

論文内容の要旨

論文題目 扁平母斑における、表皮角化細胞および真皮線維芽細胞の
メラノサイトに対するパラクリン作用の解析

氏名 岡崎 睦

扁平母斑 (Nevus spilus) は、母斑細胞の増殖のない、褐色調の皮膚面より隆起しない色素斑とされ、その治療法としては、皮膚剥削術、ドライアイスの圧抵法、化学的表皮剥離法 (chemical peeling)、レーザー治療などが行われている。しかし、経過観察中に色素斑の再発を認める症例が多く、形成外科的な切除術も行われているが、線状痕が残るなどの欠点もあり、有効な治療法がないのが現状である。有効な治療法の開発には、扁平母斑における色素沈着のメカニズムの解明が必要であると考えられるが、扁平母斑の病理学的・組織学的研究報告は意外に少なく、その病因に関しても仮説の域を出ていない。

一方で、皮膚の色素沈着に影響を与えるホルモン以外の因子について、表皮角化細胞由来の ET-1、GM-CSF、IL1- α 、真皮線維芽細胞由来の HGF、SCF、bFGF がメラノサイトの増殖・分化に大きな影響を与えていることが近年わかってきた。本研究では、整容的な面から形成外科を受診する機会が比較的多い、単発性扁平母斑と Recklinghausen 病に伴う多発性扁平母斑を研究対象とし、色素沈着の原因を、表皮角化

細胞や真皮線維芽細胞からのパラクリン作用によるメラノサイトへの持続的な刺激に帰する仮説を立て、扁平母斑における過剰色素沈着のメカニズムの解明を試みた。

単発性扁平母斑、Recklinghausen 病に伴う多発性扁平母斑はいずれも先天性で、単なる削皮術治療が無効あることから、その異常は局所の細胞が生来から固有に持っており、細胞分裂や老化に関係なく持続する性質のものである可能性が高いと考えた。そのため、生体内の諸細胞間相互作用を排した培養細胞を用いる系を実験に用いた。培養表皮角化細胞と真皮線維芽細胞を用いて、まず ELISA 法によってタンパクレベルでのサイトカイン分泌の解析を行った。ELISA 法によって得られた結果に対して、さらに半定量的 Reverse transcription-polymerase chain reaction 法 (RT-PCR 法) を用いて、mRNA 発現レベルでのサイトカイン分泌の解析を行った。後半では、メラノサイト、表皮角化細胞、真皮線維芽細胞を用いた皮膚三次元培養法を樹立して、表皮角化細胞、真皮線維芽細胞の由来を変えた扁平母斑皮膚モデルを作成して色素沈着量を調べた。

実験の対象は、単発性扁平母斑(以下単発群) 9 例と Recklinghausen 病に伴う多発性扁平母斑例 (以下レック群) 5 例で、東大病院形成外科において、患者の希望により切除術を行った皮膚を検体とした。単発性扁平母斑皮膚 9 検体より、表皮角化細胞 8 例、真皮線維芽細胞 8 例を、Recklinghausen 病に伴う扁平母斑皮膚 5 検体より、表皮角化細胞、真皮線維芽細胞ともに 5 例を初代培養することができた。コントロール (以下正常群) としては、形成外科の手術中に余剰となった正常皮膚のうち、頭部皮膚、陰部皮膚、手掌・足底部皮膚などの特殊な部位の皮膚を除いた任意の検体より、表皮角化細胞 16 例、真皮線維芽細胞 19 例を採取した。それとは別に、Recklinghausen 病患者の非扁平母斑部の正常と考えられる皮膚より、真皮線維芽細胞 5 例を採取した。

Recklinghausen 病に伴う多発性扁平母斑では、病変局所由来の真皮線維芽細胞が、正常皮膚由来の真皮線維芽細胞に比べて、高いレベルの HGF、SCF を分泌する性質を持ち、この HGF、SCF によるメラノサイトへの持続的刺戟が過剰色素沈着の原因である可能性が示唆された。Recklinghausen 病に伴う多発性扁平母斑では、病変部皮膚でのメラノサイトの数が増加しているがチロシナーゼ活性は正常であるとされてきたが、HGF、SCF はメラノサイトに対して主に細胞増殖を刺激することがわかっており、本実験の結果と一致するものと考えられた。Recklinghausen 病患者の非扁平母斑部皮膚由来の線維芽細胞による、サイトカイン分泌量を調べた結果、扁平母斑部と同様に高い

レベルの HGF、SCF を分泌する 1 症例と、正常人と同レベルの HGF と正常人よりやや高いレベルの SCF の分泌パターンを示す 4 症例に分かれた。これは Recklinghausen 病の表現型の違いによるものと考えられた。また、Recklinghausen 病の皮膚神経線維腫では、正常人皮膚に比べて肥満細胞が増加しているとの報告があり、高いレベルの SCF 分泌と関連している可能性があると考えられた。また、HGF は組織・臓器の線維化を抑制する作用があるが、Recklinghausen 病の患者の手術瘢痕は肥厚性にはなりにくいことが臨床的に知られており、真皮が高いレベルの HGF を分泌していることと関連がある可能性が考えられた。

近年、Recklinghausen 病の原因となる遺伝子(Nf1 遺伝子)が第 17 染色体の長腕 17q11.2 に座位し、腫瘍抑制遺伝子の一つとして作用していることが解明された。この遺伝子が code する neurofibromin は、癌遺伝子の Ras を、活性型の Ras-GTP から不活性型の Ras-GDP に変換することによって、Ras 活性を負に制御する作用を有している。Recklinghausen 病では、Nf1 遺伝子の変異により Ras の不活性化が行われにくいために、神経線維腫やメラノサイトの増殖（扁平母斑）その他の増殖性疾患が引き起こされるとされている。サイトカインと neurofibromin との相互作用に関しては、培養メラノサイトを用いた実験で、培地に SCF を加えることによりメラノサイトにおける neurofibromin の産生量が増加したとされる報告がある。また培養線維芽細胞を用いた実験では、PDGF(Platelet-derived Growth Factor)、TGF- β (Transforming Growth Factor- β) の添加によって、線維芽細胞における neurofibromin の発現が増加したとする報告がある。この報告の中ではさらに、正常真皮と瘢痕部における neurofibromin の産生を比較し、瘢痕部で増大していることを示し、neurofibromin が創傷治癒に関連している可能性を述べている。しかし、neurofibromin が線維芽細胞のサイトカイン分泌に対して、どのような作用を有しているかに関する報告は現在のところなく、本研究により示された、扁平母斑部由来の真皮線維芽細胞による HGF、SCF の分泌増加が、Recklinghausen 病の病態の中で neurofibromin とどのような関連性をもっているかは今後の研究課題である。

正常な個体に発生する単発性扁平母斑では、病変局所由来の表皮角化細胞が正常皮膚由来の表皮角化細胞に比べて高いレベルの ET-1 を分泌する性格を持ち、この ET-1 によるメラノサイトへの持続的刺激が過剰色素沈着の原因である可能性が示唆された。

また、この ET-1 の高い分泌量は、継代を重ねた細胞においても、ある程度維持されることが分かった。このことは、削皮術などにより扁平母斑部の表皮を除去しても、扁平母斑局所に存在する表皮角化細胞が分裂増殖し上皮化する限り、色素沈着は再発してくることを意味すると考えられ、われわれが臨床で経験する所見に一致していると考えられた。単発性扁平母斑は、病変部においてメラノサイトの数は正常で、チロシナーゼ活性が上昇しているとされているが、ET-1 は、HGF、SCF に比較して、強いメラニン産生刺激作用を持つことがわかっており、本実験の結果と一致するものと考えられた。単発性扁平母斑では、表皮角化細胞からの IL1- α の分泌も亢進していることが分かった。IL1- α は色素沈着における作用以外にも、主に first mediator として多様な生物学的活性を示し、急性期炎症反応、免疫反応・造血反応の調節などに関与しているため、病変局所で何らかの病的反応が持続している可能性もあると考えられ、今後の研究が必要であると考えられた。

表皮角化細胞、メラノサイト、真皮線維芽細胞を用いた皮膚三次元培養モデルを樹立し、表皮角化細胞と真皮線維芽細胞の由来を変えて、色素沈着量の違いを調べた。Recklinghausen 病の扁平母斑由来の線維芽細胞を用いたモデルは、正常皮膚由来の線維芽細胞を用いたモデルに比べて有意に色素沈着量が多かった。一方、表皮角化細胞の由来を単発扁平母斑皮膚由来と正常皮膚由来に分けて行った実験では、色素沈着量の明らかな違いは認められなかった。この理由としては、コラーゲンゲル中で培養されている線維芽細胞は、真皮中のように増殖せず定常化した状態であるのに比較して、ゲル上に播種された表皮角化細胞は、削皮術を行った直後のように盛んに分裂している未分化な状態に近いことが一つの原因である可能性が考えられる。また、単発群由来の表皮角化細胞では、メラノサイトの増殖因子である ET-1 が多量に分泌されているほかに、抑制因子とされる IL1- α も多く分泌されており、これらの増殖・抑制機構が皮膚三次元培養内で複雑に関与しているものと考えられた。

本研究は、扁平母斑皮膚の過剰な色素沈着についてメラノサイト自身の異常を否定するものではないが、扁平母斑をはじめとした皮膚色素沈着症の治療法や、Recklinghausen 病の病態解明に対して一つの方向性を示すものであると考えられる。