

榎野祥生 論文内容の要旨

主 論 文

DHMEQ, a novel NF-kappaB inhibitor, suppresses growth and type I collagen accumulation in keloid fibroblasts.

(新規 NF-kappaB 阻害剤である DHMEQ のケロイド由来線維芽細胞に対する効果：
細胞増殖と I 型コラーゲンの蓄積に関する検討)

榎野 祥生、光武 範吏、中島 正洋、ウラジミール A. サエンコ、大津留 晶、梅澤
一夫、田中 克己、平野 明喜、山下 俊一

(Journal of Dermatological Science in press)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：平野明喜教授)

緒 言

ケロイドは正常な創傷治癒過程の異常により引き起こされる皮膚線維芽細胞の増殖と細胞外マトリックスの過剰産生を主体とする疾患である。ケロイドは良性皮膚腫瘍に分類されるにも拘わらず機能的・整容的に問題となる疾患であり、しかも外科的治療単独では再発率が高いためしばしば治療に難渋する。

Nuclear factor- κ B (NF- κ B) は炎症や細胞の増殖、アポトーシス調節に関わる重要な細胞内情報伝達因子及び発現調節因子であるが、近年ケロイドにおいてこの活性異常が報告され、ケロイドの発生と病態に深く関与している可能性がある。そこで、本研究では NF- κ B を特異的に阻害するシグナル伝達阻害剤である Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) を用いて、ケロイド由来線維芽細胞に対する効果を検討した。

対象と方法

細胞はそれぞれ別の 4 個体から得られた正常真皮由来線維芽細胞 (NF) 及びケロイド由来線維芽細胞 (KF) を用い、10% FBS、1% ペニシリン/ストレプトマイシンを含む DMEM 培地で 37°C、5% CO₂ の条件下で細胞を培養した。

まず基礎となる NF- κ B の活性の状態を DNA-binding assay で調べた。これは NF- κ B 結合部位を含むオリゴヌクレオチドで被覆したプレートと培養細胞の核抽出物を反応させ、結合した NF- κ B を抗原抗体反応で検出して吸光度分析を行い、検討した。また、正常皮膚及びケロイドの組織切片を用いて NF- κ B の p65 サブユニットに対する免

疫染色を行い、比較検討した。

次に、DHMEQを含む溶液を種々の濃度で加えて DHMEQ が細胞死を誘導する効果を water-soluble tetrazolium salt based assay (WST) を用いて調べ、これがアポトーシスによるものであることを確かめるために PARP の発現をウエスタンブロット法を用いて解析した。

DHMEQ の細胞増殖抑制効果についても同様に WST を用いて検討を行った。

最後に DHMEQ 投与後の細胞内または培養液中の I 型コラーゲンの量をウエスタンブロット法を用いて解析した。

結 果

DNA-binding assay より KF において NF- κ B は活性化されており、DHMEQ 投与により NF- κ B の p65 サブユニットの核への結合が有意に抑制されることが分かった。免疫染色においてもケロイドで p65 陽性細胞が有意に多く、また、真皮線維芽細胞のみならず表皮の角化細胞まで強く染色されていることが観察された。

DHMEQ は NF と KF とともに濃度依存性に細胞死の増加及びアポトーシスを誘導した。DHMEQ は NF に対して濃度が 15 μ g/ml 以下では細胞死効果を示さなかったが、KF においてはこの濃度以下の DHMEQ 投与 (5 μ g/ml、10 μ g/ml) でもその増殖が有意に抑制された。同様に 5 μ g/ml、10 μ g/ml の濃度の DHMEQ 投与により細胞内及び培地中に分泌された I 型コラーゲンは、KF において有意に減少していた。

考 察

本研究結果よりケロイドにおいて NF- κ B は有意に活性化されており、DHMEQ 投与によりその増殖が抑制され、細胞内及び培地中に分泌された I 型コラーゲンが減少することが明らかとなった。これらの事実から NF- κ B はケロイドの病態形成に深く関与している可能性が示唆された。DHMEQ 投与による NF- κ B の阻害がケロイドの増殖能の抑制に有効であった機序として NF- κ B は細胞周期に関わる蛋白質である Cyclin D1 や D2、また、線維芽細胞の増殖を引き起こす炎症性サイトカインである IL-6 の発現を調節しているため、DHMEQ 投与によりこれらの蛋白質の発現が減少して増殖抑制に至った可能性が考えられた。一方、NF- κ B が I 型コラーゲンの産生に果たす役割については一定の見解が得られていないが、我々の結果からは少なくともケロイドにおいては NF- κ B の活性化は I 型コラーゲンの蓄積に対して促進的に働くことが示された。

以上より NF- κ B がケロイドの病態形成に寄与しており、活性化された NF- κ B 経路を阻害することはケロイド治療に有効な可能性が示された。今後ケロイド治療に対して DHMEQ を含めた NF- κ B 阻害剤の臨床研究への展開が期待される。