

氏 名 (本籍) 伊 佐 治 正 幸

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 薬 第 359 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 7 年 3 月 8 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 目 炎 症 性 肉 芽 組 織 形 成 に か か わ る 内 因 性 因 子 の 探 索 と
薬 物 制 御 に 関 す る 研 究

(主 査)
論 文 審 査 委 員 教 授 大 内 和 雄 教 授 佐 藤 進
教 授 鈴 木 康 男

論文内容要旨

炎症反応は生体防衛反応の発現であり、本来、生体にとって合目的な反応である。炎症反応は一連の反応であって、炎症初期においては滲出反応に続いて白血球の浸潤反応が起こり、炎症後期には肉芽組織が増殖し、損傷された組織は通常は修復される。しかし起炎刺激が持続したり、炎症部位に浸潤した細胞が起炎刺激に対して過剰に反応したりすると炎症反応は終結しないで、いわゆる慢性炎症へ移行する。慢性炎症の場合は、炎症局所における症状は増悪・寛解を繰り返し治癒の方向に進まず、増殖性反応が過剰に発現する結果として必要以上の肉芽組織が形成されてしまうことが多い。肉芽組織が過剰に形成されると、多量の collagen 線維が蓄積し、さらに肉芽組織が収縮することにより組織構築の異常が起こり、肥厚性はん痕やケロイドが形成される。

本研究は、肉芽組織形成の機構解明及び薬物制御を目的とし、[1] 肉芽組織形成を伴う再燃型の炎症モデルの確立、[2] 肉芽組織形成に重要な役割を果たしている線維芽細胞の機能を調節する内因性因子の検索、及び [3] 肉芽組織の収縮に関与するとされる筋線維芽細胞への線維芽細胞からの変換を調節する内因性因子の検索を行った。また、肉芽組織中の線維芽細胞及び筋線維芽細胞による collagen 線維の産生は、マクロファージ、リンパ球、血小板、肥満細胞などから遊離する chemical mediator により調節されていることが示唆されているので、[4] 炎症組織における collagen 産生を薬物により制御する試みとして、抗原刺激による肥満細胞の脱顆粒反応を抑制し chemical mediator の産生遊離を抑制する作用のある tranilast の作用について *in vivo* 及び *in vitro* で検討し、tranilast の肥厚性はん痕やケロイドへの適用の可能性について検討した。

第1章では、起炎刺激を反復することにより炎症反応が増強される条件を検討し、肉芽組織形成を伴う再燃型の炎症モデルを確立した。起炎剤として sodium carboxymethylcellulose (CMC-Na) を用い、ラットの背部に作成した空気嚢内に CMC-Na 溶液を注入することにより急性炎症を誘発させ、種々の時間経過後に炎症部位 (CMC-Na 嚢) に再び CMC-Na 溶液を注入し、炎症反応の再燃の程度について検討した。CMC-Na 溶液を空気嚢内に注入すると、空気嚢内液の貯留は認められず、注入した CMC-Na 溶液は時間経過と共に急速に減少し、注入後3日目ではほとんど吸収されてしまい、炎症反応は鎮静化した状態になる。炎症反応が鎮静化した3日目の CMC-Na 嚢に再び CMC-Na 溶液を注入すると、鎮静化していた炎症反応が顕著に再燃されることを見出し、CMC-Na 溶液を再注入して著しい炎症反応が惹起されるためには1回目の CMC-Na 溶液を注入することにより、炎症部位の構成細胞が質的に変化していることが必要であることを示した。炎症反応が鎮静化している3日目の CMC-Na 嚢表層に形成された肉芽組織の組織学的な観察では、マクロファージ等の炎症性細胞が存在し、線維芽細胞及び毛細血管の新生も認められた。したがって、CMC-Na 溶液を再注入することによって炎症反応が増強した原因としては、はじめの CMC-Na 刺激により (a) 空気嚢周辺細胞を含む炎症局所の構成細胞の chemical mediator に対する反応性が高くなったこと、(b) 種々の chemical mediator により炎症性細胞が活性化されていること、(c) 新生毛細血管の増生が始まっていること、(d) chemical mediator に対する新

生毛細血管の反応性が高くなっていること、などが関与していることが示唆された。

第2章では、炎症反応が再燃されるための条件をさらに明確にするため、空気嚢と CMC-Na 嚢の組織学的相違点に着目し、種々の起炎物質を空気嚢内あるいは CMC-Na 嚢内に注入することによって誘発される炎症反応の違いについて解析した。起炎物質として炎症性細胞を活性化させる lipopolysaccharide (LPS) 溶液を注入した場合でもメチル化牛血清アルブミン (m-BSA) で感作したラットの嚢内に抗原 (m-BSA) 溶液を注入した場合でも、CMC-Na 嚢内に起炎刺激をした方が空気嚢内に起炎刺激をした場合よりも顕著な炎症反応が誘発されることを明らかにした。空気嚢とは異なり、CMC-Na 嚢では嚢内の表層に肉芽組織が形成され、マクロファージ等の炎症性細胞が存在し、毛細血管の新生が観察されている。この両嚢における組織学的な相違点と LPS や免疫刺激に対する反応性を考え合わせると、CMC-Na 嚢でみられた炎症反応の増強には、浸潤したマクロファージ等の炎症性細胞や新生毛細血管の内皮細胞などが関与していることを示唆した。

第3章では、第2章で確立した m-BSA で感作したラットに CMC-Na 嚢を作成し、その嚢内に抗原溶液を注入することによって誘発される再燃型炎症モデルにおいて、肉芽組織中に存在する線維芽細胞の機能及び形態を調節する内因性因子が炎症滲出液中に存在することを明らかにした。すなわちこの因子には線維芽細胞の増殖及び collagen 合成を促進する活性のみならず、線維芽細胞の形態を変化させる活性があることを見いだした。免疫機序により誘発させた炎症組織から採取した滲出液の存在下で種々の組織由来の線維芽細胞を培養すると、線維芽細胞の形態は変化したが、同時に採取した血清あるいは CMC-Na による炎症由来の滲出液ではこのような変化を起こすことが出来なかった。したがって、免疫機序により誘発させた炎症の滲出液中に存在するこの活性は、浸潤した炎症性細胞や肉芽組織から遊離した因子によるものと考えられる。光学顕微鏡、走査型及び透過型電子顕微鏡による観察により、この形態変化した線維芽細胞の形態学的特徴は、形態学的に定義されている筋線維芽細胞の特徴的所見に極めて一致していることを明らかにした。筋線維芽細胞は線維芽細胞に比べて collagen 合成能が高く、細胞中には細胞の収縮に関与するマイクロフィラメント束が発達しており、肉芽組織の増殖に伴って出現し、創傷治癒の終了時には消失することが報告されている。したがって、免疫機序により誘発される炎症局所に存在する内因性因子が線維芽細胞の増殖、collagen 合成、及び筋線維芽細胞の増殖を調節し、肉芽組織の増殖、線維化及び収縮を調節している可能性が示唆された。

第4章では、抗アレルギー薬である tranilast の肉芽形成に対する作用について、カラゲニン空気嚢型炎症モデルを用いて検討した。Tranilast は、抗原刺激による肥満細胞の脱顆粒反応抑制作用及び受動皮膚アナフィラキシー反応抑制作用を有し、気管支喘息、アレルギー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎及びアレルギー性結膜炎に使用されている。Tranilast の *in vivo* での抗炎症効果及び *in vitro* での線維芽細胞の増殖及び collagen 合成に対する作用を検討した結果、カラゲニン空気嚢型炎症モデルにおいて、tranilast は肉芽組織中の noncollagen protein 及び DNA 含量には影響を与えずに collagen の蓄積のみを抑制し、その作用はカラゲニンによる起炎刺激後2日以内に発現することを示した。また、collagen 合成の律速酵素であるプロリン水酸化酵素の肉芽組織中の活性は tranilast 投与により低下したことから、tranilast

による collagen 蓄積の抑制は collagen 合成系の抑制に起因すると考えられた。線維芽細胞の培養系において、tranilast は線維芽細胞の collagen 合成に対して特異的な抑制作用は示さず、増殖に対して強い抑制作用を示した。したがって、tranilast は炎症刺激後数日以内で起こる線維芽細胞の増殖を抑制し、炎症組織中の collagen 蓄積を抑制したものと考えられた。

第 5 章では、第 2 章で確立した m-BSA 誘発再燃型炎症に対する tranilast の効果及び第 3 章で見いだした m-BSA 誘発再燃型炎症の滲出液中に存在する内因性因子の *in vitro* における作用発現に対する tranilast の作用について検討した。Tranilast はカラゲニン空気嚢型炎症の場合と同様に、m-BSA 誘発再燃型炎症における肉芽組織中の collagen 蓄積も抑制することが明らかになった。また、2-mercaptopropionyl glycine (2-MPG) によるモルモットの過敏性皮膚反応モデルにおいて、抗原刺激 24 時間後の遅延型皮膚反応を tranilast は抑制しないことを明らかにした。したがって、m-BSA 誘発炎症の肉芽組織中の collagen 蓄積が tranilast 投与によって抑制されたことは、tranilast が免疫反応に影響を及ぼしたためではなく、肉芽組織中の線維芽細胞の機能に対して tranilast が直接的に作用した結果と考えられる。また、tranilast にはこの炎症モデルから採取した滲出液による線維芽細胞の形態変化及び増殖を直接抑制する作用があることを明らかにした。さらに、tranilast には線維芽細胞の collagen 合成には影響を及ぼさずに細胞周期を G₀/G₁ 期で停止させる作用があることも判明した。滲出液の添加により形態変化した線維芽細胞は筋線維芽細胞に類似しており、肉芽組織の収縮に関与していることを第 3 章で示した。実際、肉芽組織の収縮の *in vitro* 実験系と考えられている collagen ゲル収縮を免疫機序により誘発した炎症組織から採取した滲出液が促進し、この滲出液による collagen ゲル収縮を tranilast は抑制した。また、第 3 章で見いだした m-BSA 誘発再燃型炎症の滲出液中に存在する線維芽細胞の筋線維芽細胞への形質変換因子について検討を加え、この因子は TGF- β とは異なる因子であることを示した。

本研究を通じて、慢性炎症に見られる炎症反応の増強及び遷延化には炎症局所の構成細胞の質的变化が重要な要因になっていることが示唆され、さらに、再燃型炎症滲出液中には肉芽形成に関与する線維芽細胞の増殖及び collagen 合成を調節する因子、さらには肉芽組織の収縮に関与する筋線維芽細胞への線維芽細胞からの変換を促進する因子が存在することを明らかにした。また、抗アレルギー薬の tranilast には、肉芽組織形成に付随する collagen の過剰蓄積、肉芽組織の収縮、線維芽細胞や筋線維芽細胞の増殖を抑制する作用があることを明らかにし、tranilast は線維化や拘縮などによる組織構築の異常を伴う肥厚性はん痕やケロイドに対して有用であることを示唆した。

審査結果の要旨

肉芽組織の形成を伴う炎症反応が過剰に発現すると、肉芽組織中には collagen 線維が過剰に蓄積し、肉芽組織が収縮して組織構築の異常が起こり、肥厚性はん痕やケロイドが形成される。本研究は、肉芽組織形成の機構解明及び薬物制御を目的とし、肉芽組織形成を伴う異物性及び免疫機序による再燃型の炎症モデルを確立し、線維芽細胞の機能及び形態を調節する内因性因子の探索を行った。さらに、肉芽組織形成に対する抗アレルギー薬 tranilast の作用を解析し、tranilast の肥厚性はん痕やケロイドへの適用の可能性について考察したものである。

ラットの背部皮下に作成した空気嚢内に起炎剤として sodium carboxymethylcellulose (CMC-Na) 溶液を注入することにより急性炎症を誘発させ、炎症反応が鎮静化した 3 日目の CMC-Na 嚢内に再び CMC-Na 溶液を注入して炎症反応を誘発させる再燃型炎症モデル、炎症性細胞を活性化させる lipopolysaccharide 溶液を CMC-Na 嚢内に注入して誘発する再燃型炎症モデル、及びメチル化牛血清アルブミンで感作したラットの CMC-Na 嚢内に抗原溶液を注入して免疫機序による炎症反応を誘発させる再燃型炎症モデルをそれぞれ確立し、炎症反応の増強及び遷延化には炎症局所を構成している細胞が質的に変化していることが重要であることを示した。

また、免疫機序により誘発した再燃型炎症モデルの滲出液中には、線維芽細胞の増殖、線維芽細胞による collagen 合成、及び線維芽細胞から筋線維芽細胞への変換を促進する因子が存在することを見いだした。

さらに、肉芽組織形成を薬物により制御する試みとして、抗アレルギー薬である tranilast の肉芽組織形成に対する作用を解析し、その結果、カラゲニン空気嚢型炎症モデル及び免疫機序により誘発した再燃型炎症モデルにおいて、tranilast は肉芽組織中の collagen の蓄積を抑制する作用があることを明らかにした。その作用機序として、tranilast は線維芽細胞の細胞周期を G_0/G_1 期で停止させて線維芽細胞の増殖を抑制すること、及び線維芽細胞が筋線維芽細胞へ変換する過程を抑制するためであることを明らかにし、これによって、tranilast は肉芽組織の線維化及び収縮を抑制することを示した。

本研究により、炎症反応の増強及び遷延化を解析するための再燃型炎症モデルが確立され、このモデルを活用することによって炎症反応の増強及び遷延化に関与する要因が明らかにされた。さらに、再燃型炎症滲出液中には線維芽細胞の機能及び形態を調節する内因性因子が存在することが明らかにされ、肉芽組織の形成、線維化及び肉芽組織の収縮機構について新たな視点からの解明が行われた。

また、抗アレルギー薬の tranilast には、肉芽組織形成に付随する collagen 線維の過剰蓄積、肉芽組織の収縮、及び線維芽細胞や筋線維芽細胞の増殖を抑制する作用があることが明らかにされ、従来薬物治療が困難であった肥厚性はん痕やケロイドに対して tranilast が新しい治療薬になり得ることが示された。

以上の研究成果により、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。