

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 470 号		学位申請者	馬場 淳徳
審査委員	主査	宮田 篤郎	学位	博士 (医学)
	副査	家入 里志	副査	黒野 祐一
	副査	中川 昌之	副査	橋口 照人

### Silk fibroin produced by transgenic silkworms overexpressing the Arg-Gly-Asp motif accelerates cutaneous wound healing in mice.

(Transgenic RGD シルクフィブロインは創傷治癒を促進する)

絹糸は古くから手術の際の縫合糸として使われており、強度、生体適合性、生分解性に優れている。また、シルクの主成分であるシルクフィブロイン (SF) は繊維以外にも不織布、フィルム、スポンジ、チューブ等、様々な形状に加工することができることから、組織再生を促す足場材料としての研究が進められている。創傷モデルマウスを用いた皮膚再生能に関する基礎実験で SF フィルムで処置した創傷では治癒後の肉芽組織が対照としたウレタンフィルム群と比較して厚く創表面が滑らかであった。この結果から SF は創傷被覆材としての利用が大いに期待されるものである。申請者らは SF と細胞との接着性が高ければ組織再生の足場としてより効果的であると予想した。そこで細胞外マトリックスであるフィブロネクチンの細胞接着アミノ酸配列 Arg-Gly-Asp (RGD) 配列を遺伝子導入した transgenic amorphous SF film (TG-ASFF) の創傷治癒効果について皮膚全層欠損モデルマウスを用いた in vivo の系で野生型 SF film (WT-ASFF) およびウレタンフィルム (対照) と比較検討した。ヒト線維芽細胞を用いた ex vivo の系では、transgenic SF (TG-SF) と野生型 SF (WT-SF) の細胞増殖と遊走に及ぼす効果を比較検討した。その結果、以下の知見が明らかにされた。

- 1) WT-ASFF は 8 日目において対照と比較して肉芽の断面積、肉芽の厚さが有意に増していた。
- 2) CD31 染色による新生血管の評価では WT-ASFF は対照と比較して 8、12 日目において有意に新生血管の増生を認めた。
- 3) Scratch assay では SF は対照 (SF 非含有培地) と比較して有意に線維芽細胞の遊走を促進した。
- 4) Western blotting では、SF は JNK と ERK のリン酸化をそれぞれ 30 分と 3 時間をピークとして促進した。
- 5) TG-ASFF は 12 日目において対照と比較して肉眼的創閉鎖を有意に促進していた。
- 6) TG-ASFF では肉芽の断面積は対照と比較して 4、8、12 日目、肉芽の厚さは対照と比較して 8、12 日目、WT-ASFF と比較して 12 日目に有意に増していた。
- 7) Fibroin addition assay において WT-SF は濃度依存的に線維芽細胞の増殖を促進した。WT-SF と TG-SF は対照 (SF 非含有培地) と比較してともに有意に線維芽細胞の増殖を促進した。
- 8) Fibroin coating assay において対照 (SF 非含有培地) と WT-SF の間に有意差は認めなかったが、TG-SF は WT-SF、対照 (SF 非含有培地) と比較して有意に線維芽細胞の増殖を促進した。

以上より SF は創傷治癒過程において MAP キナーゼ経路のリン酸化を促進することにより、線維芽細胞の遊走、増殖を刺激し、肉芽形成、血管新生を高めることを示した。さらに TG-ASFF は、線維芽細胞の接着性を向上させることで、より効果的に肉芽形成と創閉鎖が促進し、より高い創傷治癒効果を示したことから、褥瘡等の治療への臨床応用が期待される本研究は大変意義深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。