

論 文 要 旨

氏 名	林 琳
-----	-----

論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと)

Histamine inhibits differentiation of skin fibroblasts into myofibroblasts (ヒスタミンは皮膚線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を阻害する)

論文要旨

研究の目的: 強皮症は、血管病変と皮膚線維化を主病態とする難治性自己免疫疾患である。皮膚線維化には、T 細胞、樹状細胞、マクロファージ、肥満細胞などの免疫担当細胞が関与する。肥満細胞は、ヒスタミンや TGF- β 1 などの分泌を介して、炎症および線維化の両者に重要な役割を果たす。皮膚線維化の病変部では、線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化偏向が観察されるが、肥満細胞がどのような役割を担うのか不詳であった。本研究では、TGF- β 1 刺激で誘導される線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化モデル系を用いて、線維化進展におけるヒスタミンの役割および皮膚線維化の治療標的としての可能性を解明することを目的とした。

方法: TGF- β 1 を含む培地でヒト皮膚線維芽細胞を培養する際、ピークルおよびヒスタミンで刺激し、24 時間後、 α SMA の発現量を qPCR 法と WB 法により測定した。皮膚線維芽細胞における H1R、H2R、H4R の発現を qPCR 法で解析した。さらに、各ヒスタミン受容体に対する阻害剤を投与し、24 時間後の α SMA 量を qPCR 法と WB 法により解析した。また、H1R に対する siRNA を導入後、同様に α SMA 量を qPCR 法で定量した。細胞内シグナルを明らかにするため、ヒスタミン存在下および非存在下で培養した皮膚線維芽細胞を TGF- β 1 で 5 分間刺激後、TGF- β 1 シグナルの活性化マーカーである Smad2/3 のリン酸化を WB 法で検討した。

結果: (1) TGF- β 1 刺激後、線維芽細胞での α SMA 遺伝子の発現が経時的に誘導された。他の間葉系細胞マーカーである I 型コラーゲン、フィブロネクチン、N-カドヘリンについても同様に経時的な発現誘導が観察された。

Snail に関しては、6 時間をピークに 24 時間まで高発現が維持された。(2) TGF- β 1 で誘導される α SMA の mRNA およびタンパク質レベルでの発現はヒスタミンの添加により容量依存性に抑制された。しかし、ロイコトリエン C4 では TGF- β 1 誘導性 α SMA 発現は抑制されなかった。(3) 皮膚線維芽細胞において H1R は mRNA とタンパク質レベルで著明に発現していた。しかし、H2R と H4R に関し mRNA がわずかに検出されたものの、タンパク質として検出されなかった。(4) H1R 阻害剤(H1RA)投与により、ヒスタミンによる TGF- β 1 誘導性 α SMA の mRNA およびタンパク質発現の抑制は解除された。しかし、H2RA、H4RA ではこのような効果はみられなかった。

さらに、siRNA 法によりヒスタミン-H1R のタンパク質発現を抑制すると、TGF- β 1 誘導性 α SMA 発現がコントロールではヒスタミン刺激により抑制されるのに対し、*H1R* ノックダウンでは抑制されなかった。(5) 一方、TGF- β 1 で刺激すると、線維芽細胞での H1R の発現は 24 時間後に mRNA レベルで、48 時間後にタンパク質レベルで劇的に低下した。(6) 皮膚線維芽細胞における TGF- β 1 刺激 5 分後で、Smad2 の総タンパク質量は変わらないが、リン酸化が誘導された。さらに、ヒスタミン刺激により、Smad2 のリン酸化は抑制された。一方、TGF- β 1 刺激により、Smad3 リン酸化が誘導されるものの、ヒスタミン刺激してもリン酸化は変化しなかった。

考察: 以上、肥満細胞から分泌される TGF- β 1 は皮膚線維芽細胞に作用して、 α SMA と I 型コラーゲンの発現誘導、細胞外基質の蓄積、筋線維芽細胞への分化を誘導し皮膚線維化を促進する一方、同じく肥満細胞から分泌されるヒスタミンは皮膚線維芽細胞に発現する H1R に作用して、Smad2 リン酸化を抑制することで TGF- β 1 で誘導される皮膚線維化を強力に抑制した。すなわち、肥満細胞から分泌されるヒスタミンが TGF- β 1 シグナルを阻害することによって、皮膚線維化の発症を制御、または遅延させる可能性が示唆された。一方、TGF- β 1 による慢性刺激は、皮膚線維芽細胞での H1R の発現を低下させ、ヒスタミンによる皮膚線維化の抑制機構を破綻させることが示された。これまで、皮膚線維化の初期では、肥満細胞は病変に局在しているが、慢性期には消失するとの報告もあり、今回の結果は、肥満細胞からのヒスタミンと TGF- β 1 のバランスが皮膚線維化の病態の抑制および促進の双方に重要であることを示し、皮膚線維化の治療標的としての可能性が示唆された。

結論: 肥満細胞から分泌されるヒスタミンは、皮膚線維芽細胞に発現する H1R を介して、TGF- β 1 で誘導される Smad2 シグナルを阻害し、筋線維芽細胞への分化と細胞外基質の蓄積を抑制することで皮膚線維化を遅延させることが示唆された。

学位論文審査結果要旨

氏 名	Lin Lin (林 琳)				
論文審査委員	主査 所属	生体適応系	生体機構部門	岩井 佳子	
	副査 所属	生体適応系	機能調節部門	柳原 延章	
	副査 所属	障害機構系	災害医学部門	中村 元信	
		系	部門		
		系	部門		

論文題目

Histamine inhibits differentiation of skin fibroblasts into myofibroblasts.

ヒスタミンは皮膚線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を阻害する

学位論文審査結果要旨

<目的>全身性強皮症は、皮膚や内臓諸臓器が硬化する原因不明の自己免疫疾患である。皮膚の線維化には T 細胞、樹状細胞、肥満細胞などの免疫担当細胞や TGF-β1などのサイトカインが関与するが、肥満細胞から分泌されるヒスタミンの皮膚線維化における役割については知られていない。そこで本研究では、線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化モデルを用いて、線維化進展におけるヒスタミンの作用について解析を行った。

<方法> (1)ヒト皮膚線維芽細胞におけるヒスタミン受容体の発現を real-time PCR および Western blot により解析した。(2)ヒト皮膚線維芽細胞を TGF-β1 で 24 時間刺激すると筋線維芽細胞へ分化する。この分化モデルを用いて、ヒスタミンの存在下および非存在下で、筋線維芽細胞マーカー (α-smooth muscle actin (αSMA), type I collagen) の発現を real-time PCR または Western blot により解析した。(3)筋線維芽細胞分化におけるヒスタミン受容体の役割を調べるために、ヒスタミン受容体阻害剤および siRNA の存在下で、(1)と同様の実験を行い、αSMA の発現を real-time PCR または Western blot により解析した。(4) TGF-β1 シグナルにおけるヒスタミンの効果を調べるため、ヒスタミン存在下および非存在下で培養した皮膚線維芽細胞を TGF-β1 で刺激し、Smad2/3 のリン酸化を Western blot により解析した。

<結果> (1)ヒスタミン受容体には 4 種類のサブタイプ(H₁R, H₂R, H₃R, H₄R)が存在するが、皮膚線維芽細胞においては H₁R が mRNA とタンパク質レベルで高発現していた。(2) TGF-β1 で誘導される αSMA および type I collagen の発現はヒスタミンの添加により抑制された。(3) H₁R 阻害剤および H₁R siRNA により、ヒスタミンによる αSMA の発現抑制は解除された。(4) TGF-β1 刺激による Smad2リン酸化は、ヒスタミン添加により抑制された。

<考察>以上の結果から、肥満細胞から分泌されるヒスタミンは、皮膚線維芽細胞に発現する H₁R を介して TGF-β1 で誘導される Smad2 シグナルを阻害し、筋線維芽細胞への分化を抑制することで皮膚線維化の進展を抑制することが示唆された。本研究はこれまで知られていなかったヒスタミンによる皮膚線維化抑制のメカニズムを明らかにしたもので、本学の学位論文として適格であると判断した。

平成 27 年 9 月 // 日