

学 位 論 文 題 名

The effect of transforming growth factor-beta on mechanical properties of the fibrous tissue regenerated in the patellar tendon after resecting the central portion

(Transforming growth factor-beta の投与が膝蓋腱中央切除部に再生する線維性組織の力学的特性に与える効果)

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

膝蓋腱中央 1/3 は、靭帯再建の材料としてよく用いられるが、自家膝蓋腱採取部位には線維性組織が再生されることが臨床的にも実験的にも報告されている。これは、*in vivo* における腱再生のメカニズムを研究するための重要なモデルである。しかしながら、中央 1/3 切除後の膝蓋腱全体の構造特性についての報告はあるが、再生された組織そのものの特性を調べた研究はほとんどない。我々は家兎モデルを用いて、膝蓋腱中央 1/3 切除後に線維性組織の再生が起こる過程を詳細に研究し、再生組織と周囲の腱組織を分離してそれぞれの生体力学的特性を報告した。その結果、再生組織の引張強度は 6 週で正常膝蓋腱の約 32%、24 週でも約 64%と、生体力学的成熟は従来に想像されていたほど早いものではなく、この再生組織の成熟を時間的・強度的に促進させるサイトカインを明らかにすることは、腱・靭帯損傷の治療に再生工学・組織工学を応用するための有用な情報が与えられると考えられる。一方、移植腱や損傷靭帯において TGF-beta の投与が生体力学的特性を向上させるという報告が散見される。

我々は TGF-beta1 は膝蓋腱中央切除後に再生される組織の生体力学的特性の改善を促進するという仮説を立てた。本研究の目的は、膝蓋腱中央 1/3 切除時における外因性 TGF-beta1 の投与が、欠損部に再生する線維性組織の力学的特性に与える効果を明らかにすることである。

実験には、日本白色家兎 30 羽を用いた。右膝蓋腱中央部に幅 3mm、長さ 10mm の矩形の欠損を鋭的に作成し、その 4 隅に 5-0 ナイロン糸でマーカーを残し、創を縫合した後、無作為に 10 羽ずつ 3 群に分けた。I 群ではこの欠損部に 5ng の TGF-beta1 を、0.1cc の PBS を担体として経皮的に 27G の注射針で投与した。II 群では 0.1cc の PBS のみ投与した。III 群では何も投与しなかった。各動物は、外固定を行わずケージ内で飼育した。尚、左膝蓋腱を無作為に 10 羽抽出し正常対照 N 群とした。6 週で屠殺し、膝関節を摘出し、8 羽を生体力学的評価に、2 羽を組織学的評価に供した。生体力学的評価では、膝蓋腱長と全体の断面積を光学的に計測した後、手術時に残したナイロン糸マーカーを基準に内側、中央、外

側に分離し、各部の内外側 1/3 を切除した膝蓋骨—軟組織—脛骨複合体を作成し、おのこの Tangent modulus, 引張強度, 破断ひずみを video dimension analyzer を用いた引張試験にて計測した。また、組織学的評価として、線維芽細胞密度を測定した。

膝蓋腱の長さは各群(I群;  $25.2 \pm 4.7$ , II群;  $24.6 \pm 3.2$ , III群;  $25.6 \pm 3.5$ mm)ともN群( $20.4 \pm 1.2$ mm)に比較し有意に長くなっていたが、各群間には有意差はなかった。また、膝蓋腱全体の断面積もN群( $18.5 \pm 6.2$ cm<sup>2</sup>)に比較し各群(I群;  $28.9 \pm 11.0$ , II群;  $29.8 \pm 8.0$ , III群;  $31.7 \pm 9.1$ cm<sup>2</sup>)とも有意に大きくなっていたが、各群間には有意差はなかった。I群の再生組織の Tangent modulus( $280.9 \pm 82.3$ MPa)は、II群( $144.4 \pm 58.9$ MPa)及びIII群( $137.8 \pm 51.1$ MPa)のそれよりも有意の高値を示した。II群及びIII群間に有意差はなかった。周囲の腱組織に関しては、各群間に有意差はなかった。また、各群ともN群( $795.4 \pm 97.6$ MPa)に比較すると再生組織も周囲の腱組織も有意に低値だった。引張強度に関しても、I群( $17.0 \pm 3.8$ MPa)はII群( $12.4 \pm 2.6$ MPa)及びIII群( $12.3 \pm 2.9$ MPa)のそれより有意に高値であった。破断ひずみは、I群で小さい傾向だったが、各群間に有意差はなかった。組織学的には、N群に比較し各群とも再生組織の crimp pattern は乱れており、細胞数の増加が認められた。線維芽細胞密度はN群に比較し再生組織、周囲の腱組織とも各群で有意に高値であったが、各群間には有意差はなかった。

本研究において、time0 における TGF-beta1 の投与が膝蓋腱中央切除後に再生する線維性組織の Tangent modulus と引張強度を有意に向上させた。広範な欠損を有する腱損傷において、ある成長因子を使った革新的な治療を開発するための重要な情報を提供することができる。また、*in vivo* におけるこの研究結果は、*ex vivo* における腱組織形成のための tissue engineering に TGF-beta1 が有用性であることを示唆した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 本 有 平

副 査 教 授 三 浪 明 男

副 査 教 授 安 田 和 則

## 学位論文題名

### The effect of transforming growth factor-beta on mechanical properties of the fibrous tissue regenerated in the patellar tendon after resecting the central portion

(Transforming growth factor-beta の投与が膝蓋腱中央切除部に再生する線維性組織の力学的特性に与える効果)

膝蓋腱中央 1/3 は、靭帯再建の材料としてよく用いられるが、自家膝蓋腱採取部位には線維性組織が再生されることが臨床的にも実験的にも報告されている。これは、*in vivo* における腱再生のメカニズムを研究するための重要なモデルである。家兎モデルによる再生線維性組織の生体力学的特性の変化を報告した研究で、再生組織の引張強度は6週で正常膝蓋腱の約32%、24週でも約64%と、生体力学的成熟は従来に想像されていたほど早いものではないことが明らかとなった。この再生組織の成熟を時間的・強度的に促進させるサイトカインを明らかにすることは、腱・靭帯損傷の治療に再生工学・組織工学を応用するための有用な情報が与えられると考えられる。一方、移植腱や損傷靭帯において TGF-beta の投与が生体力学的特性を向上させるという報告が散見されるが、transforming growth factor B1 (TGF-B1)を投与して再生組織の強度を促進させる研究はこれまでなかった。そこで、申請者は TGF-B1 は膝蓋腱中央切除後に再生される線維性組織の力学的特性に与える効果を調べた。

実験には、日本白色家兎30羽を用いた。右膝蓋腱中央部に幅3mm、長さ10mmの矩形の欠損を鋭的に作成し、その4隅に5-0ナイロン糸でマーカを残し、創を縫合した後、無作為に10羽ずつ3群に分けた。I群ではこの欠損部に5ngのTGF-B1を、0.1ccのPBSを担体として経皮的に27Gの注射針で投与した。II群では0.1ccのPBSのみ投与した。III群では何も投与しなかった。各動物は、外固定を行わずケージ内で飼育した。尚、左膝蓋腱を無作為に10羽抽出し正常対照N群とした。6週で屠殺し、膝関節を摘出し、8羽を生体力学的評価に、2羽を組織学的評価に供した。生体力学的計測には、膝蓋腱長をノギスで、また全体の断面積を非接触的方法で計測した後、手術時に残したナイロン糸マーカを基準に内側、中央、外側に分離し、各部の内外側1/3を切除した膝蓋骨-軟組織-脛骨複合体を作成し、万能試験機を用いて、20mm/minの速度で軟組織実質部を破断させた。腱実質部の歪みの計測は video dimension analyzer を用いた。応力ひずみ曲線を作成し、

Tangent modulus, 引張強度, 破断ひずみを求めた. N 群については, 正常膝蓋腱中央 1/3 を同様の手技でダンベル状に形成し, 計測した. また, 組織学的評価として, 線維芽細胞密度を測定した. 結果として, 膝蓋腱の長さは各群とも N 群に比較し有意に長くなっていたが, 各群間には有意差はなかった. また, 膝蓋腱全体の断面積も N 群に比較し各群とも有意に大きくなっていたが, 各群間には有意差はなかった. I 群の再生組織の Tangent modulus は, II 群及び III 群のそれよりも有意の高値を示した. II 群及び III 群間に有意差はなかった. 周囲の腱組織に関しては, 各群間に有意差はなかった. また, 各群とも N 群に比較すると再生組織も周囲の腱組織も有意に低値だった. 引張強度に関しても, I 群は II 群及び III 群のそれより有意に高値であった. 破断ひずみは, I 群で小さい傾向だったが, 各群間に有意差はなかった. 組織学的には, N 群に比較し各群とも再生組織の crimp pattern は乱れており, 細胞数の増加が認められた. 線維芽細胞密度は N 群に比較し再生組織, 周囲の腱組織とも各群で有意に高値であったが, 各群間には有意差はなかった. この実験は, time0 における TGF- $\beta$ 1 の投与が膝蓋腱中央切除後に再生する線維性組織の生体力学的特性を向上させたことを示している.

口頭発表にあたり, 三浪教授からは TGF- $\beta$  を選択した理由について, 山本教授からは TGF- $\beta$  の初回一回投与を選択した理由や, 線維芽細胞密度に有意差がなかったにもかかわらず力学的特性が向上した理由について, 安田教授からは臨床応用の可能性に関して質問があった. これらに対して申請者は自己の研究結果と文献的知識に基づいて概ね妥当な回答を行った.

この論文は, 腱の広範な欠損部に再生する線維性組織の生体力学的強度を, 成長因子を使って向上させた初めての研究であり, 今後あるサイトカインを使った革新的な治療を開発するための重要な情報を提供するものと期待される.

審査員一同は, これらの成果を高く評価し, 大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した.