

京都大学	博士（ 医学 ）	氏 名	樋 渡 直
論文題目	The efficacy of a novel collagen-gelatin scaffold with basic fibroblast growth factor for the treatment of vocal fold scar (塩基性線維芽細胞増殖因子徐放性コラーゲンゼラチンスポンジを用いた声帯癬痕の再生治療)		
(論文内容の要旨)			
<p>声帯は特徴的な層構造を有し、声帯粘膜固有層は 3 層から構成される。この層構造が良好な粘弾性に寄与し理想的な声帯振動に必要不可欠とされる。声帯癬痕は外傷、炎症、手術後などに生じ、層構造が破綻することで粘弾性の低下をもたらし、重篤な音声障害をきたすが、従来、有効な治療法がなかった。</p> <p>塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）は創傷治癒過程において線維芽細胞を刺激し、組織の再生に寄与する。声帯癬痕に対しても声帯内への bFGF 注入術により、動物実験で組織再生と機能改善効果が報告され、現在は実臨床へ応用されている。しかし、bFGF は生体内で急速に拡散・吸収されるため複数回の投与が必要で、また、重度な癬痕への効果は限定的であった。</p> <p>そこでより確実に高い効果を目的に、コラーゲンスポンジの生成段階においてゼラチンを重合した製剤であるコラーゲンゼラチンスポンジ（CGS）に着目した。コラーゲンスポンジは周囲細胞の遊走を促す 3 次元的足場材料として働き、負電荷を帯びた酸性ゼラチンは陽電化を帯びた bFGF と静電気結合することで bFGF を保持し、CGS の分解に伴って bFGF を緩徐に徐放する。本研究では、CGS と bFGF を用いた声帯癬痕の再生効果を確認するために、<i>in vitro</i> と <i>in vivo</i> において検討を行った。</p> <p>ラット声帯を傷害し、2 ヶ月後に声帯癬痕由来線維芽細胞を採取し、CGS 上で培養を行った。細胞増殖の検討では、bFGF は濃度依存的に増殖を促進した。免疫組織化学検査では、bFGF 100 ng/ml 群においてアポトーシスの抑制と、α-SMA の発現低下を認めた。定量的 PCR 検査では bFGF 100 ng/ml 群においてヒアルロン酸合成酵素 1、3 の上昇とコラーゲン 1a1 型、3a1 型は減少を認めた。線維芽細胞増殖因子 2、肝細胞増殖因子、血管内皮細胞増殖因子の mRNA 発現が bFGF 濃度度依存的に上昇し、培養開始後 4 日目でピークとなり、その後 7 日目または 14 日目まで持続していることを確認した。</p> <p>続いてイヌ声帯を傷害し、傷害後 1.5 ヶ月後に CGS を声帯内に移植、5 ヶ月後に喉頭を摘出し、吹鳴法を用いた機能評価と組織評価を行った。吹鳴実験では、移植治療群（CGS+bFGF 群）が非治療群（sham 群）、CGS のみ留置群（CGS 群）と比較し、良好な声帯粘膜振動が観察された。発声閾値声門下圧・声帯粘膜振動振幅は CGS+bFGF 群において、声門間隙は CGS 群と CGS+bFGF 群において有意に改善していた。組織評価では、CGS+bFGF 群において他の 2 群と比較して、有意に粘膜固有層内のヒアルロン酸量が増加、コラーゲンの過剰蓄積が軽減されていた。声帯の厚みは CGS 群、CGS+bFGF 群とも</p>			

<p>に有意に増加していた。CGS 移植部位に過剰な炎症反応は認めなかった。</p> <p>本研究により、<i>in vitro</i> では、声帯癬痕由来線維芽細胞に対し CGS が生体親和性を有すること、bFGF が作用することにより声帯再生に有益となる遺伝子発現が促進されることを確認した。<i>in vivo</i> では、CGS と bFGF 移植により良好な機能・組織改善を得ることが確認された。これらの結果により、bFGF 徐放性 CGS は声帯癬痕再生に寄与する事が示された。</p>			
<p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>声帯癬痕は外傷、炎症、手術後など種々の原因で生じる。一旦形成された声帯癬痕は難治性で重篤な音声障害をきたすため、様々な治療が試みられているが、現在のところ確立された治療法は存在しない。その中で、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）の声帯内注入術の効果が報告されているが、bFGF は周囲組織に急速に拡散する欠点があった。本研究は bFGF 徐放性コラーゲンゼラチンスポンジ（CGS）を用いて声帯癬痕の治療効果を <i>in vitro</i>、<i>in vivo</i> の両面より検証したものである。</p> <p>CGS 上で培養されたラット声帯癬痕由来線維芽細胞に対し、bFGF が細胞増殖を促進、アポトーシスを抑制、α-SMA の発現を抑制することが示された。また、遺伝子発現解析では bFGF 100 ng/ml 群におけるヒアルロン酸合成酵素 1、3 の上昇、コラーゲン 1a1 型、3a1 型の減少が確認された。線維芽細胞増殖因子 2、肝細胞増殖因子、血管内皮細胞増殖因子は bFGF 濃度 100 ng/ml まで濃度依存的に上昇していた。イヌ声帯損傷モデルを用いた CGS 留置実験では、CGS と bFGF を投与された群において有意に声帯粘膜振動が改善され、組織学的にもヒアルロン酸が保持され、コラーゲンの過剰蓄積と声帯粘膜の拘縮の改善が確認された。</p> <p>以上の研究は bFGF 徐放性 CGS が声帯癬痕の治療効果を有することを実証し、新たな治療法の提示につながると考えられる。</p> <p>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。</p> <p>なお本学位授与申請者は平成 28 年 2 月 23 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。</p>			
<p>要旨公開可能日： 年 月 日 以降</p>			