



Title	卵膜由来間葉系幹細胞培養上清によるケロイド線維芽細胞に対する抑制効果の検討
Author(s)	佐藤, 千草
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第12812号
Issue Date	2017-06-30
DOI	10.14943/doctoral.k12812
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/68382
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 : 2334
File Information	Chigusa_Sato.pdf



[Instructions for use](#)

学位論文

卵膜由来間葉系幹細胞培養上清による
ケロイド線維芽細胞に対する抑制効果の検討

(Conditioned Medium Obtained from Amnion-derived Mesenchymal Stem Cell
Culture Prevents Activation of Keloid-derived Fibroblasts)

2017年6月

北海道大学

佐藤 千草

学位論文

卵膜由来間葉系幹細胞培養上清による
ケロイド線維芽細胞に対する抑制効果の検討

(Conditioned Medium Obtained from Amnion-derived Mesenchymal Stem Cell
Culture Prevents Activation of Keloid-derived Fibroblasts)

2017年6月

北海道大学

佐藤 千草

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	5 頁
実験方法	6 頁
実験結果	13 頁
考察	29 頁
総括および結論	32 頁
謝辞	34 頁
引用文献	35 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Chigusa Sato, M.D.; Yuhei Yamamoto, M.D., Ph.D.; Emi Funayama, M.D., Ph.D.; Hiroshi Furukawa, M.D., Ph.D.; Akihiko Oyama, M.D., Ph.D.; Naoki Murao, M.D., Ph.D.; Hidetaka Hosono, Ph.D.; Kazumichi Kawakubo, M.D., Ph.D.; Naoya Sakamoto, M.D., Ph.D.; Shunsuke Ohnishi, M.D., Ph.D.

Conditioned Medium Obtained from Amnion-derived Mesenchymal Stem Cell Culture Prevents Activation of Keloid Fibroblasts (2017年 投稿済み)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 佐藤千草、大西俊介、村尾尚規、舟山恵美、山本有平
卵膜由来間葉系幹細胞のケロイド治療への応用
第31回北大形成外科アカデミー, 2015年12月12日・札幌
2. 佐藤千草、大西俊介、村尾尚規、舟山恵美、山本有平
卵膜由来間葉系幹細胞によるケロイド抑制効果の検討
第33回北大形成外科アカデミー, 2016年12月10日・札幌
3. 佐藤千草、大西俊介、村尾尚規、舟山恵美、山本有平
間葉系幹細胞培養上清のケロイド線維芽細胞に対する抑制効果の検討
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
4. Chigusa Sato, Shunsuke Ohnishi, Emi Funayama, Hiroshi Furukawa, Akihiko Oyama, Naoki Murao, Hidetaka Hosono, Kazumichi Kawakubo, Naoya Sakamoto and Yuhei Yamamoto
CONDITIONED MEDIUM OBTAINED FROM AMNION-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS PREVENTS THE ACTIVATION OF KELOID FIBROBLASTS
ISSCR (International Society for Stem Cell Research) 2017.6.15・Boston (予定)

緒言

【論文の背景】

構造と機能の回復は医学が目指す究極の到達点である。組織・器官における線維性癒痕形成は、正常な構造と機能を破壊し、ケロイド・肥厚性癒痕、肝硬変、肺線維症、動脈硬化などのさまざまな難治疾患を惹起する。本研究は皮膚における線維性癒痕形成であるケロイド・肥厚性癒痕に注目した。

皮膚における創傷治癒の結果、癒痕として傷跡が残されるが、それらは外観によって成熟癒痕、肥厚性癒痕、ケロイドに分けられる。白く平坦で目立たない、所謂きれいな傷跡は成熟癒痕と呼ばれ、多くの人は気にすることもなくきれいな傷跡を持つことになる。体質、部位、創傷治癒の過程によって、肥厚性癒痕・ケロイドと呼ばれる、紅色に隆起し、掻痒や疼痛を伴う、醜い傷跡が形成される。なかでも、傷の範囲を越えて増大していくものをケロイドとしている。その発生原因や病態については未だに不明な点が多い。ケロイドの発症は人種差があり、黒人に多く、次いで黄色人種に多い。白人にケロイドが発症することは極めて稀である。これらは、ヒトの皮膚（真皮由来）にのみ発症する良性線維性病変であり、動物モデルの作成には至っていない。そのため、その発症機序、病態、消退などのメカニズムに関して不明な点が多く、決定的な治療法の開発には難渋している。ヒトであっても、胎児における創傷治癒は出生後のそれとは大きく様相を異にし、出生後の創傷は癒痕性修復によって治癒するが、胎児においては癒痕すら残さず、組織の再生によって治癒する。

ケロイド・肥厚性癒痕はいずれも生命に直接の危険を及ぼすことはないが、しばしば治療抵抗性で患者の生活の質を著しく低下させる。

ケロイド・肥厚性癒痕の保存的治療においては、線維芽細胞の増殖抑制、コラーゲンの生合成のコントロールが主目的となる。実際の治療法としては、圧迫療法、ステロイド局所投与、トラニラスト内服、レーザー治療など、複数の治療法を併用して行う。外科的切除による再発率は高く、切除後に電子線照射を必要とする。

【ケロイドと卵膜由来間葉系幹細胞】

ケロイド肥厚性癒痕は、軽微な外傷や外科的侵襲を契機として皮膚が紅色あるいは褐色調に隆起し、激しい掻痒や疼痛を伴う醜状を呈する病変であり、患者に身体的・精神的苦痛を生じる。その病態は炎症を伴う線維性増殖で、創傷治癒過程の何らかの異常によって生じると考えられているが、その詳細なメカニズムは依然として不明な部分も多い。治療法としては手術単独では再発率が高く、放射線治療やステロイド局注を併用するが、治療に難渋する。

一方、近年注目されている間葉系幹細胞は、免疫調整作用、抗線維化作用、創傷治癒促進作用があることが明らかにされており、骨髄や脂肪から分離培養された細胞が様々な炎症性疾患や線維化疾患へと応用されている。中でも、卵膜由来間葉系幹細胞は通常分娩時に破棄される胎児付属物からドナーの侵襲なく大量に得ることができる。卵膜は胎児と羊水を囲む薄い膜で、それ自体が妊娠成立に重要となる免疫寛容能を持つ。

卵膜由来間葉系幹細胞がもつ、抗炎症、抗線維化、創傷治癒促進作用が、創傷治癒過程の異常であるケロイドの慢性炎症、線維性増殖に対し、抑制的に働く可能性がある。これまでに、卵膜由来間葉系幹細胞のケロイドへの応用を検討した報告はなく、難治性疾患であるケロイドに対し、有効な作用を持つ卵膜由来間葉系幹細胞を用いて検証することは意義があると考えた。

【ケロイドについて】

ケロイドは局所の持続する炎症と線維化がその病態であり、創傷治癒の遅延も関与すると考えられているがその詳細な病態の解明には至っていない。適切な動物モデルが存在しないという研究障害もある。

当教室では現在までに、ケロイド組織内で制御性 T 細胞が相対的に不足し炎症反応が遷延している可能性や、prostaglandin E₂ (PGE₂) の産生低下がケロイドの成因に関与していること等を示してきた。^{1,2}

ケロイドの分子生物学的性質については未だ不明な点が多いが、これまでにケロイド由来線維芽細胞（以下、KF）は正常皮膚由来線維芽細胞（以下、NF）に比して TGF(transforming growth factor)- β を過剰に産生していること、また TGF- β に対する特異な感受性を示し、その結果として線維芽細胞の高い細胞増殖能と I 型コラーゲンを主体とした細胞外基質の産生亢進をきたしていることなどが報告されている。また、TGF- β は正常な線維芽細胞を癒痕やケロイド部位で見られる myofibroblast に分化させることが知られている。この分化の過程で myofibroblast は α SMA と呼ばれる特殊なタンパク質を細胞内に蓄積する。傷を収縮することに関与する α SMA の過剰な発現もケロイドの病態に関与していると考えられている。

³ TGF- β はケロイドの病態形成において中心的な役割を果たしている重要な因子である。本研究では、ケロイド由来線維芽細胞を TGF- β で刺激し活性化したものを実験に用いた。

【卵膜由来間葉系幹細胞について】

間葉系幹細胞は間葉系に属する細胞への分化能を有する細胞であり、近年、遺伝子操作なく入手可能な再生医療の新たなソースとして注目されている。分化能のみ

ならず、パラクライン効果による制御性 T 細胞(Treg)の誘導促進や prostaglandin E2(PGE2)産生を介する免疫調整能、抗炎症作用が認められており、さらには、線維化抑制や創傷治癒促進作用を有することも報告されている。⁴ これまでに慢性炎症性疾患や線維化疾患への応用のための研究が進んでいる。

間葉系幹細胞の中でも、卵膜に由来する間葉系幹細胞は、本来分娩時に破棄される胎児付属物である胎盤からドナーの侵襲なく大量に採取培養することができる。免疫寛容をもつ胎盤から得られる間葉系細胞であることも、その治療応用の可能性は高い。

卵膜由来間葉系幹細胞の培養上清は、細胞から分泌されるさまざまな作用を持つ生理活性物質を含有している。本研究ではこの培養上清を実験に用いた。

【本研究で明らかにすること】

慢性炎症性線維化疾患で、創傷治癒の遷延がその病態を増悪させる性質をもつケロイドに対し、免疫調整作用、抗線維化作用、創傷治癒促進作用のある卵膜由来間葉系幹細胞を作用させ、その効果を明らかにすることを本研究の目的とした。

ケロイドには適切な動物モデルが存在しないため、ケロイドの性質を有するケロイド由来線維芽細胞を TGF- β で活性化し、卵膜由来間葉系幹細胞の培養上清を作用させ、その反応について評価することとした。

線維芽細胞の増殖に与える影響を検証する他、 α SMA、SM22 α の変化や、細胞外基質である I 型、III型コラーゲンの他、細胞外基質の蓄積と分解に関与する MMP2、TIMP1 について測定し評価する。

ケロイドに対する卵膜由来間葉系幹細胞の有効性を検討し、治療応用を目指すことが目的である。

【本研究の結論】

卵膜由来間葉系幹細胞の培養上清は、TGF- β により刺激したケロイド線維芽細胞に作用し、細胞増殖を抑制する傾向があることがわかった。また、 α SMA、SM22 α や I 型コラーゲン産生を有意に抑制することが明らかとなった。本研究では、卵膜由来間葉系幹細胞がケロイド治療に応用できる可能性が明らかとなった。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである

18SrRNA	18S ribosomal RNA
AMSC	aminion-derived mesenchymal stem cell
CM	conditioned medium
CM-H	conditioned medium-high, 3kDa<
CM-L	conditioned medium-low, 3kDa>
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
FBS	fetal bovine serum
KF	keloid fibroblast
MF	mature scar fibroblast
MSC	mesenchymal stem cell
NF	normal skin fibroblast
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
RT	reveres transcription
SM	standard medium
TGF- β	transforming growth factor beta
α -SMA	alpha smooth muscle actin

実験方法

1. 組織の採取、病理標本作製、線維芽細胞の培養

ケロイド (7 例)、成熟瘢痕(3 例)、正常皮膚(3 例)より手術時に組織を採取した。臨床検体の採取、取扱いについては、北海道大学大学院医学研究科・医学部医学科医の倫理委員会、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会に申請して承認を得た。同委員会の規定に沿って研究を実施した。

正常皮膚(3 例)に関しては、非炎症性疾患の別手術時に余剰として破棄する予定の正常部分を対象とした。採取したそれぞれの組織の一部は、病理組織観察目的にブロックを作成し、HE、 α SMA の染色を行った。その他の部分の組織は、**explant** 法にて線維芽細胞の初代培養を行った。2~5 継代の細胞を実験に使用した。

初代培養は以下の方法で行った。組織を滅菌操作で、表皮部分を含まない真皮層を 1 辺 2mm 程度の大きさに細分化し、100mm dish に付着させ、そこへ 10% fetal bovine serum + Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) + 100 units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin で構成した培養液を添加し、インキュベーター内で 37°C、5%CO₂ の環境で培養した。培養液は同じ構成で適宜交換し、組織片は培養開始 1 週間後に同 dish 内で位置を移動させ、2 週間後に破棄した。線維芽細胞の増殖を観察しながら必要に応じて継代をした。

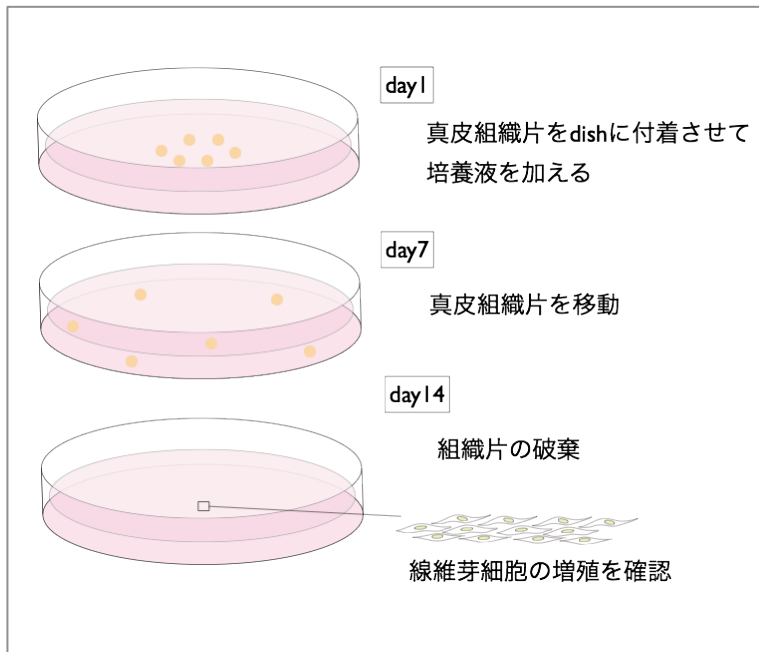


図 1 explant 法による線維芽細胞の初代培養

表 1 本研究に用いた検体の患者情報

	No.	年齢	性別	部位
ケロイド	KF①	38	F	耳介
	KF②	24	F	耳介
	KF③	25	F	耳介
	KF④	31	F	腹部
	KF⑤	62	M	胸部
	KF⑥	29	F	耳介
	KF⑦	31	F	腹部
成熟癬痕	MF①	18	F	胸部
	MF②	47	F	胸部
	MF③	15	F	腹部
正常皮膚	NF①	15	F	腹部
	NF②	33	F	背部
	NF③	47	F	大腿

2. 卵膜由来間葉系幹細胞の培養と培養上清の作成

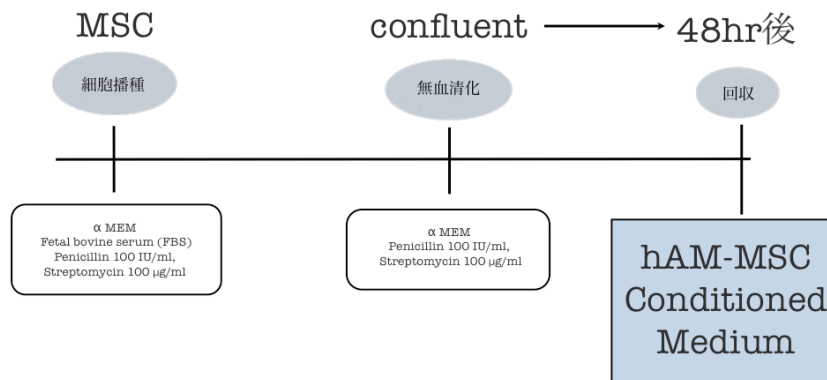


図 2 MSC 培養上清の作成

帝王切開時、胎盤組織から羊膜を手動的に採取して胎児側の膜である卵膜を分離する。コラゲナーゼ処理を行い卵膜由来間葉系幹細胞の初代培養を行う。数継代後に 250mm dish に播種、10% fetal bovine serum + αMEM + 100 units/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin で構成した培養液にて培養し、

confluent の状態になったところで、PBS で 2 回洗浄、続けて無血清 α MEM で 1 回洗浄後、無血清 α MEM20ml で培養する。48 時間経過したところで 0.45 μ m のフィルターを通して MSC 培養上清を回収した。

回収した MSC-CM の一部は Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices 3K を用いて 5 倍濃縮し、3kDa 以上の高分画培養上清(CM-H)と 3kDa 以下の低分画培養上清(CM-L)に分けた。



図 3 Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices 3K を用いて培養上清を分画化した。

3. MTS assay

96well plate に 1well あたり 3000cells/100 μ l で細胞を播種し、10% fetal bovine serum + α MEM + 100 units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin で 24 時間培養後、PBS で 2 回洗浄し、各 well に対し次の 8 種の添加培地 100 μ l で置換した。① α MEM ② CM ③ CM-H ④ CM-L ⑤ α MEM+TGF β 1 ⑥ CM+TGF β 1 ⑦ CM-H+TGF β 1 ⑧ CM-L+TGF β 1 (TGF β 1 濃度は 10ng/ml)

培地置換 48 時間後に各 well に CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) を 20 μ l 加え、インキュベーター内で 37°C、5%CO₂ の環境で 24 時間反応後に 490nm の波長で吸光度を測定した。(GloMax®-Multi Detection System)

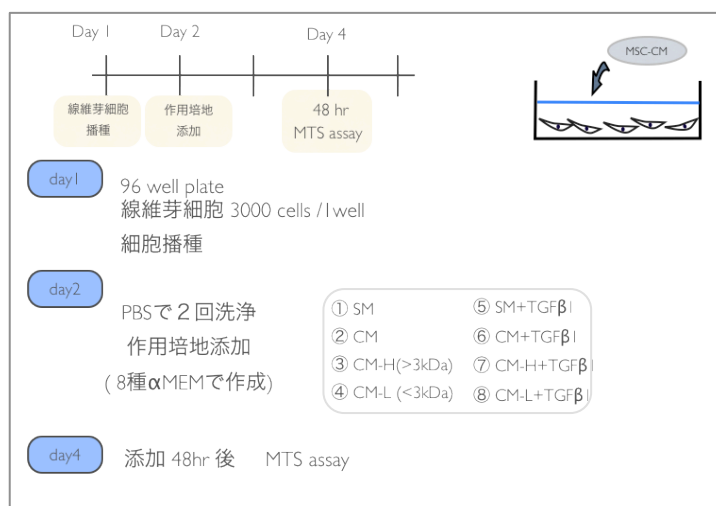


図 4 MTS assay のプロトコール

3. CCK8 (cell counting kit 8)

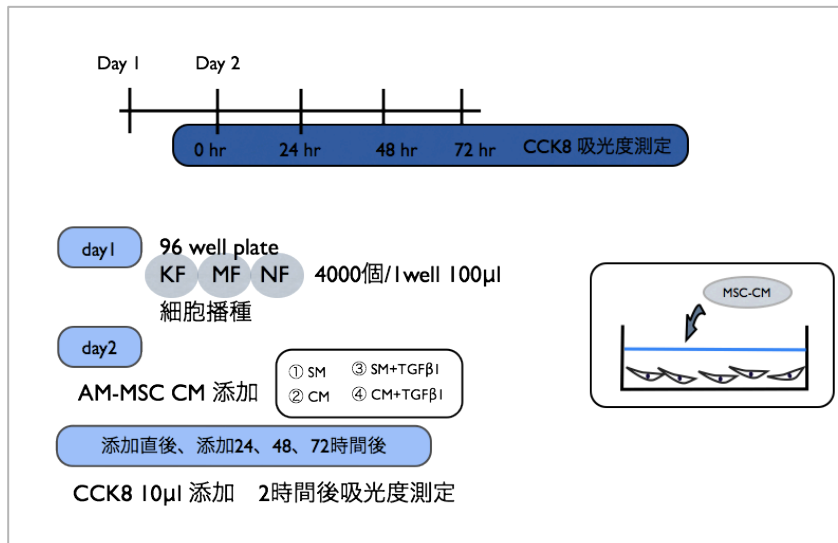


図 5 CCK8 プロトコール

96well plate を用いて、線維芽細胞を 4000cells/100μl で播種。24 時間後、次の 4 種で培地交換 ①αMEM ② CM ③αMEM+TGFβ1 ④ CM+TGFβ1。(TGFβ1 濃度は 10ng/ml) 培地交換直後、24 時間後、48 時間後、72 時間後に CCK8(Dojindo) 10μl 添加し、2 時間後、450nm の波長で吸光度を測定した。(GloMax® -Multi Detection System)

4. 6well plate による線維芽細胞の培養と MSC-CM の添加 RNA 抽出

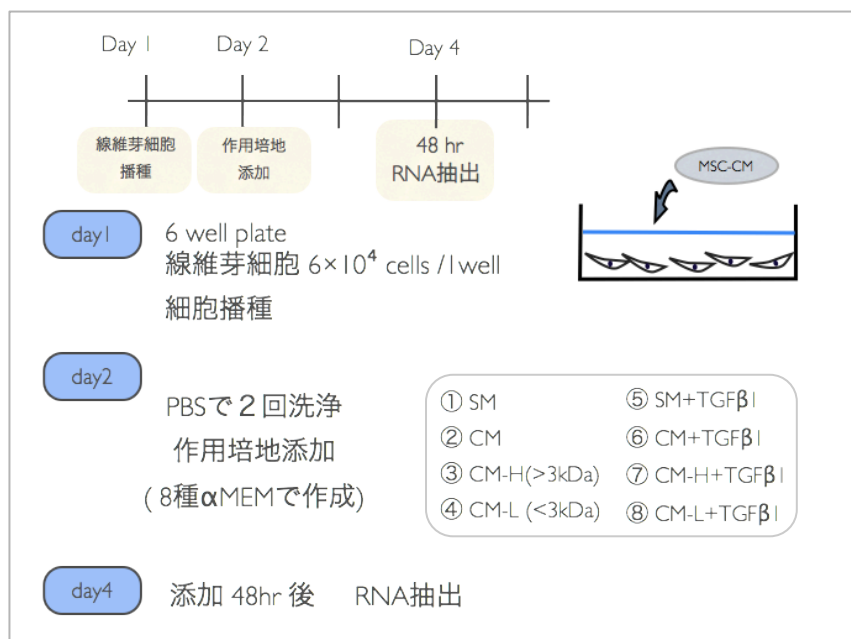


図 6 RNA 抽出

線維芽細胞を 6well plate に 1well あたり 6×10^4 で播種し、10% fetal bovine serum + α MEM + 100 units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin で 24 時間培養後、PBS で 2 回洗浄し、各 well に対し次の 8 種の添加培地で置換した。

① α MEM ② CM ③ CM-H ④ CM-L ⑤ α MEM+TGF β 1 ⑥ CM+TGF β 1 ⑦ CM-H+TGF β 1 ⑧ CM-L+TGF β 1

培地置換 48 時間後に培養細胞を回収し、細胞のホモジナイズを行い (QIAGEN QIAshredder)、スピнкаラム法にて total RNA を抽出した (QIAGEN RNeasy Mini Kit)。抽出の過程においてゲノム DNA のコンタミネーションを防ぐ目的で DNase 処理を行った (QIAGEN RNase-Free DNase Set)。RNA の濃度は分光光度計 (Nano Drop ND-1000, Thermo Fisher Scientific) で測定した。

5. 逆転写 (RT:reverse transcription) 反応

total RNA から RT により cDNA を作成した。逆転写酵素として The High Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (thermo fisher) を用いた。サーマルサイクラー (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems) による RT 反応条件は 37°C 15 分、85°C 5 秒、4°C ∞ とした。

6. Real time PCR

熱変性 95°C・10 分、熱変性 95°C・15 秒・アニーリング/伸長反応 60°C・60 秒 \times 40 サイクル、融解曲線分析 95°C・15 秒-60°C・15 秒のプロトコールで real time PCR を行った。Real time PCR 装置は 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いた。使用したプライマー配列は以下の表 2 の通りである、内在性コントロールとして 18SrRNA を用いた。⁵ Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) を用いたインターカレーション法により PCR 増幅産物生成量を測定し、 $\Delta\Delta$ CT 法により解析した。

表 2 プライマー配列

Gene	Primer sequence
18SrRNA	F: GTAACCCGTTGAACCCCATTT
	R: CCATCCAATCGGTAGTAGCG
αSMA	F: CCGACCGAATGCAGAAGGA
	R: ACAGAGTATTTGCGCTCCGAA
SM22a	F: CTGAGGACTATGGGGTCATC
	R: TAGTGCCCATCATTCTTGGT
collagen-I	F: GGGATTCCCTGGACCTAAAG
	R: GGAACACCTCGCTCTCCA
collagen-III	F: CTGGACCCCAGGGTCTTC
	R: CATCTGATCCAGGGTTTCCA
MMP-2	F: GTTCCCCTTCTTGTTCAATG
	R: CTTGCCATCCTTCTCAAAGT
TIMP-1	F: CCAGCGTTATGAGATCAAGA
	R: AGTATCCGCAGACACTCTCC

7. 蛍光染色

チャンバースライドに、10000cells/1well で細胞播種。24 時間後、PBS 300μl/well で 2 回洗浄後、次の 4 種で培地添加 ①αMEM ② CM ③αMEM+TGFβ1 ④ CM+TGFβ1。(250μl/well,TGFβ1 濃度 10ng/ml)

培地交換より 48 時間後に蛍光染色した。PBS 300 μ l/well で洗淨後 4%パラホルムアルデヒド 300 μ l、室温で 15 分固定した。2%FBS 含有 HBSS(-) 300 μ l でリンスし、0.05% Triton 150 μ l 2 分間浸透処理。2% FBS 含有 HBSS 300 μ l で洗淨。一次抗体 (Rb pAb to α SMA ab5694 0.2mg/ml) を 2% FBS 含有 HBSS で 500 倍希釈して細胞に 150 μ l/well 滴下, 室温で 30 分インキュベートした。2% FBS 含有 HBSS 300 μ l で 5 分おいて洗淨した。二次抗体 (Hoechst 33342, FITC anti Rabbit) を 2% FBS 含有 HBSS で 500 倍と 5000 倍に希釈し、細胞に 150 μ l/well 滴下, 室温で 30 分インキュベートした。2% FBS 含有 HBSS 300 μ l で 5 分おいて洗淨した。All-in-One Fluorescence Microscope BZ-X700 で撮影した。

8. 統計学的解析

実験群と対照群について、One-way ANOVAおよびTurkey's post-hoc analysis による多重比較を行った。 $P < 0.05$ を有意差ありとした。(GraphPad Prism Software, Ver. 6.0, San Diego, California, USA).

実験結果

【1】ケロイドと成熟癒痕、正常皮膚における α SMA の存在

ケロイド、成熟癒痕組織、正常皮膚それぞれの組織内 α SMA の存在を確認する目的に、手術検体より作成したホルマリン固定標本について HE 染色、 α -SMA 染色を行い観察した。ケロイド組織内には、成熟癒痕組織、正常皮膚と比較して、間質に α -SMA の発現が亢進している部位がみられた。

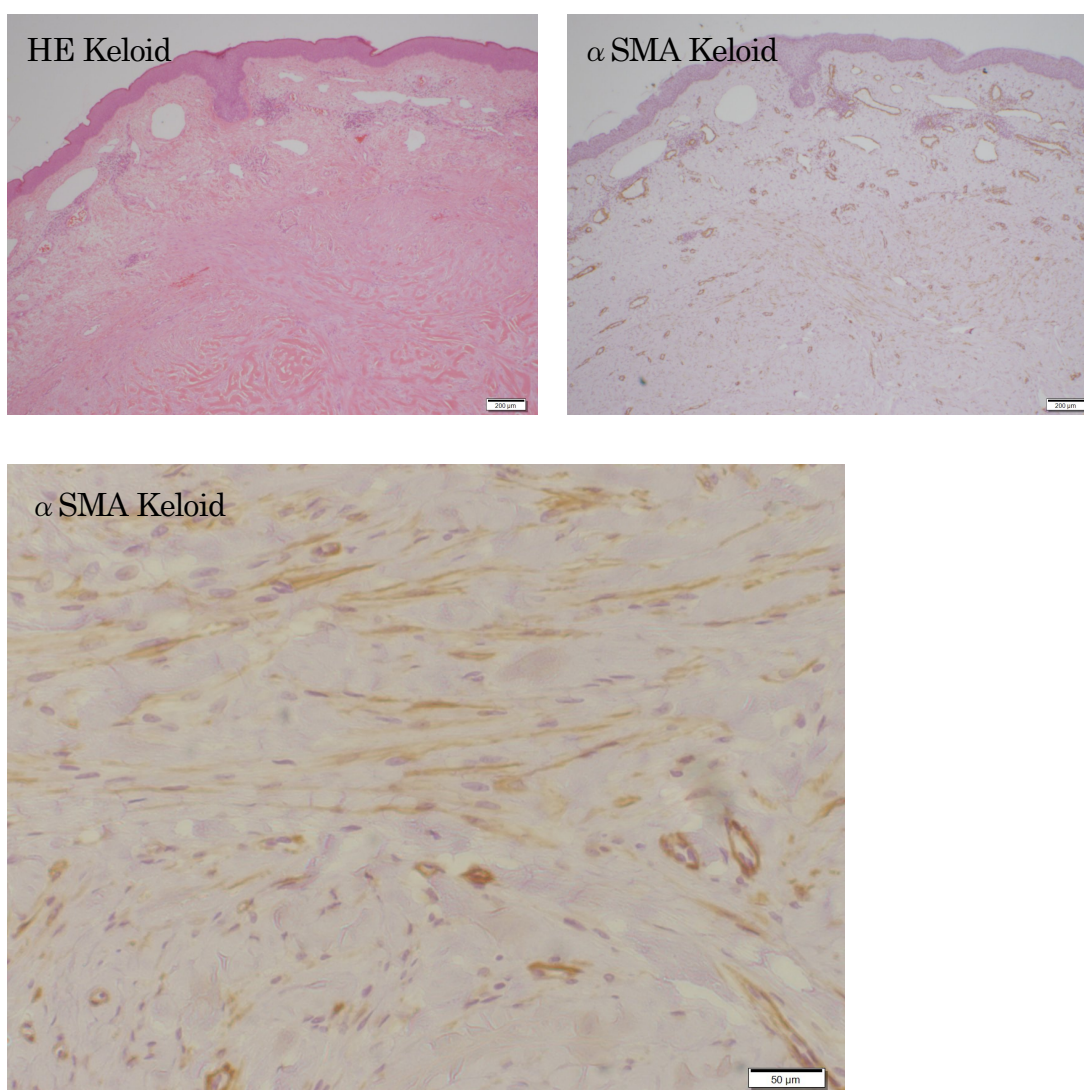


図7 ケロイドにおける HE 染色および α -SMA 染色を示す。上段弱拡大、下段強拡大。 α SMA の発現亢進を認めている。

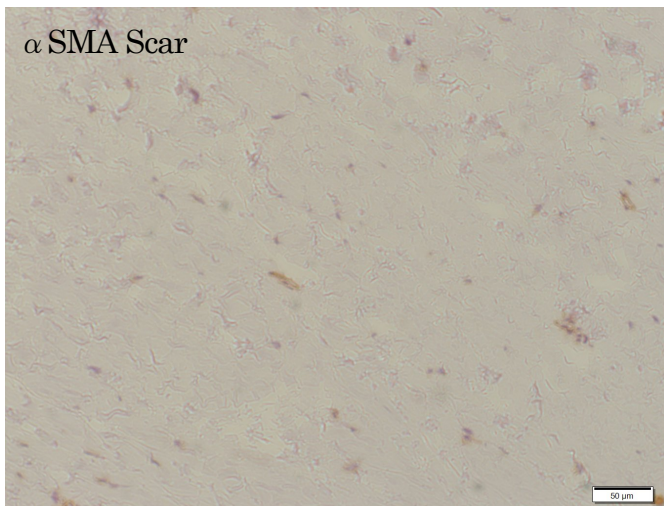
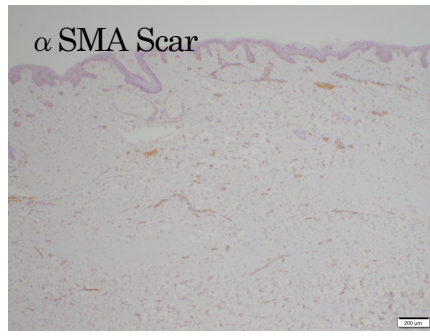
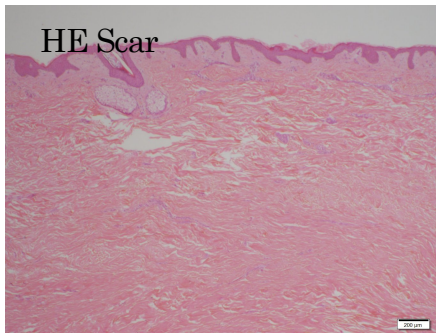


図8 成熟瘢痕組織におけるHE染色およびα-SMA染色を示す。上段弱拡大像、下段強拡大像。αSMAの発現はケロイド組織と比較して少ない。

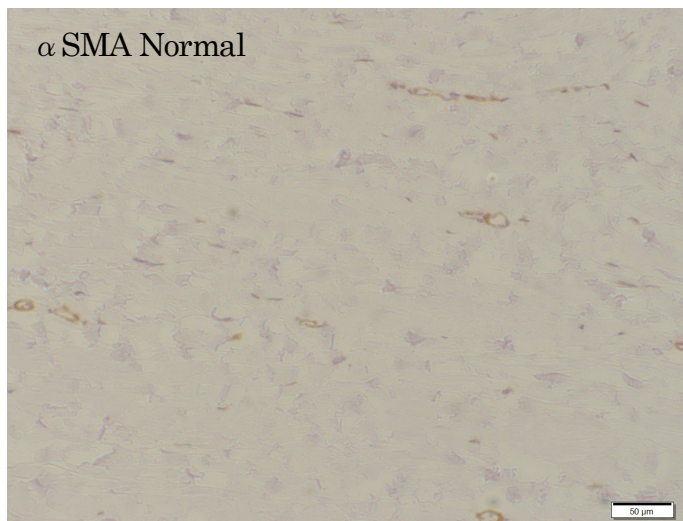
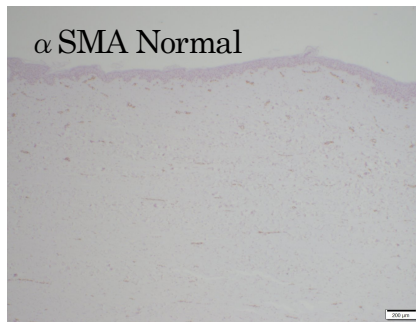
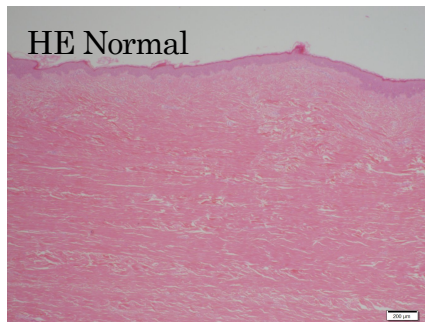


図9 正常皮膚におけるHE染色およびα-SMA染色を示す。上段弱拡大像、下段強拡大像。αSMAの発現は血管周囲のみである。

【2】AMSC-CM が各線維芽細胞の細胞増殖に与える影響

<MTS assay>

AMSC-CM が各線維芽細胞の細胞増殖に対し与える影響を評価する目的で、MTS assay を行った。グラフはケロイド7検体、成熟癬痕3検体、正常皮膚3検体それぞれの線維芽細胞の細胞増殖の結果である。サンプルによって様々な反応が見られ、有意な結果は得られなかった。添加培地に交換後48時間の1時点で測定したこともあり、添加した培地がもたらす吸光度変化の影響も出ていると考える。

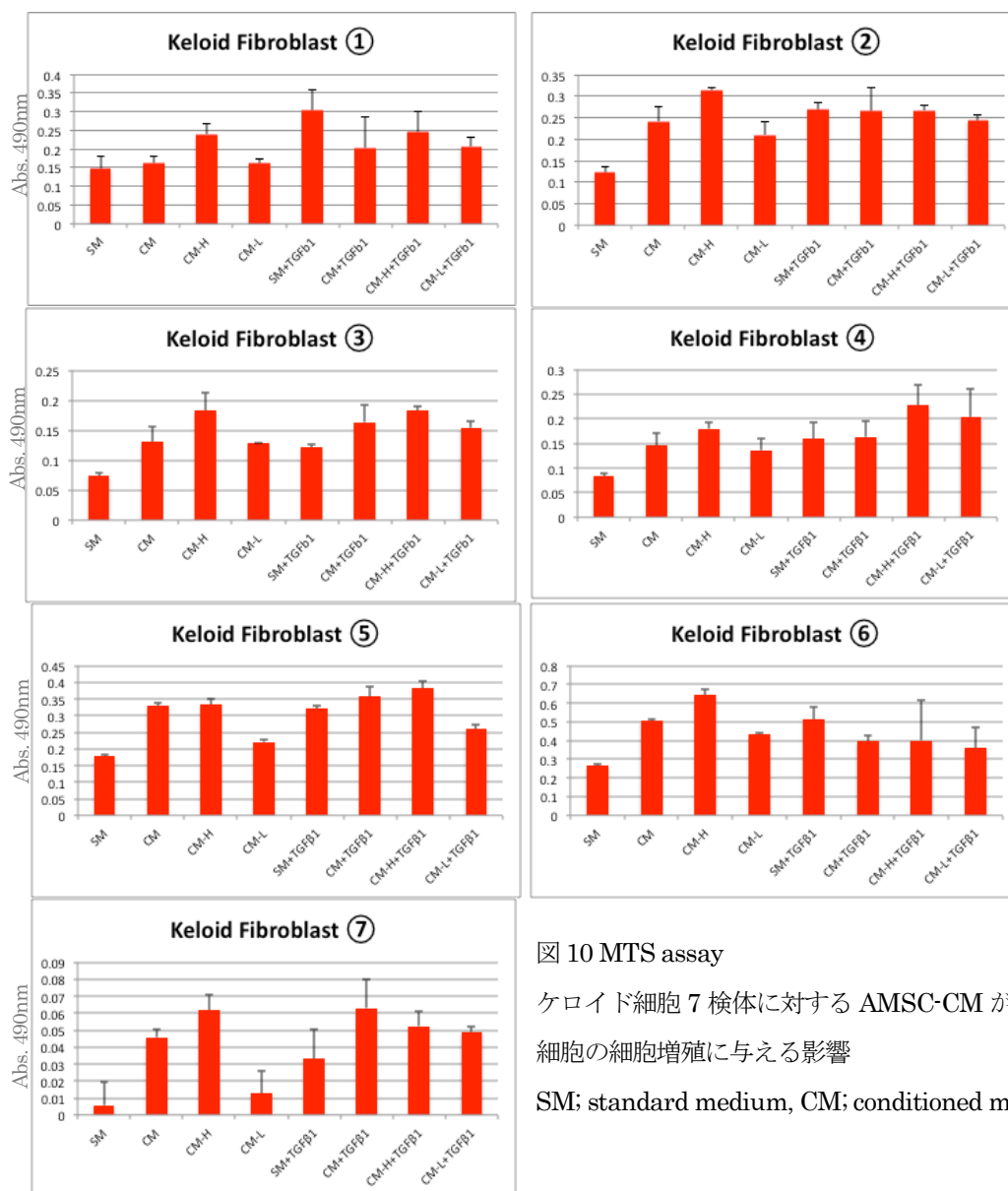


図 10 MTS assay

ケロイド細胞7検体に対するAMSC-CMが線維芽細胞の細胞増殖に与える影響

SM; standard medium, CM; conditioned medium

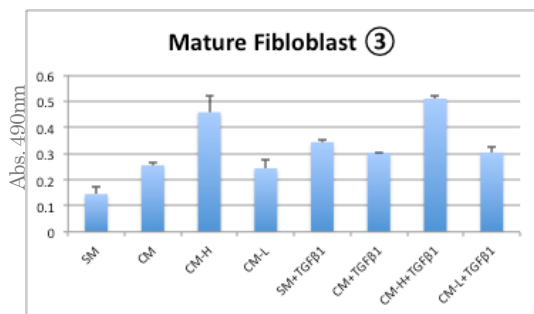
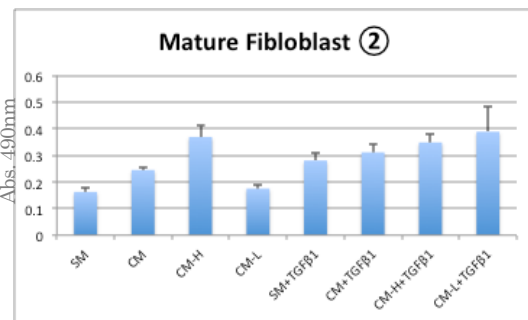
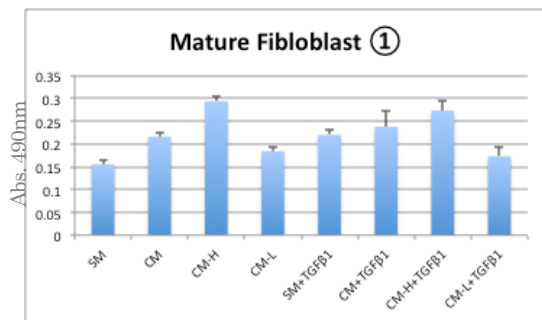


図 11 MTS assay

成熟癒痕 3 検体に対する AMSC-CM が線維芽細胞の細胞増殖に与える影響

SM; standard medium,

CM; conditioned medium

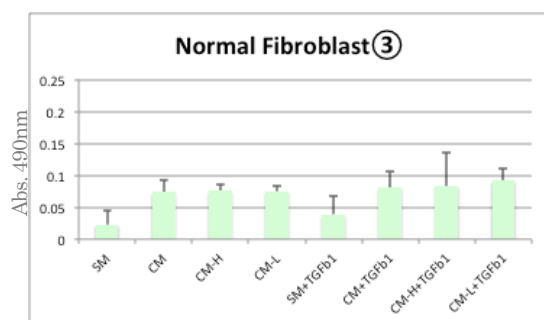
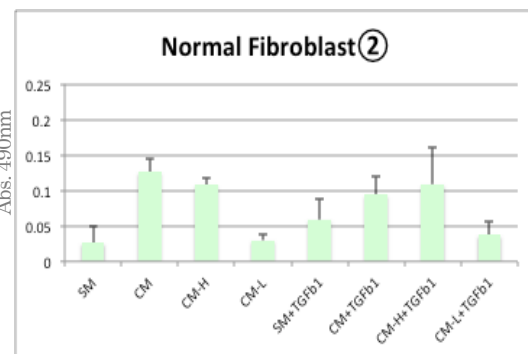
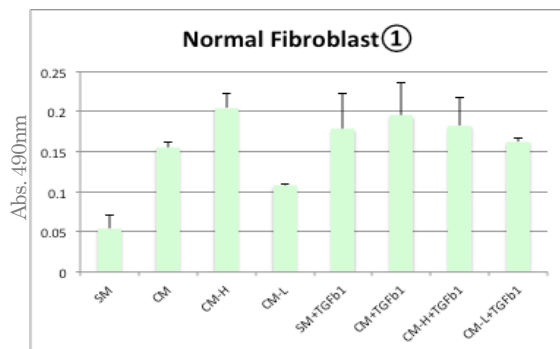


図 12 MTS assay

正常皮膚 3 検体に対する AMSC-CM が線維芽細胞の細胞増殖に与える影響

SM; standard medium,

CM; conditioned medium

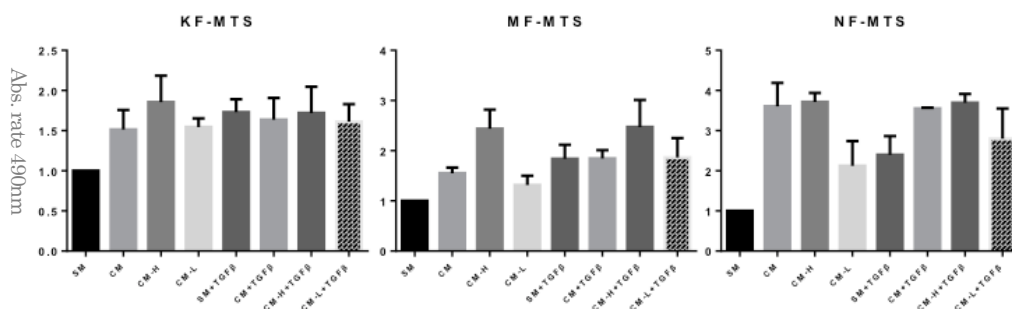


図 13 MTS assay の結果

MTS assay の結果をまとめたが、統計学的な有意差も傾向も得られなかった。添加培地に交換後、反応させる時間が短いことなど考えて、細胞増殖の変化を経時的に追うこととした。また、各培地による吸光度へ与える影響も大きいと判断し、添加直後の点でも測定した上で細胞増殖を評価する方針に変更した。

<CCK8>

AMSC-CM が各線維芽細胞の細胞増殖に与える影響を評価するために CCK8 による実験を行った。MTS assay では添加培地に交換後 48 時間で評価していたが、CCK8 では添加直後、24 時間後、48 時間後、72 時間後の 4 点で経時的に評価した。

線維芽細胞の細胞増殖を肉眼的にも確認する目的で細胞写真を撮影した。48 時間では添加培地による細胞増殖の変化がはっきりしないため、72 時間で各種細胞の増殖を顕微鏡で確認した。

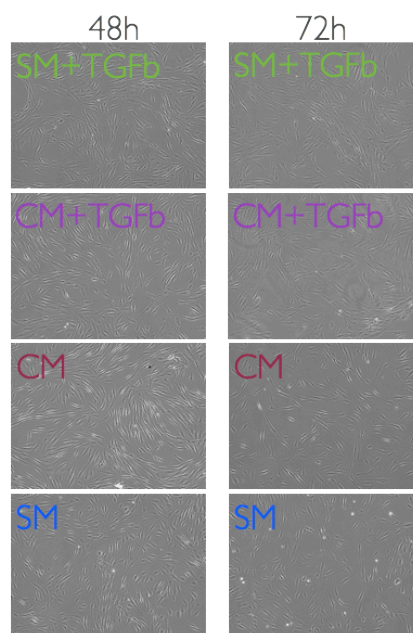
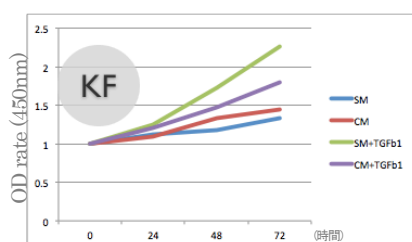


図 14 グラフはケロイド線維芽細胞に TGF-β 刺激と AMSC-CM 添加を行い、添加直後からの経時的な細胞増殖を評価する目的で CCK8 を用いて吸光度を測定した。48 時間と 72 時間で顕微鏡観察した細胞写真を示す。グラフは n=7。顕微鏡写真は 48 時間と 72 時間で別のケロイド検体を使用している。グラフの結果と顕微鏡写真のどちらも、72 時間での各作用培地による変化が明瞭だった。

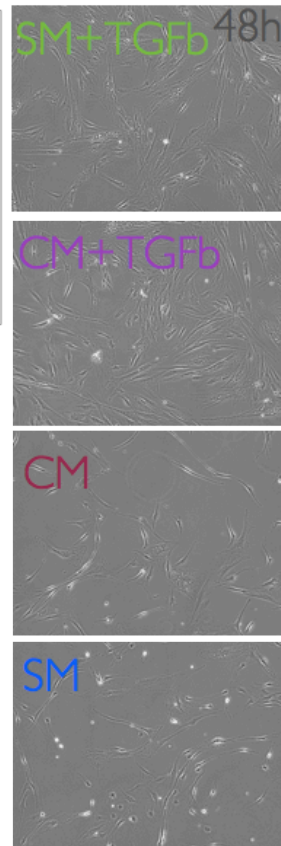
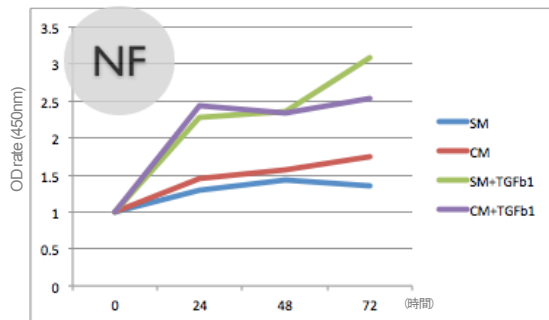


図15 正常皮膚組織から得られた線維芽細胞に TGF- β 刺激、AMSC-CM を作用させて細胞増殖の変化を評価した。グラフは n=3。写真は添加培地に交換後 48 時間の細胞顕微鏡像顕微鏡像である。

細胞増殖に関する実験のここまでの結果をふまえ、各細胞の 72 時間での細胞顕微鏡写真と経時的な細胞増殖の変化を評価する方針とした。

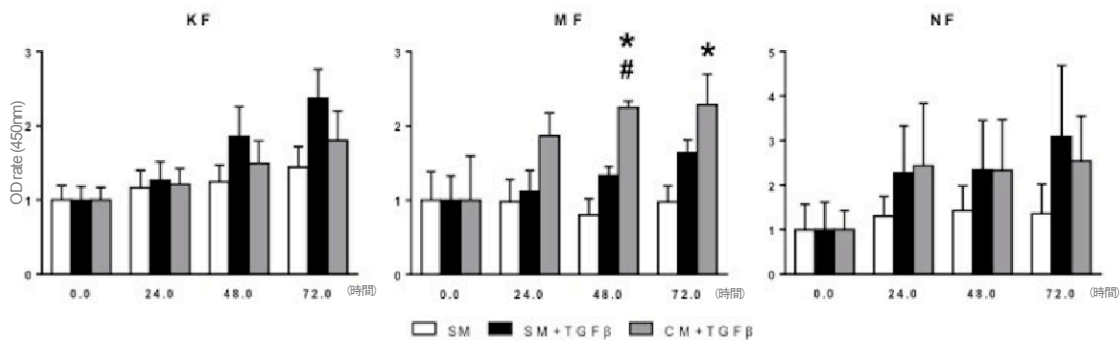


図16 ケロイド、成熟瘢痕組織、正常皮膚それぞれの線維芽細胞増殖を示す。

*p < 0.05 vs. SM group. # p < 0.05 vs. SM + TGF- β group.

SM; standard medium, CM; conditioned medium

図 16 のグラフに示すように、TGF- β 刺激によって全ての種類の細胞が増殖促進する傾向にあった。また、ケロイドにおいて、TGF- β 刺激によって亢進する細胞増殖が AMSC-CM によって抑制される傾向があることがわかった。一方で成熟瘢痕は AMSC-CM によって細胞増殖が有意に促進された。正常皮膚組織に関しては有意な増殖促進は認めなかった。

顕微鏡による細胞写真を以下に示す。

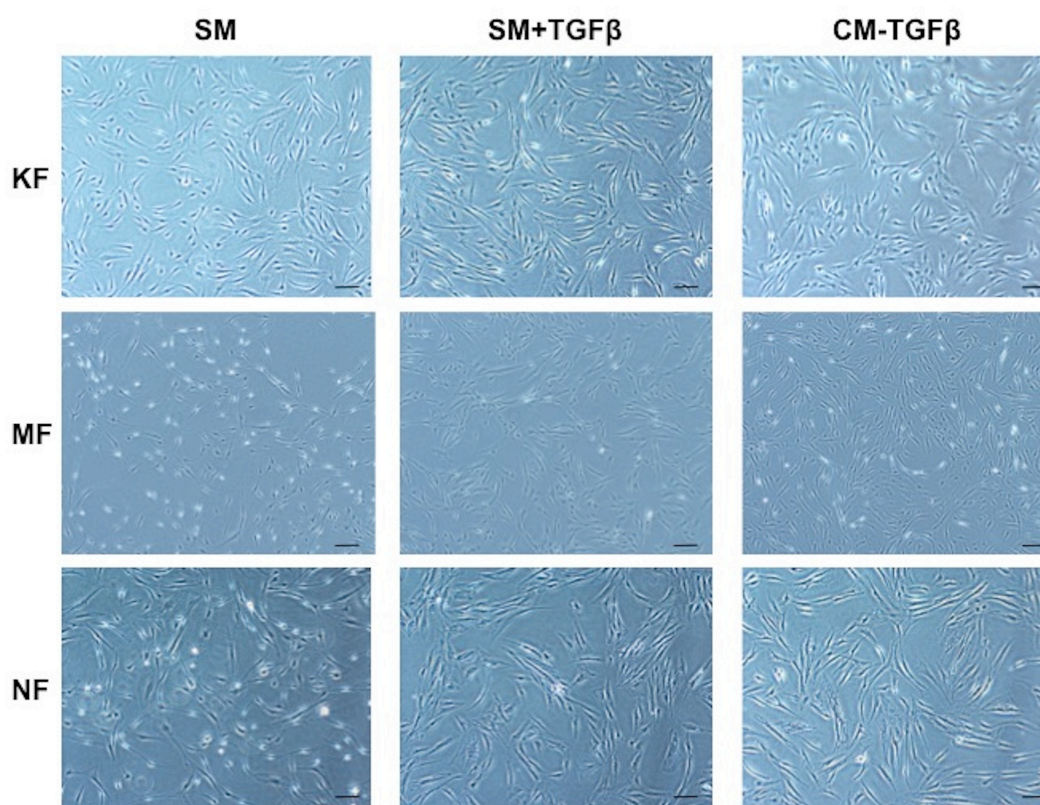


図 17 添加培地交換後 72 時間の細胞顕微鏡写真を示す。右下のスケールバーは 200 μ m である。

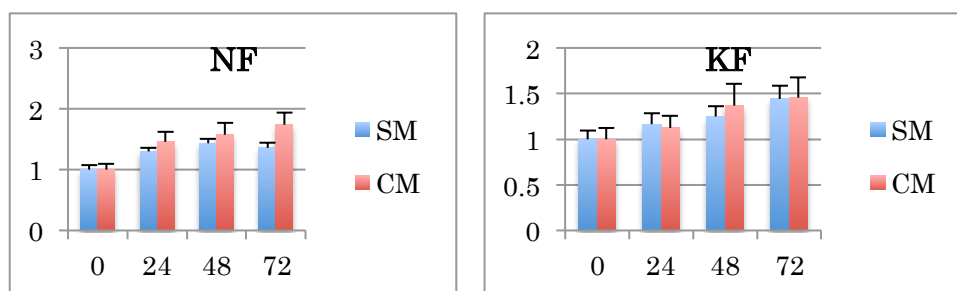


図 18 TGF- β 添加なしでの CM 単独刺激に対する細胞増殖の変化を示す。正常由来に対しては増殖促進、ケロイドに対しては増殖抑制の傾向があった。

【3】AMSC-CM が各線維芽細胞の α SMA 遺伝子発現に及ぼす効果

各種線維芽細胞に対し、TGF- β 刺激と AMSC-CM 添加し、 α SMA 遺伝子発現の変化を検証した。図 19 に示すように、ケロイド線維芽細胞において、 α SMA の遺伝子発現は TGF- β 刺激により有意に上昇し、それは AMSC-CM によって有意に発現抑制された。成熟癬痕、正常皮膚においては、有意な変化を認めなかった。

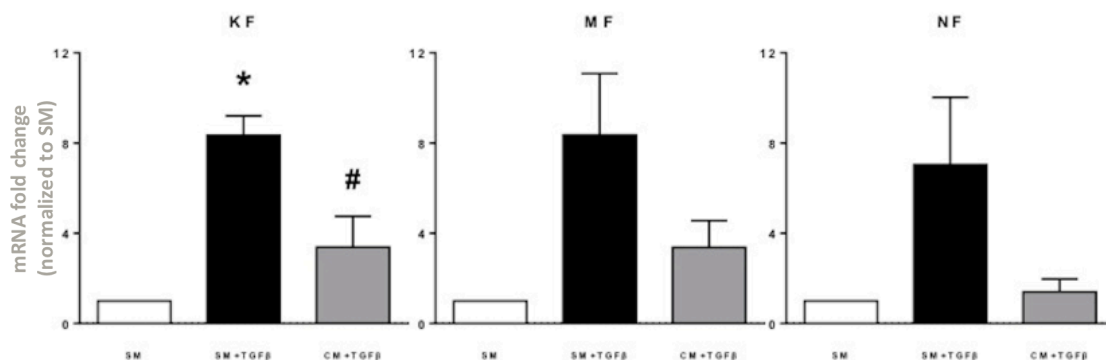


図 19 α SMA 遺伝子発現

* $p < 0.05$ vs. SM group. # $p < 0.05$ vs. SM+TGF- β group.

SM; standard medium, CM; conditioned medium

有意な変化を引き起こす成分を特定する目的で、高分画の CM(CM-H)と低分画の CM(CM-L)を作用させる実験を行った。ケロイド線維芽細胞に対してのみ、すべての CM タイプで有意に α SMA 抑制効果を示した。(図 20)

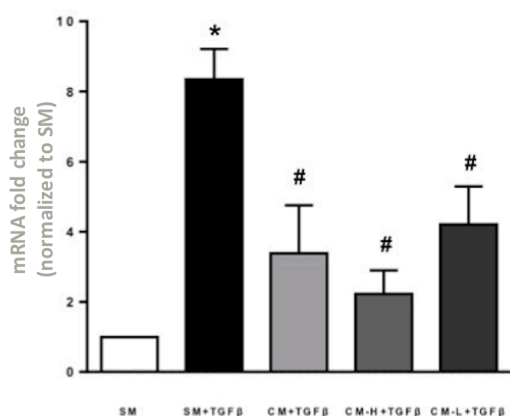


図 20 ケロイド α SMA 遺伝子発現

* $p < 0.05$ vs. SM group.

$p < 0.05$ vs. SM+TGF- β group.

SM; standard medium,

CM; conditioned medium

成熟癬痕、正常皮膚に関しては、有意な変化を認めなかった。(図 21)

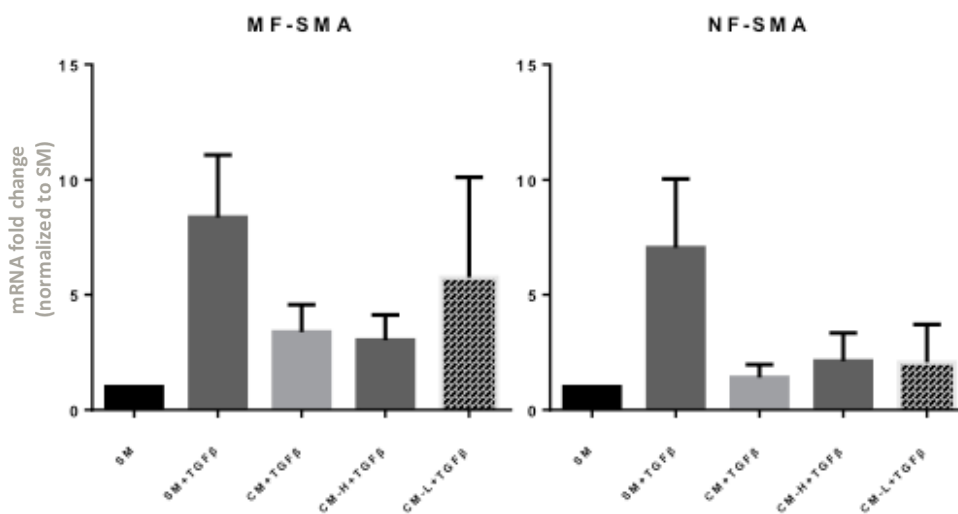


図 21 成熟癬痕、正常皮膚 αSMA 遺伝子発現

SM; standard medium, CM; conditioned medium

ケロイド、成熟癬痕、正常皮膚に関して、TGF-β 刺激をしない結果も含めて評価する多群解析では、いずれも有意な結果を得られなかった。(図 22)

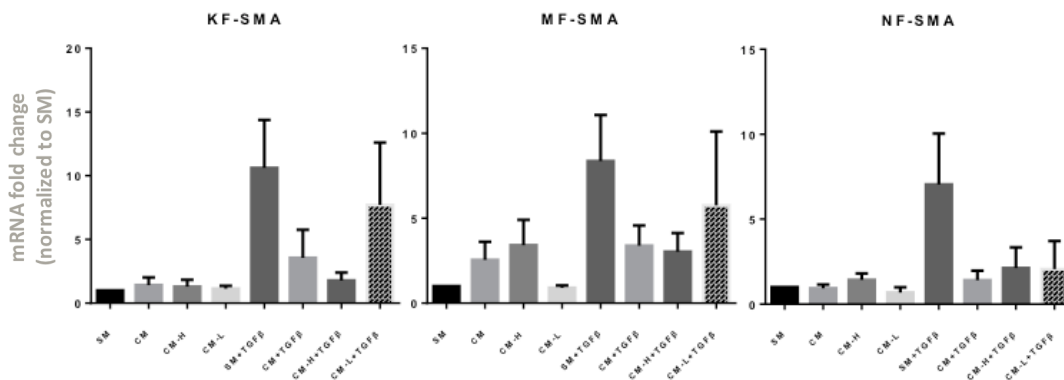


図 22 ケロイド、成熟癬痕、正常皮膚 αSMA 遺伝子発現

SM; standard medium, CM; conditioned medium

【4】各線維芽細胞の蛍光画像

α SMA 遺伝子発現で示された結果を蛍光染色画像で確認する目的で行った。

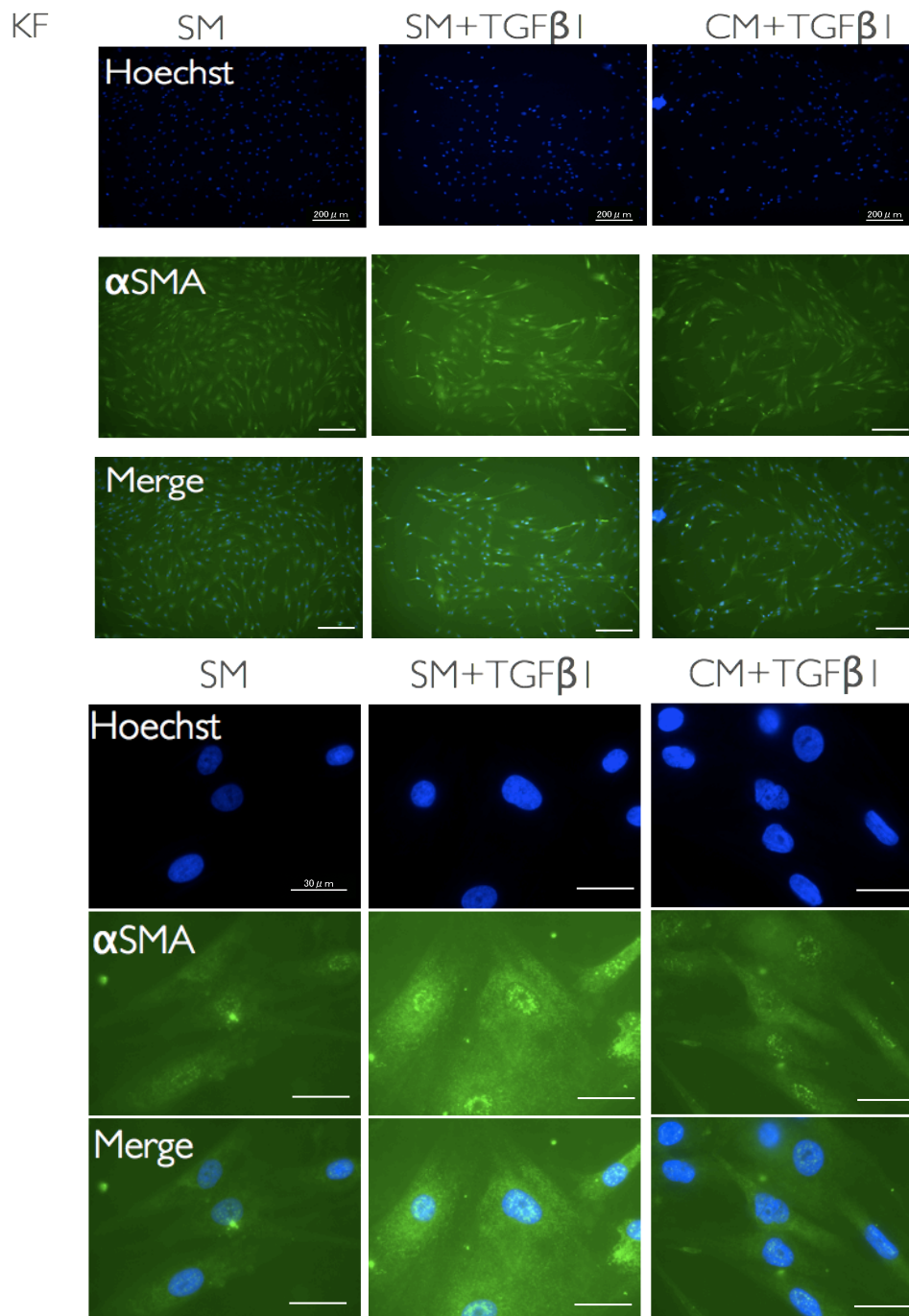


図 23 ケロイド線維芽細胞の蛍光染色画像

MF

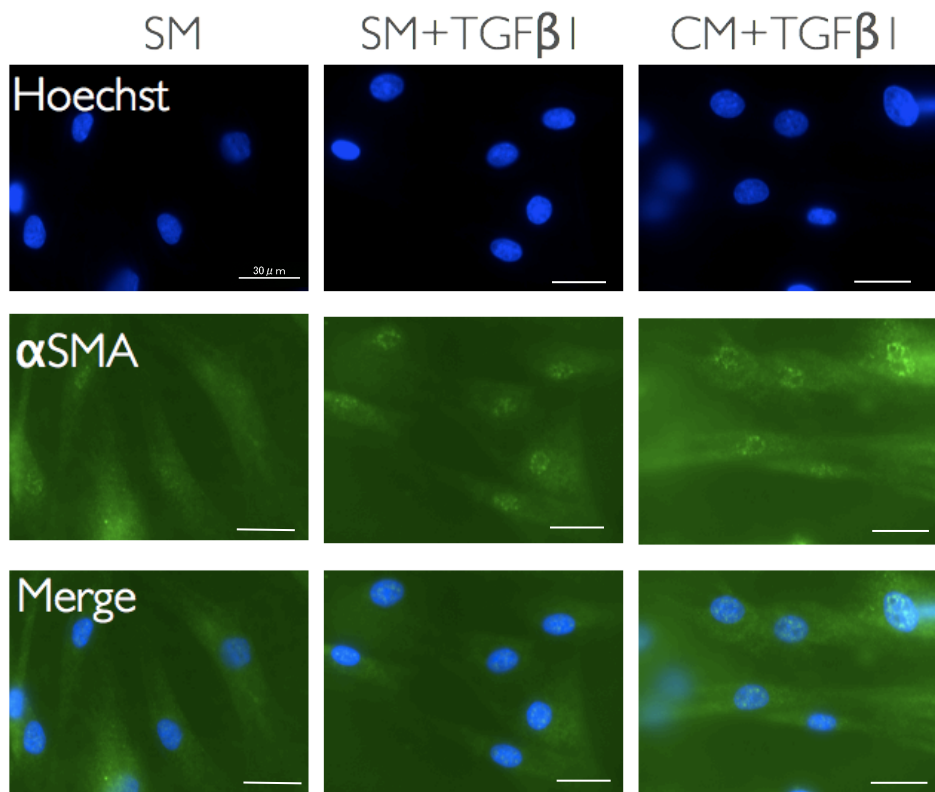
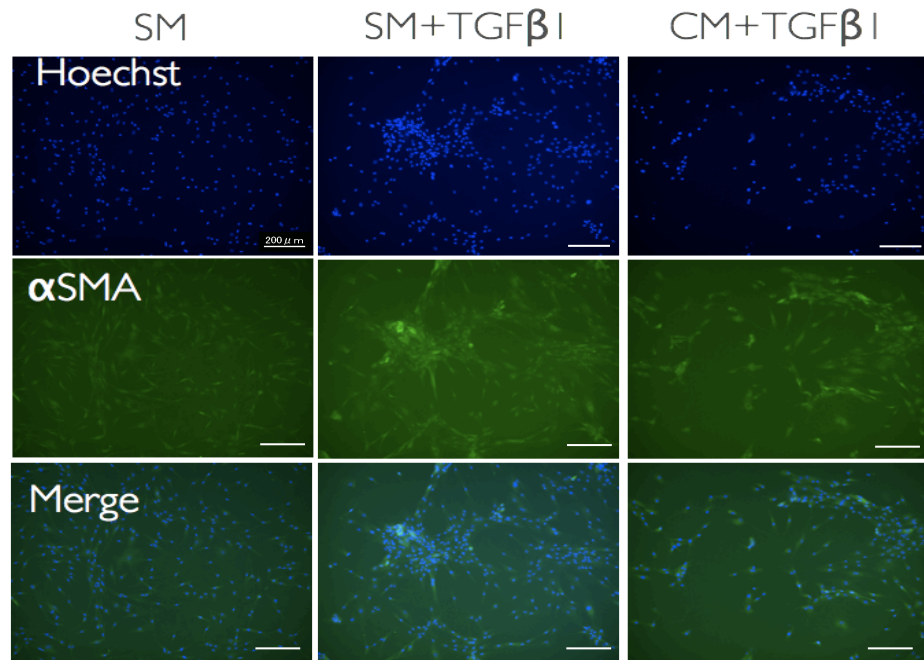


図 24 成熟瘢痕由来線維芽細胞の蛍光染色画像

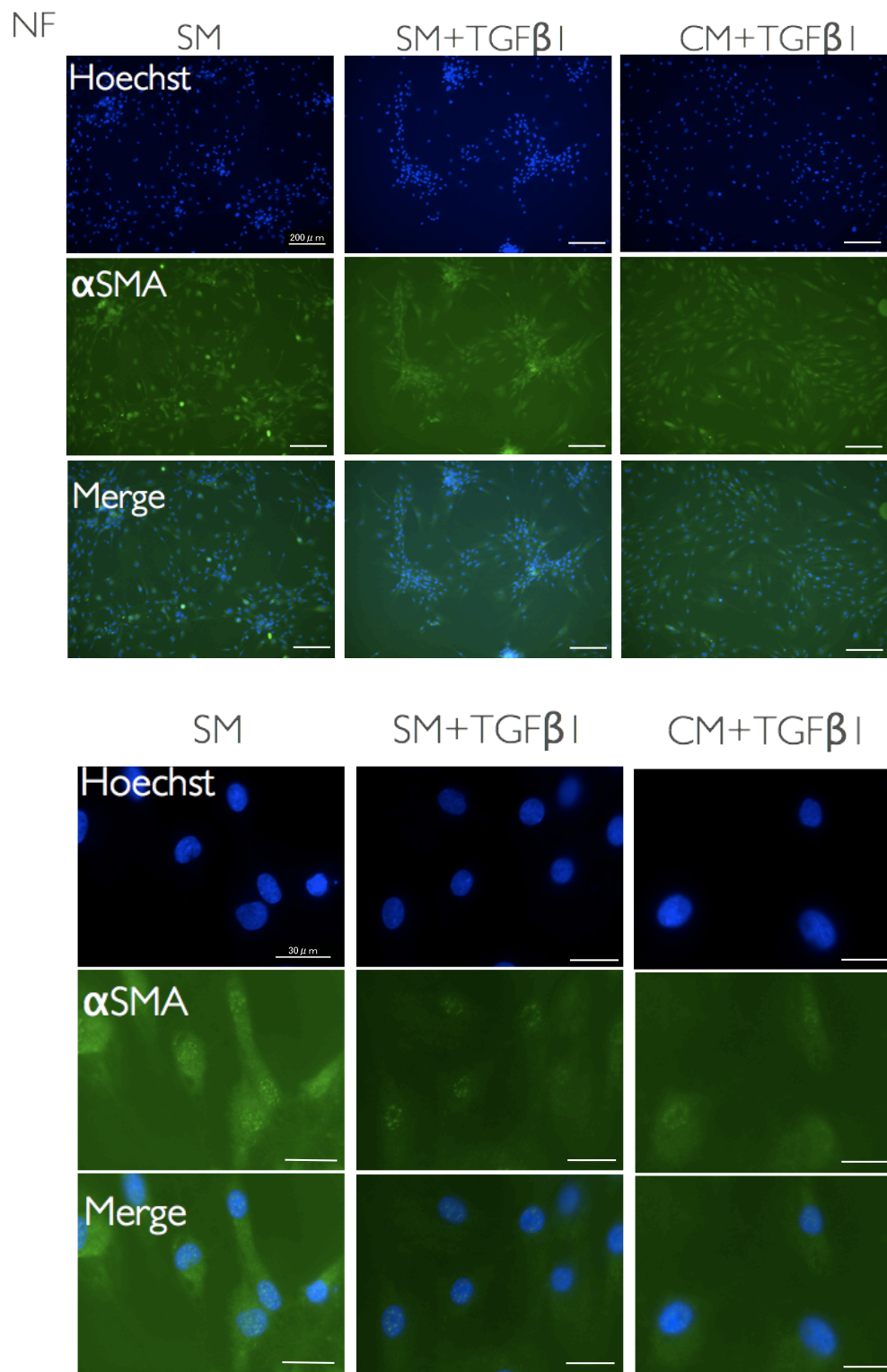


図 25 正常皮膚由来線維芽細胞の蛍光染色画像

【5】AMSC-CM が各線維芽細胞の SM22 α 遺伝子発現に及ぼす効果

ケロイドにおいて、TGF- β 刺激での SM22 α 発現が有意に亢進し、その効果が AMSC-CM によって有意に抑制された。成熟癬痕では TGF- β 刺激で有意な発現亢進を認めたが、AMSC-CM による有意な抑制効果は認めなかった。正常皮膚では TGF- β 刺激による発現の亢進傾向と AMSC-CM による抑制の傾向を認めた。(図 26)

有意な変化を引き起こす成分を特定する目的で、高分画の CM(CM-H)と低分画の CM(CM-L)を作用させる実験を行った。分画化した AMSC-CM で有意な抑制効果を示す結果は得られなかった。(図 27)

多群解析では TGF- β 単独刺激での発現亢進以外の有意な結果は得られなかった。(図 28)

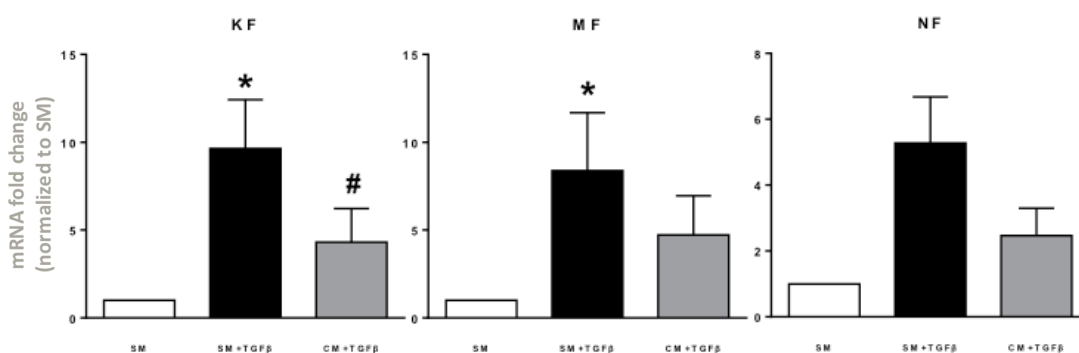


図 26 SM22 α の遺伝子発現

* $p < 0.05$ vs. SM group. # $p < 0.05$ vs SM + TGF- β group.

SM; standard medium, CM; conditioned medium

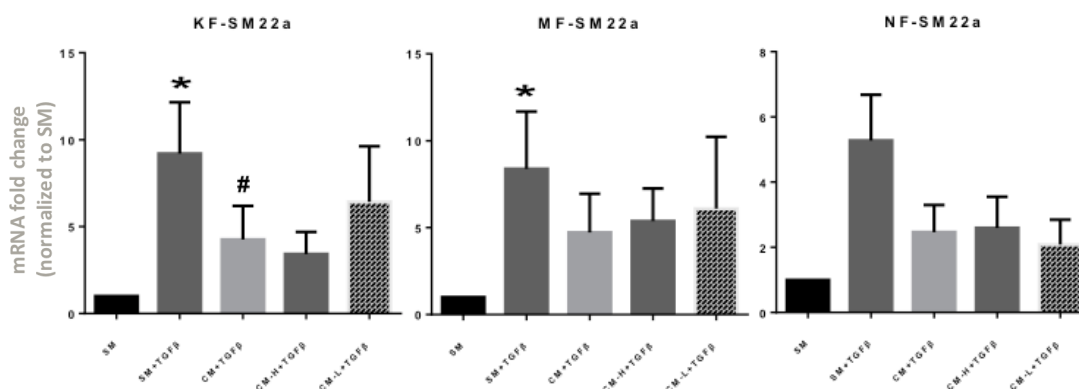


図 27 SM22 α の遺伝子発現

* $p < 0.05$ vs. SM group. # $p < 0.05$ vs SM + TGF- β group.

SM; standard medium, CM; conditioned medium

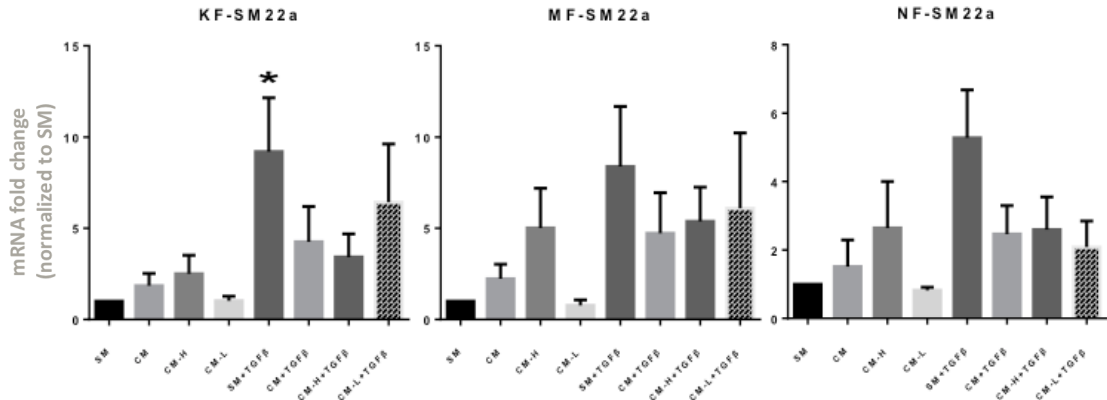


図 28 SM22α の遺伝子発現

*p < 0.05 vs. SM group.

【6】AMSC-CM が各線維芽細胞の CollagenI 遺伝子発現に及ぼす効果

細胞外基質を構成する collagenI の遺伝子発現に及ぼす効果を検証した。ケロイドにおいて TGF-β 刺激で有意に発現亢進し、AMSC-CM で抑制された。成熟瘢痕、正常皮膚では有意な変化を認めなかった。

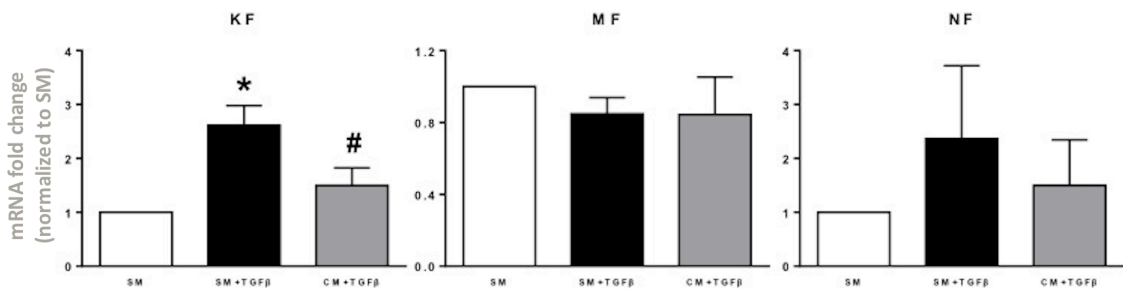


図 29 Collagen I の遺伝子発現

*p < 0.05 vs. SM group. # p < 0.05 vs SM + TGF-β group.

SM; standard medium, CM; conditioned medium

有意な変化を引き起こす成分を特定する目的で、高分画の CM(CM-H)と低分画の CM(CM-L)を作用させる実験を行った。分画化した AMSC-CM で collagenI に対する有意な抑制効果を示す結果は得られなかった。(図 30)

多群解析では有意な結果は得られなかった。(図 31)

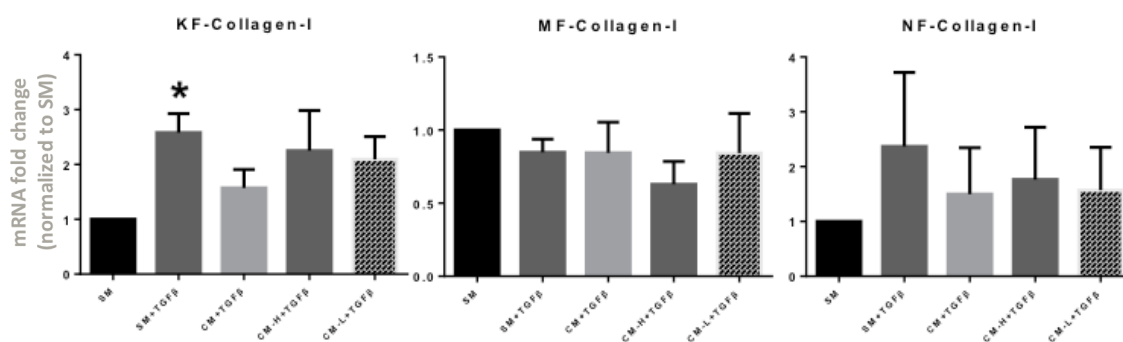


図 30 CollagenI の遺伝子発現

*p < 0.05 vs. SM group.

SM; standard medium, CM; conditioned medium

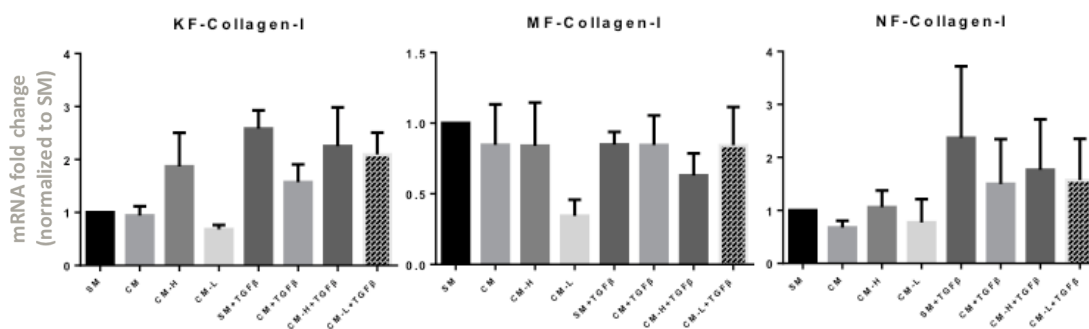


図 31 CollagenI の遺伝子発現

SM; standard medium, CM; conditioned medium

【7】AMSC-CM が各線維芽細胞の collagenIII、MMP2、TIMP1 遺伝子発現に及ぼす効果

その他の細胞外基質に関わる成分の遺伝子発現解析では、有意な結果は得られなかった。

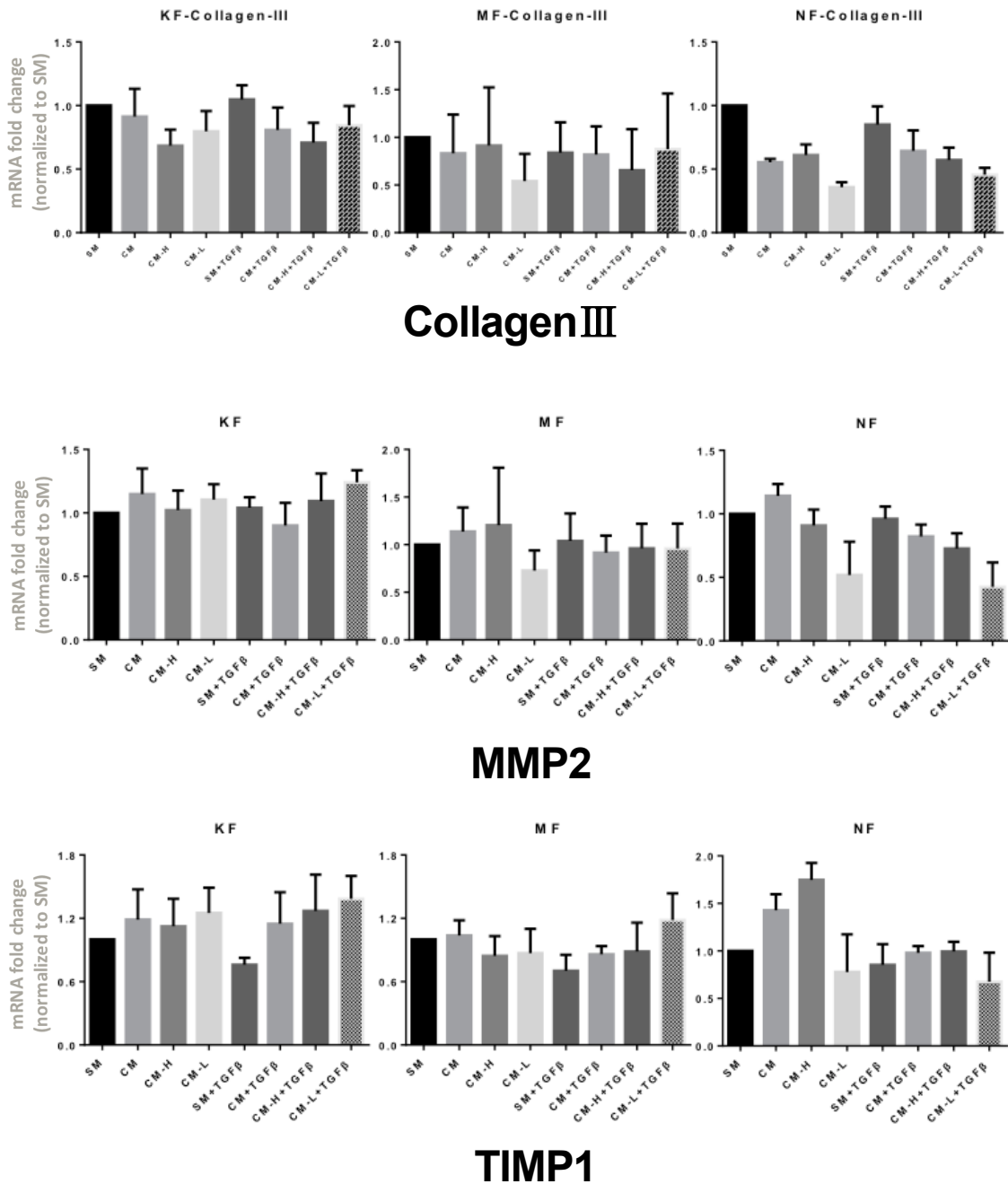


図 32 CollagenIII、MMP2、TIMP1 の遺伝子発現結果。多群解析。

考察

卵膜由来間葉系幹細胞培養上清のケロイド線維芽細胞に対する作用について報告した論文はこれまでになく、本研究が初である。

ケロイドは炎症の持続と線維化がその病態であり、創傷治癒過程における異常が認められる。炎症反応が欠如しているといわれる胎仔の創傷治癒においては、ケロイドや肥厚性癒痕が形成されないのみならず、成熟した癒痕すら認めずに治癒する。また、臨床上、我々は炎症が遷延した創がケロイドや肥厚性癒痕を形成しやすいことも経験する。ケロイドは過剰な炎症とそれに引き続くコラーゲンの合成を特徴とする。^{6,7} コラーゲンの合成を阻害することでケロイド線維芽細胞の活性化を抑制できるという報告もある。⁸⁻¹¹

MSC は、分化増殖のみならず、抗炎症作用や抗線維化作用などを併せ持ち、心筋や腎臓において炎症を制御し線維化を抑制したという報告がある。^{12,13}

本研究では、卵膜由来間葉系幹細胞から得られた培養上清がケロイド線維芽細胞に及ぼす影響について検討した。ケロイドの主要な病態形成と維持に最も重要な役割を担っている因子のひとつである TGF- β で刺激して AMSC-CM を作用させた。

【AMSC-CM のケロイド線維芽細胞に対する細胞増殖抑制効果】

AMSC-CM は TGF- β 刺激で亢進するケロイド線維芽細胞の増殖を抑制する傾向があることが示された。同時に、成熟癒痕由来の線維芽細胞の細胞増殖は有意に促進していた。これまでに、骨髄由来の間葉系幹細胞がケロイド由来線維芽細胞の細胞増殖を抑制したとする報告がある。¹⁴ Fong らは Wharton's jelly 間葉系幹細胞がケロイド線維芽細胞の増殖を抑制したという報告もある。また、間葉系幹細胞が正常の線維芽細胞の増殖を促進し、創傷治癒を促進するとする報告もある。¹⁵

本研究では卵膜由来間葉系幹細胞が、これまでに報告されている由来の異なる間葉系幹細胞と同様に、TGF- β によって誘導されるケロイドの異常な線維芽細胞の増殖を抑制する傾向が示された。正常癒痕治癒過程で形成される成熟癒痕の線維芽細胞に対しては有意に細胞増殖を促進させる結果が得られた。

【ケロイド線維芽細胞に対する α -SMA 発現抑制作用】

線維化の主体は筋線維芽細胞によるコラーゲンの産生である。¹⁶ 筋線維芽細胞は α -SMA を発現し、組織の収縮と細胞外マトリックスの産生を促進する。この α -SMA

は筋線維芽細胞のマーカーであるが、肝星細胞のように多くの臓器において、線維芽細胞に似た特徴をもつ複数の種類の細胞に発現することがある。そして、これらの細胞は臓器の線維化疾患に関与していると考えられている¹⁷。

本研究では、ケロイド (KF) において、TGF- β によって刺激され発現が亢進する α -SMA mRNA に対し AMSC-CM が発現抑制作用を有することを遺伝子レベルで証明し、さらに蛍光染色でも α -SMA の発現が減少していることを確認した。

AMSC-CM が KF の α -SMA の発現を抑制することは線維芽細胞が筋線維芽細胞の形質を獲得することを阻止し、細胞外マトリックス産生の増大の予防につながる可能性がある。また α -SMA は創傷の収縮にも深く関与¹⁸しており、強い拘縮を伴うことも多いケロイドに対し、病変のある局所の拘縮を弱めることで機械的な外力としての緊張を除くことにもつながるのではないかと推察する。

【ケロイド線維芽細胞に対する 1 型コラーゲン産生抑制作用】

ケロイド線維芽細胞においては TGF- β 刺激によって I 型コラーゲンの発現が亢進する¹⁹。本研究では、AMSC-CM によって TGF- β 刺激によって亢進する I 型コラーゲンの mRNA 発現が有意に抑制された。これは、ケロイドの病態であるコラーゲンの蓄積に対する有効な阻害効果を示す結果と考えた。

【TGF- β 刺激による評価について】

本研究では過去のケロイドの基礎研究のデザインに従い、ケロイド由来の線維芽細胞を *in vitro* で TGF- β 刺激をし、それに対しての MSC-CM の作用を検証している。これは極めて人工的な実験モデルであり、どのくらい臨床的な意義のある結果であるのかは不明とも言える。TGF- β 刺激なしでの MSC-CM 添加に対する反応は、結果に示している通り、統計学的有意差は得られなかった。しかし、有効と思われる傾向を示す結果は得られている。統計学的有意な結果が得られない背景として、ケロイドの検体がいわばバスケットであり、その臨床的な活動性の差によるのではないかと考えられる。本研究ではできなかったが、得られた検体それぞれの本質に迫る検討を加えることで、新たな知見が得られる可能性が残されていると考える。各検体それぞれのケロイドそのものの性質を追求することで、実際に治療効果が期待できるケースを選別するなど、臨床的意義の大きい結果を得られる可能性があると考えられる。

【本研究の問題点】

第一に、本研究で使用したのは線維芽細胞であるが、ケロイドの発症、増悪には皮膚の角化細胞などの上皮系細胞やリンパ球、単球、好中球などの血球細胞といった多

くの細胞²⁰⁻²⁴が関与した複合的な作用も考えられる。これら複数の細胞間の作用に対して AMS-CM が与える影響の検討が本研究では欠如している。

また、AMSC-CM 中のどの成分が KF に作用したのかも明らかにする必要がある。今回、AMSC-CM を分画し作用させたが、作用している CM 中の有効成分の特定までには至らなかった。今後別の手法を追加しさらなる検討が必要と考える。

次に上げられる問題点として、ケロイドが手術適応となる症例が少なく、対象が少なかったことがあげられる。同時に、瘢痕組織や正常皮膚の検体も少数しか確保できなかった。n が少ないことは、実験結果の真の評価の妨げとなっている。

この他の問題点としては、ケロイド検体の術前治療の影響も上げられる。通常、ケロイド患者が保存的療法の施行なく手術に至ることはほとんどない。長期にわたって、ステロイド局所注射や貼付剤の使用、圧迫療法など複数の治療が行われている症例がほとんどである。そのことが、実験に用いた手術検体にどのくらいの影響を及ぼしているかは不明である。長期保存的治療でも難治性で、炎症や線維化が遷延している状態のケロイドに対する手術治療時に得られた検体ではあるため、一定の評価はできるとは考えてはいるが、詳細な検討は必要と考える。

MSC をケロイドに応用する時に考え得るさらなる問題点として、MSC が誘導する線維芽細胞増殖促進作用を創傷治癒促進ととらえるか、病的線維化の兆候ととらえるかということがあげられる。

MSC に期待される効果は複数存在するため、どのように調節的作用が働くかは未知な部分が多く、検証をかさねる必要がある。

総括および結論

【本研究から得られた新知見】

AM-MS-CM は KF に対して以下の作用を持つ。

- 1) TGF- β 刺激によって促進される細胞増殖の抑制作用
- 2) TGF- β 刺激によって亢進する α -SMA の発現抑制作用
- 3) TGF- β 刺激によって亢進する SM22 α mRNA 発現抑制作用
- 4) TGF- β 刺激によって亢進する I 型コラーゲン mRNA 発現抑制作用

【新知見の意義】

本研究では、卵膜由来間葉系幹細胞の培養上清がケロイド線維芽細胞に対して細胞増殖を抑制し、癒痕拘縮や線維化に直接関連する α -SMA や I 型コラーゲン産生を抑制していることが明らかとなった。

本研究の結果は卵膜由来間葉系幹細胞がケロイドに対する治療薬として応用できる可能性が示唆された。難治性疾患であるケロイドに対する全く新しい治療法開発の可能性を示したことは意義深い。幹細胞のなかでも臨床への応用がしやすい卵膜由来の細胞で検証したことも有益であると考えられる。

【今後の展開】

まずは、各種細胞の対象を増やしてさらに検討したいと考えている。また、ケロイド形成のどの過程を阻害することができるのか、実験手法を検討して詳細を評価したい。形成阻害の視点の他、罹患後の早期治療も考慮したい。

他には、創傷治療に関与する細胞として、リンパ球や一部のマクロファージなども報告されていることから、線維芽細胞以外のこれらの細胞に対しても AMSC-CM の作用を検討する必要がある。AMSC に関しては、培養上清のみならず、細胞を作用させる手法も検討したい。MSC 中のどの成分が KF のどの経路に作用しているのかを解明するべく、ケロイドと AMSC に関わる基礎実験を追加していきたい。

臨床応用を考えると、いずれは、大型動物などを用いて癒痕モデルを作成し、MSC の実際的な効果を *in vivo* で検証したいと考えている。

ケロイドの病態をより詳細に解明していくことと、MSC の効果の検証を行い、ケロイドに対する新しい治療薬の開発を目指してさらなる実験を進めていきたいと考えている。

【今後の課題】

本研究で示された AM-MSc のケロイド線維芽細胞に対する作用は、新たなケロイド治療薬となる可能性があることを期待させる。

ケロイドは体表の疾患であるため、AMSC-CM を局所に作用させることができればより副作用も小さく、有用な治療法となると考えられる。しかし、臨床応用に至るまでには課題が多く残る。

ケロイドに適切な動物モデルがないとはいえ、*in vitro* での有効性の評価には限界がある。もっと具体的で確証が得られる有効性の評価を検討しなければならない。その初期の段階として、まずは AMSC-CM の詳細な成分解析と、成分中の有効作用を持つ物質の解明、さらには、ケロイドに対しどの過程で効果を示すのか作用機序にそった効果の検討等、残される課題は多い。

また、線維化に対する治療が困難である理由として、一時的な線維化は創傷治癒過程における正常な反応であることが考えられる。さらに、創傷治癒は複数の細胞や増殖因子などによって極めて複雑に制御されている。MSC の複合的な作用によって、ケロイドの病態がコントロールされる可能性があるとも考えることもできるが、確証はない。ケロイドは慢性の炎症性線維化であるが、その病態にはさまざまな要因が関係しているとされる。人種差や遺伝的素因、機械的な外力による影響、創傷治癒過程など、複合的な要素を含むため、多元的なアプローチが求められるだろう。

さらなる効果を検証するとともに、詳細な作用機序の解明を進め、臨床にどのように応用するかを検討したい。

謝辞

手術検体の取得をはじめ本研究の全てに渡ってご指導，ご協力，ご援助をいただいた北海道大学大学院医学研究科機能再生医学講座形成外科学分野・山本有平教授，古川洋志准教授，小山明彦講師，舟山恵美講師，村尾尚規助教，同教室員の皆様，および北海道大学歯学部歯学研究科・林利彦准教授，北海道大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野・大西俊介准教授，川久保和道助教，帝王切開による卵膜採取にご協力いただいた北海道大学病院産科・山田崇弘特任准教授に深く感謝申し上げます。

(順不同)

引用文献

- 1 Hayashi, T., Nishihira, J., Koyama, Y., Sasaki, S. & Yamamoto, Y. Decreased prostaglandin E2 production by inflammatory cytokine and lower expression of EP2 receptor result in increased collagen synthesis in keloid fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 990-997, (2006).
- 2 Murao, N., Seino, K., Hayashi, T., Ikeda, M., Funayama, E., Furukawa, H., Yamamoto, Y. & Oyama, A. Treg-enriched CD4+ T cells attenuate collagen synthesis in keloid fibroblasts. *Exp. Dermatol.* **23**, 266-271, (2014).
- 3 Lee, T. Y., Chin, G. S., Kim, W. J., Chau, D., Gittes, G. K. & Longaker, M. T. Expression of transforming growth factor beta 1, 2, and 3 proteins in keloids. *Ann. Plast. Surg.* **43**, 179-184, (1999).
- 4 Le Blanc, K. & Mougiakakos, D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 383-396, (2012).
- 5 Spiekman, M., Przybyt, E., Plantinga, J. A., Gibbs, S., van der Lei, B. & Harmsen, M. C. Adipose tissue-derived stromal cells inhibit TGF-beta1-induced differentiation of human dermal fibroblasts and keloid scar-derived fibroblasts in a paracrine fashion. *Plast. Reconstr. Surg.* **134**, 699-712, (2014).
- 6 Ala-Kokko, L., Rintala, A. & Savolainen, E. R. Collagen gene expression in keloids: analysis of collagen metabolism and type I, III, IV, and V procollagen mRNAs in keloid tissue and keloid fibroblast cultures. *J. Invest. Dermatol.* **89**, 238-244, (1987).
- 7 Funayama, E., Chodon, T., Oyama, A. & Sugihara, T. Keratinocytes promote proliferation and inhibit apoptosis of the underlying fibroblasts: an important role in the pathogenesis of keloid. *J. Invest. Dermatol.* **121**, 1326-1331, (2003).
- 8 Chen, X. G., Wang, Z., Liu, W. S. & Park, H. J. The effect of carboxymethyl-chitosan on proliferation and collagen secretion of normal and keloid skin fibroblasts. *Biomaterials.* **23**, 4609-4614, (2002).
- 9 Ong, C. T., Khoo, Y. T., Mukhopadhyay, A., Do, D. V., Lim, I. J., Aalami, O. & Phan, T. T. mTOR as a potential therapeutic target for treatment of keloids and excessive scars. *Exp. Dermatol.* **16**, 394-404, (2007).
- 10 Wang, Z., Gao, Z., Shi, Y., Sun, Y., Lin, Z., Jiang, H., Hou, T., Wang, Q., Yuan, X., Zhu, X., Wu, H. & Jin, Y. Inhibition of Smad3 expression

- decreases collagen synthesis in keloid disease fibroblasts. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* **60**, 1193-1199, (2007).
- 11 Zhang, G. Y., Yi, C. G., Li, X., Ma, B., Li, Z. J., Chen, X. L., Guo, S. Z. & Gao, W. Y. Troglitazone suppresses transforming growth factor-beta1-induced collagen type I expression in keloid fibroblasts. *Br. J. Dermatol.* **160**, 762-770, (2009).
- 12 Ishikane, S., Yamahara, K., Sada, M., Harada, K., Kodama, M., Ishibashi-Ueda, H., Hayakawa, K., Mishima, K., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Kangawa, K. & Ikeda, T. Allogeneic administration of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells attenuates acute myocarditis in rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **49**, 753-761, (2010).
- 13 Tsuda, H., Yamahara, K., Ishikane, S., Otani, K., Nakamura, A., Sawai, K., Ichimaru, N., Sada, M., Taguchi, A., Hosoda, H., Tsuji, M., Kawachi, H., Horio, M., Isaka, Y., Kangawa, K., Takahara, S. & Ikeda, T. Allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells contribute to renal repair in experimental glomerulonephritis. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **299**, F1004-1013, (2010).
- 14 Fang, F., Huang, R. L., Zheng, Y., Liu, M. & Huo, R. Bone marrow derived mesenchymal stem cells inhibit the proliferative and profibrotic phenotype of hypertrophic scar fibroblasts and keloid fibroblasts through paracrine signaling. *J. Dermatol. Sci.* **83**, 95-105, (2016).
- 15 Arno, A. I., Amini-Nik, S., Blit, P. H., Al-Shehab, M., Belo, C., Herer, E., Tien, C. H. & Jeschke, M. G. Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells promote skin wound healing through paracrine signaling. *Stem. Cell. Res. Ther.* **5**, 28, (2014).
- 16 Wynn, T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.* **214**, 199-210, (2008).
- 17 Desmouliere, A., Chaponnier, C. & Gabbiani, G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound. Repair. Regen.* **13**, 7-12, (2005).
- 18 Agarwal, C., Britton, Z. T., Alaseirli, D. A., Li, Y. & Wang, J. H. Healing and normal fibroblasts exhibit differential proliferation, collagen production, alpha-SMA expression, and contraction. *Ann. Biomed. Eng.* **34**, 653-659, (2006).
- 19 Bettinger, D. A., Yager, D. R., Diegelmann, R. F. & Cohen, I. K. The effect of TGF-beta on keloid fibroblast proliferation and collagen synthesis. *Plast.*

- Reconstr. Surg.* **98**, 827-833, (1996).
- 20 Nirodi, C. S., Devalaraja, R., Nanney, L. B., Arrindell, S., Russell, S., Trupin, J. & Richmond, A. Chemokine and chemokine receptor expression in keloid and normal fibroblasts. *Wound. Repair. Regen.* **8**, 371-382, (2000).
- 21 Boyce, D. E., Ciampolini, J., Ruge, F., Murison, M. S. & Harding, K. G. Inflammatory-cell subpopulations in keloid scars. *Br. J. Plast. Surg.* **54**, 511-516, (2001).
- 22 Niessen, F. B., Schalkwijk, J., Vos, H. & Timens, W. Hypertrophic scar formation is associated with an increased number of epidermal Langerhans cells. *J. Pathol.* **202**, 121-129, (2004).
- 23 Iqbal, S. A., Sidgwick, G. P. & Bayat, A. Identification of fibrocytes from mesenchymal stem cells in keloid tissue: a potential source of abnormal fibroblasts in keloid scarring. *Arch. Dermatol. Res.* **304**, 665-671, (2012).
- 24 Mahdavian Delavary, B., van der Veer, W. M., van Egmond, M., Niessen, F. B. & Beelen, R. H. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology.* **216**, 753-762, (2011).