



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 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	佐藤, 千草
Description	配架番号 : 2334
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12812号
Issue Date	2017-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66931
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Chigusa_Sato_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 佐藤 千草

学 位 論 文 題 名

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)

【背景と目的】 ケロイドとは皮膚の創傷治癒過程の異常で生じる、持続的な炎症を伴う線維性疾患であり、痛みや痒みの症状と醜状を呈し、患者に身体的精神的苦痛を生じる。手術治療単独では再発率が高く、放射線治療やステロイド局所療法を併用されるが治療に難渋することが多い。その病態は、真皮線維芽細胞の増殖と過剰なコラーゲンの蓄積を特徴とする。ケロイド由来線維芽細胞（KF）は正常由来線維芽細胞（NF）に対し、TGF(Transforming growth factor)- β を過剰に産生し、また、TGF- β に対する特異な感受性を示しており、その結果として線維芽細胞の高い増殖能と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。ケロイドはヒトに特有な疾患であり、適切な動物モデルが存在しないことから、本研究ではケロイドの病態に深く関与し、その特徴を有するといわれるケロイド由来線維芽細胞を実験に用い、さらにケロイドの病態形成において中心的役割を果たしている重要な因子であるTGF- β で刺激して評価した。

一方、間葉系幹細胞は、目的細胞への分化・増殖のみならず、さまざまな生理活性物質を分泌するため、免疫調整、抗炎症、抗線維化、創傷治癒促進作用を有しており、多くの炎症、線維化疾患への応用が進行している。間葉系幹細胞のもつ抗炎症・抗線維化・創傷治癒促進作用は、ケロイドの病態に対しても抑制的に働く可能性があると考えた。間葉系幹細胞の中でも、分娩時に破棄される胎盤からドナーの侵襲なく大量に得ることができる卵膜由来間葉系幹細胞に注目し、その培養上清のケロイド線維芽細胞に対する抑制効果を検証した。

【対象と方法】 同意の得られた患者から検体を採取し、正常皮膚由来線維芽細胞（NF）、成熟癒痕由来線維芽細胞（MF）、ケロイド由来線維芽細胞（KF）を分離・培養した。同様に、同意の得られた患者から卵膜を採取し、卵膜由来間葉系幹細胞（AMSC）を分離・培養、無血清化後に培養上清を採取して実験に用いた。それぞれの線維芽細胞に卵膜由来間葉系幹細胞培養上清（AMSC-CM）を作用させ、さらにTGF- β 1で刺激した上でその反応を評価した。細胞増殖や各種遺伝子発現、蛍光染色による α -SMAの発現について検証した。AMSC-CM中の有効性のある物質を検証する目的で、分画化したCMも実験に用いた。

各線維芽細胞を培養し、AMSC-CMを作用させた。TGF- β で刺激した線維芽細胞についてもCMを作用させた。細胞増殖についての評価をMTS assay、CCK-8で行った。遺伝子発現は、筋線維芽細胞のマーカーである α -SMAとSM22a、コラーゲンのtype Iとtype III、細胞外マトリックスの蓄積と分解に関与するマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP2）、その抑制因子である組織メタロプロテアーゼ阻害物質（TIMP1）について real time PCR で評価した。また、 α -SMAについて蛍光染色を行い、発現を確認した。

【結果】 AMSC-CMは有意にMFの細胞増殖を促進した一方で、KFの線維芽細胞増殖は抑制する傾向があった。AMSC-CMはKFにおいてTGF- β によって刺激される α SMA、SM22a、collagen Iの遺伝子発現を有意に抑制した。NF、MFにおいては有意な抑制効果を認めなかった。同様の結果を α SMA 蛍光染色でも確認した。分画化したAMSC-CMについては、高分画のAMSC-CMによって、 α SMAに関して有意な抑制効果を認めた。collagenIII、MMP2、TIMP1の遺伝子発現については有意な変化を認めなかった。

【考察】 創傷治癒の過程は一般に炎症期、肉芽形成および再上皮化期、マトリックス形成および再構築期という一連の段階を経て、最終的には正常の平坦な瘢痕を形成して完了する。線維芽細胞はこの過程において、当初は受傷部位で活発な細胞増殖と細胞外基質の産生を行うが、上皮化が進み治癒過程の終盤に向かうと過剰に増殖していた線維芽細胞は消失していく。ケロイドはこのような正常な創傷治癒のメカニズムに何らかの破綻をきたしたことにより、線維芽細胞の増殖と細胞外基質の過剰産生が遷延した状態と考えられている。

AMSC-CMは有意にMFの細胞増殖を促進した一方で、KFの線維芽細胞増殖は抑制する傾向があった。MFに対し細胞増殖を促進した作用は創傷治癒を促進する効果を示していると考えた。KFに対しては増殖抑制する傾向があり、過剰な増殖をコントロールする可能性を示唆した。

α SMA陽性の線維芽細胞である筋線維芽細胞は、組織の収縮と細胞外マトリックスの産生を促進する。本研究ではケロイド由来の線維芽細胞がTGF- β によって活性化され、 α SMAの発現を亢進し、それはAMSC-CMで抑制されることが示された。蛍光染色による α SMA染色によっても、同様の反応を確認できた。AMSC-CMが α SMAの発現を抑制することで、線維芽細胞が筋線維芽細胞の性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予防につながる可能性があると考えられた。

Collagen IについてもKFはAMSC-CMによって発現を抑制されることが示され、病態に効果的に働く可能性が認められた。

線維化に対する治療が困難である理由としては、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や、創傷治癒が複数の細胞や増殖因子等によって極めて複雑に制御されていることなどが考えられる。しかし、本研究ではAMSC-CMは、創傷治癒は促進するが線維化は抑制するという調節的な作用を持つ可能性が示された。

ケロイド形成は外的刺激もその発症に大きく影響することを考えると、さらに別の手法でAMSC-CMのケロイドに対する効果を検証する必要がある。

【結論】 本研究ではAMSC-CMがケロイド線維芽細胞の増殖を抑制する傾向があり、正常瘢痕組織に対しては増殖促進効果があることがわかった。また、TGF- β によって発現が亢進するケロイド線維芽細胞における α SMAの発現を抑制することがわかった。さらに、collagen Iについても、ケロイド線維芽細胞に対し、AMSC-CMが抑制効果を示した。

これらの結果より、AMSC-CMがケロイドに対し抑制的に作用し、新たな治療薬となり得る可能性を有することがわかった。