



Title	ケロイドにおける炎症制御機構に関する検討 [全文の要約]
Author(s)	藤田, 宗純
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13025号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/70552
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。; 配架番号 : 2404
Note(URL)	https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
File Information	Munezumi_Fujita_summary.pdf



[Instructions for use](#)

学 位 論 文 (要約)

ケロイドにおける炎症制御機構に関する検討

(Studies on the mechanism for regulating inflammation in keloid)

2018年3月

北 海 道 大 学

藤 田 宗 純

学位論文（要約）

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 藤田 宗純

学位論文題名

ケロイドにおける炎症制御機構に関する検討

(Studies on the mechanism for regulating inflammation in keloid)

【背景と目的】

ケロイドは、炎症後、外傷や手術後、あるいは特別な誘因なく発生し、一定の傾向をもって周囲に浸潤、増大する線維増殖性の慢性炎症性皮膚疾患である。創傷治癒過程における炎症期、増殖期の遷延がケロイドの成因と考えられており、I型コラーゲン産生や Transforming growth factor beta (TGF- β)の亢進のみならず、Interleukin (IL)-1 α 、IL-1 β 、IL-6、腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor ; TNF) α といった炎症性サイトカインの産生が亢進しているが、炎症期が遷延する機序は未だ解明されておらず、有効な治療法は確立されていない。局所における慢性炎症の病態を誘導する分子機構として、IL-6を中心として形成されるケモカインの過剰産生機構、「炎症回路」が報告されている。本分子機構では、角化細胞・線維芽細胞・血管内皮細胞などの非免疫細胞において NF- κ B 経路と STAT3 経路の二つの転写因子が同時に活性化することで、炎症性サイトカイン・ケモカインの発現が相乗的に増加し、局所的な慢性炎症を引き起こす病態が明らかにされた。さらに、ゲノムワイド解析 (Genome-wide association study ; GWAS)にて炎症回路を正に制御する 1200 以上の遺伝子群が同定され、これらの遺伝子の中には、多くのヒト慢性炎症性疾患の関連遺伝子が含まれることが証明された。本研究では、既報において日本人を対象とした GWASにて報告された一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism ; SNP)を含む、ケロイド関連遺伝子・A が、炎症回路の正の制御遺伝子である可能性について、さらにはケロイド内で炎症回路の活性化を引き起こし、ケロイドの慢性炎症および病態形成、「ケロイド体質」に関与している可能性について解明することを目的とした。すなわち、ケロイドの炎症病態形成において炎症回路が重要な役割を担っているという仮説のもと、ケロイド関連遺伝子・Aがどのようにケロイドの炎症病態を制御するかを SNP の関与を含めて明らかにすることを本研究目的とした。

【対象と方法】

同意の得られた患者からケロイド、正常皮膚組織を採取し、各種実験を行った。

- ケロイド、正常皮膚の免疫組織化学染色により STAT3 と NF- κ B の同時活性化が見られる非免疫細胞を同定した。同定した細胞を初代培養し、培養後に各種サイトカインで刺激した後、定量 PCR にて炎症性ケモカイン、サイトカインの mRNA の発現を解析し、炎症回路の活性化の有無を検証した。また、ケロイド患者及び非ケロイド患者の皮膚組織から抽出した核酸を用いて、ケロイド関連遺伝子・A のリスク多型 SNP の有無を確認した。
- ケロイド関連遺伝子・A が炎症回路の正の制御遺伝子としてケロイドの慢性炎症に関与しているか、すなわちケロイド関連遺伝子・A のノックダウンにより炎症回路の活性化が減弱するかを *in vitro* および *in vivo* で検証した(細胞株を用いた RNA 干渉法にて *in vitro* での検証を行い、マウス炎症モデルを用いた関節炎誘導実験で *in vivo* での検証を行った)。また、ケロイド患者由来のケロイド組織、非ケロイド患者由来の正常皮膚組織から初代培養した細胞から抽出した mRNA を用いてケロイド関連遺伝子・A の発現を検証し、ケロイ

ド関連遺伝子・A の SNP の有無と、炎症回路の維持に重要な NF- κ B 経路との関与について解析を行った。

【結果】

1. 免疫組織化学染色の結果、ケロイドでは炎症回路が表皮角化細胞および線維芽細胞に存在すると同定した。ケロイド組織由来の表皮角化細胞および線維芽細胞では、*in vitro* のサイトカイン刺激により炎症回路の活性化が見られた。さらに、ケロイド患者ではリスク多型 SNP を有する割合が顕著に多かったが、非ケロイド患者ではリスク多型 SNP を有する割合は少数であった。両者の初代培養細胞で炎症回路活性を比較すると、SNP を有するケロイドサンプルで炎症回路の活性化がより大きいことが明らかとなった。

2. 細胞株でのケロイド関連遺伝子・A のノックダウンにより炎症性サイトカイン IL-6 の発現が有意に抑制され、ケロイド関連遺伝子・A が非免疫細胞における炎症に関与していることが明らかになった。また、マウスを用いた関節炎誘導実験においてもケロイド関連遺伝子・A に対する shRNA の関節腔内投与により関節炎の発症が抑制された。次に、患者サンプルにおけるケロイド関連遺伝子・A の SNP の有無とケロイド発症との関与について検討した。ケロイド関連遺伝子・A にはタンパク質に翻訳されるいくつかのスプライスバリエント (splice variant ; SV) が存在することがこれまでにわかっているが、各バリエント間での発現や機能の相違については不明であった。SNP の有無により各バリエントの発現に相違があるかをケロイド患者および非ケロイド患者のサンプルで検証した。結果、SNP を有するケロイドサンプルでは、SNP の無い正常皮膚サンプルと比較してケロイド関連遺伝子・A のスプライスバリエント X (SV X) の発現が mRNA レベルで有意に高くなっていた。ケロイド関連遺伝子・A の SV X を認識する抗体を用いた免疫組織化学染色においても、SNP を有するケロイド組織では SNP の無い正常皮膚組織と比較して、ケロイド関連遺伝子・A の SV X がタンパク質レベルにおいても強く発現していることが明らかになった。以上のことから、ケロイド関連遺伝子・A の SNP の有無により、各バリエントへの発現、特に SV X に影響を及ぼしている可能性が考えられた。次に、ケロイド関連遺伝子・A の SV X の NF- κ B 経路における分子機構を解析した。レポーターアッセイにおいてケロイド関連遺伝子・A の SV X を過剰発現させた細胞では NF- κ B 経路の標的遺伝子の発現が亢進したこと、siRNA においてケロイド関連遺伝子・A の SV X をノックダウンした細胞では、炎症性サイトカイン IL-6 の mRNA 発現と TNF α 刺激後におけるタンパク質レベルの p65 ser536 のリン酸化がともに抑制されたことから、ケロイド関連遺伝子・A の SV X が NF- κ B 経路の活性化に関与していることが明らかになった。さらには、ケロイド関連遺伝子・A の SV X は NF- κ B 経路において細胞質内で、TNF α のアダプター分子の活性化に関与することで NF- κ B の活性化に働くと考えられた。

【考察】

ケロイドの慢性炎症が遷延する病態については十分に明らかになっていない。また、臨床現場において、特別な誘因なくケロイドを発症し、多発性、家族性に生じるケロイド患者に遭遇することがあり、「ケロイド体質」と認知されてきたが、ケロイド体質を説明できる詳細な機序は未だ不明である。ケロイド疾患関連遺伝子として遺伝子・A が報告されているが、ケロイド発症や「ケロイド体質」との関与については明らかにされていない。本研究では、ケロイド関連遺伝子・A の SNP を有するケロイドサンプルでは、SNP の無い正常皮膚サンプルと比較して炎症回路の活性化がより強く見られること、ケロイド関連遺伝子・A の SV X の発現がより高くなっていること、さらにはケロイド関連遺伝子・A の SV X によって、NF- κ B が活性化することを明らかにできた。以上のことから、ケロイド関連遺伝子・A の SNP を有することで、ケロイド関連遺伝子・A の SV X の発現が高くなり、炎症回路の活性化につながり、ケロイドの慢性炎症の遷延および「ケロイド体質」の一因

となることが示唆された。今後、ケロイドの慢性炎症の原因のさらなる解明により、ケロイド体質の診断マーカーの開発や創薬化の可能性も期待される。

【結論】

本研究では、ケロイド関連遺伝子・Aの一塩基多型 (SNP)によるスプライスバリエント Xの高発現によって、創傷治癒過程において局所的な慢性炎症の遷延が引き起こされ、ケロイド発症につながる起因が示された。本遺伝子の SNP がスプライスバリエントに与える影響や機能を解析することで、今後のケロイド研究において、ケロイドの診断マーカーとして有用となる可能性や、外科的治療の可否判定の指標や将来における治療標的となる可能性が示唆された。