

氏 名	奥野 涼子
(ふりがな)	(おくの りょうこ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙 第 1195 号
学位審査年月日	令和2年1月29日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	Upregulation of autophagy and glycolysis markers in keloid hypoxic-zone fibroblasts: Morphological characteristics and implications (ケロイドにおける低酸素領域線維芽細胞のオートファジーと解糖系マーカーの発現増加—形態学的考察—)
論文審査委員	(主) 教授 森脇 真一 教授 廣瀬 善信 教授 高井 真司

学位論文内容の要旨

《背景》

オートファジーは、正常環境下において損傷した器官を自己消化することでエネルギーを再利用し、細胞内恒常性を保つという重要な役割を果たしている。低酸素、酸化ストレス、ミトコンドリア機能不全や炎症性サイトカインなどのストレスにさらされるとオートファジーが亢進し、恒常性の維持のため傷害されたミトコンドリアやタンパク質をアデニン三リン酸(ATP)生合成に再利用することで、アポトーシスに抵抗性を示す。近年、固形癌では、低酸素と酸化ストレスが、間質の線維芽細胞のオートファジーと乳酸の蓄積を亢進させ、乳酸の exporter である monocarboxylate transporter 4 (MCT4)の発現が亢進した間質の線維芽細胞において、過剰に生産された乳酸が importer である

monocarboxylate transporter 1 (MCT1) を発現している隣接した癌細胞に輸送され、癌細胞の増殖を促進しているという reverse Warburg effect が報告されている。

申請者らのグループはこれまでに、ケロイド組織では ATP が長期に渡り高値を示していること、ケロイドの中心部では血管が低密度で平坦化しており低酸素状態であることなどを報告してきた。また、血管内皮細胞のマーカーである CD31 と hypoxia inducible factor 1 α (HIF1 α) の発現に基づいて、ケロイドの中心部は低酸素であり、辺縁部は正常酸素環境である可能性を報告した。

上記以外にもケロイド線維芽細胞では、低酸素により HIF1 α が誘導され、乳酸生成が増加し、主に解糖系を通して ATP を産生している(Warburg effect) 点が癌細胞と類似しているとの報告や、中心部のケロイド線維芽細胞は、Fas 誘導性アポトーシスに抵抗性であり、一方、周辺部のケロイド線維芽細胞は、増殖能および I 型と III 型コラーゲンの産生が亢進しているという報告がある。しかしながら、それらのケロイド発生における関与のメカニズムについてはまだ分かっていない。また、ケロイドの病態におけるオートファジーの関与についての報告はまだない。そこで、申請者らはケロイド組織が数個の結節より形成されていることに着目して、免疫染色と二重標識免疫蛍光法により、オートファジー蛋白 [microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) と pancathepsin]、解糖系エフェクター [lactate dehydrogenase (LDH)] およびその関連転写因子である HIF1 α 、HIF2 α の発現とケロイド結節における局在について検討した。

《対 象》

2007 年 1 月から 2014 年 12 月までの間に大阪医科大学附属病院形成外科にてケロイドと臨床診断を受けて切除された症例のうち、放射線治療歴がなく、病理専門医により病理組織学的にケロイドと診断を受けた 10 標本について解析を行った。

《方 法》

ヘマトキシリン・エオジン（H.E）染色と抗 CD31 抗体による免疫染色にて、結節の中心部は、硝子化した太い膠原線維が渦巻き状に沈着し血管の少ない部分、辺縁部はその周囲の血管が豊富に取り巻いている部分と定義した。

抗 LC3 抗体、抗 pancathepsin 抗体、抗 CD31 抗体、抗 LDH 抗体、抗 MCT1 抗体、抗 MCT4 抗体、抗 HIF1 α 抗体、抗 HIF2 α 抗体を用いて免疫染色を行った。また、抗 vimentin 抗体を線維芽細胞のマーカーとして、これらの抗体との二重標識免疫蛍光法を行い、線維芽細胞における発現を確認した。

10 個のケロイド組織標本からランダムに 35 カ所の結節を抽出し中心部と周辺部に分け、免疫組織化学染色の量的評価は ImageJ を用いて解析を行った。

《結 果》

結節の中心部では辺縁部に比べ CD31 の発現が有意に少なく、血管が少ないことが示された。

LC3 は結節中心部の線維芽細胞に強く発現しており、リソソームのマーカーである pancathepsin との共局在を認めたことから、結節中心部の線維芽細胞ではオートファジーが亢進していることが示唆された。

LDH は、周辺部に比べ結節中心部の線維芽細胞で有意に高く発現しており、乳酸の蓄積が高いことが推測された。MCT1 の発現は、結節中心部・辺縁部ともに散在して認められたが、MCT4 は結節中心部の線維芽細胞で多く発現しており、中心部への乳酸の流出および蓄積に矛盾しない結果が得られた。

HIF1 α は、周辺部より結節中心部の線維芽細胞の核内でより多く発現し、一方、HIF2 α は周辺部で発現が亢進しており、線維芽細胞と血管内皮細胞に認められた。

《考 察》

本研究で、結節中心部の線維芽細胞で低酸素によりオートファジーが誘導され、MCT4 陽性の線維芽細胞は乳酸シャトルを通して MCT1 を発現した周辺部の線維芽細胞に乳酸を

供給している可能性が示唆された。この知見は、受け取った線維芽細胞は解糖系により ATP を生成し、アポトーシスに抵抗性を示して、線維芽細胞の増殖と過剰なコラーゲンの生成が促進される結果、ケロイドの増殖を促しているとの仮説に合致すると考えられる。このことは、固形癌で癌細胞が生き残るために起こっている reverse Warburg effect と同様であると推測された。

《結 論》

ケロイドの病態形成には、オートファジー亢進によるアポトーシス抵抗性および reverse Warburg effect が重要である可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

ケロイドは線維芽細胞が長期間にわたり異常に増殖する良性の皮膚疾患である。中心部では血管が扁平化しており、高度の虚血状態に陥っているにもかかわらず、長期に渡り ATP が高い状態であること、辺縁部では血管密度が高く、血管新生が活発化していることが報告されている。近年、解糖系により ATP を産生する癌細胞との類似性も注目されている。本研究では、ケロイドにおける ATP 産生過程に注目し、ケロイドにおけるオートファジーと解糖系の関与について病理組織学的に検討した。ケロイドが数個の結節から形成されていることに着目し、結節の中心部と辺縁部における LC3、pancathepsin、CD31、LDH、MCT1、MCT4、HIF1 α 、HIF2 α の発現の局在について比較検討した。

病理解析の結果、結節中心部の線維芽細胞において HIF1 α の発現が増強しており、オートファジーと解糖系マーカーの発現も亢進していることが示唆された。すなわち、血管が少なく低酸素環境下の中心部の線維芽細胞では、オートファジーが誘導され、アポトーシスに抵抗性を示し、MCT4 により乳酸シャトルを通して乳酸を MCT1 陽性の他の線維芽細胞に供給するとの仮説に合致する結果と考えられた。供給された乳酸は解糖系により ATP を生成し、線維芽細胞の生存、増殖と過剰なコラーゲン沈着が促進される結果、長期間にわたるケロイド結節の維持と拡大に寄与する可能性が示唆された。

病態に不明な点が多く根治的治療法がないケロイドであるが、本研究の成果はケロイドの増殖にオートファジーと解糖系が関与している可能性を示したものであり、今後のケロイドの病態解明、新規治療法の開発に少なからず貢献する知見であると考えられる。

以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 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)

Histology and histopathology 33(10): 1075-1087, 2018 Oct

doi: 10.14670/HH-18-005