HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ケロイドにおける炎症制御機構に関する検討［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	藤田, 宗純
Description	配架番号：2404
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13025号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70551
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Munezumi_Fujita_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　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、主に外傷や手術後に生じ、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、IL-1α、IL-1β、IL-6、TNFα 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。本機構では、角化細胞・線維芽細胞などの非免疫細胞において NF-κB 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（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ている。本研究では、既報において日本人における GWAS にて報告された一塩基多型（Single nucleotide polymorphosm ; SNP）を含む、ケロイド関連遺伝子・NEDD4 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。
【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、各種実験に使用した。
１．ケロイド、正常皮膚の免疫組織化学染色により STAT3 と NF-κB 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、NEDD4 のリスク多型 SNP の有無を確認した。
２．NEDD4 のノックダウンにより炎症回路の活性化が減弱するか、細胞株を用いた RNA 干渉法（siRNA 法）にて in vitro で検証し、マウス炎症モデルを用いた関節炎誘導実験で in vivo で検証した。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 NEDD4 に見られるスプライスバリアント（Splice variant ; SV）の発現を検証し、NEDD4 の SNP の有無と各スプライスバリアントへの影響、さらに、炎症回路の維持に重要な NF-κB 経路と NEDD4 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 で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 を有する割合は低かった。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かった。

２．細胞株での NEDD4 全バリアント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 NEDD4 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 NEDD4 全バリアントに対する 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 NEDD4 の SNP の有無とケロイド発症との関与について検討した。NEDD4 にはタンパク質に翻訳される 6 つのスプライスバリアントが存在することがこれまでにわかっているが、各バリアント間での発現や機能の相違については詳細な検討はされていなかった。SNP の有無により各バリア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 NEDD4 スプライスバリアント 3（SV3）の発現が mRNA レベルで有意に高くなっていた。NEDD4 SV3 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、表皮角化細胞で NEDD4 SV3 が強く発現していることがタンパクレベルにおいても明らかになった。NEDD4 の SNP の有無により、各バリアントへの発現、特に SV3 に影響を及ぼしている可能性が考えられた。次に、NEDD4 SV3 の NF-κB 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 NEDD4 SV3 を過剰発現させた細胞では NF-κB 経路の標的遺伝子の発現が亢進したこと、siRNA において NEDD4 SV3 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 TNFα 刺激後におけるタンパクレベルの p65 ser536 のリン酸化がともに抑制されたことから、NEDD4 SV3 が NF-κB 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、NEDD4 SV3 は NF-κB 経路において細胞質内で、TNFα のアダプター分子である RIP の活性化に関与することで NF-κB 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 NEDD4 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、NEDD4 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、NEDD4 SV3 の発現がより高くなっていること、さらには NEDD4 SV3 によって、NF-κB 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 NEDD4 の SNP を有することで、NEDD4 SV3 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 NEDD4 の一塩基多型（SNP）によるスプライスバリアント 3 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 がスプライスバリアントに与える影響および機能の解析により、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の有用性、外科的治療の可否の判定や将来における治療標的となる可能性が示唆された。