 CD3 抗体 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (プレートに固相化)と抗 CD28 抗体 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、IL-2 100 IU/ml で CD4 陽性 T 細胞を刺激した。培養液は Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640+10%FBS (fetal bovine serum) とし、1 well あたり 0.5 ml 用いた。7 日目に新たな well に 3×10^5 個/well となるように細胞を移動し、同量の抗 CD3 抗体(プレートに固相化)、抗 CD28 抗体、IL-2 で細胞を再刺激した。8 日目に抗 CD3 抗体を固相化していない新たな well に培養液ごと細胞を移動した。 3×10^5 個/well を保つように 10 日目、12 日目に培養液の追加または細胞の分割を行った。IL-2 は well 内の培養液の総量に対して 100 IU/ml となるよう 10 日目、12 日目に追加した。14 日目に細胞を回収した。

(3)免疫抑制剤のケロイド線維芽細胞に対する効果

ケロイド線維芽細胞 3×10^4 個を 12-well プレートに播種した。培養液はダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) +10%FBS とした。48 時間後に 100 nM の rapamycin または tacrolimus をウェルに添加した。添加後 96 時間で培養上清を回収した。

(4)-1 共培養モデル (図 1)

今回行った共培養の方法は、セルカルチャーインサートを用いた間接共培養である (図 1)。セルカルチャーインサートのメンブレンは 0.4 μm の小孔を有し、インサートの上下でサイトカインの拡散は可能だが細胞同士の直接的な接触はない。

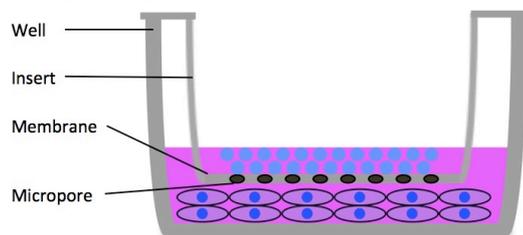


図 1：間接共培養モデル模式図。

また、共培養に使用する細胞の組み合わせは、一定のケロイド線維芽細胞と正常人から分離した CD4 陽性 T 細胞とした。

共培養のプロトコールは以下の通りである。ケロイド線維芽細胞 3×10^4 個を 12-well プレートに播種した。培養液は RPMI 1640+

10%FBS とした。48 時間後にセルカルチャーインサートを各ウェルに設置し、上段ウェル（セルカルチャーインサート内）に活性化した CD4 陽性 T 細胞 3×10^5 個及び IL-2 100 IU/ml を播種、添加した。コントロール群（非共培養群）は CD4 陽性 T 細胞を含まない培養液と IL-2 の添加を行った。共培養後 96 時間で培養上清を回収した。

(4)-2 免疫抑制剤の添加

共培養開始時（CD4 陽性 T 細胞播種時）に 100 nM の rapamycin または tacrolimus をウェルに添加した。

(5) タンパク解析

ケロイド線維芽細胞の I 型コラーゲン、TGF- β 、IL-6 産生をタンパクレベルで検証するため、回収した培養上清中の intact procollagen type I N-terminal peptide (PINP)、TGF- β 、IL-6 をそれぞれ radioimmuno assay (RIA)、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)、chemiluminescent enzyme immunoassay (CLEIA) 法で測定した。PINP は I 型コラーゲン産生を反映する。

4. 研究成果

(1) 免疫抑制剤の線維芽細胞に対する効果 (図 2)

共培養に使用するケロイド線維芽細胞に対する免疫抑制剤の効果を確認した。Rapamycin 添加群で control 群と比較して PINP、IL-6 産生が低下した。

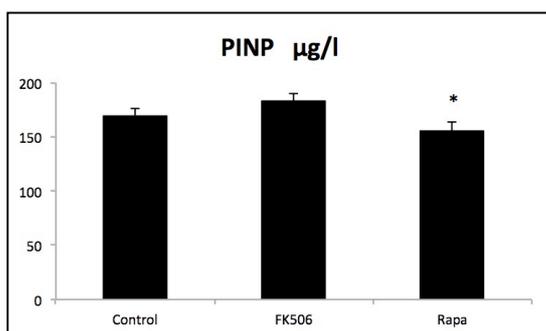


図 2-a: PINP 産生量. Mean \pm SD. * $p < 0.05$ from control. FK506 は tacrolimus、Rapa は Rapamycin を示す。

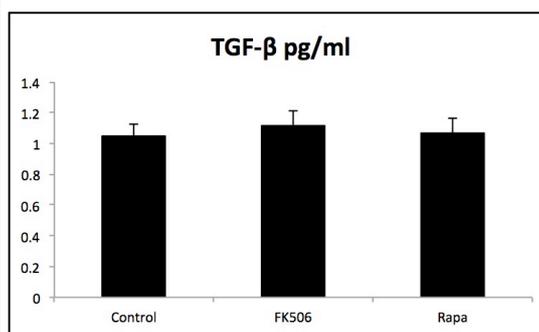


図 2-b: TGF- β 産生量. Mean \pm SD.

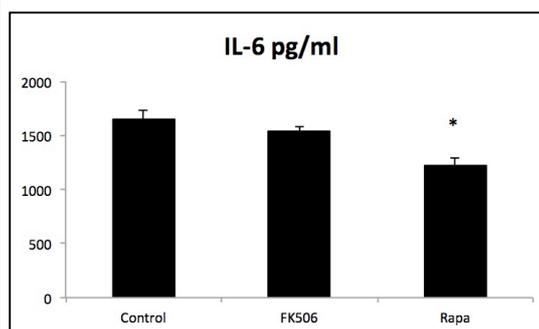


図 2-c: IL-6 産生量. Mean \pm SD. * $p < 0.05$ from control.

(2) 共培養モデルにおける免疫抑制剤の効果 (図 3)

① CD4 陽性 T 細胞との共培養がもたらすケロイド線維芽細胞への影響

CD4 陽性 T 細胞との共培養により、ケロイド線維芽細胞の IL-6 産生が増加することを確認した。PINP、TGF- β は産生量の有意な変化がなかった。

② I 型コラーゲン

Rapamycin、tacrolimus の添加により CD4 陽性 T 細胞との共培養時のケロイド線維芽細胞の I 型コラーゲン産生が抑制される傾向があったが、統計的に有意ではなかった。

③ TGF- β

Rapamycin、tacrolimus の添加により CD4 陽性 T 細胞との共培養時のケロイド線維芽細胞の TGF- β 産生が抑制される傾向があったが、統計的に有意ではなかった。

④ IL-6

Rapamycin の添加により CD4 陽性 T 細胞のケロイド線維芽細胞に対する IL-6 産生促進

効果が抑制された。Tacrolimus は共培養によるケロイド線維芽細胞の IL-6 産生促進を抑制する傾向があったが、統計学的に有意ではなかった。

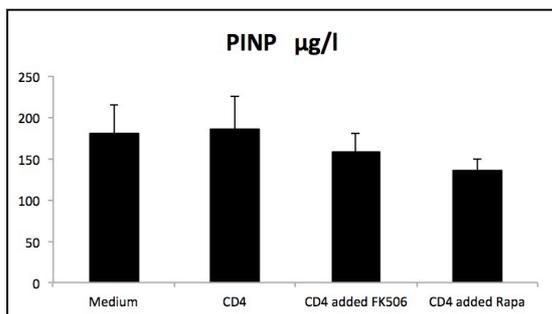


図 3-a: 共培養時 PINP 産生量. N=3. Mean ± SEM.

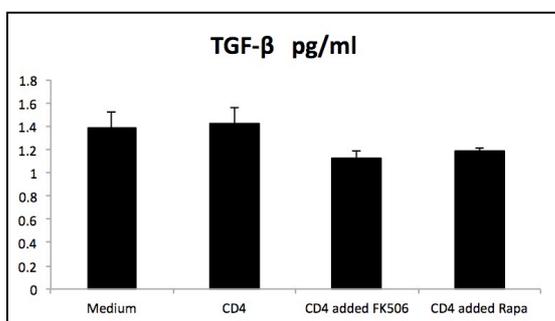


図 3-b: 共培養時 TGF-β 産生量. N=3. Mean ± SEM.

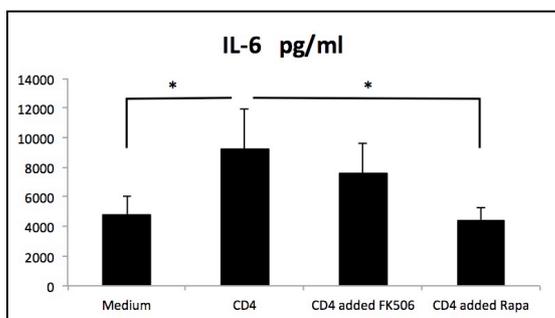


図 3-c: 共培養時 IL-6 産生量. N=3. Mean ± SEM. * p<0.05.

(3) 得られた成果の意義

本研究は免疫抑制剤のケロイドに対する治療効果を、ケロイド線維芽細胞のみならず CD4 陽性 T 細胞も含めた共培養モデルを用いて、より生体に近い条件で検証したことに意義がある。

Rapamycin, tacrolimus などの免疫抑制剤は局所でケロイド線維芽細胞、CD4 陽性 T 細胞の両者に作用しコラーゲン産生や炎症を抑制する可能性を有する。これらの薬剤の濃度設定や培養条件などを更に検証し、生体内

でも有効にケロイド抑制効果を示しかつ安全に作用する濃度域や、外用剤などの局所投与方法を検討する必要がある。

また、共培養モデルで得られた結果は in vitro のある一定条件下のものであることも考慮する必要がある。

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 2 件)

① 村尾尚規、藤田宗純、池田正起、林利彦、七戸龍司、舟山恵美、小山明彦、古川洋志、山本有平

免疫抑制剤のケロイドに対する効果～共培養モデルによる検証～

第 89 回北日本形成外科学会北海道地方会

2015 年 01 月 31 日

札幌医科大学記念ホール(北海道・札幌市)

② 村尾尚規、藤田宗純、池田正起、林利彦、山本有平

ケロイド治療における免疫抑制剤の可能性

第 44 回日本創傷治癒学会

2014 年 12 月 02 日～2014 年 12 月 03 日

ホテルメトロポリタン仙台(宮城県・仙台市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

古川 洋志 (FURUKAWA, Hiroshi)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 00399924

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・講師

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

村尾 尚規 (MURAO, Naoki)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号: 90706558