

氏名（本籍）	萩原 幸輝（三重県）		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 7050 号		
学位授与年月	平成26年 3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Skeletal Muscle Regeneration Therapy Research for Congenital Diaphragmatic Hernia (横隔膜ヘルニア治療を目的とした骨格筋再生医療研究)		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	水谷 太郎
副査	筑波大学教授	医学博士	山崎 正志
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	福島 敬
副査	筑波大学助教	博士（医学）	長野 真澄

論文の内容の要旨

(目的)

本研究の目的は、先天性横隔膜ヘルニアの治療を想定した骨格筋再生医療技術を開発することであり、以下の3つの研究から構成される。1) basic fibroblast growth factor (bFGF)徐放による移植筋芽細胞生存率の向上に関する研究、2) 直列した筋管細胞分化への溝パターン幅の影響に関する研究、3) 直列した筋管細胞を包埋するゲル化コラーゲン作製に関する研究。

(対象と方法)

研究1 : Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)を発現したラット下肢骨格筋組織からEGFP筋芽細胞を採取・培養し、この細胞と共にbFGFを吸着したGelatin Hydrogel Microsphere (DDSゲル)を野生型ラット下肢骨格筋に作製した人工的筋欠損部へ移植し、1または4週間後に移植患部の骨格筋を採取し、移植細胞の生存率、骨格筋再生率、血管数などを蛍光免疫染色、筋中心核率、RT-qPCRより解析した。また、コントロールとして、EGFP細胞のみを移植した群 (C1)、EGFP筋芽細胞とPBS含有したDDSゲルのみを移植した群 (C2) を作製し、実験群 (Ex)の比較対象とした。またExとC1からは移植10ヶ月後にも組織を採取し、移植細胞の生存率、中心核数、CD31を比較した。

研究 2 : Photolithography法を用いてPolystyrene上に1000 $\mu\text{m} \times 5, 10, 25, 50, 200, 400 \mu\text{m}$ 幅のPoly Vinyl Alcohol (PVA)コートを行って細胞の接着領域を制限し、その上でL6筋芽細胞を分化培養させ、播種から1, 2, 3, 4, 7, 10, 14日後に増殖率、角度、太さ、Myogenin発現率、形状観察などの解析を行った。

研究 3 : 直径500 μm のガラス管を並列に並べた型上でSodium Alginateを塩化カルシウム溶液で架橋して並列半円柱パターンを持つアルギン酸足場材料を作製し、筋芽細胞を包埋したコラーゲンを塗布・ゲル化させた後、分化培養を行った。

(結果)

研究 1 : bFGF徐放を併用した筋芽細胞の生存率は比較群に比べて高く、その傾向は10ヶ月後も同じであった。また、実験群の筋中心核は比較群に比べて高かった。10ヶ月後の実験群CD31は比較群に比べて高かった。

研究 2 : 全ての溝パターン内では平面上での培養に比較して直列した筋管細胞が出来た。5, 10 μm 幅溝は網目状の筋管細胞を、25, 50 μm 幅溝はMyogenin発現率の高い直列した1~2本の筋管細胞を、200, 400 μm 幅溝は1~3本程度の100 μm 以上の太さのある細胞と多数のごく細い筋管細胞を作り出す傾向が見受けられた。また、太い溝内ではPVAに隣接した細胞ほど整列した。

研究 3 : 溝幅403.32 μm 、深さ123.60 μm の溝幅を持つアルギン酸足場材料が出来、その足場上に、並列した筋管細胞を含むコラーゲンゲルを作製することに成功した。1, 3, 5, 7, 10, 14日目の、足場材料に対する細胞の角度は、それぞれ24.54°、22.27°、10.15°、10.70°、9.33°、6.18°であり、培養期間が長くなるにつれて直列した。また、7, 10, 14日目の細胞はMyosin Heavy Chain染色および α -sarcomeric actinが陽性であったことから、筋管細胞であることが確認された。

(考察)

研究 1 : bFGF徐放併用による筋芽細胞生存率向上の機序は、血管新生促進とともに筋形成の促進に由来することが示された。bFGF徐放を併用した筋芽細胞移植を、横隔膜ヘルニア患者の人工パッチ周辺に施すことにより、周囲の横隔膜筋組織の増殖を促進し、再発率が低下する可能性がある。

研究 2 : 本研究結果から、目的により選択する溝幅を選ぶ必要があることが示唆された。5, 10 μm の細い溝幅では隣接する筋管細胞などと融合し易く、方向を保ちながらも網目状になる性質が得られる。これらは枝分かれする心筋やシート状に広がる平滑筋の培養に適すると考えられる。また、15~50 μm の径で直列した筋管細胞が必要な場合は25, 50 μm 幅の溝が有効である。高い力学強度が必要とされる場合は、非常に太い筋管細胞と細い多数の筋管細胞を同時に移植出来る200, 400 μm 幅のパターンが有効と思われる。

研究 3 : 今回、整列した筋芽細胞・筋管細胞を包埋したコラーゲンゲルを作製することに成功した。これにより3次的に増殖しながらも直列した筋管細胞シートの作製が可能となった。横隔膜ヘルニアによって出来た穴を埋める為には、この筋管細胞シートを何層かに重ねて強度を上げ、移植する必要があると思われる。

本研究により、bFGF徐放併用による筋芽細胞生存、骨格筋再生、血管新生における有用性が示唆された。また、異なるパターン幅は筋管細胞の動態を変化させることが確認され、3次的に細胞増殖する整列した

筋管細胞内包コラーゲンシートを作製することに成功した。今後、移植可能な強度を有する並列化筋管細胞シートを作製し研究を行う必要がある。

審査の結果の要旨

(批評)

骨格筋再生医療に関する研究は、患者の生活の質を著明に改善する可能性があり、極めて重要な研究テーマである。本研究は、先天性横隔膜ヘルニアの治療を想定し、basic fibroblast growth factor (bFGF)徐放による移植筋芽細胞生存率の向上、溝パターン幅が直列した筋管細胞分化に及ぼす影響、直列した筋管細胞を包埋するゲル化コラーゲン作製、の3つのテーマに関する研究より構成される。本研究により、bFGF徐放併用は移植筋芽細胞生存率を改善すること、目的により至適な溝幅があること、3次元的に細胞増殖する整列した筋管細胞内包コラーゲンシート作製が可能であること、が示された。今後、移植可能な強度を有する並列化筋管細胞シート開発などに発展することが期待される。

2013年12月27日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。