

ケロイドにおける表皮角化細胞と 線維芽細胞の相互作用に関する解析

学位論文内容の要旨

緒言

ケロイドは良性皮膚腫瘍であるが、創の境界を越えて浸潤拡大する疾患である。その発生メカニズムは解明されていない点も多い。皮膚組織において上皮・間葉系組織の相互作用が上皮細胞のホメオスターシス、増殖、分化に影響を与えることはすでに知られているが、同様に間葉系細胞のホメオスターシス、増殖、分化も上皮・間葉系細胞の相互作用がその制御の一端を担っている可能性も否定できない。ケロイド組織においても表皮が直接的あるいは間接的にその下層にあるケロイド組織内の線維芽細胞の増殖およびアポトーシスの制御に関与し、ケロイドの成立に寄与していることが推測される。本研究では表皮角化細胞と線維芽細胞の共培養系を確立し、正常皮膚由来表皮角化細胞あるいはケロイド由来表皮角化細胞との共培養下における正常皮膚およびケロイド由来線維芽細胞の細胞増殖およびアポトーシス抵抗性について解析を行った。

材料と方法

1. 線維芽細胞および表皮角化細胞の培養：インフォームドコンセントの上、手術検体よりケロイド、正常皮膚を採取し、線維芽細胞および表皮角化細胞を得た。
2. 線維芽細胞および表皮角化細胞の共培養系の確立：2チャンバーになっている6穴プレートを使用し、共培養系を確立した。上部のチャンバーの底部は透過性の膜で構成されており、上下部のチャンバーを分離している。上部のチャンバーにはケロイド由来表皮角化細胞(KK)および正常皮膚由来表皮角化細胞(NK)をそれぞれ播種し、confluentになるまで培養を行った。一方、各下部チャンバーにケロイド由来線維芽細胞(KF)、正常皮膚由来線維芽細胞(NF)を播種し、培養表皮角化細胞がconfluentになった上部チャンバーをセットし共培養系とした。4日間、共培養を行い線維芽細胞の細胞増殖とアポトーシスの状態を解析した。共培養の培地としてFBSに含まれる増殖因子等の修飾の排除およびアポトーシスの誘導の目的でFBSを含まないDMEMのみを用いた。
3. 線維芽細胞の増殖とアポトーシスの検出：表皮角化細胞と共培養した線維芽細胞について細胞数を計測した。また、Hoechst 33342にて核染色(5mg/ml)を行い、核の形態変化(核凝縮、核の断片化)の検索を行った。
4. WesternBlot解析：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Fas ligand抗体、抗Bcl-2抗体、抗Bax抗体、抗activeERK抗体、抗activeJNK抗体、抗TGF- β 1、 β 2抗体と反応させ二次抗体をさらに結合させたのちECL法を用いて検出した。
5. Conditioned media処理：各表皮角化細胞(KK, NK)を培養し、confluentになった時

点で DMEM 単独培地 (0.2ml DMEM/cm²) に入れ換え、24 時間培養し、各 conditioned media (KCM, NCM) を得た。各線維芽細胞 (KF, NF) に conditioned media を加え、培養を行った。刺激後の細胞は細胞増殖、アポトーシス耐性の検索を行うとともに Western Blot 解析を行った。

6. 統計処理

データは分散分析を用いて統計処理し、有意差は Scheffe's post-hoc にて解析した。

結果と考察

3 継代の各線維芽細胞 (KF, NF) をそれぞれ各表皮角化細胞 (KK, NK) と共培養し、細胞増殖およびアポトーシス耐性を検討した。KF, NF のいずれも KK と共培養した場合、有意に高い細胞増殖性とアポトーシス耐性が認められた。これは明らかにケロイドの成因に表皮角化細胞が関与していることを示唆している。しかしながら、conditioned media 処理群では DMEM 単独培養群に比べ有意に高い細胞増殖とアポトーシス耐性が認められるものの、KCM 処理群と NCM 処理群間には、その差が認められなかった。

Fas/FasL, MAPK ファミリー, Bcl-2 ファミリー, TGF- β などは細胞の生死を制御する役割をもつことが知られている。本研究では共培養した線維芽細胞についてそれらの発現を解析した。

共培養後の KF および NF における Fas および FasL のタンパクレベルの発現量にはコントロール群を含め、いずれにも有意な差は認められなかった。

表皮角化細胞は多くのサイトカインを放出することが明らかになっている。本研究では KK と共培養した線維芽細胞で最も細胞増殖率が高く、かつ最も高いアポトーシス抵抗性を示し、さらに、リン酸化された ERK, JNK が最も強く発現していた。したがって、これら表皮由来のサイトカインはひとつには MAPK 経路を経て細胞増殖、アポトーシスに関与し、真皮線維芽細胞を制御するものと推定される。さらに、その影響は正常表皮よりケロイド表皮がより強いものと考えられた。ERK は細胞周期を促進するだけでなく、アポトーシスを阻害するシグナルとしても知られている。また、ストレスに反応した JNK 活性はアポトーシス誘導に関連しているといわれていたが、近年、線維芽細胞においては JNK の活性化はアポトーシスを阻害するシグナルであることを示す報告が多く、これは本研究の結果を支持するものである。

また、KF, NF 両者とも KK と共培養した群で最も強い Bcl-2 の発現が認められた。しかし、各 conditioned media 処理した線維芽細胞については、コントロール群を含めいずれにも差は認められなかった。これは表皮角化細胞と線維芽細胞間の interaction あるいは double paracrine 作用が線維芽細胞の Bcl-2 の発現をさらに強めることが示唆された。さらに、KF においては、KK との共培養群が NK との共培養群に比べ有意に低い Bax の発現量を示し、これらの作用が KK との共培養系におけるアポトーシス耐性に強く関与していると考えられた。

また、ケロイドの成因として TGF- β が深く関与していることが明らかになっているが、本研究においても KF, NF いずれの線維芽細胞でも KK との共培養群で有意に TGF- β 1 および β 2 の発現量が高いことが明らかになり、ケロイド表皮が KF の TGF- β の産生を増強させ、そのアポトーシス耐性をさらに強めることが推測された。

結語

表皮角化細胞と線維芽細胞の共培養系を確立し、正常皮膚由来表皮角化細胞あるいはケロイド由来表皮角化細胞との共培養下における正常皮膚およびケロイド由来線維芽細胞の細胞増殖およびアポトーシス抵抗性について検討した。ケロイド由来表皮角化細胞と共培養した線維芽細胞で最も細胞増殖率が高く、かつ最も高いアポトーシス抵抗性を示し、リ

ン酸化されたERK, JNKが強く発現していた。また, Bcl-2およびTGF- β 1, β 2の発現量も有意に増加していた。ケロイド表皮は正常表皮に比べ共培養下の線維芽細胞の細胞増殖およびアポトーシス耐性に強い影響をもつと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 杉 原 平 樹

副 査 教 授 加 藤 紘 之

副 査 教 授 清 水 宏

学 位 論 文 題 名

ケロイドにおける表皮角化細胞と 線維芽細胞の相互作用に関する解析

本研究は0.4ミクロンの細穴のある透過性の隔壁をもつ2チャンバプレートを用いて、正常皮膚あるいはケロイド由来表皮角化細胞と線維芽細胞の共培養系を確立し、正常あるいはケロイド由来表皮角化細胞が線維芽細胞（正常皮膚およびケロイド由来線維芽細胞）に及ぼす影響を細胞増殖とアポトーシスの観点より解析したものである。各表皮角化細胞と共培養した線維芽細胞について direct cell count による proliferation assay を行うとともに、Hoechst核染色法を用いてアポトーシス抵抗性について解析した。その結果、ケロイド由来表皮角化細胞と共培養したケロイド由来線維芽細胞で最も高い細胞増殖性とアポトーシス耐性が認められた。一方、各表皮角化細胞より回収した conditioned media 処理により表皮より産生される液性因子のみの影響を解析したところ、conditioned media 処理群は非処理群に比し、有意に高い細胞増殖とアポトーシス耐性を示したが、正常表皮とケロイド表皮に有意差は認められなかった。これらの結果よりケロイド由来表皮角化細胞とケロイド由来線維芽細胞間の interaction あるいは double paracrine 作用により下層のケロイド由来線維芽細胞の有意に高い細胞増殖性とアポトーシス抵抗性が誘導されるものと考えられた。そこで共培養した線維芽細胞の Western Blot 解析を行った。アポトーシスシグナル受容体として知られる Fas およびそのリガンドである FasL について調べたところ、正常皮膚およびケロイド由来線維芽細胞のいずれでも、各共培養系間に差は認められなかった。しかしながら、アポトーシス抑制因子として知られる MAPK cascade の下流の ERK および JNK、Bcl-2 および TGF- β 1, β 2 の発現量の解析では、ケロイド由来表皮角化細胞と共培養したケロイド由来線維芽細胞における ERK・JNK の強いリン酸化、そして Bcl-2 および TGF- β 1, β 2 の発現量の増加が認

められた。ケロイド表皮は正常表皮に比べ共培養下のケロイド由来線維芽細胞の細胞増殖およびアポトーシス耐性に強い影響をもち、ケロイドの成因にケロイド表皮が大きく関与していることが明らかになった。

本研究の公開発表にあたって副査の加藤教授より今回の実験系と生体内の現象との違い、治療法への応用について質問があった。これに対し、申請者は生体内の現象により近づけるには炎症細胞等の関与を考える必要があること、治療への応用としては表皮にケロイド由来線維芽細胞の特異的な経路を制御する遺伝子を導入しケロイドの本体である線維芽細胞を制御する方法が考えられると解答した。次いで副査の清水教授より、この実験系が全く別個体のケロイド由来表皮角化細胞とケロイド由来線維芽細胞の組み合わせで行った実験か否か、それらの組み合わせによる細胞増殖およびアポトーシス耐性の差についての質問があった。これに対して、本研究は全く別個体のケロイド由来表皮角化細胞と線維芽細胞の組み合わせで行ったものであること、その組み合わせによる反応性に差はなかったことなど研究の経過・結果を詳細に説明した。さらに、正常皮膚とケロイド由来線維芽細胞間で有意差が明らかになっている別のアポトーシス誘導方法を用いた研究、RNAレベルで検証についてコメントがあったが、ケロイドの成因として新しい見解を示したことが評価された。さらに主査の杉原教授より共培養する各表皮角化細胞（正常皮膚あるいはケロイド由来表皮角化細胞）により線維芽細胞の性質に差がでるメカニズムについての質問があった。これに対して、申請者は正常皮膚およびケロイド由来線維芽細胞間の sensitivity の差に加え、各表皮角化細胞間の activity の差を hyperproliferative keratin の局在性などの最新の知見をあげ解答した。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。

この論文はケロイドの成因に関する新しい見解を示したもので、本研究結果は表皮による制御を用いた新しいケロイド治療の確立に寄与するものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。