

学位論文題名

Keloid-derived fibroblasts are refractory to Fas-mediated apoptosis and neutralization of autocrine transforming growth factor- $\beta$ 1 can abrogate this resistance

(ケロイド由来線維芽細胞のアポトーシス耐性および TGF- $\beta$ 1 の関与)

学位論文内容の要旨

緒言

ケロイド・肥厚性瘢痕は長期にわたり疼痛や搔痒をとめない、治療に抵抗性で、その発生のメカニズムは未解明な点が多い。われわれは、創傷治癒過程の細胞増殖期の異常、すなわち細胞の増殖と細胞死（アポトーシス）のバランスの崩壊がケロイド・肥厚性瘢痕の病因の一つと推測し、アポトーシスの機構に重要な役割を果たしている細胞膜表面の Fas に着目した。一般にその経路としては、Fas ligand および抗 Fas 抗体の刺激により、順次 caspase が活性化されていく caspase cascade が考えられている。

本研究では、抗 Fas 抗体および Staurosporine(アポトーシス誘導物質)によるアポトーシスを、ケロイド・肥厚性瘢痕・正常皮膚由来の線維芽細胞で検証したところ、ケロイド由来線維芽細胞がアポトーシスに耐性であることが判明した。さらにアポトーシスの主要な経路である caspase cascade や TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 との関与について検討し、ケロイド由来線維芽細胞におけるアポトーシス耐性のメカニズムについて解析を行った。

材料と方法

1. 細胞：ケロイド、肥厚性瘢痕ならびに正常皮膚の手術検体を用いて、初代培養を行い本実験には3継代培養を用いた。
2. アポトーシス誘導：24時間 starvation 後、0.1 と 1  $\mu$ g/ml 抗 Fas 抗体 (CH11) および 10 nmol/L staurosporine によりアポトーシスを誘導し、24 時間、48 時間、72 時間後に cell viability (Trypan blue 染色) と 核凝縮・断片化 (ヘキスト 33342 核染色) の検索を行なった。
3. Flow Cytometry：細胞表面の Fas 受容体発現は flow cytometry で定量した。一次抗体には抗 Fas 抗体、二次抗体としては FITC conjugate 抗マウス抗体を使用し、Becton-Dickinson FACScan にて検討行なった。
4. Western Blot：ケロイド、肥厚性瘢痕ならびに正常皮膚由来線維芽細胞より蛋白質を抽出し、定量後、SDS-PAGE にて分離し、抗 Fas 抗体、抗 Bcl-2 抗体、抗 Bcl-xL 抗体および抗 Bax 抗体にて Western Blotting を行ない、アポトーシスを制御する蛋白質の発現の差を調べた。
5. Caspase 活性：正常皮膚、肥厚性瘢痕ならびにケロイド由来線維芽細胞に抗 Fas 抗体および Staurosporine にてアポトーシスを誘導し、これより、経時的に、5 種類の proteinase inhibitor を加えた lysis buffer を用いて蛋白質を抽出し、定量後、SDS-PAGE にて分離し、抗 caspase-8 抗体、抗 caspase-9 抗体、抗 caspase-3 抗体、抗 caspase-7 抗体および抗ゲルソリン

抗体にて Western Blotting を行なった。

6. **TGF- $\beta$ 1** ,**TGF- $\beta$ 2** の添加 : 5 と 10 ng/ml recombinant ヒト TGF- $\beta$ 1 および同濃度の recombinant ヒト TGF- $\beta$ 2 を、抗 Fas 抗体および Staurosporine にてアポトーシスを誘導する 6 時間前に添加し、24 時間、48 時間、72 時間後に、ヘキスト 33342 核染色法にて検索を行なった。対象として、非添加群と 20 ng/ml recombinant ヒト EGF および同濃度の recombinant ヒト PDGF 添加群を用いた。

7. **TGF- $\beta$ 1** ,**TGF- $\beta$ 2** の中和 : ケロイド由来線維芽細胞の内因性 TGF- $\beta$ 1 を中和するため、50  $\mu$ g/ml 抗 TGF- $\beta$ 1 中和抗体と抗 Fas 抗体、または、0.1  $\mu$ g/ml 抗 TGF- $\beta$ 2 中和抗体と抗 Fas 抗体を同時に添加し、経時的に、ヘキスト 33342 核染色法にて検索を行った。

8. 統計処理 : 統計処理は ANOVA および Scheffé's post hoc 法にて行なった。

## 結果

1. ケロイド由来線維芽細胞のアポトーシス耐性 : 抗 Fas 抗体および Staurosporine によるアポトーシスの誘導において、ケロイド由来線維芽細胞では肥厚性癬痕・正常皮膚由来線維芽細胞に比較して cell viability が高く、Fas 刺激後に生じる核凝縮も明らかに少なく、有意な低抗性が認められた。ケロイド、肥厚性癬痕および正常皮膚由来線維芽細胞ともに、Fas 刺激によるアポトーシスは、Fas 抗体の濃度および刺激時間に依存性であった。

2. **Fas**、**Bcl-2**、**Bcl-xL**、および **Bax** の発現 : 正常皮膚、肥厚性癬痕ならびにケロイド由来線維芽細胞との間で Fas の発現量に差は認められなかった。また、Bcl-2、Bcl-xL、および Bax にも発現量の差は認められなかった。

3. **Caspase** 活性の検索 : 正常皮膚および肥厚性癬痕由来線維芽細胞においてはアポトーシスの誘導時間に比例して caspase - 3、-8、-9 の活性化が認められたが、ケロイド由来線維芽細胞においてはいずれも活性化されなかった。ケロイド、肥厚性癬痕および正常皮膚由来線維芽細胞ともに、caspase - 7 の活性化は認められなかった。

4. アポトーシス耐性に対する **TGF- $\beta$ 1** の関与 : 正常皮膚および肥厚性癬痕由来線維芽細胞では TGF- $\beta$ 1 の添加が抗 Fas 抗体によるアポトーシスを有意に抑制した。さらに、抗 TGF- $\beta$ 1 中和抗体処理したケロイド由来線維芽細胞では抗 Fas 抗体単独刺激群に比して、有意に高いアポトーシスの誘導が認められた。一方、TGF- $\beta$ 2 および抗 TGF- $\beta$ 2 中和抗体の添加では TGF- $\beta$ 1 処理と同様の変化は認められなかった。

## 考察

正常皮膚および肥厚性癬痕由来線維芽細胞に比し、ケロイド由来線維芽細胞では抗 Fas 抗体刺激に対して強いアポトーシス耐性を示した。ケロイド由来線維芽細胞が抗 Fas 抗体に対してアポトーシス耐性を示すメカニズムはケロイド由来線維芽細胞が caspase 3, 8, 9 のいずれにおいても活性化されていないことから、アポトーシス抑制のレベルは caspase cascade より上流で生じていることが推測された。

そこで、すでにケロイド由来線維芽細胞における TGF- $\beta$ 1 産生の増加および TGF- $\beta$ 1 に対する increased sensitivity の報告があることから、TGF- $\beta$ 1 に着目した。TGF- $\beta$ 1 を添加することで、正常皮膚由来線維芽細胞の抗 Fas 抗体刺激によるアポトーシス誘導が阻害されること、また、TGF- $\beta$ 1 中和抗体処理をおこなうとケロイド由来線維芽細胞の抗 Fas 抗体刺激によるアポトーシス誘導が亢進することを本研究で明らかにした。すなわち、ケロイド由来線維芽細胞における Fas 刺激によるアポトーシス耐性は TGF- $\beta$ 1 に対する反応性ならびに内因性 TGF- $\beta$ 1 産生の増強がその要因と考えられ、この機序がケロイドの重要な成因であることが示唆される。したがって、本研究結果はケロイドに対する新しい側面からの治療法の開発を期待させるものである。

#### 結語

1. 正常皮膚および肥厚性瘢痕由来線維芽細胞に比し、ケロイド由来線維芽細胞では抗 Fas 抗体および staurosporine によるアポトーシスに対して有意な抵抗性を示した。
2. ケロイド由来線維芽細胞の内因性 TGF- $\beta$ 1 はアポトーシス耐性の機序の重要な要因である。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 紘 之  
副 査 教 授 清 水 宏  
副 査 教 授 杉 原 平 樹

学 位 論 文 題 名

## Keloid-derived fibroblasts are refractory to Fas-mediated apoptosis and neutralization of autocrine transforming growth factor- $\beta$ 1 can abrogate this resistance

(ケロイド由来線維芽細胞のアポトーシス耐性および TGF-  $\beta$  1 の関与)

ケロイドは一般に線維芽細胞および細胞外基質の増生を主体とする疾患である。臨床的には周囲に浸潤拡大する性質があり、疼痛や搔痒をとめない、治療に抵抗性であるとともに再発傾向が強い。しかし、その発生のメカニズムについてはいまだ解明されていない点が多く、その治療は対症療法的な、古典的治療法に頼らざるを得ないのが現状である。本研究では、抗 Fas 抗体および Staurosporine(アポトーシス誘導物質)によるアポトーシスを、ケロイド・肥厚性癬痕・正常皮膚由来の線維芽細胞で検証したところ、ケロイド由来線維芽細胞がアポトーシスに耐性であることが判明した。しかし、正常皮膚、肥厚性癬痕ならびにケロイド由来線維芽細胞との間で Fas の発現量に差は認められなかった。アポトーシスを制御しているタンパクである Bcl-2, と Bax の発現量にも差は認められず、また、Bcl-xL については、いずれの線維芽細胞においても発現を認められなかった。さらにケロイド由来線維芽細胞が caspase 3, 8, 9 のいずれにおいても活性化されていないことから、アポトーシス抑制のレベルは caspase cascade より上流で生じていることが推測された。そこで、ケロイド由来線維芽細胞における TGF- $\beta$ 1 産生の増加、および TGF- $\beta$ 1 刺激に対する正常皮膚および肥厚性癬痕由来線維芽細胞と異なる反応の報告があることから、TGF- $\beta$ 1 に着目した。TGF- $\beta$ 1 を添加することで、正常皮膚由来線維芽細胞の抗 Fas 抗体刺激によるアポトーシス誘導が阻害されること、また、TGF- $\beta$ 1 中和抗体処理をおこなうとケロイド由来線維芽細胞の抗 Fas 抗体刺激によるアポトーシス誘導が亢進することが本研究で明らかになった。すなわち、ケロイド由来線維芽細胞における Fas 刺激によるアポトーシス耐

性は TGF- $\beta$ 1 に対する反応性ならびに内因性 TGF- $\beta$ 1 産生の増強がその要因と考えられ、この機序がケロイドの重要な成因であることが示唆された。

公開発表にあたって、副査の清水教授より、ケロイド由来線維芽細胞の内因性 TGF- $\beta$ 1 産生量、ケロイドと同一個体の正常皮膚由来の線維芽細胞を用いた場合の予想される結果についての質問があった。次いで、主査の加藤教授よりケロイド発生の個人差と本研究の臨床応用についての質問があった。また、副査の杉原教授より TGF- $\beta$ 1 と TGF- $\beta$ 2 は同じレセプター complex に結合するにもかかわらず TGF- $\beta$ 1 のみが anti-apoptotic 機能を示す理由についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は学位論文の背景に関する詳細な説明と最新の知見を交えて概ね適切に解答した。

この研究の結果は、ケロイドの発生のメカニズムの解明に一步近づく重要な研究であり、今後の研究を進展させ、ケロイドに対する新しい側面からの治療法の開発を期待させる。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。