

ヒト正常皮膚および瘢痕組織由来線維芽細胞におけるコラーゲンゲル収縮

姫路 完

外科的治療時に得られた種々の瘢痕組織と正常皮膚を用いて、ゲル収縮実験と蛋白質パターン解析を行った。ゲル収縮実験はI型コラーゲン溶液を用いたコラーゲンゲル培養法により、蛋白質パターンは2次元電気泳動法を用いた。

同一症例から得られた瘢痕組織と正常皮膚からそれぞれの線維芽細胞を遊出させて実験を行った。コラーゲンゲル収縮実験では、今回実験した10症例すべてで正常皮膚由来の線維芽細胞より瘢痕由来のものの方が早期より収縮を始め、またその程度も大きかった。2次元電気泳動では、pI 5.4, 43kDのspotが瘢痕組織由来線維芽細胞で優位に存在していた。(平成6年10月29日採用)

Collagen Gel Contraction by Human Fibroblasts Isolated from Normal Skin and Scar Tissue

Tamotsu Himeji

Using collagen gel contraction and two-dimensional electrophoresis, we investigated human dermis fibroblasts in various scar tissues and normal skin from the same case. In collagen gel contraction, the fibroblasts of scar tissue began contraction on earlier period than of normal dermis on all occasion. Two-dimensional electrophoresis showed increase of a spot of pI 5.4, 43 kD in scar tissue fibroblasts.

(Accepted on October 29, 1994) *Kawasaki Igakkaishi* 20(4): 277-283, 1994

Key Words ① Fibroblast ② Scar tissue ③ Collagen gel contraction

はじめに

創傷治癒過程に生ずる収縮は、損傷部の修復にとって不可欠なものである。ヒト真皮の大部分を占める線維芽細胞が創の収縮に関して重要な役割を担っていると考えられている。線維芽細胞をコラーゲンのゲルの中で培養すると、細胞がコラーゲン線維を引き寄せ真皮様組織を再構築する。その現象が創収縮に似ているためコ

ラーゲンゲル培養を用いることで創収縮を生体外で観察できる。受傷後早期に出現する肉芽組織の線維芽細胞を使用したコラーゲンゲル培養や他の個体の正常皮膚由来線維芽細胞との比較実験の報告は若干あるが、経過の長い瘢痕と同一症例の正常皮膚を比較した報告はない。

日常の診療で切除対象となる瘢痕は、受傷後6カ月以上経過している場合が多い。そこで比較的経過の長い瘢痕を用い、同症例の正常皮膚を対象として、各々の組織に由来した線維芽細

胞を遊出させコラーゲンゲル収縮実験と2次元電気泳動による蛋白質パターンの比較実験を行った。

方法と試料

1. 細胞培養法

使用した組織は、同一症例より切除された癍痕と正常皮膚で、これを一組として10症例を比較検討した (Table 1)。癍痕の性状、部位等は様々で、癍痕組織は採取した部分の中央部を正常皮膚は癍痕から最も離れた部分を検体とした。初代培養は Explant 法で行い、各々の組織より癍痕由来線維芽細胞 (scar fibroblasts: SF) と正常皮膚由来線維芽細胞 (normal fibroblasts: NF) を遊出させ実験に用いた。培養液は抗生物質 (penicillin, streptomycin) を加えた Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, 極東製薬) に10%胎児牛血清 (FBS) を混合させ使用した。培養は37°C, 5% CO₂ 培養器中で行い、加齢の影響を最小限とするため、すべての実験を通し継代数4~12の細胞を用いた。なお、細胞の形態観察は位相差顕微鏡で行った。

2. コラーゲンゲル培養

コラーゲンゲルの培養液はDMEM液を用い、0.5%コラーゲン溶液 (I型セルゲン: 高研) とFBSを最終濃度がそれぞれ0.1%, 10%となるように調製した (Table 2)。プレートは12穴疎水性 (テルモ: 直径24mm) を使用し、細胞数 (2×10^5 cells/ml) の浮遊液1mlをwellに播種した。37°C培養器内でゲル培養を維持し、well

は各細胞につき2個ずつ作成した。コラーゲンゲル内の細胞を位相差顕微鏡で観察した。なお、Table 2にはFBS(-)の時の組成も付け加えた。

3. コラーゲンゲル収縮の測定

線維芽細胞を含んだコラーゲンゲルはほぼ円形のまま収縮していくので、直交する2カ所で直径を計測し、その平均をもってゲルの直径とした。また、測定はコラーゲンゲル内での細胞増殖の影響を少なくするため、48時間以内に経時的に行った。

4. 2次元電気泳動法による蛋白質パターンの比較

24穴組織培養用プレートを用いて、NF・SFとも 10×10^4 cells/well に DMEM+10% FBS (500 μ l) を加えた混合液を播種した。44時間、37°Cでインキュベートした後、各々のwellに³⁵S-メチオニンを 2.3×10^6 Bq/0.5 ml となるように調製し4時間ラベリングをした。培養液は Methionine(-)DMEM+10%透析FBSを用いた。培養液を除いた後、Lysis Buffer (9.8 M Urea, 2% (W/v) NP-40, 2% Ampholyte (pH 7-9), 100 mM DTT) を加え細胞を溶解し試料とした。2次元電気泳動はO'Farrellの方法¹⁾に準じて行った。

・1次元目の電気泳動

マイクロディスク等電点電気泳動 (6.8%アクリルアミド: A. A.)

・2次元目の電気泳動 (SDS-PAGE)

upper gel: 4.5% A. A.

lower gel: 12% A. A.

スラブゲルを乾燥させた後、X線フィルムに

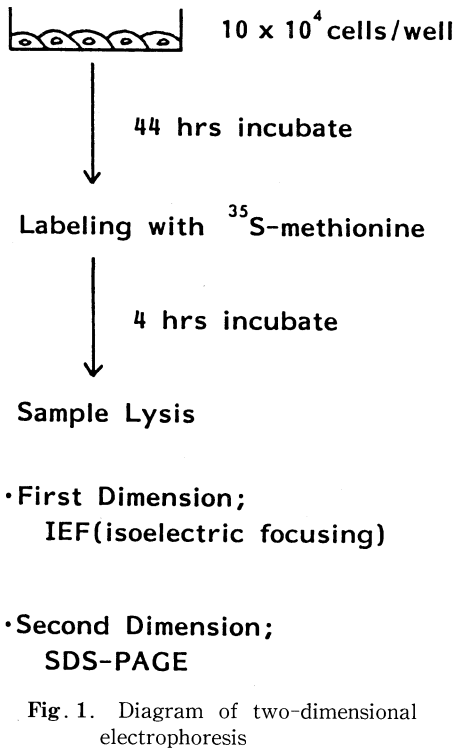
Table 1. Cases of scar tissue

Case	Age. Sex	Scar	Place	Cause	Passage
1	12 y F	Hypertrophic	Abdomen	Operation	3 y 8 m
2	19 y F	Hypertrophic	Thigh	Trauma	2 y
3	11 y F	Hypertrophic	Chest	Op.	1 y 6 m
4	8 y M	Hypertrophic	Knee	Trauma	10 m
5	20 y F	Hypertrophic	Neck	Trauma	7 m
6	15 y F	Mature	Upp. Arm	Burn	10 m
7	17 y F	Mature	Forearm	Op.	2 y 8 m
8	35 y F	Keloid	Abdomen	Trauma	5 y
9	13 y F	Hypertrophic	Abdomen	Op.	2 y
10	13 y F	Hypertrophic	Elbow	Trauma	1 y

Passage: period from injury to scar revision

Table 2. Preparation of collagen gel culture

Cells	2×10^5	2×10^6
FBS	100 μ l	(-)
4 \times concentrated DMEM	225 μ l	250 μ l
0.5% (M/V) type I collagen solution	200 μ l	200 μ l
Water (DDW)	475 μ l	550 μ l
Total	1000 μ l	1000 μ l



exposeした。なお、蛋白質スポットはBio Image (MILLIPORE) で画像解析した (Fig. 1)。

結 果

1. 単層培養下での細胞形態

単層培養下の線維芽細胞を位相差顕微鏡で観察したところ、confluent な形態で正常皮膚由来線維芽細胞 (NF) と癩痕由来線維芽細胞 (SF) で相違のあるものが1症例あった (Fig. 2)。NFが単層で均一なものに対し、SFでは細胞密度の疎な部分と密な部分が混在していた。他の9症例においては両者の間に形態的な差は認められなかった。

2. コラーゲンゲル収縮実験および細胞形態

受傷から癩痕切除までの期間が約10年という経過の長い検体を含めて10症例すべてにおいてNFに比べてSFの方が早期より収縮を開始し、また収縮の程度も大きかった。代表的な2症例の収縮グラスを Figure 3 に示す。

コラーゲンゲル内の細胞形態を2時間後と24時間後に位相差顕微鏡で観察したところ、SFの方が早期より突起を出しコラーゲン線維と接着していた (Fig. 4)。

また、一度コラーゲンゲル培養を行い、その2週間後に収縮きったゲルから再び Explant 法にて細胞を遊出させゲル収縮実験を行ったが、

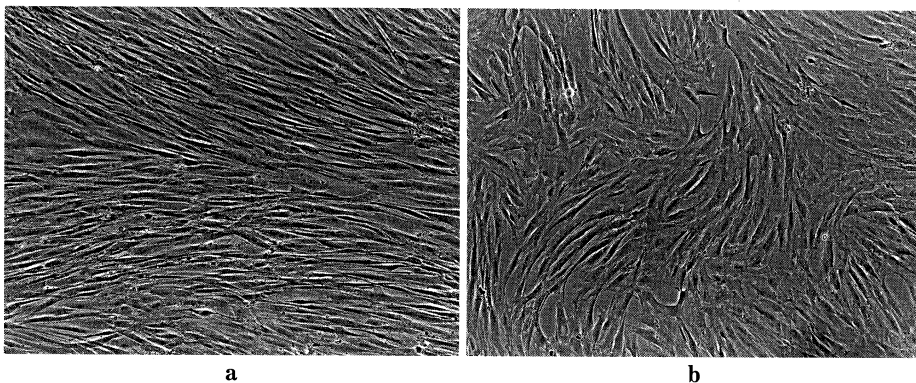
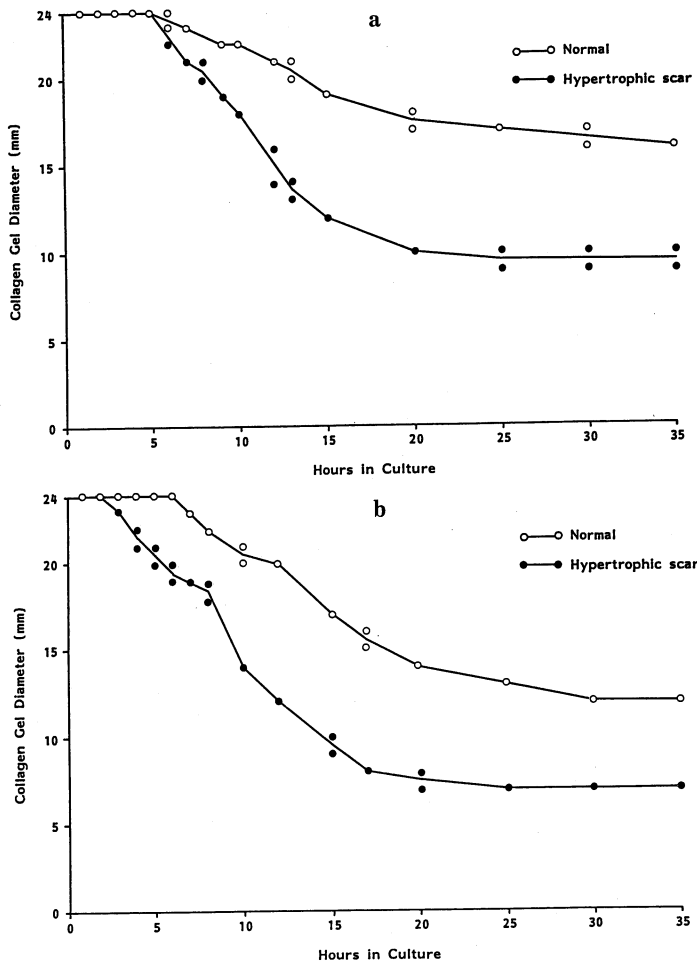


Fig. 2. Monolayer culture of case 5
a. normal dermis fibroblasts

b. hypertrophic scar fibroblasts



その収縮度はNF・SFともに初回のものと同程度であった。

3. 2次元電気泳動法による蛋白質パターンの比較

case 2～4で2次元電気泳動を行った。その結果、NFに比較してSFでpI 5.4, 43 kD付近のspotが優位であった。代表例をFigure 5に示す。またBio Imageの吸光度による定量を行ったところ、両者の α -アクチン量で補正すると、SFで約2.6～2.8倍多く存在していた。

Fig. 3. Collagen gel contraction by fibroblasts of normal skin and scar
 a. case 2 (P=6)
 b. case 3 (P=8)

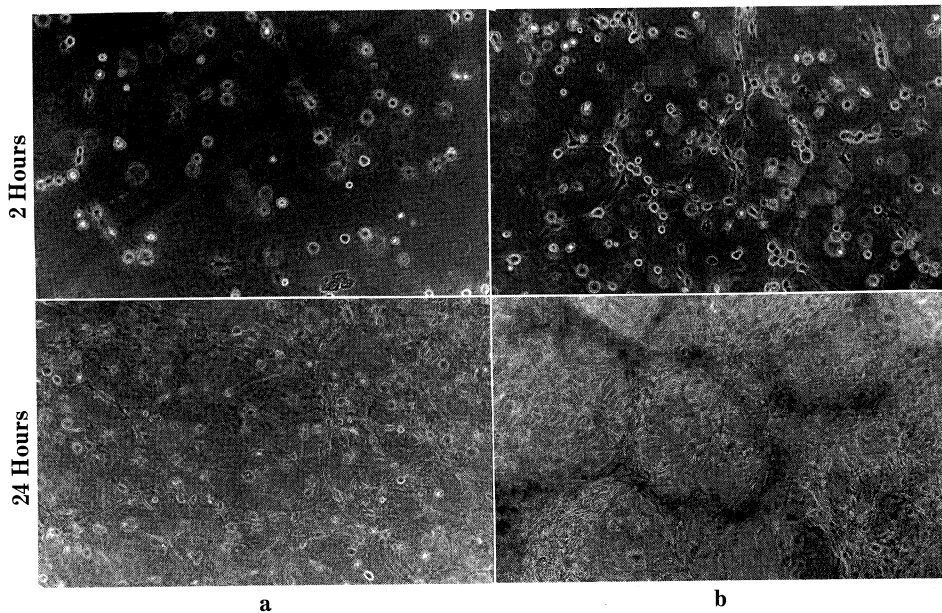


Fig. 4. Collagen gel contraction of case 3
 a. normal dermis fibroblasts
 b. hypertrophic scar fibroblasts

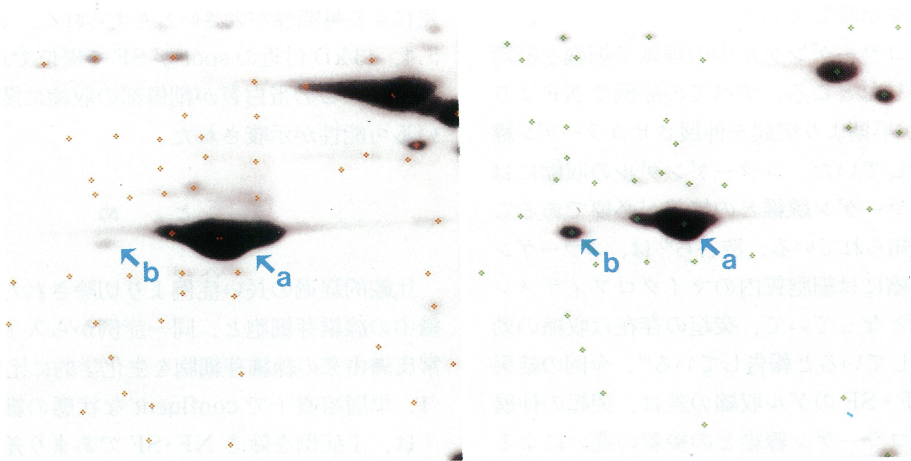


Fig. 5. Two-dimensional electrophoresis of case 3
 left: fibroblasts of normal skin right: fibroblasts of hypertrophic scar
 a. actin b. spot of pI 5.4, 43 kD

考 察

癩痕組織の成因については旧来より多くの組織学的、生化学的検討がなされてきたが、その機序は十分に解明されたとは言い難い。一方、皮膚が損傷を受けた修復される過程において、創周囲の軟部組織の移動、すなわち創収縮が重要な位置を占めていることは確かである。その収縮には線維芽細胞が力源となっている可能性が高い。また創傷治癒過程の早期に出現する肉芽組織中には筋線維芽細胞が多く存在²⁾、強い収縮力を有するという説もある。この線維芽細胞の収縮が癩痕拘縮につながり、また癩痕形成にも影響を与えている可能性が高い。Bellらは、コラーゲンの三次元格子の中で線維芽細胞を培養³⁾すると、細胞はコラーゲン線維を引き寄せ再構築する⁴⁾と報告した。この細胞を含むゲルの構造が真皮に似ていて培養人工真皮となる^{5),6)}。また、線維芽細胞によるコラーゲンゲルの再構成の過程における収縮⁴⁾という現象は、生体の創傷治癒過程における収縮現象の生体外モデルとして有用である。馬場⁷⁾は、ラットの口蓋粘膜の正常皮膚と癩痕由来の線維芽細胞を用いてコラーゲンゲル収縮実験を行い、癩痕由来の線維芽細胞の方がやや強い収縮力を示したと発表した。

今回の実験結果より、臨床的には非活動期にあると思われる比較的経過の長い癩痕中に存在する線維芽細胞 (SF) でも、コラーゲンゲルを強く収縮する性質が残存していることが判った。そしてゲル収縮の違いは、細胞自体の収縮力の差よりも I 型コラーゲン線維に対する接着能の差による影響が大きいと考えられる。

1. 単層培養下の細胞形態

Vande Berg ら⁸⁾は、癩痕組織由来の線維芽細胞を単層培養下で観察し、hills and valley 様の形態を示したと発表している。今回行った10症例中で彼らの所見と一致したものは1例のみで、他の症例では NF・SF の間で違いはなかった。今回実験で用いた癩痕組織が比較的経過の長いものであったことが影響しているのではないかと考えられる。

2. コラーゲンゲル収縮能および細胞形態

線維芽細胞を用いたコラーゲンゲル収縮実験を10症例で行った。その結果、すべての症例で癩痕組織由来線維芽細胞の方が早期より収縮を開始し、その程度も大きかった。その後も収縮実験を継続すると、ゲル培養開始後約2週間で NF・SF とも同程度の大きさまで収縮した。本実験では I 型コラーゲンのみのゲルを用いているので、収縮の違いは細胞自体の差によると考えられ、この細胞が創の収縮に大きく関与して

いることを示唆している。

また、コラーゲンゲル中の線維芽細胞を経時的に観察したところ、すべての症例でNFよりSFの方が早期より突起を伸展させコラーゲン線維と接着していた。コラーゲンゲルの収縮には細胞とコラーゲン線維との接着が必要であることは広く知られている。渋谷ら⁹⁾は、コラーゲンゲルの収縮には細胞質内のマイクロフィラメントが主役となっていて、突起の存在は収縮の効率に関与していると報告している⁹⁾。今回の結果より、NF・SFのゲル収縮の差は、突起の伸展すなわちコラーゲン線維との接着の違いによる影響が主体となっていると思われる。

3. 2次元電気泳動による蛋白質パターンの比較

3症例についてO'Farrellの方法¹⁾に準じて、³⁵S-メチオニンを用いて蛋白質パターンを比較検討した。その結果r-アクチンに比較的近いpI 5.4, 43 kD付近のspotがSFで優位に認められた。また吸光度によるコンピュータ画像解析によりNFに比べてSFで約2.6~2.8倍多く存在していた。現時点ではこの蛋白質の詳細は不明であるが、ゲル収縮に何らかの関係を持っている可能性が示唆された。

以上のことより、日常の臨床でよく切除の対象となる癩痕組織中の線維芽細胞を用いても、*in vitro*でのコラーゲンゲル収縮実験が可能であると言える。そしてゲル収縮の違いは、線維芽細胞のコラーゲン線維に対する認識能・接着能の

差による可能性が大きいと考えられる。また、pI 5.4, 43 kD付近のspotがSFで優位であったことより、この蛋白質が創傷部の収縮に関与している可能性が示唆された。

ま と め

比較的経過の長い症例より切除された癩痕組織中の線維芽細胞と、同一症例から入手した正常皮膚由来の線維芽細胞を生化学的に比較した。

1. 単層培養下でconfluentな状態の細胞形態は、1症例を除きNF・SFであまり差が認められなかった。
2. コラーゲンゲル収縮実験では、NFに比べてSFの方が、早期より突起を出し収縮の開始も早かった。
3. 2次元電気泳動による蛋白質パターンの比較で、pI 5.4, 43 kD付近のspotがNFに比べてSFで約2.6~2.8倍多く存在していた。

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜りました川崎医科大学形成外科 森口隆彦教授、広島大学理学部生物科学科 吉里勝利教授、小関宜雅先生に深謝いたします。

本研究は川崎医科大学プロジェクト研究(4-806)の援助によって行われたものである。

なお本論文の主旨は、第2回日本形成外科学会基礎学術集会(1993年10月、於仙台)にて発表した。

文 献

- 1) O'farrell PZ: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250: 4007-4021, 1975
- 2) Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR, Majno G: Granulation tissue as a contractile organ. *J Exp Med* 135: 719-734, 1972
- 3) Elsdale T, Bard J: Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol* 54: 626-637, 1972
- 4) Bell E, Ivarsson B, Merrill C: Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 1274-1278, 1979
- 5) Kao W W-Y, Prockop DJ: Proline analogue removes fibroblasts from cultured mixed cell populations. *Nature* 266: 63, 1977
- 6) Lapiere CM, Nussgens B, Pierard GE: Interaction between collagen type I and type III in condition-

ing bundle organization. *Conn Tissue Res* 5:21, 1977

- 7) 馬場祥行：ラット口蓋粘膜瘢痕組織由来筋線維芽細胞に関する生化学的検討. *口病誌* 55:599-614, 1988
- 8) Vande Berg JS, Rudolph R, Woodward M: Comparative growth dynamics and morphology between cultured myofibrablasts from granulating wounds and dermal fibroblasts. *Am J Pathol* 114:187-200, 1984
- 9) 渋谷純一, 庄司 祐：レクチンおよび細胞骨格蛋白重合阻害剤による細胞のコラーゲン収縮能への影響. *Conn Tissue* 24:53-63, 1992