

# 博士論文要約

○ 論文題目 脂肪組織由来細胞を用いた膵組織再生迅速化に関する研究

○ 指導教員

人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 関堂 充 教授

(所属) 筑波大学大学院人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻

(氏名) 渋谷 陽一郎

## (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 fetal 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 群に比較して S 群で短縮し、足関節底屈可動域制限は、M 群に比較して S 群で改善し、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 群と S 群で差はなかったが、術後 21 日目には、M 群に比較して S 群で有意に減少した。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。

#### (結論)

mSVF から腱細胞への分化誘導における KSR の有用性を示した。マウスアキレス腱縫合足関節固定モデルを確立し、mSVF 移植によりアキレス腱使用再開までの期間短縮と、関節可動域改善、異所性軟骨形成低減を確認した。今後は、特に腱組織再生過程における SVF 移植の抗炎症効果について、更なる解析が必要である。