

Title	Growth-promoting effect of bacterial products from <i>Clostridium perfringens</i> on human keratinocytes
Author(s)	高田, 章好
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/39388
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏 名	たか だ おさ よし 高 田 章 好
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 6 2 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 1 月 1 1 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	Growth - promoting effect of bacterial products from Clostridium perfringens on human keratinocytes (Clostridium perfringens 由来の細菌産生物がヒト表皮ケラチノサイトに与える増殖促進作用について)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉 川 邦 彦 (副査) 教 授 杉 本 侃 教 授 田 野 保 雄

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

近年、多種の細胞成長因子が表皮細胞の増殖を促進していることが明らかになっている。またその一方でコレラトキシシンや EDIN (epidermal cell differentiation inhibitor) のような細菌産生物も同様な作用を持つことが知られている。藤井らは腸内細菌である Clostridium perfringens の培養菌体から細胞増殖促進作用を持つ Wound Healing Substance (WHS) を発見した。この WHS の創傷治癒に対する有効性については、ラットを用いた背部皮膚欠損創の実験でその創傷治癒過程を病理組織学的に観察することにより表皮形成および肉芽形成を促進すること、さらに、in vitro の細胞培養系において種々の線維芽細胞の増殖を促進させる作用が確認されている。この創傷治癒に有効な WHS のヒト表皮細胞に対する増殖促進作用の有無を無血清培養法によるヒト表皮細胞の培養系を用いて検討した。

(方法ならびに成績)

1) WHS のヒト表皮細胞の増殖および DNA 合成に対する効果

WHS がヒト表皮細胞の増殖を促進するかどうかを検討するために、培養ヒト表皮細胞に対する WHS の添加実験を行った。培養開始3日目に0, 1, 5, 10, 20, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の WHS を加えた培養液に交換し、その後5日目に細胞数を測定した。WHS の濃度が 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のとき最大のヒト表皮細胞増殖促進作用を示した。DNA 合成能に対する影響を methyl- ^3H -thymidine のヒト表皮細胞への取り込みを測定して検討したところ、WHS の濃度が 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のとき無添加に比べ4.8倍の取り込み能の増加が認められた。

2) ヒト表皮細胞の ^{125}I -EGF 結合能に対する WHS の影響

EGF Receptor への影響を検討するため、各濃度の WHS を添加しヒト表皮細胞の ^{125}I -EGF 結合能を調べたが、どの濃度においてもヒト表皮細胞の ^{125}I -EGF 結合能に変化はみられず、WHS はヒト表皮細胞の EGF Receptor には影響を与えないことが示された。

3) EGF と WHS のヒト表皮細胞の増殖に対する相互作用の検討

最初に EGF 単独のヒト表皮細胞の増殖に対する作用を検討した。0, 0.01, 0.1, 0.2ng/ml の濃度では EGF は

0.01ng/ml でヒト表皮細胞の増殖を57%促進した。しかし、0.1ng/ml 及び 0.2ng/ml ではほとんど影響はなく 1ng/ml 以上の高濃度ではむしろ増殖を抑制した。次に増殖を最も促進する濃度 5 μ g/ml の WHS を添加したヒト表皮細胞に0, 0.01, 0.1, 0.2ng/ml の EGF を加えて両者の相互作用を検討した。5 μ g/ml の WHS と 0.01ng/ml の EGF 濃度で、無添加に比べ75.7%の増殖促進作用がみられた。この結果は EGF と WHS はその至適濃度で加えた場合、ある程度相加的作用を有することを示している。

4) TGF- β および Vitamine D₃ によるヒト表皮細胞の増殖抑制作用に対する WHS の作用

TGF- β および Vitamine D₃ はヒト表皮細胞の増殖に対し抑制的に作用することが知られている。ヒト表皮細胞に0, 0.25, 0.5, 1, 5, 10ng/ml の TGF- β , および0, 10⁻¹⁰, 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶M の Vitamine D₃ を添加した。WHS をその至適濃度で加えたが、TGF- β および Vitamine D₃ のヒト表皮細胞に対する抑制作用は影響を受けなかった。この結果は WHS のヒト表皮細胞の増殖促進作用は TGF- β および Vitamine D₃ によっても制御されることを示している。

5) WHS のインボルクリン陽性細胞に対する影響

WHS の表皮細胞の分化に対する影響を調べるため、分化のマーカーであるインボルクリン陽性細胞数を検討した。0, 0.1, 1, 5, 10, 50 μ g/ml の WHS を培養上清に加え、48時間後にインボルクリン陽性細胞数を測定した。コントロール群と WHS 添加群の間に統計的に有意差はみられず、WHS はインボルクリン陽性細胞数に影響を与えなかった。この結果は WHS は表皮細胞の分化に影響を与えないことを示唆している。

(総括)

WHS は以上の実験結果より次のような特徴を持つことが示された。

- 1) WHS はヒト表皮細胞の増殖と DNA 合成能を促進する。
- 2) WHS は EGF の EGF Receptor に対する結合に影響を与えない。
- 3) WHS と EGF は至適濃度で添加すると、ヒト表皮細胞の増殖促進にある程度の相加作用がみられる。
- 4) TGF- β および Vitamine D₃ によるヒト表皮細胞の増殖抑制作用には WHS は影響を与えない。
- 5) WHS は表皮細胞の分化には影響を与えない。

論文審査の結果の要旨

本論文は細菌 Clostridium Perfringens 由来の細胞増殖促進物質 (420 KDa protein) の表皮ケラチノサイトに対する作用を検討したものであり、5 μ g/ml の濃度で in vivo における表皮ケラチノサイトの増殖を有意に促進させた。この作用は正常表皮の TGF- α による増殖促進作用とは無関係であり、TGF- β , 1, 25 (OH)₂ vitaminD₃ による増殖抑制作用にも影響を与えなかった。

本物質の皮膚潰瘍治癒促進効果はすでに動物実験で確認されており、in vitro における線維芽細胞増殖促進作用と合わせて本物質の臨床応用に対し有意義な基礎的知見を提供したものであり、学位に値するものと認める。