

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462738

研究課題名(和文)ケロイドにおけるTh17細胞/制御性T細胞による免疫機構の解明と新治療の開発

研究課題名(英文)Elucidation of immune response by Th17/Treg in keloid and application of new therapy

研究代表者

村上 正洋(MURAKAMI, MASAHIRO)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00239500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ケロイド患者の末梢血とケロイド組織におけるヘルパーT細胞/制御性T細胞のバランスを解析したところ、末梢血では、正常人との有意差を認めなかったが、ケロイド組織ではTh17優位であった。また、ケロイド組織における制御性T細胞(FOXP3陽性細胞)数は、正常皮膚と比較して減少していた。ケロイド組織においてIL17とIL10の発現増加がみられた。正常皮膚由来線維芽細胞にIL-17とIL10を添加するとコラーゲン関連遺伝子発現やコラーゲン産生能増加が認められた。この結果より、ケロイドにおける制御性T細胞をターゲットとした新治療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We studied the Th17/Treg balance in a peripheral blood and keloid tissues. There was significant difference of Th17/Treg balance in the keloid tissues compared with control. High expression of IL17 and IL10 was found in keloid tissues compared to normal skin. Treatment of normal fibroblast with recombinant IL17 and IL10 peptide resulted in an increase in collagen synthesis. These findings highlight a potential role for Th17/Treg balance triggered by IL10 and IL17 in keloid pathogenesis and development of molecular therapy for keloid.

研究分野：創傷治癒

キーワード：ケロイド IL-17 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

(1)ケロイドに関する分子レベルの研究は多数報告されているが、ケロイド原因遺伝子の解明には至っていない。動物モデルが確立していないため、特効薬もなく、ステロイド局所投与によっても完治できない場合も少なくない。放置すれば、増大・悪化するためケロイド新治療の確立は急務である。

(2)われわれは、マイクロアレイ法を用いた解析の結果、臨床においてケロイド抑制効果が確認されている電子線治療のターゲットのひとつが、IL-6 遺伝子であることを報告し (Tosa, Murakami et al J Invest Dermatol, 2005)、培養細胞におけるIL-6 シグナル機能解析の結果、ケロイドにおいては、IL-6 シグナルの亢進により細胞増殖が促進し過剰なコラーゲン合成を引き起こすことを明らかにしてきた(Tosa et al J Invest Dermatol 2007)。

さらに、IL-6 存在下に分化誘導され、炎症に関与するTh17 細胞がケロイド患者の末梢血およびケロイド組織において増加していることを示した(Tosa et al J Invest Dermatol impress)。

(3)一方、制御性T 細胞(regulatory T cell:Treg)は、種々の免疫反応を抑制する機能を持ち、過剰な免疫反応を制御することで自己免疫疾患の抑制、移植免疫の調節のみならず、慢性炎症の抑制にも重要な役割を果たすことが明らかになり注目されている (Sakaguchi S et al Cell 2008)。

また、近年、IL-6 によるTh17 細胞分化誘導のメカニズムについて、IL-6 がT 細胞からTreg への分化を抑制する結果であるとの報告や(Thomas K et al PNAS)、Treg が炎症刺激によりTh17 にサブセット転換してIL-17+FOXP3+細胞が生じることが報告され、Treg と様々な炎症性疾患との関連が示唆されている。

IL-6 シグナルが亢進しTh17 細胞の増加を認めるケロイドにおいて、Treg が重要な役割を果たしている可能性が非常に高い。そこで、ケロイド患者の末梢血におけるCD4+T 細胞を解析すると、IL17A+FOXP3+という特殊なフェノタイプの細胞を認め、ケロイドの慢性炎症におけるTreg の関与が強く示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、ケロイド発生におけるTh17 細胞/Treg の役割を検討する。

(1)ケロイド組織および末梢血に浸潤しているT 細胞のフェノタイプを解析していく。ケロイドにおけるTh17 細胞/制御性T 細胞による免疫機構の解明を本研究の目的とする。

(2)T 細胞特異的ノックアウトマウスなどを用いたケロイド動物モデルの開発も期待されその作成を試み、最終的には、ケロイドに対する新治療の確立を目指すものである。

3. 研究の方法

ケロイド患者におけるTreg の分布状況を把握するために、

(1)ケロイド患者の末梢血およびケロイド組織内に浸潤しているT 細胞を解析し、それらが産生しているサイトカイン測定を行った。ケロイド患者の末梢血およびケロイド組織片より単核球を分離して、磁気ビーズを用いたネガティブソーティングによりT リンパ球を分離する。T リンパ球関連抗体にて染色後、フローサイトメトリー解析を行い、各抗体陽性T 細胞の分布を解析した。同時に正常人の末梢血及び皮膚片より単核球を分離して、ケロイド患者と比較検討した(n=20)。

(2)分離されたT リンパ球培養上清中のサイトカイン(IL-6, IL-17A, TGF-beta, IL-10, IL-22, IL-23 など)を測定し、正常人と比較検討した(n=10)。次に、ケロイドにおけるT リンパ球分画およびTreg の局在を見るために、

(3)CD4、CD25、FoxP3 などの免疫染色および蛍光重染色を施行した。ケロイド慢性炎症の原因と考えられるT 細胞(KT)とケロイド由来線維芽細胞(KF)を共培養して、増殖能やコラーゲン合成能を亢進させるかどうかを確認する機能として

(4)KTとKF を共培養して、KF における細胞増殖能 細胞外マトリックス関連遺伝子(Fibronectin, collagen type I 2)の発現をRT-PCR 法にて解析した。また、RIA 法を用いてコラーゲン合成能解析を施行した。同時に、正常人のT 細胞(NK)と正常真皮由来線維芽細胞(NF)についても行い、ケロイドと比較検討した(n=5)。

(5)ケロイドにおけるTh17/Treg 免疫機構が解明されればケロイドモデルの作成を試み、最終的にはT 細胞をターゲットとした新治療の確立へと進む。

4. 研究成果

(1)末梢血ヘルパーT 細胞サブセットは、ケロイド患者の末梢血中のヘルパーT 細胞はすべてのサブセットが健常人と比較して有意に増加していた(図1)。Treg はケロイドと正常で有意差は認めなかった。

ケロイド組織におけるヘルパーT細胞サブセットについて、組織染色すると、真皮内に波状あるいは渦巻状に不規則に増生する膠原線維の束の周囲とケロイド発赤部に IL-17 陽性細胞を多数認め、陽性細胞はリンパ球様であった。ケロイドにおいてヘルパーT細胞は正常皮膚と比較して増加しており、ケロイド発赤部において著名であった。IL-17 陽性細胞は正常皮膚と比較して有意に増加しており、特にケロイド発赤部に強くみとめられた。IFN- γ 陽性細胞も IL-4 陽性細胞は、ケロイド隆起部では正常皮膚と明らかな差は認めなかったが、ケロイド発赤部では増加していた(図2)。

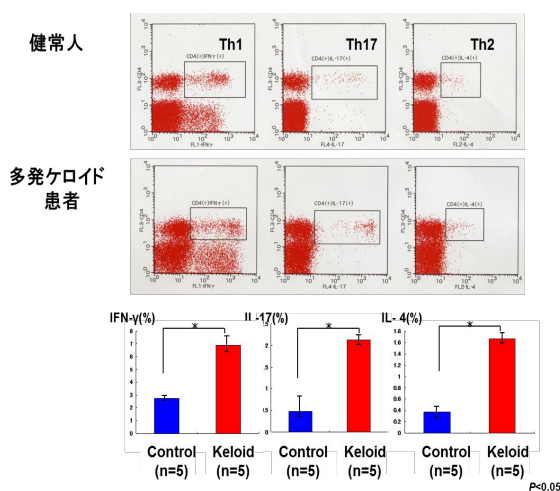


図1. 末梢血中のヘルパーT細胞サブセット

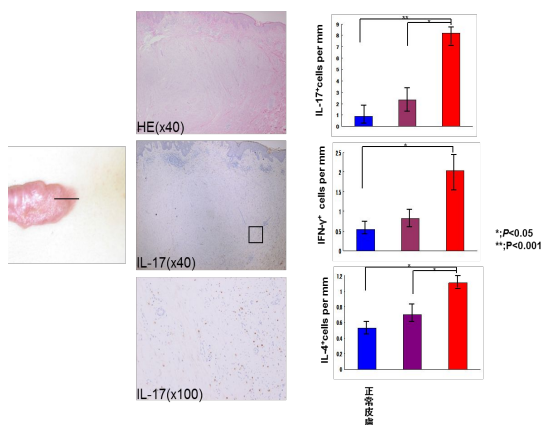


図2. 組織中のヘルパーT細胞サブセット

(2)分離されたヘルパーT細胞培養上清中のサイトカインでは、IL-6、TGF- β 、IL-10、IL-17がケロイドにおいて高かった。

(3)ケロイド組織において、正常皮膚と比較して、CD4陽性細胞率は高く、FoxP3陽性細胞は低い傾向が認められた。

(4)KTとKFなどの共培養実験は、KTの採取率が大変低く、そのためか、KTとKFの共培養群とKF単独培養群でコラーゲン関連遺伝子発現などを比較しても有意差は認められなかった。加えて、ケロイド組織からのヘルパーT細胞抽出方法の確立にも手間取り、予定していた機能解析が途中の状態の研究期間を終える形となった。従って、動物モデルの系までは行えなかった。

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 0 件)

〔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
村上正洋 (MURAKAMI MASAHIRO)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00239500

(2)研究分担者
土佐眞美子 (TOSA MAMIKO)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号：30301568

(3)連携研究者
南 史郎 (MINAMI SHIROU)
日本医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：10192361

(4)研究協力者
()