

論文審査の結果の要旨

Examination of epithelial mesenchymal transition in keloid tissues and possibility of keloid therapy target 上皮間葉転換とケロイドの関連性およびその治療薬としての可能性の検討

日本医科大学大学院医学研究科 形成再建再生医学分野
研究生 桑原大彰
Plastic and Reconstructive Surgery Global Open

ケロイドは、皮膚の創傷治癒過程の異常で生じる線維増殖性疾患である。真皮網状層に生じ、遷延する炎症や物理的刺激が悪化要因の一つであるという病態が徐々に明らかになりつつある。しかし依然不明な点も多く、特効薬が存在しないため治療に難渋しているのが現状である。動物の皮膚では、長期間にわたって持続する炎症を作成できないため、適切な動物モデルがまだ開発されていないことも研究が困難な理由の一つである。

本研究は、創傷治癒や組織の線維化に関与するとされる上皮間葉転換 (EMT: epithelial mesenchymal transition) がケロイドの発生や増大に関与していることを示唆した世界で初めての報告である。

EMT 関連タンパクとして上皮系マーカーの E-cadherin、間葉系マーカーの Vimentin を選択し、ケロイド組織内の EMT 発現の有無を確認するため、ケロイド組織と正常皮膚を免疫組織化学染色法および免疫蛍光染色法で観察した。またケロイド組織内で炎症が強い辺縁部と、炎症が収束している非発赤部、そしてケロイド周囲の正常皮膚部を使用し、それぞれの検体での EMT 誘導の差を確認するため表皮内における Vimentin 陽性細胞数をカウントし解析した。また正常皮膚から採取した表皮細胞を培養し、トランスフォーミング増殖因子 (TGF- β)、腫瘍壊死因子 (TNF- α) を添加することで EMT が誘導されるか解析を行った。さらに二層細胞共培養システムを用いケロイド組織と正常皮膚から分離培養した線維芽細胞と、ヒト表皮角化細胞株 (HaCaT) とで共培養を行い、HaCaT 層における Vimentin 蛋白の定性・定量分析を行った。その結果、ケロイド組織内では発赤部・非発赤部ともに EMT の発現が認められ、正常皮膚と比べて有意差を認めた。さらに成長因子の負荷実験では表皮細胞の形態に変化を認め間葉系マーカーの発現を認めた。成長因子非添加群では表皮細胞の形態は密な敷石状配列を呈していたのに対し、添加群では疎な紡錘形へと形態変化を認めた。その間葉系マーカー陽性細胞のうちいくつかの細胞は線維芽細胞特異蛋白である FSP-1 とで二重染色を認めていた。このことから炎症性サイトカインを添加した表皮細胞のうちいくらかは線維芽細胞へと形態を変化させたことが示唆された。さらに共培養実験では、ケロイド由来の線維芽細胞と HaCaT の共培養系で有意に Vimentin 蛋白の上昇を認めた。以上よりケロイドにおける EMT の発現が証明された。

第二次審査においては、結果が明瞭でオリジナリティーが高く、臨床に応用できる可能性のある研究という高評価を得た。間葉系細胞に変化した表皮細胞の運命についての質問では、アポトーシスする可能性、また EMT とは逆の

mesenchymal epithelial transition (MET) がおこる可能性がある」と回答された。ケロイド組織における EMT は、原因・過程・結果のどれなのか、という質問に対しては、ケロイドには確立された動物モデルがなく現在は研究段階であるため、そのすべてに関与している可能性があり、今後も研究を継続する必要性が示された。また細胞培養実験について、ケロイド由来の線維芽細胞を培養した場合、継代を重ねるごとにその特性が失われていくことが知られているため解析が難しいものの、本研究では第二継代までの細胞を使用しているため影響は少ないことが述べられた。さらにケロイドにおける人種差にはどのようなメカニズムがあるか、という質問に対しては、メラノサイトの数に比例して皮膚における細胞外基質の量が増加するという論文があるため、メラノサイトが関与している可能性もあるとの回答がなされた。今後の研究の展開についての質問では、上皮間葉転換した上皮細胞をマーキングしてその細胞挙動をトレースする研究の必要性、また EMT に関与する転写因子等の詳細な解析の必要性が議論された。

本研究はケロイドの病態解明に留まらず、臨床的に大変発展性のある研究であることが確認された。以上より、本論文は学位論文として価値あるものと認定した。