

京都大学	博士 (医学)	氏名	八木 洋輔
論文題目	An <i>ex vivo</i> model employing keloid-derived cell-seeded collagen sponges for therapy development (ケロイド治療開発のためのケロイド細胞を用いたコラーゲンスポンジ <i>ex vivo</i> モデル)		
(論文内容の要旨)			
<p>ケロイドはヒトに特徴的な疾患で、創傷治癒の異常と捉えられている。ケロイドにおける最も特徴的な性質の一つとして、コラーゲンやプロテオグリカンをはじめとした細胞外マトリックスの過剰な沈着があげられる。本研究では、ケロイド病変部に過剰に沈着しているコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの1つであるバーシカンに着目し、IL-1β 添加によるバーシカン mRNA、蛋白の発現変化を検討した。また、ケロイドにおけるバーシカン沈着をターゲットとした治療薬、治療方法の検討に有用なモデルの作製も行った。</p> <p>まず、免疫組織学的染色によりケロイド病変におけるバーシカンの過剰な沈着を明らかにし、リアルタイム PCR によりケロイド病変部におけるバーシカン mRNA の過剰発現を確認した。続いて、培養ケロイド細胞と培養ヒト正常皮膚線維芽細胞のバーシカン発現の検討を行った。培養ヒト正常皮膚線維芽細胞に比べ、培養ケロイド細胞においてバーシカン mRNA は強く発現している事が確認できた。また、ドットプロット法を用いてバーシカン蛋白を確認したところ、同様に培養ケロイド細胞においてバーシカン蛋白の産生量が多い事が確認できた。これら培養細胞にいくつかのサイトカインや成長因子を添加したところ、IL-1β の添加によりバーシカン mRNA の発現が抑制されることが分かった。</p> <p>次に、ケロイドにおけるバーシカン沈着のモデルを作製するため、コラーゲンスポンジにケロイド細胞を植えたケロイドスポンジを、ヌードマウス背部の皮下に移植した。移植から1カ月後、スポンジを取り出し重量の測定を行ったところ、ケロイドスポンジはヒト正常皮膚線維芽細胞とともにマウスの皮下に移植したスポンジよりも重量の有意な増加がみられた。一方、培養条件で1カ月培養したスポンジではこの重量の差はみられなかった。コンドロイチン硫酸を消化するため、ケロイドスポンジにコンドロイチナーゼ ABC を直接注射したところ、免疫組織学的染色によりコンドロイチン硫酸、バーシカンの消失と非注射群に比した重量の減少が確認できた。また、培養においてバーシカンの転写を抑制することが確認されていた IL-1β をケロイドスポンジに注射したところ、IL-1β 非注射群に比べ IL-1β 注射群における重量の増加を抑制することができた。これらの結果から、コンドロイチナーゼ ABC や IL-1β は、注射により直接投与を行った場合ケロイドスポンジの重量を有意に減少させる事がわかった。</p> <p>コンドロイチナーゼ ABC と IL-1β の注射により、投与群に有意な重量の減少がみられたことから、この <i>ex vivo</i> ケロイドモデルは、その新たな治療薬の効果を検討する事において有用であるといえる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

ケロイドは、創傷治癒過程の異常から細胞外マトリックスが過剰沈着をおこし、外見上また機能的障害を引き起こす難治性疾患である。本研究では、ケロイド病変部に過剰沈着し、またその水分保持機能から病変容積に大きく関与していると考えられるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンのバーシカンに着目し、ケロイド発生機序の解明を目指した。また、ケロイド由来細胞を用いたモデルでマトリックス沈着の制御を試みた。

以下に実験の流れを示す。1) 免疫組織学的染色、**Real-time PCR** により病変部でのバーシカン過剰沈着を証明した。2) 培養ケロイド細胞を用いてバーシカン発現増強の機序を検討した。その結果の1つとして **IL-1 β** によりバーシカン発現が抑制されることを見出した。これらの結果を踏まえ、3) 病変再現モデルを作成した。培養ケロイド細胞をコラーゲンスポンジに播種した後、ヌードマウス背部の皮下に移植したところ、コントロール細胞播種スポンジより重量の増加がみられ、かつバーシカンの過剰沈着を再現できた。コンドロイチナーゼ、**IL-1 β** を皮下に移植したスポンジに直接投与したところ重量増加が抑制された。したがってこの *ex vivo* ケロイドモデルは治療薬の効果を検証する上で非常に有用であると考えられた。

以上の研究はケロイド病変における細胞外マトリックス、特にプロテオグリカンの沈着メカニズムの解明に貢献しケロイドの治療方法開発に寄与するところが大きい。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。
 なお、本学位授与申請者は、平成24年12月25日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降