

## 癭痕組織由来線維芽細胞のフィブロネクチン量とコラーゲンゲル収縮の抑制

姫路 完, 森口 隆彦, 奥本 和生, 浜崎多美子, 佐原慶一郎, 千葉 容子, 大槻 真澄, 吉里 勝利\*

同一症例より入手した癭痕由来線維芽細胞 (SF) と正常皮膚由来線維芽細胞 (NF) を検体として, ELISA 法を用い単層培養下の細胞とその培養上清についてフィブロネクチンの定量比較を行った。その結果, NF・SF でフィブロネクチン量に差はなかった。

降圧剤である Minoxidil をコラーゲンゲルに加えることで, SF のゲル収縮を抑制した。そして同一症例の NF のゲル収縮を対照とした場合, NF と同等の収縮に抑制するためには, SF に 100~200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の Minoxidil を加えるのが適当であった。 (平成 6 年 10 月 29 日採用)

### Quantitative Analysis of Fibronectin and its Suppressive Effect on Collagen Gel Contraction, Using Scar Tissue-derived Fibroblasts

Tamotsu Himeji, Takahiko Moriguchi, Kazuo Okumoto, Tamiko Hamasaki, Keiichiro Sahara, Yoko Chiba, Masumi Otsuki and Katsutoshi Yoshizato\*

We inspected the amount of fibronectin from human scar tissue fibroblasts and normal dermis fibroblasts is the same case, using an enzyme-linked immunosorbent assay. Fibronectin was measured in cells and in conditioned medium in a confluent monolayer culture. There was no difference between fibroblasts from scar tissue and those from normal skin.

When minoxidil was added to collagen gel with scar tissue, gel contraction was suppressed. The minoxidil concentrations of minoxidil added to the scar tissue fibroblasts were from 100 to 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  inoculate to be equal with the contraction in collagen gel by normal fibroblasts. (Accepted on October 29, 1994) *Kawasaki Igakkaishi* 20(4) : 285-291, 1994

**Key Words** ① Scar tissue fibroblasts ② Fibronectin  
③ Gel contraction

川崎医科大学 形成外科  
〒701-01 倉敷市松島577

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Kawasaki Medical School : 577 Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-01 Japan

\* 広島大学理学部 生物化学科

Zoological Institute, Faculty of Science, Hiroshima University

## はじめに

線維芽細胞と細胞外マトリックスとの相互作用を解析することは、創傷治癒を解明するうえで重要である。コラーゲングル培養は、その創傷治癒過程の生体外モデルとされており、ゲル収縮を培養下で観察できる。コラーゲングル収縮には、線維芽細胞とコラーゲン線維の接着が不可欠であり、その接着にフィブロネクチンも関与している。瘢痕組織由来の線維芽細胞(Scar fibroblasts: SF)と正常皮膚由来の線維芽細胞(normal fibroblasts: NF)では、コラーゲングル収縮能に差が認められる。その収縮の差が細胞のフィブロネクチン産生能の違いによるものかを解明する目的で、単層培養下のSF・NFの培養上清と細胞のフィブロネクチンをEnzyme linked immunosorbent assay (ELISA)を用いて定量比較した。

また、臨床上、SFの収縮のコントロールは瘢痕拘縮の治療につながる。そのため、降圧剤であるMinoxidilを用いてコラーゲングル収縮の抑制実験を行って若干の知見を得たので報告する。

## 材料および方法

## 1. 線維芽細胞の培養

手術により切除された瘢痕とその周辺の正常皮膚を同一症例より入手した(Table 1)。瘢痕は最も厚い部分の中央部を、正常皮膚は瘢痕と最も離れた部分の組織を細片化して初代培養を行い、それぞれよりヒト瘢痕組織由来線維芽細胞(Scar fibroblasts: SF)を遊出させ実験に用

いた。培養液はDulbecco's modified eagle's medium (DMEM, 極東製薬) + 抗生物質 (penicillin, streptomycin) に10%胎児牛血清 (FBS) を加えたものを使用し、細胞は37°C, 5% CO<sub>2</sub>の培養器中で維持した。すべての実験を通して継代数4~12の細胞を用いた。

## 2. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) によるフィブロネクチン (FN) の定量 (Fig. 1)

NF・SFを一組とし、直径10cmの組織培養ディッシュ (FALCON) で継代培養した。継代時に同じ細胞数のディッシュを2個作製し confluent になった時点でNF・SFとも培養上清と細胞に分け試料とした。細胞はLysis buffer [4% (W/V) Sodium dodecyl sulfate, SDS (和光純薬), 0.02% (W/V) Ethylenediaminetetraacetic acid, trisodium salt, EDTA (同仁化学), 1mM Phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF (SIGMA)] をディッシュに加え、60°C・10分間、加温して可溶化した。細胞数は、継代時に作製しておいたもう一方のディッシュのものを計測した。抗体は広島大学理学部生物化学科吉里数室で作られた抗ヒトFN単クローン抗体(マウス)と抗ヒトFN多クローン抗体(ウサギ)を用いて、培養上清はサンドイッチ法で、細胞は通常のELISA法で実験した。96穴プレート (Titertek) を使用し対照としてヒト血漿FN (pFN, Bethesda) を0, 5, 10, 20 µg/ml を50 µl ずつ分注した。試料はPBSにて2倍, 20倍, 50倍希釈を50 µl ずつ, 1倍, 10倍, 25倍希釈のもの25 µl にpFN (10 µg/ml) を25 µl ずつ加えたものをプレートに分注した。Figure 1の順で実験を進め、ABCキット (Vectastain) と最後にABTS (SIGMA),

Table 1. Cases of scar tissue

Case	Age.Sex	Scar	Place	Cause	Passage
A	12y F	Hypertrophic	Abdomen	Operation	3y 8m
B	19y F	Hypertrophic	Thigh	Trauma	2y
C	11y F	Hypertrophic	Chest	Op.	1y 6m

Passage : period from injury to scar revision

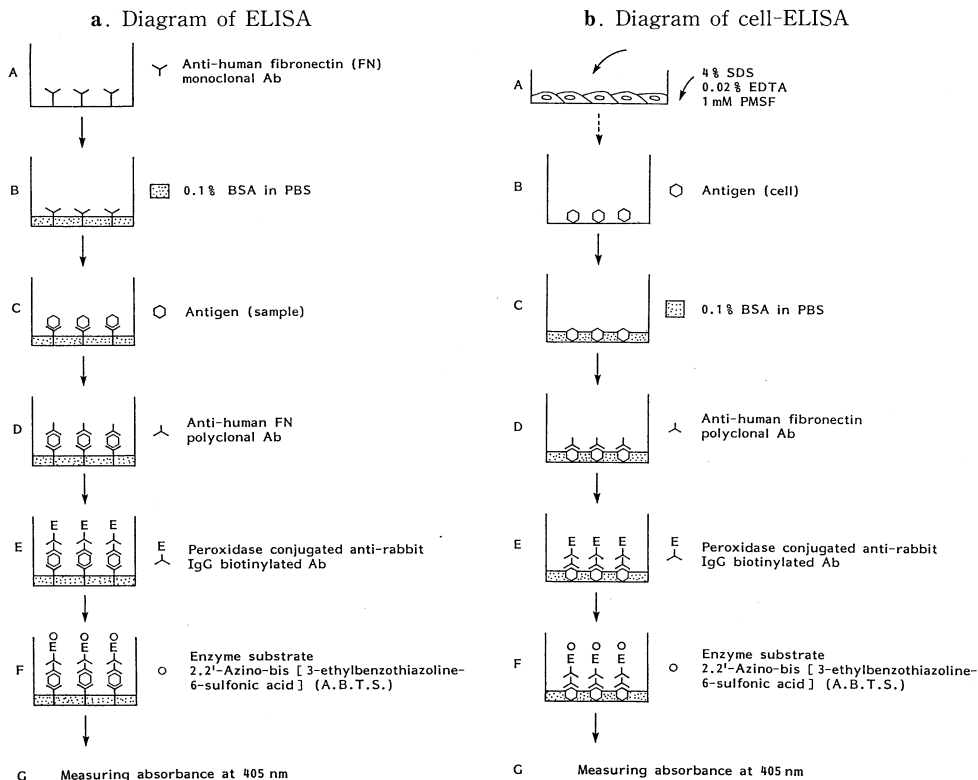


Fig. 1. a. Sample is conditioned medium in confluent monolayer culture.  
 b. Sample is fibroblasts from scar and normal dermis.

ペルオキシダーゼ基質 100  $\mu$ l を各ウエルに加え暗所室温で青緑色に発色させた。そして、その吸光度を micro-ELISA autoreader (Titertek) を用いて 405 nm で測定した。なお、各ウエルはすべて 2 個ずつ作製し、3 症例について検討した。

### 3. 線維芽細胞を用いたコラーゲンゲル収縮の Minoxidil による抑制実験

12穴疎水性プレート (直径 24 mm, テルモ) を用いて線維芽細胞 (NF・SF) のコラーゲンゲル培養を行った。細胞数は  $2 \times 10^5$  cells/ml (well) とし、各ウエルの組成は、FBS を 100  $\mu$ l, 4 倍濃度の DMEM を 225  $\mu$ l, I 型コラーゲン溶液 (0.5% セルゲン, 高研) を 200  $\mu$ l に滅菌水を加えて合計 1 ml とした。最終濃度で FBS が 10%, コラーゲンが 0.1% となるように設定した。次にゲル収縮の抑制実験に使用するために 2% (W/V) Minoxidil を調製した。その容液とし

て 10% propylene glycol (和光純薬), 73.7% ethanol (和光純薬, 16.3% 滅菌水) を使用しゲル収縮の抑制実験の際に placebo として用いた。SF のコラーゲンゲル培養中に Minoxidil を 100, 200, 400, 600, 800  $\mu$ g/ml を加え、その後 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の培養器中で維持し、ゲルの直径を直行する 2 カ所で経時的に測定した。また、Minoxidil の効果を確認するために Minoxidil 400  $\mu$ g/ml を含んだコラーゲンゲルを収縮の途中に PBS で洗浄し、Minoxidil を含まない DMEM + 10% FBS に換えて収縮実験を行った。なお各ウエルは 2 個ずつ作製し、細胞形態は位相差顕微鏡で観察した。線維芽細胞は症例 B のものを使用した。

## 結 果

### 1. フィブロネクチン (FN) の定量

今回実験した3症例において、pFNをコントロールとした曲線を用いてFNの定量を行った。その結果、症例Aの培養上清でNF ( $8.35 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ ), SF ( $10.1 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ )と、ややSFで高値を示したものの、他のものでは、培養上清、細胞ともにNF・SFであまり差は認められなかった (Fig. 2)。

2. Minoxidilによるゲル収縮の抑制実験

SFを含むコラーゲンゲル培養中に Minoxidil

を  $800 \mu\text{g/ml}$  加えたものでは、全くゲルは収縮しなかった。Minoxidil  $100 \mu\text{g/ml}$  を加えたものは軽度に収縮抑制が認められ、 $100 \sim 600 \mu\text{g/ml}$  の範囲で Minoxidil の濃度に依存してゲル収縮の抑制が見られた。また、NFを指標とした場合、SF・NFと同程度の収縮にするためには Minoxidil の濃度が  $100 \sim 200 \mu\text{g/ml}$  必要であった (Fig. 3)。Minoxidil を加えたSFの形態を観察したところ、細胞は円形のままで突起を伸展する細胞の割合が低下していた。

次に、Minoxidil を  $400 \mu\text{g/ml}$  加えたSFをゲル培養開始後、15時間目にPBSで洗浄し Minoxidil を含まない DMEM+10% FBS に換えたところ、ゲル収縮が急速に進み約35時間目で最初から Minoxidil を含まないゲルの大きさに近づいた (Fig. 4)。

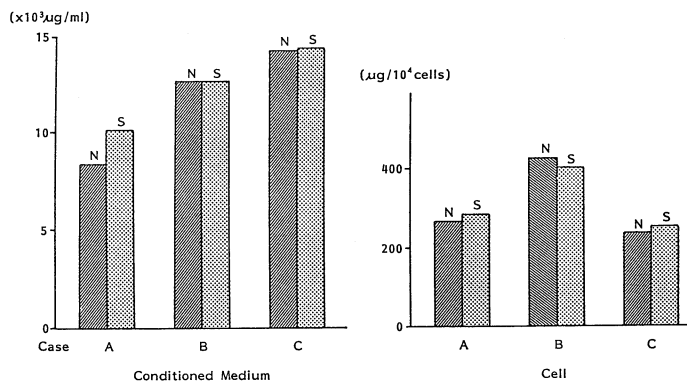


Fig. 2. The amount of fibronectin  
N : fibroblasts from normal dermis  
S : fibroblasts from scar tissue

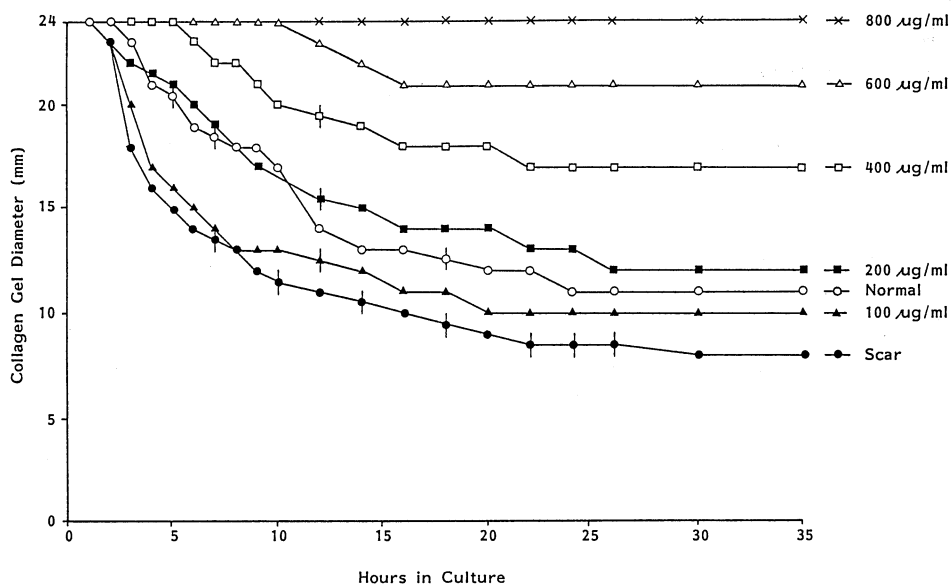


Fig. 3. Normal : fibroblasts from normal dermis  
Scar : fibroblasts from scar tissue and collagen gels in  $100 \sim 800 \mu\text{g/ml}$  minoxidil

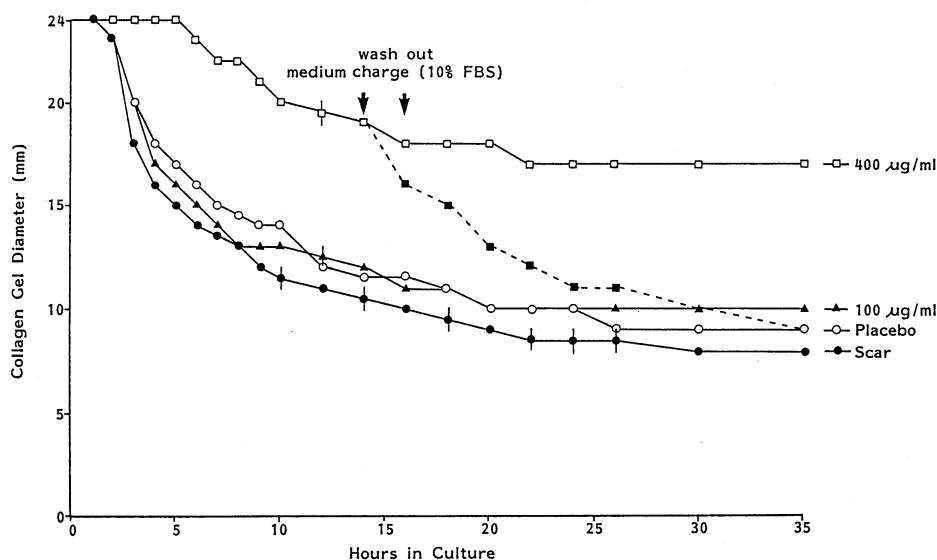


Fig. 4. Scar : fibroblasts from scar tissue and in 100, 400 µg/ml minoxidil  
 Placebo : vehicle (10% propylene glycol, 73.3% ethanol, 16.3% water) of minoxidil

考 察

1. 線維芽細胞のフィブロネクチンの定量

線維芽細胞をコラーゲンゲル中で培養<sup>1), 2)</sup>すると、ゲルは経時的に収縮して行く<sup>3)</sup>。その現象は、生体における創収縮の生体外モデルと言える。癩痕組織由来の線維芽細胞 (SF) と正常皮膚由来の細胞 (NF) をこのコラーゲンゲル培養を用いて収縮実験を行うと、SFの方が早期より収縮を開始し、その程度も大きい。その時の細胞形態を位相差顕微鏡で観察すると、NFよりSFの方が早期より突起を伸展しコラーゲン線維と接着している。コラーゲンゲルの収縮には細胞とコラーゲンの接着が必要であり<sup>4), 5)</sup>、その収縮は、細胞質内のマイクロフィラメントが主体となっていて、突起の存在は収縮の効率に関与している<sup>4)</sup>。やはり、コラーゲンゲル収縮の機構を解明する上で、細胞とコラーゲン線維の接合方法を検討することは重要である。浅賀ら<sup>6), 7)</sup>は、コラーゲンゲルに抗 FM 単クローン抗体を加えるとゲル収縮が阻害されたと報告した。そこで、NF・SFのコラーゲン収縮能の違いが、それぞ

れの細胞の FN 産生能の差によるものがどうかを検討するために ELISA 法を用いてフィブロネクチンの定量を行った。その結果、NF・SFで培養上清、細胞とも FN 量に差がなかった。線維芽細胞とコラーゲン線維との接着には、FNを介したもの<sup>8), 9)</sup>の他にコラーゲン受容体<sup>10), 11)</sup>を介したもの、直接コラーゲン線維と接着するものなどがある。このような受容体の数や活性の違いなどがゲル収縮に関与している可能性がある。

2. Minoxidil による収縮抑制実験

癩痕由来の線維芽細胞のコラーゲンゲル収縮を細胞障害なしにコントロールすることは癩痕拘縮の予防につながると考えられる。そこで今回、降圧剤である Minoxidil を使用して SF のコラーゲンゲル収縮を抑制し、同一症例の NF の収縮と同程度にするための適正濃度を調べた。Murad と Pinnell は、Minoxidil が単層培養下の線維芽細胞に対して増殖抑制と Lysyl Hydroxylase 活性を低下させる作用があり、ケロイドや肥厚性癩痕の結合織過形成の治療に Minoxidil が使用できる可能性があると報告した<sup>12)</sup>。今回の実験結果より、SFに加えてNF

の収縮度に近づけるには100~200  $\mu\text{g/ml}$  の濃度が適していることが判った。また、SFにMinoxidilを400  $\mu\text{g/ml}$  加えたものを15時間目に洗浄しMinoxidilを除去するとその後、速やかに収縮を続けたことより100~200  $\mu\text{g/ml}$  の濃度では細胞自体への障害は少ないと考えられる。しかし、生体では創傷治癒過程の早期にIII型コラーゲンの割合が高くなっている<sup>13)</sup>。我々の実験ではI型コラーゲンを使用しているため、今後III型コラーゲンも用いた検討も必要と思われる。

### ま と め

同一症例より得た癒痕由来と正常皮膚由来の線維芽細胞を用いて単層培養下の培養上清と細胞のフィブロネクチン量を比較した。またコラーゲンゲル培養下でMinoxidilを使ってSFの収縮抑制について検討した。

1. 単層培養下で confluent な状態の NF・SF のフィブロネクチンを定量したところ、培養上清、細胞とも NF・SF で差が認められなかった。

2. Minoxidil によるコラーゲンゲル収縮の抑制実験

SF のコラーゲンゲル培養に Minoxidil を加えて NF のゲル収縮レベルにするには、100~200  $\mu\text{g/ml}$  の濃度では、細胞の障害は少ないと考えられた。

臨床上、癒痕組織が引き起こす種々の問題を解決するためにも、生体外で癒痕由来の線維芽細胞の性質を検討しその収縮をコントロールすることが必要であると思われる。

なお、本論文の主旨は第1回日本形成外科学会基礎学術集会(1992年10月、於弘前)にて発表した。

### 文 献

- 1) Elsdale T, Bard J: Collagen substrate for studies on cell behavior. *J cell Biol* 54: 626-637, 1972
- 2) Yoshizato K, Taira T, Yamamoto N, Sasaki K: Remodeling of collagen: an in vitro model of connective tissue. *Biomedical Res* 6: 287-296, 1985
- 3) 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
- 4) 渋谷純一, 庄司 佑, 中沢南堂, 浅野伍郎: レクニ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. *Connective Tissue* 24: 53-63, 1992
- 5) 大浦武彦: ケロイドと肥厚性癒痕の治療. 東京, 克誠堂. 1994, pp 77-85
- 6) Asaga H, Kikuchi S, Yoshizato K: Collagen gel contraction by fibroblasts requires cellular fibronectin but not plasma fibronectin. *Exp Cell Res* 193: 167-174, 1991
- 7) 浅賀宏昭, 吉里勝利: コラーゲンゲル形成の細胞生物学. *化学総説* No.8: 153-160, 1990
- 8) Hynes RO: *Fibronectins* New York, Springer-Verlag. 1989
- 9) Rouslahti E, Pierschbacher MD: New perspective in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238: 491-495, 1987
- 10) Takada Y, Wayner EA, Caeter WG, Hemler ME: Extracellular matrix receptors, ECMR II and ECMR I, for collagen and fibronectin correspond to VLA-2 and VLA-3 in the VLA family of heterodimers. *J Cell Biochem* 37: 385-393, 1988
- 11) Kunicki TJ, Nugent DJ, Staats SJ, Orzechowski RP, Wayner EA, Carter WQ: The human fibroblasts class II extracellular Matrix receptor mediates platelet adhesion to collagen and is identical to the platelet glycoprotein I<sub>a</sub>-II<sub>a</sub> complex. *J Biol Chem* 263: 4516-4519, 1988
- 12) Murad S, Dpinnell SR: Suppression of fibroblasts proliferation and lysylhydroxylase activity by

minoxidil. J Biol Chem 262 : 11973, 1987

- 13) Light ND : Collagen in skin : preparation and analysis. New York, Methods in skin research. 1985, p 580