

学位論文題名

Ex vivo supplementation of TGF-beta1 enhances the fibrous tissue regeneration effect of synovium-derived fibroblast transplantation in a tendon defect: a biomechanical study

(培養中における TGF-beta1 の添加は、膝蓋腱欠損部への自家滑膜由来線維芽細胞移植の線維性組織の再生効果を促進させる：生体力学的研究)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】再生医療技術を基礎とした細胞治療は種々の組織欠損に対する有用な治療法のひとつとして注目されている。これらの細胞治療による効果は細胞の種類や培養環境に影響されると考えられる。しかし、ex vivo における培養環境が細胞治療の効果に与える影響はほとんど報告されていない。一方、TGF-beta1 は線維芽細胞の基質合成を促進することから、我々は TGF-beta1 の添加という培養環境の効果に注目し、自家移植腱周囲への滑膜由来線維芽細胞移植で培養中に TGF-beta1 を添加すると、移植腱の生体力学的特性を有意に向上させることを報告した。しかし、TGF-beta1 の添加による腱欠損部への細胞移植の効果に関する研究はない。本研究の目的は家兎膝蓋腱中央部欠損モデルを用い、培養中における TGF-beta1 の添加が、腱欠損部への自家滑膜由来線維芽細胞移植の線維性組織の再生効果に与える影響を検討することである。

【材料と方法】実験動物として日本成熟雌白色家兎 30 羽を用いた。左膝より滑膜組織を採取し、我々が過去に報告した方法に従い、線維芽細胞を単離し培養した。滑膜組織の採取 2 週後に右膝蓋腱実質中央部に幅 3 mm、全長 10 mm の矩形の全層欠損を鋭的に作製し、その 4 隅に 5-0 ナイロン糸で結節縫合しマーカーとして残した。これらの家兎を無作為に以下の 3 群各 10 羽ずつに分けた。A 群は対照群として PBS 0.1ml のみを膝蓋腱実質中央欠損部に投与した。B 群は前述の培養細胞(1.5×10^6 cells)を浮遊させた PBS 0.1ml を膝蓋腱欠損部に移植した。C 群は ex vivo で移植 2 日前に 10 ng/ml rh-TGF-beta1 を添加し培養した細胞を浮遊させた PBS 0.1ml を B 群と同様に移植した。全家兎を移植 6 週後に屠殺し、膝関節を摘出し、各群 8 羽は生体力学的評価を、2 羽に組織学的観察を行なった。

生体力学的評価は我々が過去に報告した方法に従い、膝蓋腱全長と非接触的に膝蓋腱全体の断面積を計測した。以上の形状計測後、手術時に残したナイロン糸マーカーより再生組織を同定し、膝蓋骨-再生組織-脛骨複合体を作製した。本複合体に対し一軸引張試験を毎分 20 mm の引張速度で行ない、膝蓋腱欠損部に再生した線維性組織の弾性係数、引張強度および破断ひずみを算出した。なお、再生組織実質部の引張試験中のひずみは video dimension analyzer を用いて非接触的に計測した。

組織学的では膝蓋腱矢状面での組織切片を HE 染色した組織標本を作製し観察した。

統計学的には再生組織の生体力学的特性に関する各パラメーターに対して一元配置分散解析を用いて有意の群間差を検討後、Fisher 検定により post-hoc で群間比較を行なった。

なお、有意水準は5%とした。

【結果】膝蓋腱全長はA群:20.4±2.0 mm、B群:22.3±3.0 mm、C群:21.0±1.4 mmであり、有意の各群間差を認めなかった。また、膝蓋腱全体の断面積はA群:19.1±6.5 mm²、B群:23.9±8.1 mm²、C群:24.6±4.7 mm²であり、有意の各群間差を認めなかった。再生組織の生体力学的特性は弾性係数および引張強度が3群間に有意の各群間差を認めた。弾性係数はC群の再生組織が271.4 MPaであり、B群の152.3 MPaよりも有意に高値であった(p=0.049)。一方、B群の弾性係数はA群の320.9 MPaよりも有意に低値であったものの(p=0.008)、C群とA群の間に有意差は認められなかった。引張強度はC群の再生組織が14.0 MPaであり、B群の8.7 MPaよりも有意に高値であった(p=0.041)。また、B群およびC群の引張強度はA群の19.3 MPaよりも有意に低値であった。なお、破断ひずみは有意の各群間差を認めなかった。

組織学的観察では各群とも著明な細胞浸潤が認められ、これらの細胞浸潤に3群間で明らかな差は認められなかった。再生組織の血管形成はB群およびC群でA群に比較して顕著な傾向が認められた。

【考察】本研究と同じ家兎膝蓋腱中央部欠損モデルを用いた過去の我々の生体力学的研究によれば、再生組織の引張強度は切除6週後で正常膝蓋腱の約32%と十分な強度を有していなかった。さらに、我々は腱欠損部にin vivoでTGF-beta1を直接投与し、その効果を力学的に評価した。その結果、TGF-beta1の直接投与6週後の再生組織の引張強度が有意に増加することを明らかにした。しかし、TGF-beta1の直接投与は関節癒着や関節症変化を惹起することなどの関節周囲組織への悪影響の危険性があった。そこで、本研究は自家滑膜由来線維芽細胞移植のex vivoにおけるTGF-beta1の添加という関節周囲組織への悪影響の危険性が比較的低いと考えられる手法の効果を検討した。その結果、移植2日前の培養中におけるTGF-beta1の添加は、腱欠損部への細胞移植後に再生した線維性組織の引張強度と弾性係数を有意に増加させることを明らかにした。これらの所見からTGF-beta1の添加は、細胞移植の再生効果を促進させると考えられた。

本研究におけるTGF-beta1の添加が細胞移植の再生効果に与えた機序については、TGF-beta1の血中内半減期を考えた場合、本研究で培養中に添加したTGF-beta1が移植後も残存し再生組織へ直接影響した可能性は低いと考えられる。一方、TGF-beta1は線維芽細胞内でコラーゲン合成および接着分子を含めた非コラーゲン基質合成を促進することが知られており、TGF-beta1の添加が、移植細胞の基質合成を促進し腱欠損部への接着性を増強した可能性がある。また、TGF-beta1は線維芽細胞のMMP発現を抑制することから、TGF-beta1の添加が移植後の周囲組織の培養線維芽細胞による基質分解を低減させた可能性もある。本研究は移植6週後と比較的短期の評価であることや再生した線維性組織の生物学的検討がされていないことなどの欠点を有している。さらに、腱欠損部への自家滑膜由来線維芽細胞移植後も移植細胞が生存していたかを検討していないことも課題と考えられる。しかし、ex vivoにおけるTGF-beta1の添加が、腱欠損部への細胞移植の線維性組織の再生効果に影響を与えるという極めて重要な情報を示した。

臨床との関連については、本研究は家兎モデルの実験であることから直接の言及は困難であるが、in vivoにおける細胞移植の効果が移植前の培養中におけるTGF-beta1の添加に影響されることを示した。従って、本研究は腱や靱帯再生のための細胞治療が成功するために移植前の培養環境が重要な一因であるという有用な知見を運動器における再生医療分野にもたらしたと考えられる。

【結論】家兎膝蓋腱中央部欠損モデルを用い、培養中におけるTGF-beta1の添加は、滑膜由来線維芽細胞による自家細胞移植が腱欠損部に再生する線維性組織の生体力学的特性に与える効果を、有意に促進させることを明らかにした。

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

Ex vivo supplementation of TGF- β 1 enhances the fibrous tissue regeneration effect of synovium-derived fibroblast transplantation in a tendon defect: a biomechanical study

(培養中における TGF- β 1の添加は、膝蓋腱欠損部への
自家滑膜由来線維芽細胞移植の線維性組織の再生効果を促進させる：
生体力学的研究)

再生医療技術を基礎とした細胞治療は種々の腱組織欠損に対する有用な治療法のひとつとして注目されており、これらの細胞治療による効果は細胞の種類や培養環境に影響される。しかし、ex vivo における培養環境が細胞治療の効果に与える影響を調べた研究はほとんど報告されていない。近年、線維芽細胞の基質合成を促進することが知られている TGF- β 1 の投与が移植腱の生体力学的特性を有意に向上させることが報告された。しかし、腱組織の細胞治療を企図した培養中における TGF- β 1 の添加が、その細胞の線維組織再生能に与える効果に関する研究はない。そこで申請者らは家兔膝蓋腱中央部欠損モデルを用い、TGF- β 1 を添加した自家滑膜由来線維芽細胞の移植が腱欠損部に再生する線維性組織の生体力学的効果に与える影響を検討した。

実験に日本成熟雌白色家兔 30 羽を用いた。左膝より滑膜組織を採取し、線維芽細胞を単離し培養した。滑膜組織の採取 2 週後に右膝蓋腱実質中央部に幅 3 mm、全長 10 mm の矩形の全層欠損を鋭的に作製し、その 4 隅にナイロン糸で結節縫合しマーカーとして残し、無作為に 3 群各 10 羽ずつに分けた。A 群は対照群として PBS 0.1ml のみを腱欠損部に投与した。B 群は前述の培養細胞 (1.5×10^6 cells) を浮遊させた PBS 0.1ml を移植した。C 群は ex vivo で移植 2 日前に 10 ng/ml rh-TGF- β 1 を添加し培養した細胞を、浮遊させた PBS 0.1ml を B 群と同様に移植した。全家兔を移植 6 週後に屠殺し、膝関節を摘出し、各群 8 羽は生体力学的評価を、2 羽に組織学的観察を行なった。生体力学的評価は膝蓋腱全長と全体の断面積を計測後、手術時に残したマーカーより再生組織を同定し、膝蓋骨－再生組織－脛骨複合体を作製し、万能材料試験機を用いて、毎分 20 mm の引張速度で再生組織を破断させた。再生組織実質部の引張試験中のひずみは video dimension analyzer を用いて非接触的に計測した。応力ひずみ曲線を作成し、弾性係数、引張強度および破断ひずみを算出した。組織学的では膝蓋腱矢状面での組織切片を HE 染色した組織標本を作製し観察した。統計学的には一元配置分散解析を用い、有意水準は 5% とした。結果は膝蓋腱全長および全体の断面積に有意の各群間差を認めなかった。再生組織の生体力学的特性は弾性係数および引張強度が 3

群間に有意の各群間差を認めた。弾性係数はC群がB群よりも有意に高値であった。B群はA群よりも有意に低値であったものの、C群とA群の間に有意差は認めなかった。引張強度はC群がB群よりも有意に高値であった。また、B群およびC群はA群よりも有意に低値であった。なお、破断ひずみは有意の各群間差を認めなかった。組織学的観察では各群とも著明な細胞浸潤が認められ、これらの細胞浸潤に3群間で明らかな差は認められなかった。再生組織の血管形成はB群およびC群でA群に比較して顕著な傾向が認められた。本研究は家兎膝蓋腱中央部欠損モデルを用い、培養中におけるTGF- β 1の添加は、滑膜由来線維芽細胞による自家細胞移植が腱欠損部に再生する線維性組織の生体力学的特性に与える効果を、有意に促進させることを明らかにした。

質疑応答にあたり、副査山本教授から、移植された自家滑膜由来線維芽細胞が家兎膝蓋腱欠損部に再生した線維性組織に与えた効果の発現機序、家兎膝蓋腱欠損部への自家滑膜由来線維芽細胞移植の効果と従来の研究報告にある自家骨髄由来間葉系幹細胞移植の効果との差、などについての質問があった。次いで主査三浪から過去に報告のある家兎膝蓋腱欠損部へのTGF- β 1直接投与の研究に対する本細胞治療の研究の意義、細胞培養中に他のCytokineを投与した場合の効果などについての質問があった。次いで副査安田教授から本研究における家兎膝蓋腱中央部欠損モデルの意義、この研究を踏まえてその次の研究計画などについての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自己の研究結果や文献的知識を引用し、概ね妥当に回答した。

本研究は、腱組織再生のための細胞治療において、培養中におけるTGF- β 1の添加が腱欠損部に再生する線維性組織の生体力学的特性の向上に有用である可能性を強く示唆し、この分野の今後の細胞治療の進歩に有用な情報を与えた。

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。