

京都大学	博士（医学）	氏名	荻野 秀一
論文題目	Efficacy of the dual controlled release of HGF and bFGF Impregnated with a collagen/gelatin scaffold (コラーゲン/ゼラチン足場材料からの肝細胞増殖因子と塩基性線維芽細胞増殖因子の2種類のサイトカイン徐放の有効性)		
(論文内容の要旨)			
<p><b>【背景】</b>  創傷治癒とは、様々な細胞がサイトカイン制御下に相互作用することで達せられる複雑な過程である。創傷治癒を促進するには、適切な時期に適切な量のサイトカインを徐放することが重要である。  全層皮膚欠損創の治療には、現在、シリコンシートとコラーゲンスポンジからなる二層性人工真皮が臨床応用されているが、人工真皮は貼付後早期には血流がないため感染に弱い。そこで、血管新生を促進し、感染に対する抵抗性を持たせるため、正電荷の塩基性線維芽細胞因子(bFGF)を徐放可能なコラーゲン/ゼラチンスポンジ(CGS)が開発された。このCGSからのbFGF徐放は、正常マウス、糖尿病性マウスの全層皮膚欠損創で血管新生、真皮様組織形成を促進し、ヒトの糖尿病性潰瘍での臨床試験ではCGSの安全性とbFGF徐放による治癒促進効果が認められている。ただし動物実験ではbFGFを高濃度にすると却って上皮形成を阻害すると報告されている。  本研究では、より最適な創傷治癒を得るため、将来臨床応用の可能性があり、かつ正電荷で、血管新生、上皮化能を有する肝細胞増殖因子(HGF)を用い、正常マウスの全層皮膚欠損創モデルでCGSからのHGF単独徐放、HGFとbFGFの同時徐放による創傷治癒に与える影響を検討した。</p> <p><b>【方法】</b>  まず、CGSからHGF単独徐放、HGFとbFGFの同時徐放可能かを検討した。CGS(1.0×1.5cm 厚さ3mm)にHGF10<math>\mu</math>g/cm<sup>2</sup>、HGF10<math>\mu</math>g/cm<sup>2</sup>+bFGF7<math>\mu</math>g/cm<sup>2</sup>の濃度で4<math>^{\circ}</math>C下に一晚含浸させた。これらのCGSを37<math>^{\circ}</math>C下にリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に24時間浸漬した。浸漬直後に3個のCGSを採取し、その後、計5回、CGSと溶液を採取した(N=3)。残りのCGSをコラゲナーゼ溶液に浸漬し替え、計5回、CGSと溶液を採取した(N=3)。CGSは乾燥重量を測定し、溶液はELISA法でHGFとbFGFの濃度を測定した。次に、C57BLマウス背部に全層皮膚欠損創(直径8mm)を作成し、5群の溶液(生理食塩水[NSS群]、HGF10, 50<math>\mu</math>g/cm<sup>2</sup>[HGF-L, HGF-H群]、bFGF7<math>\mu</math>g/cm<sup>2</sup>[bFGF群]、HGF10<math>\mu</math>g/cm<sup>2</sup>+bFGF7<math>\mu</math>g/cm<sup>2</sup>[HGF+bFGF群])を含浸したCGS(直径8mm 厚さ1.5mm)を貼付した。貼付後1、2、3週後に残存した創面積、新生上皮長、真皮様組織の断面積、新生血管について評価した(N=5)。</p> <p><b>【結果・考察】</b>  PBS浸漬間にCGSは溶解されず、HGF単独群、HGFとbFGFの混合群ともに、HGF、bFGFが一部放出された。その後のコラゲナーゼ浸漬間に、CGSが溶解されるとともに、HGF単独群、HGFとbFGFの混合群ともに、HGF、bFGFが徐々に放出された。このことからCGSはHGF単独徐放、HGFとbFGFの同時徐放ともに可能であった。  動物実験では、1週ではHGF-L群はNSS群より、残存創面積が縮小し、新生上皮の伸展を促した。2週ではbFGF群とHGF+bFGF群が全評価項目で促進し、血管新生ではHGF+bFGF群がbFGF群より促進した。これらより、HGFは早期の上皮形成に優れるが、bFGFより真皮様組織形成、血管新生は劣る。bFGFは十分な真皮様組織形成したのちに上皮形成を促す作用を持つと考えられた。また、bFGFへのHGF付加で更に血管新生が促進され、CGSからのHGFとbFGF同時徐放は全層皮膚欠損創に有効であると考えられた。</p> <p><b>【結論】</b>  CGSからHGFとbFGFの2種類を同時徐放させることは、全層皮膚欠損創の治療に有効な治療法となる可能性がある。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

**【目的】**皮膚全層欠損創の治療に用いられている人工真皮(コラーゲンスポンジ:CS)の欠点を克服するために、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を徐放可能な新規人工真皮(コラーゲン/ゼラチンスポンジ:CGS)が開発され、臨床試験でCGSの安全性および真皮様組織形成と血管新生の促進効果が認められたが、bFGFの単独使用効果には限界がある。更なる創傷治癒促進を目指し、肝細胞増殖因子(HGF)を用い、CGSとHGF、bFGFの併用効果を検討した。

**【方法】**まず、in vitroでCGSからのHGFとbFGFの徐放を検討した。次いで正常マウス背部に全層皮膚欠損創を作成し、5群の溶液(生理食塩水[NSS]、HGF10 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>[HGF-L]、HGF 50 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>[HGF-H]、bFGF7 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>[bFGF]、HGF10 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>+bFGF7 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>[HGF+bFGF])を含浸したCGSを貼付し、貼付後の創面積、新生上皮長、真皮様組織の断面積、新生血管の数および断面積を評価した。

**【結果・考察】**CGSからのHGF単独、HGFとbFGF同時徐放ともに可能であった。動物実験では、1週ではHGF-L群はNSS群と比べ、新生上皮の伸展を示した。2週ではbFGF含有2群が全項目で促進を示し、血管新生数、断面積ではHGF+bFGF群がbFGF群と比べ増加した。これらより、HGFは早期の上皮形成に優れることと、bFGFへのHGF付加で更に血管新生を促進することが明らかになり、CGSからHGFとbFGFを同時徐放させることは、全層皮膚欠損創の有効な治療法となる可能性が示された。

以上の研究は新規人工真皮からの肝細胞増殖因子徐放効果の解明に貢献し、新たな創傷治療法の開発に寄与するところが多い。

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29年12月26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