

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 池田 正起

学位論文題名

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)

【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が難治性である。ケロイド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- α 、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。

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を検討する。

【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。

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の評価を MTS Assay によって評価した。また 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評価できないため、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 Viability Assay を用いて測定した。

また、それぞれの細胞を6 well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、ピルフェニドンを添加し 96時間培養を行った。この細胞から抽出した 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。

RT-qPCR と同様のプロトコールで培養を行った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に培養した。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- β 1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、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/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 Viability Assay では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 Assay ではピルフェニドン添加により α -SMA 発現の低下が見られた。RIA 法で TGF- β 1 添加群と比較し TGF- β 1+ピルフェニドン添加群では有意な intact PINP の減少が認められた。また、TGF- β 1 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唆された。

【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おいても細胞増殖抑制作用が確認された。過去の報告によると、テノン膜の線維芽細胞におい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、細胞周期に対する作用についても言及されている。

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 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報告は本研究が初である。

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- β 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、その移行が抑制されることが示された。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。

【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 の核内移行を抑制することによって TGF/Smad シグナル伝達に関与している可能性が示唆された。