

学 位 論 文 題 名

Effects of administration of transforming growth factor
(TGF)-beta 1 and anti-TGF-beta 1 antibody on the
mechanical properties of the stress-shielded patellar tendon

(TGF- β 1 および抗 TGF- β 1 抗体の投与が除負荷を受けた
膝蓋腱の力学的特性に与える効果)

学位論文内容の要旨

【はじめに】

生体内における腱・靭帯組織は組織固有の張力の下で存在し、種々の力学的環境の変化に鋭敏に反応し、その力学的特性を変化させることが知られている。Yamamoto らは関節を不動化せずに膝蓋腱を除負荷することが可能な除負荷手法を開発し、除負荷が膝蓋腱の力学的特性を早期かつ顕著に劣化させることを報告した。しかしながら、除負荷による膝蓋腱の力学特性の劣化の機序はいまだ不明であり、除負荷による腱・靭帯組織の力学的劣化の機序を明らかにすることは生体軟組織研究領域においてきわめて重要な課題の1つである。近年、Uchida らはYamamoto らの除負荷手法を rat モデルに応用し、除負荷が膝蓋腱に存在する線維芽細胞における transforming growth factor (TGF- β) のタンパク発現を亢進させることを免疫組織化学的に明らかにした。一方、TGF- β は線維芽細胞のコラーゲン合成を促進させる作用を有し、さらに組織創傷の治癒促進作用、壊死後靭帯組織における力学的劣化の抑制作用を有することが確認されている。以上の知見は除負荷による膝蓋腱の力学特性の劣化の機序に TGF- β が関与している可能性を示唆するものである。したがって、研究者はこの除負荷による膝蓋腱の力学的劣化における TGF- β 発現の意義を解明するため、以下の2つの仮説を立てた。第1の仮説として「外因性の TGF- β 1 投与が除負荷による膝蓋腱の力学的特性の劣化を有意に抑止する」、第2の仮説として「外因性の TGF- β 1 中和抗体投与は除負荷による膝蓋腱の力学的特性を有意に低下させる」。本研究の目的は以上の2つの仮説を検証することである。

【材料および方法】

日本白色家兎 40 羽を用いた。第1の仮説を検証することを目的として、16 羽を使用した。これら動物の右膝蓋腱に対し、Yamamoto らの除負荷手法を加えた後、以下の2群に分けた。S 群ではリン酸緩衝液 (PBS) 0.2ml のみを、T 群では PBS0.2ml に溶解した 4ng のヒトリコミニナント TGF- β 1 を膝蓋腱周囲に投与した。術後は外固定を行わず、術後3週で屠殺した。次に第2の仮説を検証することを目的として、残りの24 羽を使用した。これら動物に対し右膝蓋腱に同様の処置を施した後、以下の3群に分けた。I 群には PBS0.2ml のみを、II 群では PBS0.2ml に溶解した 50 μ g の非感作マウス IgG を、III 群では、PBS0.2ml に溶解した 50 μ g モノクローナル抗 TGF- β 1 抗体を膝蓋腱周囲に投与した。術後は同様に飼育し、3週で屠殺した。各群8羽中6羽を力学試験へ、2羽を組織学的観察に供した。なお無処置の左

膝蓋腱を正常対照に用いた。力学特性の検討には area micrometer を用い、0.12MPa の圧縮応力を 2 分間与えた後に断面積を計測し、膝蓋腱の長さは 0.5N の張力下でノギスを用いて計測した。形状計測の後に膝蓋骨 - 膝蓋腱 - 脛骨複合体を特製 jig を用いてテンシロン型万能試験機に設置し、引張速度 20mm/分にて 1 軸引張試験を行った。腱実質部のひずみは、video dimension analyzer を用いて非接触に膝蓋腱実質部の局所伸びを計測し算出した。これらの結果から膝蓋腱の応力 - ひずみ曲線を作成し、引張強度、弾性率および破断ひずみを求めた。統計学的検討には 1 元配置分散分析および Fisher's PSLD test による多重比較をそれぞれ行った。なお、有意水準は 5% とした。

【結果】

(1) 除負荷膝蓋腱における外因性 TGF- β 1 投与の効果：断面積および長さに関しては、2 群間に有意差を認めなかった。膝蓋腱の力学的特性に関しては、S 群および T 群において弾性率はそれぞれ 95 ± 23 MPa (平均 \pm 標準偏差) および 173 ± 56 MPa であり、T 群は S 群より有意に高値を示した。S 群および T 群の引張強度の平均値はそれぞれ 5.4 ± 1.2 MPa および 6.9 ± 1.6 MPa と T 群は S 群より高値を示したが、有意の差は認められなかった。なお、引張試験における破断様式はすべて膝蓋腱実質部での断裂であった。ヘマトキシリン・エオジン染色による組織学的観察においては S 群、T 群ともコラーゲン線維の crimp pattern の振幅増加ならびにコラーゲン線維の分節化が認められ、細胞数の著しい増加も認められたが、これら所見に関して両群間に有意な差異は認めなかった。(2) 除負荷膝蓋腱における抗 TGF- β 1 抗体投与の効果：断面積および長さに関しては、有意の群間差を認めなかった。膝蓋腱の力学的特性に関しては、I 群、II 群、III 群で弾性率がそれぞれ 98 ± 27 MPa、 102 ± 45 MPa、 52 ± 25 MPa であり、III 群は I および II 群と比べて有意に低値であった。I 群、II 群、III 群の引張強度はそれぞれ 5.3 ± 0.6 MPa、 5.4 ± 1.6 MPa、 3.5 ± 0.5 MPa であり、III 群は I および II 群と比べて有意に低値であった。なお、引張試験における破断様式はすべて膝蓋腱実質部での断裂であった。組織学的観察においては 3 群ともコラーゲン線維の crimp pattern の振幅増加ならびにコラーゲン線維の分節化が認められ、細胞数の著しい増加も認められたが、これら所見に関して両群間に有意な差異は認めなかった。

【考察】

本研究では外因性 TGF- β 1 の局所投与は除負荷膝蓋腱の引張強度に関しては有意の効果は認めないものの、膝蓋腱の弾性率を有意に増加させた。一方、抗 TGF- β 1 抗体の局所投与は除負荷膝蓋腱の弾性率および引張強度をともに有意に低下させた。以上の所見は TGF- β 1 は除負荷による膝蓋腱の力学的劣化に関与していることを示唆するものである。Marui らは TGF- β 1 は線維芽細胞の collagen 合成を促進するとともに、線維芽細胞における非コラーゲンタンパクの合成を促進していることを報告している。したがって、TGF- β 1 投与は除負荷した膝蓋腱の線維芽細胞のコラーゲンを含めたマトリクス合成を促進し、膝蓋腱の力学特性に影響を与えた可能性がある。一方、抗 TGF- β 1 抗体の局所投与は除負荷された膝蓋腱の力学特性の劣化を有意に促進させていた。Uchida らは除負荷が膝蓋腱に存在する線維芽細胞における TGF- β 発現を亢進させることを報告した。したがって、抗 TGF- β 1 抗体の局所投与が除負荷により膝蓋腱線維芽細胞から分泌された TGF- β を中和し、その結果、膝蓋腱の力学劣化を促進させたことが示唆され、Uchida らが報告した除負荷における膝蓋腱線維芽細胞の TGF- β 過剰産生は膝蓋腱の力学劣化の原因ではなく、むしろ膝蓋腱の力学劣化に対する二次的修復機転である可能性が高いと考えられた。以上より本研究により得られた知見は除負荷による膝蓋腱の力学特性の劣化に TGF- β 1 が関与していることをはじめて明らかにしたという学術的意義とともに、将来的に長期間の臥床、関節の不働化、荷重制限などにより惹起される腱・靭帯組織の力学劣化を治療する上で有用な指針を与えるという高い臨床的意義を有するものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 浪 明 男

副 査 教 授 山 本 有 平

副 査 教 授 安 田 和 則

学 位 論 文 題 名

Effects of administration of transforming growth factor (TGF)-beta 1 and anti-TGF-beta 1 antibody on the mechanical properties of the stress-shielded patellar tendon

(TGF- β 1および抗 TGF- β 1抗体の投与が除負荷を受けた膝蓋腱の力学的特性に与える効果)

力学的負荷減少による腱・靭帯組織の力学特性の劣化の機序の解明は生体軟組織研究領域において極めて重要な課題の1つである。しかしその機序にはいまだ不明の問題が山積している。近年、UchidaらはYamamotoらが開発した除負荷法をratモデルに応用し、除負荷が膝蓋腱に存在する線維芽細胞におけるTGF- β のタンパク発現を亢進させることを免疫組織化学的に明らかにした。研究者はこの除負荷膝蓋腱の力学的劣化におけるTGF- β 発現の意義を解明する一助として、以下の2つの仮説を立て、Yamamotoらの家兎モデルを用いてその仮説を検証した。第1仮説は「外因性TGF- β 1投与が除負荷による膝蓋腱の力学的特性の劣化を有意に抑止する」であり、第2仮説は「外因性抗TGF- β 1中和抗体投与は除負荷による膝蓋腱の力学的特性を有意に低下させる」であった。

第1仮説を検証するために第1実験として家兎16羽の右膝蓋腱に対し除負荷手法を加えた後、以下の2群に分けた。S群ではPBS0.2mlのみを、T群では同量のPBSに溶解した4ngのrhTGF- β 1を膝蓋腱周囲に投与した。次に第2の仮説を検証するために第2実験として24羽の右膝蓋腱に同様の処置を施した後、以下の3群に分けた。I群にはPBS0.2mlのみを、II群では同量のPBSに溶解した50 μ gの非感作マウスIgGを、III群では、同量のPBSに溶解した50 μ gモノクローナル抗TGF- β 1中和抗体を膝蓋腱周囲に投与した。実験1、2ともに術後は外固定を行わず、術後3週で屠殺して各群8羽中6羽を力学試験、2羽を組織学的観察に供した。断面積測定はarea micrometerを用い、0.12MPaで2分間の圧縮応力下で測定した。膝蓋腱長は0.5Nの張力下でノギスにて計測した。形状計測後に膝蓋骨-膝蓋腱-脛骨複合体を万能試験機に設置し、20mm/分の速度で引張試験を行った。腱実質部のひずみはvideo dimension analyzerを用いて非接触に行い、これらの結果から膝蓋腱の引張強度、弾性率および破断ひずみを求めた。統計学的検討には1元配置分散分析を用い、多重比較にはFisher's PLSD testを用いた。有意水準は5%とした。

第1実験の結果では、SおよびT群の弾性率はそれぞれ95MPaおよび173MPaであり、T群はS群より

有意に高値を示した。S および T 群の引張強度はそれぞれ 5.4MPa および 6.9MPa であり、T 群は S 群より高値を示したが、有意差は認めなかった。第 2 実験の結果では、I、II、および III 群で弾性率がそれぞれ 98MPa、102MPa、および 52MPa であり、III 群は I および II 群と比べ有意に低値であった。I、II、III 群の引張強度はそれぞれ 5.3MPa、5.4MPa、3.5MPa であり、III 群は I および II 群と比べ有意に低値であった。実験 1、2 ともに、断面積および膝蓋腱長に関しては各群間に有意差を認めなかった。組織学的観察では実験 1、2 ともに各群でコラーゲン線維の crimp pattern の振幅増加ならびに分節化を認め、また細胞数の著しい増加も認めたが、これら所見に関しては各群間に有意な差異を認めなかった。

本研究では、TGF- β 1 の局所投与は除負荷膝蓋腱の弾性率を有意に増加させ、また抗 TGF- β 1 中和抗体の局所投与は除負荷膝蓋腱の弾性率および引張強度をともに有意に低下させることが示された。以上の所見から、TGF- β 1 投与は除負荷膝蓋腱内の線維芽細胞におけるマトリクス合成を促進し、また抗 TGF- β 1 中和抗体投与は除負荷膝蓋腱線維芽細胞から分泌される TGF- β を中和したために、腱力学的特性劣化の抑制あるいは促進が起こったと考えられた。

口頭発表の後、副査の山本有平教授からは組織学的観察の結果の解釈および TGF- β 投与が腱周囲組織に与える影響などについて、安田和則教授からはこの実験モデルを使った理由およびこの結果の臨床への貢献の方向性などについて、主査の三浪明男教授からは TGF- β 1 や中和抗体の種特異性およびその生体内濃度の経時的変化などについて質問があった。これらに対して申請者は、自己の研究結果と文献的考察に基づいて概ね妥当な回答を行った。

本研究は外因性 TGF- β 1 および抗 TGF- β 1 中和抗体の投与が、除負荷を受けた膝蓋腱の力学的特性に与える効果を初めて明らかにしたものであり、この成果は、除負荷を受けた膝蓋腱の線維芽細胞に過発現する TGF- β の意義を示唆するとともに、今後の線維芽細胞を扱う組織工学の発展に重要な情報を与えた。

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合わせ、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。