

学位論文題名

Tissue regeneration using macrophage migration inhibitory factor-impregnated gelatin microbeads in cutaneous wounds

(MIF 浸透ゼラチンビーズを用いた皮膚創傷の治療への応用)

学位論文内容の要旨

背景：

マクロファージ遊走阻止因子(MIF)は、遅延型アレルギー反応に関与することで発見された液性因子である。MIF は当初、活性化リンパ球より分泌され、マクロファージの遊走を阻止し、集積したマクロファージを局所に留める作用を持つリンフォカインとして報告された。しかし、最近の研究により、MIF はリンパ球のみならずマクロファージ、線維芽細胞、骨芽細胞、上皮細胞など種々の細胞において大量に発現しており、TNF- α や IL-6 と同様に、炎症性サイトカインネットワークを形成し、生体内の炎症反応、免疫応答など様々な現象に重要な役割を果たしている事が明らかにされた。

さらに、MIF は成長因子としての機能も有し、皮膚においては特に増殖の盛んな基底細胞に強く発現しており、MIF は細胞増殖に対しても関与することも示唆されている。よって皮膚再生現象である創傷治癒過程において、MIF が炎症メディエーターや成長因子としての働きを介して、促進的役割を持つことが予想される。

方法と結果：

本研究において、皮膚の創傷治癒における MIF の機能と役割を解明するために、皮膚創傷治癒過程における MIF の関与を *in vivo* および *in vitro* で検討した。加えて徐放剤である MIF 浸透ゼラチンビーズを用いて皮膚創傷の治療応用についても検討した。

最初に、野生型(WT)マウスと MIF ノックアウト(KO)マウスを用いて直径 5mm の皮膚欠損創を背部に作成し、創傷治癒を観察した。WT マウスは欠損創が閉鎖し、完全治癒するまでに平均 9 日間要したのに比較して、MIF KO マウスでは平均 12 日間と治癒遅延を認めた。次に MIF KO マウス線維芽細胞を用いて、細胞増殖及び遊走能を分析した。Lipopolysaccharide (LPS)刺激による線維芽細胞において、MIF KO マウス線維芽細胞は WT マウス線維芽細胞に比べ、著しく細胞増殖の抑制が見られた。さらに線維芽細胞遊走能を検討するためリゾホスファチド酸 (Lysophosphatidic acid: LPA)刺激による遊走能の変化を検討した。LPA は活性化リン脂質として細胞遊走能に関与する重要な役割を果たしていることが知られている。LPA 添加 12 時間後、MIF KO 線維芽細胞の遊走は WT に比

べ顕著に減少した。Rho 蛋白は細胞骨格、細胞運動などを制御するスイッチとして知られているため、LPA 刺激による線維芽細胞 RhoA 蛋白の発現を Rho activation assay 法を用いて検討した。WT マウス線維芽細胞では、LPA 刺激 15 分後に RhoA の発現は上昇し、30 分後まで持続したが、MIF KO マウス線維芽細胞では LPA 刺激による RhoA の発現は非常に低かった。これらの結果から、線維芽細胞において、MIF の存在下で、LPA 刺激により RhoA 蛋白は活性化され、細胞遊走は促進された。一方、MIF 非存在下では RhoA 蛋白の活性化は認められず、細胞遊走の促進は認められなかった。よって、MIF は線維芽細胞遊走に関わる RhoA シグナル伝達経路に極めて重要な分子であることが示唆された。

最後に、MIF 浸透ゼラチンビーズを用いて皮膚創傷の治療効果を検討した。このゼラチンビーズは MIF 徐放剤としての機能を有し、一定濃度で 2 日間安定して MIF を放出する。皮膚創傷周辺に MIF 浸透ゼラチンビーズ 3 $\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ を皮内投与する群は、生食に融解した MIF を注入した群に比べ、創閉鎖が 3 日間短縮し、創傷治癒の促進がみられた。更に、MIF を浸透ゼラチンビーズを含んだ人工真皮をマウスの皮内に移植すると、真皮コラーゲン産生及び毛細血管新生の促進が認められた。

考察：

今回の研究において、MIF は創傷治癒に促進的に関わり、この効果の一部は線維芽細胞の増殖、遊走を促進することから惹き起こされることが明らかとなった。さらに、徐放剤である MIF 浸透ゼラチンビーズは皮膚創傷治療に臨床応用できる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 本 有 平
副 査 教 授 近 藤 哲
副 査 教 授 清 水 宏

学位論文題名

Tissue regeneration using macrophage migration inhibitory factor-impregnated gelatin microbeads in cutaneous wounds

(MIF 浸透ゼラチンビーズを用いた皮膚創傷の治療への応用)

背景：

マクロファージ遊走阻止因子(MIF)は、遅延型アレルギー反応に関与することで発見された液性因子である。MIF は当初、活性化リンパ球より分泌され、マクロファージの遊走を阻止し、集積したマクロファージを局所に留める作用を持つリンフォカインとして報告された。しかし、最近の研究により、MIF はリンパ球のみならずマクロファージ、線維芽細胞、骨芽細胞、上皮細胞など種々の細胞において大量に発現しており、TNF- α や IL-6 と同様に、炎症性サイトカインネットワークを形成し、生体内の炎症反応、免疫応答など様々な現象に重要な役割を果たしている事が明らかにされた。

さらに、MIF は成長因子としての機能も有し、皮膚においては特に増殖の盛んな基底細胞に強く発現しており、MIF は細胞増殖に対しても関与することが示唆されている。よって皮膚再生現象である創傷治癒過程において、MIF が炎症メディエーターや成長因子としての働きを介して、促進的役割を持つことが予想される。

方法と結果：

本研究において、皮膚の創傷治癒における MIF の機能と役割を解明するために、皮膚創傷治癒過程における MIF の関与を *in vivo* および *in vitro* で検討した。加えて徐放剤である MIF 浸透ゼラチンビーズを用いて皮膚創傷の治療応用についても検討した。

最初に、野生型(WT)マウスと MIF ノックアウト(KO)マウスを用いて直径 5mm の皮膚欠損創を背部に作成し、創傷治癒を観察した。WT マウスは欠損創が閉鎖し、完全治癒するまでに平均 9 日間要したのに比較して、MIF KO マウスでは平均 12 日間と治癒遅延を認めた。次に、MIF KO マウス線維芽細胞を用いて、細胞増殖及び遊走能を分析した。Lipopolysaccharide (LPS)刺激による線維芽細胞において、MIF KO マウス線維芽細胞は WT マウス線維芽細胞に比較し、著しい細胞増殖の抑制が見られた。さらに、線維芽細胞遊走能を検討するためリゾホスファチド酸 (Lysophosphatidic acid: LPA)刺激による遊走能の変化を検討した。LPA は活性化リン脂質として細胞遊走能に関与する重要な役割を果たしていることが

知られている。LPA 添加 12 時間後、MIF KO 線維芽細胞の遊走は WT に比べ顕著に減少した。Rho 蛋白は細胞骨格、細胞運動などを制御するスイッチとして知られているため、LPA 刺激による線維芽細胞リン酸化 Rho (RhoA, Rac1, Cdc42) 蛋白の発現を Western Blot 法を用いて検討した。WT マウス線維芽細胞では、LPA 刺激 15 分後にリン酸化 Rho 蛋白の発現は上昇し、30 分後まで持続したが、MIF KO マウス線維芽細胞では LPA 刺激によるリン酸化 Rho 蛋白の発現は非常に低かった。これらの結果から、線維芽細胞において、MIF の存在下で、LPA 刺激によりリン酸化 Rho 蛋白は活性化され、細胞遊走は促進された。一方、MIF 非存在下ではリン酸化 Rho 蛋白の活性化は抑制され、細胞遊走の促進はわずかであった。よって、MIF は線維芽細胞遊走に関わる Rho シグナル伝達経路に極めて重要な分子であることが示唆された。

最後に、MIF 浸透ゼラチンビーズを用いて皮膚創傷の治療効果を検討した。このゼラチンビーズは MIF 徐放剤としての機能を有し、生体内で 10 日間安定して MIF を放出した。皮膚創傷周辺に MIF 浸透ゼラチンビーズ 3 $\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ を皮内投与する群は、生食に融解した MIF を注入した群に比べ、創閉鎖が 3 日間短縮し、創傷治癒の促進がみられた。更に、MIF を浸透ゼラチンビーズを含んだ人工真皮をマウスの皮内に移植すると、真皮コラーゲン産生及び毛細血管新生の促進が認められた。また、糖尿病モデルマウスに MIF 浸透ゼラチンビーズを投与すると、MIF 溶解液に比べて、創傷治癒が有意に促進した。

考察：

今回の研究において、MIF は創傷治癒に促進的に関わり、この効果の一部は線維芽細胞の増殖、遊走を促進することから惹き起こされることを明らかにした。さらに、徐放剤である MIF 浸透ゼラチンビーズは皮膚創傷治療に臨床応用できると期待される。

公開発表に際し、副査の近藤哲教授からは、MIF 以外には創傷治癒に関与するサイトカインについて、副査の清水 宏教授からは今後 MIF の臨床応用の展望について、主査の山本有平教授からは生体内での徐放剤の効果についての質問など、その他多くの質問があったが、申請者は大概適切な回答をなし得た。

この論文は、創傷治癒において MIF 浸透ゼラチンビーズでの臨床応用可能性についての初めての研究でありこの点を高く評価された。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。