



Title	卵膜由来間葉系幹細胞培養上清によるケロイド線維芽細胞に対する抑制効果の検討 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	佐藤, 千草
Description	配架番号 : 2334
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12812号
Issue Date	2017-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66931
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Chigusa_Sato_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 佐藤 千草

主査 教授 石田 晋
審査担当者 副査 教授 神谷 温之
副査 教授 清野 研一郎
副査 教授 田中 真樹

学 位 論 文 題 名

卵膜由来間葉系幹細胞培養上清によるケロイド線維芽細胞に対する抑制効果の検討
(Conditioned Medium Obtained from Amnion-derived Mesenchymal Stem Cell Culture
Prevents Activation of Keloid-derived Fibroblasts)

申請者は以下の内容について発表した。

難治性疾患であるケロイドに対し、新治療開発の目的に卵膜由来間葉系幹細胞培養上清を作用させ、その効果の検証について論じた。

審査にあたり、まず副査の田中教授から TGF β 刺激についての質問があった。TGF β 刺激なしの培養上清添加の効果についても評価する必要があるのではないか。申請者はそれについて実際には実験を行っていることを説明した。続けて、TGF β 刺激なしの培養上清添加に対する反応について、2 要因の統計学的解析が必須ではないかと質問があった。申請者は、刺激なしの添加については、サンプルによって反応にばらつきがあったこと、多群解析を行って有意差が得られなかったこと等について説明し、今回の論文で提示した刺激の組み合わせと統計学的検討については、これまでの報告に準じて行ったと説明した。同副査は次の質問として、培養上清から有効な化学物質を特定し、製剤化する方がよいと考えるが、培養上清ではなく細胞を投与するという臨床応用の展望について説明を求めた。申請者は、次のように回答した。現在実際に臨床応用が進んでいるものは、細胞を静脈内に直接投与する方法である。培養上清を作用させる基礎実験は、細胞が生体内に投与された時に体内で分泌される効果物質に対しての反応をみる目的がある一方、培養上清投与による効果を判定することで、卵膜由来間葉系幹細胞が分泌する物質の中の有効成分を検討する目的もある。細胞自体を作用させることも、培養上清から有効成分を特定して臨床応用することも両方想定している。細胞を作用させる方法として、細胞の静脈内投与ではなく、局所に外用として用いる方法も検討中で、現在皮膚にとどませる目的にゲルやその他の素材中に細胞が培養できないか、貼付する方法を検討し予備実験をしている。

副査の神谷教授からは次のような質問があった。細胞増殖の実験に関して、KF の結果に対し、MF では逆の結果がでていることのメカニズムについて。卵膜由来の利点はわかったので、逆にデ

メリットがあれば。効果が mild inhibition であることについては有効成分がわかっていないことからくるのか。初代培養の方法はなぜ explant 法を用いているのか。Vivo の展開、動物モデルについて質問された。申請者は次のように回答した。細胞増殖の結果が、KF と MF で逆転していることは、間葉系幹細胞のもつケロイドの細胞増殖に対する抑制効果と創傷治癒促進効果とが関与していると考ええる。間葉系幹細胞には調整作用といわれるものが存在し、過剰なものは抑制し、足りないものは補う性質をもつ。創傷治癒促進効果があり、線維芽細胞に対しては増殖促進に働くことはすでに報告がある。今回の実験では過剰な線維芽細胞増殖という性質をもつケロイドに対しては抑制的に働くことが示されたと解釈している。骨髓由来間葉系幹細胞に対し、卵膜由来間葉系幹細胞の方が、利点が多いのにも関わらず臨床応用が遅れているのは、発見されたのが遅かったことにあると考える。現在では骨髓と脂肪、卵膜由来をそれぞれ比較した基礎論文がいくつか出てきており、由来によって作用効果に差があることなどが示されている。しかし、適応によって結果が違い、卵膜の特別なデメリットは今のところ認識していない。結果が mild inhibition であることについては、先に述べた通り、調整作用によるものと考ええる。今回の実験で線維芽細胞の初代培養に explant 法を用いた理由は、皮膚線維芽細胞の初代培養方法で一般的な手法はふたつあり、ひとつは今回用いた explant 法で、もうひとつは酵素法である。細胞収量が多いのは酵素法と言われているが、DNA 障害が大きいという報告がある。ケロイド線維芽細胞は、その特徴を維持した状態で基礎実験することに意義があるので、当教室では伝統的に explant 法を用いてケロイド実験を行っている。動物モデルに関しては、これまで小動物での試みは数多くなされているがケロイドの病態の再現はできていない。最近の報告で、ある種のブタ、duroc pig では肥厚性瘢痕が再現できるのではないかというものがある。そこで、同じ系統のブタに対し予備実験を開始しているがまだ再現には至っていない。

最後に主査の石田教授から次のような指摘と質問があった。実験に用いられている検体は各症例背景が違い、いわばバスケットである。CM 単独刺激のデータが不均一であり載せにくかったのは検体が均一の集団ではないことにあるのではないか。学位論文では CM 単独刺激のデータも載せて考察することが望ましい。TGF β 刺激なしの KF をプロファイルする必要がある。CTGF、FGF 等線維化の factor について評価し、どういう KF に対しては CM 単独で効果があるのか評価が必要である。In vitro で TGF 刺激をする人工的な実験系が既報でも多かったのは、結果が出やすいからではないか。人がやっていないことに意義がある。追加実験できれば、臨床データなども加えて考察するのがよい。KF の診断基準や診断マーカーの存在について問われ、申請者は特異的なものはないと答えた。主査は続けて、線維化に代表的なマーカーや M2 マクロファージなど検討すべきマーカーがあるはずだと指摘した。CM 単独で有効なものはなにか、ケロイドとは何かを突き詰めるべきである。CM 単独刺激における反応差をもう一度振り返ることの重要性について言及した。申請者は、すでに実験している CM のデータを学位論文に追加して考察すると答えた。

別時間で行われた副査の清野教授からは、TGF β で刺激するのは人工的であり、それで評価することは生体とどのくらい差があるのかという質問があった。申請者は、KF の過去の論文でよくあるデザインであり、参考にして実験したことを言及した上で、同様の指摘を別時間の審査でも受けたこと、CM 単独刺激のデータと考察を学位論文に加える予定であることなどを説明した。

この論文は、これまでの内容を発表した学会や投稿中の論文雑誌の査読者に高く評価され、今後のケロイド治療において有用な新知見を付与するものと期待される。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。