HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ケロイド線維芽細胞に対する肺線維症治療薬ピルフェニドンの作用とその機序［全文の要約］
Author(s)	池田，正起
Description	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：2071 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11199号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55685
Type	doctoral thesis
File Information	Masaki_Ikeda_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文（要約）

ケロイド線維芽細胞に対する肺線維症治療薬ピルフェニドンの作用とその機序

(The effect and mechanism of pirfenidone in keloid-derived fibroblasts)

2014 年 3 月

北海道大学

池田　正起

【背景】　ケロイドは結合組織の増殖による，境界明瞭な紅色あるいは褐色の隆起として観察される病変で，一般的には外傷などに続発して発生するとされている。しばしば原因となった創部をこえて周囲に拡大することが知られており，治療法としては圧迫，シリコンゲルシート，ステロイド注射といった保存的療法と手術，および術後放射線照射といった外科的治療が行われている。しかしケロイドは再発を来しやすく難治性であり，これらの治療法にも治療効果や副作用の面でそれぞれの限界がある。

ケロイド組織では真皮線維芽細胞の増殖やコラーゲン線維の不規則な増殖がみられ，TGF-βのような線維化に関係するサイトカインの影響なども指摘されている。しかしながら，その発症原因と病態についてはいまだ不明な点が多い。

2006年に世界で初めて日本で発売された特発性肺線維症治療薬ピルフェニドンはコラーゲンの産生抑制や，TNF-a，IL-6といった炎症性サイトカインの産生抑制，線維芽細胞の増殖抑制作用などの様々な作用を通じて抗線維化作用を持つとされている。現在では肺以外にも肝臓や腎臓，眼科領域，皮膚科・形成外科領域においても研究が進められている。

これらのピルフェニドンの作用はケロイドの治療においても有用であるため，ピルフェニドンのケロイド治療への有用性について検討を行った。

【方法】　臨床検体の採取，取扱いについて北海道大学病院自主臨床研究審査委員会に申請し承認（自 011-0330）を得た。同委員会の規定に沿って研究を実施した。ヘルシンキ宣言に基づき，対象となった患者には十分な説明と同意を得た上で検体の採取を行った。

同意の得られた患者から検体を採取し， Explant法を用いて正常皮膚線維芽細胞，ケロイド皮膚線維芽細胞を培養，分離した。正常皮膚線維芽細胞4株（うち1株はLONZA社より購入したセルライン），ケロイド線維芽細胞9株を最終的に使用した。また，全ての細胞は4-7継代のものを使用した。

まずピルフェニドンの線維芽細胞に対する増殖抑制作用の評価を行った。これらの細胞を96 wellプレートを使用し，10% fetal bovine serum（FBS）を添加したDulbecco’s modified Eagle’s medium （DMEM）へ3×10^3ずつ播種した。24時間培養後にピルフェニドンを添加し，さらに24時間後に添加の有無による細胞増殖をMTS Assayによって評価した。MTS Assayでは細胞増殖抑制作用と細胞毒性による細胞数低下が識別できないため，35 mmディッシュで10%FBS＋DMEMを用いて24時間培養した細胞にピルフェニドンを添加し，その24時間後の細胞生存率についてTrypan Blue染色を用いたCell Viablity Assayを用いて測定した。

次にピルフェニドンの線維芽細胞に対するα-SMA，1型コラーゲンのmRNA発現の評価を行った。それぞれの細胞を6wellプレートに入れた10%FBS＋DMEMへ3×10^4ずつ播種し，72時間培養後に24時間のstarvationを行った後に，ピルフェニドン，TGF-β1を添加し96時間培養を行った。この細胞から抽出したtotal RNAからRT-qPCRでα-SMAおよび1型コラーゲンのmRNAの発現の解析を行った。

またRT-qPCRと同じプロトコールで培養を行った線維芽細胞の培養上清を回収し，RIA法でintact P1NP（1型プロコラーゲンN末端テロペプチド）を測定した。

これらと並行して60 mmディッシュを用いて，10%FBS＋DMEMに6×10^4ずつ播種した正常皮膚線維芽細胞，ケロイド皮膚線維芽細胞をRT-qPCRのプロトコールと同様の条件で培養し，ピルフェニドンを作用させた。培養した細胞から抽出したタンパク質を用いてWestern Blot Assayを行い，α-SMAタンパクの発現を評価した。またピルフェニドンの作用機序に関する過去の報告を参考に，150 mmディッシュを用いて，10%FBS＋DMEMに2.5×10^5ずつ播種した細胞を96時間培養し，24時間のstarvationの後にTGF-β1で細胞に刺激を与え，細胞質，核のタンパクを分離して抽出した。得られた細胞質タンパク，および核タンパクからWestern Blot Assayによって核内のリン酸化Smad3発現を評価することによって，TGF-β1添加時のTGF/Smad シグナル伝達に対するピルフェニドンの作用を検討した。

【結果】　MTS AssayおよびCell Viablity Assayの結果からピルフェニドンは正常皮膚線維芽細胞，ケロイド線維芽細胞に対して細胞生存率の有意な低下を起こさずに，有意な細胞増殖抑制作用を示した。RT-qPCR，Western Blotの結果からピルフェニドン添加によりα-SMA発現（mRNA，タンパク）の有意な低下が見られた。RIA法によるintact P1NP測定の結果からTGF-β1添加群と比較しTGF-β1＋ピルフェニドン添加群では有意なintact P1NPの減少が認められた。TGF-β1添加時の核内リン酸化Smad3に関するWestern Blotの結果からTGF-β1投与によってケロイド線維芽細胞の核内におけるリン酸化Smad3の発現が亢進するが，ピルフェニドンによってこれが有意に抑制されることが示された。

【考察】　本研究の結果から正常皮膚線維芽細胞，ケロイド線維芽細胞に対してピルフェニドンの細胞増殖抑制作用が確認され，これは細胞毒性による作用ではないことが示された。過去の報告によると，テノン膜の線維芽細胞に関してピルフェニドンの細胞増殖抑制効果が報告されており，それは細胞周期に対する抑制作用（G1 arrest）であると言及され

ている。

また線維化疾患に深く関連する1型コラーゲンの産生量，そしてα-SMAタンパク発現についてもピルフェニドンは抑制作用を示した。ピルフェニドンがケロイド線維芽細胞におけるα-SMAのmRNA発現を抑制するという報告はすでに存在するが，実際のタンパクレベルでの抑制作用についての報告は本研究が世界初である。

ピルフェニドンの作用機序は未だ解明されていない。我々はケロイドの病態にはTGF-βが関与しているという報告，そしてTGF-βによる刺激が核内へ伝達される経路として知られているTGF/Smad シグナル伝達の存在と，ピルフェニドンが網膜上皮細胞においてこのシグナル伝達を抑制しているという報告を参考に，ケロイド線維芽細胞においてもピルフェニドンが同様の作用をもつと仮説をたてた。本研究の結果からTGF-β1添加による刺激を行ったケロイド線維芽細胞の核内リン酸化Smad3はピルフェニドンによって，その発現が抑制されていることが示された。このことからピルフェニドンはSmad3のリン酸化を抑制している，あるいはリン酸化Smad3の核内移行を抑制しているといった可能性が考えられる。これはピルフェニドンのケロイド線維芽細胞に対する抗線維化作用の一端を証明するものであると考える。

【結論】　ピルフェニドンはケロイド線維芽細胞に対する細胞増殖抑制作用，α-SMA産生抑制作用，1型コラーゲン産生抑制作用を持つ。特にα-SMA，1型コラーゲン産生抑制作用については，ピルフェニドンがリン酸化Smad3の核内発現を抑制することによってTGF/Smadシグナル伝達に関与し，これがα-SMA，1型コラーゲンのmRNAの転写を抑制している可能性が示唆された。