

## 論文内容の要旨

Examination of epithelial mesenchymal transition in keloid tissues and possibility of keloid therapy target.

上皮間葉転換とケロイドの関連性およびその治療薬としての可能性の検討

日本医科大学大学院医学研究科 形成再建再生医学分野

研究生 桑原大彰

Plastic and Reconstructive Surgery Global Open  
4 卷 11 号掲載(2016 年 11 月 28 日)

## 【背景】

ケロイドは皮膚のコラーゲン集積と血管増生を特徴とする線維増殖性疾患である。罹患部にしばしば搔痒や疼痛を伴うことがあり、またその醜形により多くの患者に苦痛を与える疾患である。真皮網状層に持続的な炎症を伴うと、様々なサイトカインが影響し細胞外マトリックスの産生と分解のバランス不均衡が生じるためにケロイドが発生するとわれわれは考えている。しかし早期改善を望む患者が多い一方でケロイドの発生メカニズムはまだ明確には解明されていない。

近年、創傷治癒過程や組織の線維化に上皮間葉転換（EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition）が深く関与していることが報告されている。さらにケロイドで高発現している炎症性サイトカインが EMT を誘導することも知られてきている。今回われわれはケロイド組織内においても EMT が存在しているか否か、またケロイド病変の拡大や増悪に対しても EMT が関与しているか否かを検討した。

## 【方法】

ケロイド組織 19 例、正常皮膚組織 13 例を対象とした。検体は全て治療に必要相当として切除された組織のみを使用した。本研究は日本医科大学倫理委員会の承認を得て行われ、またインフォームドコンセントを全ての患者から取得した。

EMT 関連蛋白として上皮系マーカーである E-cadherin、間葉系マーカーである Vimentin を選択し、ケロイド組織内の EMT の発現の有無を調べるため、正常皮膚とケロイド組織を免疫組織化学染色法および免疫蛍光染色法で観察し表皮内 Vimentin 数をカウントした。またケロイド病変内における発赤部、膨隆部（非発赤病変部）、正常皮膚部の 3 箇所を比較し、40 倍率の顕微鏡下でランダムに 5 視野選択し、表皮内における Vimentin 数を比較解析した。次に正常皮膚から表皮細胞(NK)を分離培養し、トランスフォーミング増殖因子(TGF- $\beta$ )、腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )を添加することで EMT が発現するかを形状観察し、培養後の細胞の性質確認のため免疫 2 重染色を行い、E-cadherin、Vimentin および FSP-1 の測定を行った。また 2 層細胞共培養システムを用いて、正常皮膚とケロイド組織から分離培養した線維芽細胞(それぞれ NF および KF と称する)とヒト表皮角化細胞株(HaCaT)とで共培養を行ったのち上層(HaCaT)を収集、ウエスタンブロット法を用い Vimentin 蛋白の定性および定量分析を行った。

## 【結果】

免疫染色の結果、正常表皮部に比してケロイド表皮内に優位に EMT の発現が確認された。発赤部、膨隆部、正常皮膚における Vimentin 陽性細胞の平均個数はそれぞれ 12.98 個、8.10

個、1.36 個であり、正常皮膚と比較し発赤部、膨隆部いずれとも優位に高かった。また正常皮膚からの分離培養表皮細胞に炎症制サイトカインを添加培養した実験系では、細胞接着が密で敷石状の形態を呈する表皮細胞が、疎で紡錘形の線維芽細胞様へと形態変化することが確認された。またその培養細胞を用いた 2 重免疫染色では、間葉系マーカー Vimentin に混じり FSP-1 陽性細胞が確認された。さらに共培養実験の定量ウエスタンブロット解析では、HaCaT 単培養と比し HaCaT/KF の群で優位に Vimentin 蛋白量が高かった。

### 【考察】

EMT とは表皮細胞が細胞極性や細胞間接着を失い間葉系細胞様に形態変化する現象である。今回ケロイド表皮内に EMT の発現を優位に認めたことで、EMT がケロイドの発生に何らかの関与をしている可能性が示唆された。しかしケロイドの発赤部と膨隆部における EMT 発現では有意差を認めなかったため、ケロイド病変の拡大や増悪に関与している可能性は言及できなかった。また正常表皮細胞に炎症性サイトカインを添加した実験では、表皮細胞が間葉系細胞様に形態変化したということのみならず FSP-1 陽性細胞が確認されたことから、炎症性サイトカインにより表皮細胞が線維芽細胞へと形態変化したことが示唆された。さらに共培養実験では、HaCaT 単培養に対し HaCaT/KF 群で優位に Vimentin 蛋白析出量が高かった。ケロイド組織に見られる線維芽細胞過剰の一端は表皮からも起因している可能性がある。

ケロイドの発生メカニズムは明確に解明されてはいないものの、今回の結果から EMT 関連遺伝子がケロイド治療のターゲットの一つになる可能性があるかと推測される。間葉系マーカーである N-Cadherin を抑制する短鎖ペプチド(His-Ala-Val peptides)、またそのモチーフを含むサイクリックペプチド(N-Ac-CHAVC-NH<sub>2</sub>:ADH-1)は血管内皮細胞由来の N-cadherine を抑制し、延いては血管新生を抑制するためケロイドの治療薬になりうる可能性がある。またチロシンマルチキナーゼ阻害薬:ソラフェニブは同様に血管新生抑制作用をもち腫瘍の増殖を抑制する経口薬であるが、TGF- $\beta$  誘導の EMT を抑える働きをもつことから同様にケロイドの治療薬になりうる可能性がある。しかしケロイドは動物モデルをもたないため、今後の症例集積とさらなる実験解析が必要である。

### 【結論】

ケロイド組織において明確に EMT の発現が証明されたことから EMT がケロイド発生に何らかの関与をしている可能性が考えられた。またケロイド由来線維芽細胞から EMT が優位に発現したことから EMT 関連遺伝子がケロイド治療のターゲットの一つになる可能性があるかと示唆された。