

審査の結果の要旨

氏名 鈴木 みなみ

本研究は医療用ウジ療法における治療効果発現機構について検討を行っている。マウス線維芽細胞と *Lucilia sericata* より抽出した滲出液/分泌液 (excretion/secretion; ES)を用い、本治療における血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)の関与を明らかにすることを目的としており、下記の結果を得ている。

1. ES をマウス線維芽細胞に作用させることにより、0.025-0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で濃度依存性に *Vegf* の発現上昇を認めた。また、*Vegf* の発現の継時的な変化を見ると、12 時間で前値の約 6.06 倍まで増加し 24 時間後には減少していた。Lysate 中の *Vegf* は 24 時間後で有意に増加した。しかし、この *Vegf* 発現上昇は protease inhibitor (PI) 添加により 0.15 倍に抑制されており、ES 中の protease が *Vegf* 発現上昇に寄与していることが示された。*Igf-1*、*Tgf β* では ES・PI 添加により同様の傾向はみられず、IGF-1、TGF β を介さずに VEGF 発現上昇に関与していることが示唆された。
2. 通常メディウムに ES ないしは PBS \pm PI を投与することにより、マウス線維芽細胞の遊走能の評価を行った。ES を加えた群でのみ治療開始後 48 時間において線維芽細胞の遊走を認めたが、通常メディウム群、ES+PI 群では認めず、ES 中の protease が遊走能活性化に関与していることが示された。
3. cMet を knockdown した系においては control 群と同様に、ES 投与による *Vegf* 発現上昇を認めていたが、*Hgf* では ES 投与による発現上昇は見られなくなっていた。ES による VEGF 発現上昇は HGF の発現上昇を介さずに誘導されていることが示唆された。
4. recombinant VEGF₁₈₉ を protein digestion buffer 内で ES と 30 分間培養すると ES の濃度依存性に 14 kD、10 kD へと切断され、この切断は PI 添加により抑制された。したがって、ES 中の protease が VEGF 切断に関与していることが示唆された。また、ES を作用させた recombinant VEGF₁₈₉ 50ng/mL を培養液中に添加すると、2-24 時間の範囲で cell viability が有意に上昇したが、recombinant VEGF₁₆₅ ではこの傾向が見られなかった。ES を作用させた VEGF₁₈₉ は、PBS を作用させた VEGF と比較して 10-30 分後に VEGFR2 のリン酸化、6 時間後に ERK リン酸化が有意に促進しており、VEGFR 以降の系の活性化をもたらすことが示された。
5. Zymogram で ES を泳動すると 40 kDa、34 kDa、30 kDa にバンドを認めており、ES が protease 活性を有することが示された。中でも 40 kDa のバンドが一番強い

protease 活性を有していた。Zymogram gel 上の protease 活性を示していた各々のバンドから protein extraction kit を用いて抽出した抽出溶液を、recombinant VEGF と共に培養することにより VEGF の切断活性の評価を行ったが、得られた抽出溶液による VEGF の切断活性は評価困難であった。

以上、本論文は *L. sericata* から得た ES を用いた検討を行うことにより、マウス線維芽細胞における、VEGF 発現上昇、線維芽細胞の遊走能向上に加え、VEGF の切断にともなう VEGF/VEGFR/ERK の系の活性化を示した。医療用ウジ療法における血管新生、肉芽増生等の創傷治癒機構に関与している可能性を示し、主に ES 中の protease が寄与していることを明らかにした。今後、*L. sericata* などの生物由来の protease の機能・成分解析を行うことで、今後の創傷治癒を促進する治療薬の開発の一助になることが考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。