

氏名	渋谷 陽一郎
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博甲第 7860 号
学位授与年月	平成 28 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	脂肪組織由来細胞を用いた腱組織再生迅速化に関する研究

主査	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)	長谷川 雄一
副査	筑波大学准教授	博士 (医学)	柳川 徹
副査	筑波大学助教	博士 (医学)	濱田 理人

論文の内容の要旨

(目的)

近年、手指屈筋腱断裂に対する治療法には、運動制限解除までの期間が短縮する進歩はない。この背景として、臨床経過を模したマウスモデルがなかったことが考えられる。一方、間質血管細胞群 (stromal vascular fraction, 以下 SVF) には、多様な分化能を持つ脂肪由来幹細胞 (adipose-derived stem cell, 以下 ADSC) が含まれる。本研究では、腱の再生迅速化により合併症低減を図るため、脂肪組織由来細胞を用いた基礎的研究を行こうことを目的とした。

(対象と方法)

まず、損傷腱の再生迅速化を図る移植候補細胞の調製を目指した。このため、マウスアキレス腱由来の腱細胞培養条件を検討した。続いて Sugii らの方法 (Nat Prot, 2011) で調製したマウス由来の SVF (以下 mSVF) において、上述の培養条件検討結果をもとに、腱細胞への分化誘導を行い、遺伝子発現を解析した。並行して、マウスアキレス腱縫合固定モデルを確立した。全身麻酔下に、右アキレス腱完全断裂を作製し、10-0 nylon を Kessler 変法で糸を通した後、近位、遠位両断端間に移植を行い、腱縫合糸を結紮した。皮膚は 7-0 nylon で縫合し、新規に考案した splint で足関節底屈位固定を行った。続いて、本マウスモデルに、Sugii らの方法で調製した mSVF を移植した。c57BL/6 マウス 16 匹を、mSVF を移植する S 群に 8 匹、細胞以外の担体のみを移植する M 群に 8 匹用いた。また同様に緑色蛍光蛋白 (GFP) で標識したヒト SVF (以下 hSVF) を移植し、免疫染色を行った。

(結果)

マウス腱細胞の培養条件検討では、Knockout Serum Replacement (以下 KSR) を使用した群で、腱細胞に発現する転写因子である *mouse early growth response 1(mEgr1)*、*mouse scleraxis (mScx)*、effector である *mouse tenascin C (mTNC)*、*mouse collagen 1a1(mCol-1a1)*の発現が、7 日目、14 日目、21 日目に feral bovine serum(FBS)を使用した群よりも上昇する傾向にあった。mSVF からの腱細胞誘導実験では、7、10 日目の KSR の群において FBS の群に比較して *mScx*、*mTNC*、の発現が上昇し、*mTenomodulin* も 7 日目、*mCol-1a1* は 10 日目に、KSR の群において FBS の群に比較して上昇がみられた。mSVF 移植実験では、アキレス腱使用再開までの期間が、M 群で 13.5 ± 4.6 日、S 群で 9.3 ± 2.7 日であり、足関節底屈可動域制限は、M 群では $146.9 \pm 13.7^\circ$ 、S 群では $164.4 \pm 8.6^\circ$ で、いずれも有意差を認めた。組織学的には、術後 14 日目における異所性軟骨様細胞出現領域は、M 群で $18.1 \pm 10.1\%$ 、S 群で $10.6 \pm 7.7\%$ であった。術後 21 日目の異所性軟骨様組織形成領域は、M 群で $39.5 \pm 11.0\%$ 、S 群で $14.5 \pm 3.2\%$ で有意差を認めた。hSVF-GFP 移植後、3 日目のアキレス腱組織の GFP 免疫染色では、GFP 陽性細胞は認められなかったが、定量リアルタイム PCR (以下 q-rtPCR) では GFP 陽性細胞の存在が示唆され、局所炎症所見も軽い傾向がみられた。

(考察)

マウスアキレス腱由来腱細胞の腱細胞マーカー維持に有用であった KSR を用いて mSVF に腱細胞分化誘導を行うと、腱細胞マーカーの発現が上昇し、KSR が mSVF の腱細胞への分化誘導に有用と考えられた。マウスモデルへの mSVF 移植では、アキレス腱使用再開までの期間が短縮し、関節可動域障害が軽減した。続いて、ヌードマウスに hSVF を移植したところ、関節可動域障害は有意に軽減したが、ヌードマウスの行動学的性質により、アキレス腱使用再開の評価が不能であった。そこで、ADSC が持つ強力な抗炎症作用に注目し、他家移植を前提に野生型マウスへの hSVF-GFP 移植を行い、移植後 3、10 日目の細胞挙動を評価した。実際には、遠縁種間の移植であり急性期の拒絶反応が強いことも予想されたが、定性的には局所の腫脹は移植群においてむしろ軽減していた。3 日目の免疫染色では GFP 陽性細胞は確認できなかったが、遺伝子発現解析では GFP 陽性細胞の残存が示唆され、移植後早期の局所炎症反応低減へ SVF が関与している可能性が考えられた。

審査の結果の要旨

(批評)

渋谷陽一郎氏は、脂肪組織由来細胞の移植により腱の再生を促進させることを目的として、マウスアキレス腱縫合固定モデルを用いた研究を遂行した。その結果、脂肪組織由来細胞の移植により、アキレス腱使用再開までの期間を短縮することが可能となった。脂肪組織由来細胞移植の有用性が示されたという点で、大変に意義のある論文である。

平成 28 年 1 月 8 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。