

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293379

研究課題名(和文)ケロイドの免疫細胞治療を目指して！～制御性T細胞は炎症&線維化を抑制する～

研究課題名(英文) Investigation of the anti inflammatory and antifibrotic function of regulatory T cells to establish the immune cell therapy in keloid

研究代表者

村尾 尚規 (MURAO, Naoki)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：90706558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000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、CD4陽性T細胞などの炎症性細胞が病態に大きく寄与する。CD4陽性T細胞のサブセットの一つである制御性T細胞は炎症・免疫反応を制御し、抗線維化作用を有する。ケロイド内での炎症制御機構、線維化抑制機構について線維芽細胞-CD4陽性T細胞共培養モデルを用いて検証した。制御性T細胞などが主に産生する炎症抑制性サイトカインIL-10は、ケロイド線維芽細胞への直接的な作用より、CD4陽性T細胞の各サブセット間の相互作用に寄与し、間接的にケロイド線維芽細胞に対して抗炎症作用、抗線維化作用を示す可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Keloid is an inflammatory and fibrotic disease. CD4+ T cells have been shown to play an important role in regulating inflammation and fibrosis. CD4+ T cells, especially regulatory T cells, suppress the inflammatory response and the expression of inflammatory cytokines via secreting an anti inflammatory cytokine IL-10. Nevertheless, little is known about the role of CD4+ T cells in the pathogenesis of keloid. We therefore investigated the interaction between CD4+ T cells and keloid fibroblasts using a coculture system. Our data suggested that IL-10 secreted from CD4+ T cells attenuate IL-6 production in keloid fibroblasts. Strategies to activate CD4+ T cells secreting IL-10 in keloids might represent a novel approach for the treatment of keloids.

研究分野：ケロイド

キーワード：ケロイド

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である。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)制御性 T 細胞による炎症・線維化抑制

制御性 T 細胞 (Treg) は、CD4 陽性 T 細胞の一種で、炎症・免疫反応を抑制し、抗線維化作用を有することが明らかとなっている。我々は以前にケロイド内に浸潤する CD4 陽性 T 細胞中に占める Treg の割合が 10%程度であることを示している。

(3)ケロイド共培養モデル

ケロイドは動物モデルがないため、炎症細胞とケロイド線維芽細胞との相互作用を検証することが困難である。我々はケロイド線維芽細胞-CD4 陽性 T 細胞共培養モデルを確立しており、より生体に近い条件での検証が可能である。

(4)ケロイドに対する細胞治療を目指して

生体内には Treg などの CD4 陽性 T 細胞の各サブセットのバランス、相互作用による免疫・炎症制御機構 (免疫バランス) が存在し、過剰な炎症反応を抑制することで線維化が抑制される。ケロイド内における Treg などの CD4 陽性 T 細胞による炎症制御機構の詳細を明らかにし、免疫バランスを意図的にコントロールする方法が解明できれば、ケロイドに対する細胞治療の可能性が見出せる。

2. 研究の目的

細胞治療の方法として、ケロイド局所で Treg を増やす、または Treg を活性化し産生するサイトカインを増やす、という 2 つの考え方があつた。今回の研究では特に炎症抑制性サイトカイン IL-10 に着目した。IL-10 は Treg を始めとする CD4 陽性 T 細胞のサブセットから産生される。生体内での炎症制御機構、線維化抑制機構の中心となるサイトカインと予想し、共培養モデルを用いてより生体に近い条件で、IL-10 を介した CD4 陽性 T 細胞による制御機構を検証した。また、今回の研究では代表的な炎症性サイトカインである IL-6 を主な評価項目とした。

3. 研究の方法

(1) 検体の採取

ケロイド患者よりケロイド組織、末梢血を採取した。Explant 法により線維芽細胞を初代培養した。末梢血より濃度勾配を用いて単核球を分離した後、磁気ビーズを用いた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、当研究機関の倫理委員会の指針に従い、患者より文書による同意を得た上で実施した。

(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、well に固相化した抗 CD3 抗体 $10 \mu\text{g/ml}$ 、抗 CD28 抗体 $2 \mu\text{g/ml}$ 、IL-2 100 IU/ml で刺激した。培養液は、Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640+10%FBS (fetal bovine serum) 0.5 ml/well とした。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、前述と同量の抗 CD3 抗体、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 日目に培養液を追加、または細胞を分割した。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。

本プロトコールで得られる CD4 陽性 T 細胞の純度は 95%以上であり、CD4 陽性 T 細胞中に占める Treg の割合は 15%程度である。また、CD4 陽性 T 細胞から 50 pg/ml/well 以上の IL-10 が産生されることを確認している。

(3)IL-10 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 ng/ml の IL-10 を well に添加した。添加後 96 時間で線維芽細胞及び培養上清を回収した。

(4)-1 共培養モデル (図 1)

セルカルチャーインサートを用いた間接共培養を行った (図 1)。共培養に使用する細胞の組み合わせは、同一個体由来のケロイド線維芽細胞と 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 1.5 ml/well とした。48 時間後に RPMI 1640+10%FBS 0.5 ml を入れたセルカルチャーインサートを各 well に設置し、上段 well (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。Control 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 時間で線維芽細胞及び培養上清を回収した。

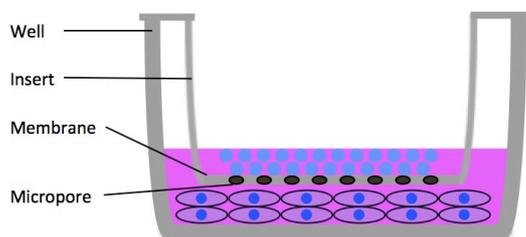


図 1：共培養モデル模式図。

(4)-2 抗 IL-10 抗体の添加

共培養開始時（CD4 陽性 T 細胞播種時）に抗 IL-10 抗体 8×10^{-3} または $5 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$ を well に添加した。

(5)mRNA 解析

回収した線維芽細胞からスピニング法で RNA を抽出し、逆転写反応で cDNA を合成した。Real time PCR にて IL-6 の mRNA 発現を $\Delta\Delta\text{CT}$ 法で解析した。内在性コントロールは hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) とした。

(6)タンパク解析

培養上清中の IL-6 を chemiluminescent enzyme immunoassay (CLEIA) 法で測定した。

(7)統計解析

対応のある t 検定、多重比較検定を行った。

4. 研究成果

(1) IL-10 のケロイド線維芽細胞に対する効果 (図 2)

ケロイド線維芽細胞単独培養下に IL-10 を添加した後のケロイド線維芽細胞の IL-6 mRNA 発現 (図 2 上) 及び培養上清中の IL-6 (図 2 下) は、IL-10 非添加群 (control 群) と差がなかった。IL-10 のケロイド線維芽細胞に対する直接的な抗炎症効果 (IL-6 抑制効果) は明らかではなかった。

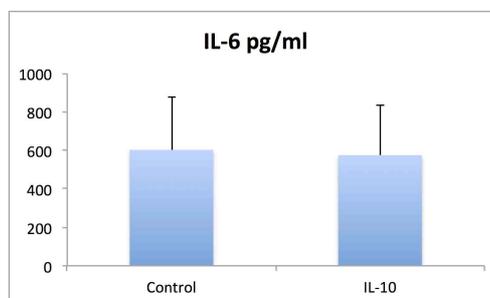
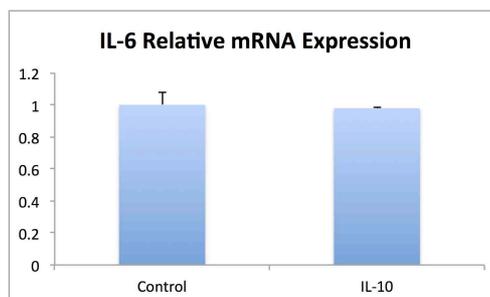


図 2：IL-10 添加後のケロイド線維芽細胞の IL-6 mRNA 発現 (上) 及び培養上清中の IL-6 量 (下)。N=3、Mean±SEM.

(2) 共培養モデルにおける抗 IL-10 抗体の効果 (図 3)

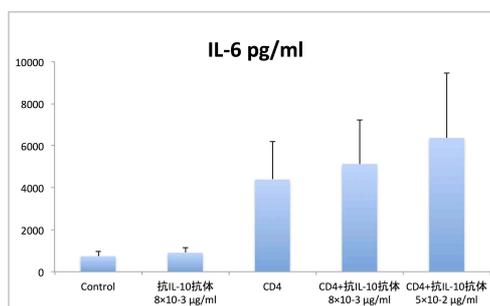
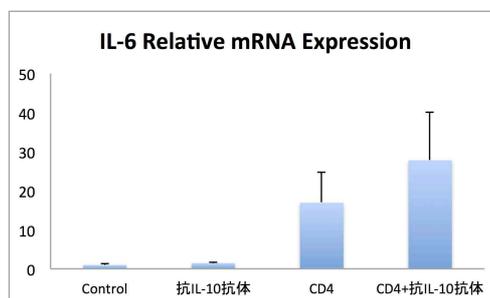


図 3：共培養条件における抗 IL-10 抗体添加後のケロイド線維芽細胞の IL-6 mRNA 発現 (上) 及び培養上清中の IL-6 量 (下)。N=3、Mean±SEM. mRNA 解析時の抗 IL-10 抗体添加量は $8 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ とした。

ケロイド線維芽細胞と CD4 陽性 T 細胞を共培養すると、我々の過去の報告通りにケロイド線維芽細胞の IL-6 mRNA 発現 (図 3 上) 及

び培養上清中の IL-6 (図 3 下) が増加する。
共培養条件下に抗 IL-10 抗体を添加すると、ケロイド線維芽細胞の IL-6 mRNA 発現及び培養上清中の IL-6 がより増加する傾向が見られた。培養上清中の IL-6 は抗 IL-10 抗体の濃度依存性に増加する傾向があった。

Control 群に抗 IL-10 抗体を添加した群、すなわち、線維芽細胞単独培養に抗 IL-10 抗体を添加した条件に相当する群では、IL-6 mRNA 発現、培養上清中の IL-6 は control 群と差がなかった。抗 IL-10 抗体は線維芽細胞に対して直接的に作用していないといえる。

(3) 得られた成果の意義

IL-10 はケロイド線維芽細胞単独培養条件下では抗炎症作用を示さなかった。IL-10 はケロイド線維芽細胞に直接的には作用しないと考えられた。

しかし、共培養モデルに抗 IL-10 抗体を添加すると、ケロイド線維芽細胞の IL-6 産生亢進傾向が見られることから、CD4 陽性 T 細胞から産生される IL-10 はケロイド線維芽細胞に対して炎症を抑制する方向に作用していることがわかる。IL-10 の作用機序として、CD4 陽性 T 細胞間のバランスを調節し、間接的にケロイド線維芽細胞に作用する機序が想定される。

本来、生体内では IL-10 を介した CD4 陽性 T 細胞による炎症制御機構が存在するが、ケロイド内では IL-6 などの炎症性サイトカインが高発現しているため炎症制御機構が十分に機能していない可能性がある。今後、IL-10 を介した CD4 陽性 T 細胞による炎症制御機構を強化する方法を検討することで、ケロイドに対する細胞治療の実現に近づくことができると考えられた。

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 0 件)

[学会発表] (計 11 件)

①藤田宗純、村尾尚規、高橋周子、林 利彦、山本有平
ケロイドにおける CD4 陽性 T 細胞を介した IL-10 の炎症制御の検証
第 93 回北日本形成外科学会北海道地方会
2017 年 2 月 4 日
札幌医科大学記念ホール(北海道・札幌市)

②藤田宗純、村尾尚規、林 利彦、山本有平
ケロイドにおける IL-10/IL-6 バランスによる炎症制御機構の解明
第 25 回日本形成外科学会基礎学術集会
2016 年 9 月 15 日～2016 年 9 月 16 日

ナレッジキャピタルコングレ・コンベンションセンター(大阪府・大阪市)

③村尾尚規、林 利彦、池田正起、藤田宗純、舟山恵美、小山明彦、古川洋志、山本有平、清野研一郎

癒痕・ケロイド治療の基礎から臨床応用に向けて～炎症制御機構の解明と免疫抑制剤、抗線維化剤の応用

第 25 回日本形成外科学会基礎学術集会

2016 年 9 月 15 日～2016 年 9 月 16 日

ナレッジキャピタルコングレ・コンベンションセンター(大阪府・大阪市)

④藤田宗純、村尾尚規、林 利彦、山本有平
ケロイドにおける IL-10 の炎症制御機構

第 11 回癒痕・ケロイド治療研究会

2016 年 8 月 28 日

お茶の水ソラシティカンファレンスセンター(東京都・千代田区)

⑤藤田宗純、村尾尚規、林 利彦、山本有平
ケロイド線維芽細胞に対する IL-10 の抗炎症作用の検証

第 8 回日本創傷外科学会総会・学術集会

2016 年 7 月 21 日～2016 年 7 月 22 日

ホテルメトロポリタン東京池袋(東京都・豊島区)

⑥藤田宗純、村尾尚規、林 利彦、山本有平
CD4 陽性 T 細胞による IL-10 を介した炎症制御機構～ケロイド共培養モデルによる検証～

第 91 回北日本形成外科学会北海道地方会

2016 年 2 月 6 日

北海道大学医学部学友会館フラテホール(北海道・札幌市)

⑦藤田宗純、村尾尚規、林 利彦、山本有平
ケロイドにおける IL-10 の炎症制御機構～CD4 陽性 T 細胞-ケロイド線維芽細胞共培養モデルによる検証～

第 24 回日本形成外科学会基礎学術集会

2015 年 10 月 8 日～2015 年 10 月 9 日

岩手県民会館、岩手県公会堂(岩手県・盛岡市)

⑧村尾尚規、藤田宗純、岩寄大輔、塩谷隆太、林 利彦、古川洋志、山本有平、清野研一郎
創傷治癒過程における炎症制御と癒痕抑制

第 24 回日本形成外科学会基礎学術集会

2015 年 10 月 8 日～2015 年 10 月 9 日

岩手県民会館、岩手県公会堂(岩手県・盛岡市)

⑨村尾尚規、池田正起、林 利彦、舟山恵美、小山明彦、古川洋志、山本有平、清野研一郎
我々のケロイド研究の転換点～ケロイドと制御性 T 細胞、免疫バランス～

第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会

2014年10月9日～2015年10月10日
キッセイ文化ホール(長野県・松本市)

⑩村尾尚規、池田正起、林 利彦、舟山恵美、
小山明彦、古川洋志、山本有平
制御性T細胞のケロイド線維芽細胞に対する
抗線維化作用
第6回日本創傷外科学会総会・学術集会
2014年7月24日～2014年7月25日
サントポール高松(香川県・高松市)

⑪村尾尚規、清野研一郎、池田正起、林 利
彦、舟山恵美、小山明彦、古川洋志、山本有
平
制御性T細胞のケロイド病態への関与
第79回日本インターフェロン・サイトカイン
学会学術集会
2014年6月19日～2014年6月20日
北海道大学医学部学友会館フラテホール(北
海道・札幌市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村尾 尚規 (MURAO, Naoki)
北海道大学・大学病院・助教
研究者番号：90706558

(2) 研究分担者

山本 有平 (YAMAMOTO, Yuhei)
北海道大学・医学研究科・教授
研究者番号：70271674

小山 明彦 (OYAMA, Akihiko)
北海道大学・大学病院・講師
研究者番号：70374486

舟山 恵美 (FUNAYAMA, Emi)
北海道大学・医学研究科・講師
研究者番号：10533630

七戸 龍司 (SHICHINOHE, Ryuji)
北海道大学・大学病院・医員
研究者番号：30640346

古川 洋志 (FURUKAWA, Hiroshi)
北海道大学・医学研究科・講師
研究者番号：00399924
平成26年度まで研究分担者

林 利彦 (HAYASHI, Toshihiko)
北海道大学・歯学研究科・准教授
研究者番号：00432146
平成26年度まで研究分担者

齋藤 典子 (SAITO, Noriko)
北海道大学・医学研究科・客員研究員
研究者番号：80374487
平成26年度まで研究分担者

関堂 充 (SEKIDO, Mitsuru)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：40372255
平成26年度まで研究分担者

(3) 連携研究者

清野 研一郎 (SEINO, Kenichiro)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授
研究者番号：20312845