

氏 名	李 有姫
(ふ り が な)	(り ゆ う み)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	甲 第 91 号
学 位 審 査 年 月 日	令和 6 年 1 月 31 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
Experimental Study of Warburg Effect in Keloid	
学 位 論 文 題 名	Nodules: Implication for Downregulation of miR-133b (ケロイド小結節におけるワーブルグ効果 : miR133b の脱制御)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 森脇 真一 教授 小野 富三人 教授 佐浦 隆一

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

ケロイドは過剰なコラーゲン形成を特徴とする皮膚の線維増殖性疾患であり、長期間にわたり細胞増殖が維持されることが特徴である。ケロイドの病態は未だ解明されておらず、確実な治療法は確立されていない。

我々はこれまでにケロイドの構成単位である小結節 **nodule** に注目し、**nodule** を中央部 (CZ ; 低酸素領域) と辺縁部 (MZ ; 正常酸素領域) の 2 つのゾーンに分け、それぞれのゾーンの機能的役割を検討してきた。その結果、**nodule** はその数と総面積を増加させることにより、ケロイド本体の継続的な増殖、拡大のためのエネルギー代謝に重要な役割を果たしているのではないかと考えた。

そこで、ケロイドががん細胞と同様にエネルギー獲得にワーブルグ効果を行なっている

か、また、ワールブルグ効果が行われているとすれば、nodule 内の各ゾーンの役割は何か、さらに、そのワールブルグ効果を制御する microRNA はなにか、を明らかにするために、本研究を開始した。

【方法】

大阪医科薬科大学病院にて患者から採取した 11 個のケロイドを用いた。これらのケロイドから無作為に 179 個の nodule を選び、Photoshop®および ImageJ®を用いて免疫組織化学的解析結果から nodule、CZ、MZ に組織を分類し研究を行なった。コントロールとしては他の手術で採取した健常皮膚 6 検体を使用した。

各組織内でワールブルグ効果に関連する解糖系マーカー（HK2、GLUT1）およびオートファジーマーカー（LC3、p62）、解糖系の律速酵素であるピルビン酸キナーゼ M（PKM1/2）および PTBP1 の発現やその変化を調べた。また、PKM、PTBP1 および PTBP1 標的 microRNA（miR-133b と miR-200b、c）はウェスタンブロット法と qRT-PCR 検査により定量を試みた。

【結果】

① Nodule の同定および病理組織学的特徴

- ・採取したケロイドの検体を H&E 染色し、ヒアリンコラーゲン線維を示す小結節 nodule を同定した。Nodule は CZ と CZ よりも内腔の広い直列血管を多く認める MZ から構成されていた。
- ・電子顕微鏡による両ゾーンの線維芽細胞の観察は、CZ ではオートファゴソームを多くもつオートファジーに陥った細胞やクロマチンが凝縮した核を持つアポトーシスに陥った細胞を多く認めた。一方、MZ ではミトコンドリアが発達し酸化的リン酸化が活発であること、また粗面小胞体がよく発達し盛んなタンパク質合成が行われていることがあきらかとなった。

② ケロイドでの解糖系およびオートファジーマーカーの発現評価

免疫組織化学的解析の結果、オートファジーマーカー(LC3 および p62)および解糖系マーカー(HK2 および GLUT1)の発現は、MZ よりも CZ で有意に高かった。

③ 健常皮膚とケロイドでのワールブルグ効果マーカーの発現評価

・健常皮膚とケロイドでのワールブルグ効果マーカー(PKM1、PKM2、PTBP1)のウェスタンブロット解析の結果、ケロイドでの PKM1 の発現レベルは健常皮膚と同様であったが、PKM2 の発現は健常皮膚よりも高かった。一方、PTBP1 の発現は健常皮膚でケロイドよりも有意に高かった。

・免疫組織化学的解析の結果、ケロイドの nodule では、PKM1 の発現より PKM2 の発現が有意に高かった。さらに、PKM2 の発現は MZ よりも CZ で高かった。一方、PKM1 と PTBP1 の発現レベルは CZ よりも MZ で高かった。

・ワールブルグ効果マーカーとビメンチン(線維芽細胞マーカー)との二重免疫蛍光染色を行ったところ、ビメンチン陽性の線維芽細胞にワールブルグ効果マーカーが発現していた。

④ 健常皮膚とケロイドにおける PTBP1 標的 miRNA の発現評価

qRT-PCR 解析の結果、ケロイドでは健常皮膚組織に比べて miR-133b-3p の発現が有意に低下していた。

【考察】

ケロイド内の nodule においてワールブルグ効果が起こっていることが確認された。そして、MZ よりも CZ では解糖系マーカー及びオートファジーマーカーの発現が有意に亢進している所見が得られた。

いくつかの先行研究では PKM2 のアップレギュレーションが、がん細胞でのワールブルグ効果を誘導することが報告されているが、ケロイドでも PKM2 の発現が健常皮膚よりも

高い結果が得られた。

PTBP1 は PKM1 から PKM2 へのスイッチングを触媒し、PTBP1 標的 miRNA である miR-133b-3p は PTBP1 の発現を抑制することが報告されている。ケロイドでは miR-133b-3p の発現が中程度低下しているという今回の結果から、miR-133b-3p のダウンレギュレーションにより PTBP1 が活性化される結果、PKM1 陽性線維芽細胞が PKM2 陽性線維芽細胞に変化してワールブルグ効果が亢進した可能性が考えられた。miR-133b-3p のような PTBP1 標的 miRNA がケロイドの核酸医薬になりうる可能性が示された。

がん細胞ではオートファジーによって生成された乳酸などを再利用する逆ワールブルグ効果が知られている。我々はこれまで、ケロイドの CZ 線維芽細胞では虚血によりオートファジーの亢進およびワールブルグ効果により産生された乳酸が MCT4（乳酸排出トランスポーター）を介して MZ 線維芽細胞へ放出され、MZ 線維芽細胞ではミトコンドリアでの ATP 産生および HIF2a の発現により血管新生が行われている可能性を報告している。

本研究でも電子顕微鏡を用いた観察の結果、CZ ではオートファゴソームを多くもつオートファジーに陥った細胞やクロマチンが凝縮した核を持つアポトーシスに陥った細胞を認め、MZ ではミトコンドリアが発達し酸化的リン酸化が活発であること、また粗面小胞体がよく発達しておりタンパク質合成が顕著である特徴を認めたことから、CZ がワールブルグ効果の中心であり乳酸を MZ に供給している可能性と MZ では miR-133b のダウンレギュレーションによって PTBP1 が活性化され、PKM1 陽性の線維芽細胞が PKM2 陽性の線維芽細胞に変化して CZ に送られている可能性が考えられた。

【結論】

ケロイドの各 nodule においてワールブルグ効果が起こっていることが確認できた。そして、ケロイドの CZ、MZ がワールブルグ効果で異なる役割を果たしていることを示した。さらに、miR-133b-3p がケロイドにおいてワールブルグ効果を制御する可能が示され、miR-133b-3p が今後のケロイド治療のための核酸医薬の候補のひとつとなりうる可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

がん細胞の特異的代謝機構として、好気下でも解糖系を用いて ATP を産生するワールブルグ効果が知られている。がん細胞では PTBP1 標的 microRNA がダウンレギュレーションされることでワールブルグ効果の律速酵素である PKM2 の発現を誘導する PTBP1 が活性化され、PKM2 の発現が亢進することに伴い、ワールブルグ効果も亢進すると報告されている。そこで、申請者らはケロイドが増殖を長期間維持するためのエネルギー獲得にケロイドの小結節 **nodule** が主となりワールブルグ効果が起こっているとの仮説を立て、ケロイドがワールブルグ効果を獲得している機序を確認するために本研究を計画した。

患者のケロイド標本を用い、免疫組織化学的解析やウェスタンブロット、qRT-PCR 解析を行ったところ、ケロイドでは健常皮膚よりも PKM2 の発現が高く、さらにケロイド内の各 **nodule** (中央部 (CZ ; 低酸素領域)、辺縁部 (MZ ; 正常酸素領域)) では PKM2 が PKM1 より有意に高いこと、さらに、PKM2 の発現は MZ よりも CZ で高く、特に CZ でワールブルグ効果が起こっていることが明らかになった。また、両ゾーンにおける線維芽細胞の形態的特徴の差から MZ と CZ がワールブルグ効果において異なる役割を果たしていることを考察した。さらに、皮膚と比較してケロイドでは PTBP1 を標的とする miRNA である miR-133b-3p の有意なダウンレギュレーションがみられたことは、miR-133b-3p が PKM2 の発現調整機構を介してワールブルグ効果を制御する重要な因子である可能性を示した。

本研究の結果は、ケロイドの **nodule** でワールブルグ効果が観察されること、その機序から miR-133b-3p が糖代謝経路を標的とした新たなケロイド治療薬となる可能性があることを明らかにした。現在、ケロイドに対する有効な治療薬はないことから、創薬の面からも本研究結果は非常に重要な知見であると考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 13 条第 1 項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

