

学位論文題名

マクロファージ遊走阻止因子遺伝子の欠損が
膝内側側副靱帯損傷の治癒に与える影響

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

マクロファージ遊走阻止因子 (Macrophage migration inhibitory factor : MIF) は、活性型Tリンパ球より分泌されるリンフォカインとして報告され(引用)、マクロファージを炎症部位に留まらせ、炎症性サイトカインの発現を惹起する液性因子である。近年、MIFは、組織損傷の修復や形成に関与することが明らかとなっている。しかし、MIF遺伝子の欠損が、膝内側側副靱帯(MCL)損傷後の治癒過程で生じる線維組織の力学的特性に与える影響を明らかにすることである。

【材料と方法】

1. MCL実質部損傷モデルの作製

実験動物として10週齢の雌BALB/Cマウス72匹を使用した。Wild-type(WT群)とMIF-KOマウス(KO群)をそれぞれ6匹ずつ用いた。MCL損傷の作製は、Wrightらの方法に従って行った。右膝関節内側に1cmの縦切開を加え、MCLを展開し、MCL実質部を注意深く関節包より分離し、大腿脛骨関節の高さで鋭的に全層切離した。術後は外固定を行わずに制限を設けずに飼育した。

2. 力学的試験

MCL損傷作製後4週で両群ともに6匹ずつ屠殺し、引っ張り試験を行った。屠殺後、採取した標本は、MCL以外の軟部組織を全て取り除き、直径6mmのアルミニウム製ポッドに大腿骨および脛骨をPolymethyl methacrylate resinを用いて包埋した。MCLの断面積の計測は、digital caliper(Mitutoyo社製)を用いて長方形に近似して測定した。引っ張り試験はYamamotoらの報告した方法に従い、Micro-tensile testerを用いて行った。大腿骨-MCL-脛骨(FMT)複合体は、Micro-tensile testerに連結された特製の把持具に固定し膝屈曲45度でMCLが引っ張り方向に一致する位置で設置し、FMT複合体に対して0.01Nのpreloadを与え、preconditioningとして2%ひずみを10回与えた後、10 mm/minのCross-head速度(UPD566TG30-A, Orientatal Motor, Tokyo, Japan)にて破断にいたるまで引っ張り試験を行った。靱帯実質部のひずみの計測は、Video dimension analyzer(HTV-V、浜松フォトニクス、浜松)とCCDカメラ(WV-BD400、パナソニック、大阪)を用いて計測した。

3. RT-PCR

WT群、KO群の両群で両側後肢に対しMCL損傷作製後3, 7, 14, 28日目にそれぞれ3匹ずつ、またコントロールとして手術操作を加えていないものを両群より3匹ずつ屠殺し、両側のMCLを採取し、治癒組織のMIF、TNF- α 、VEGF、MMP-2、MMP-9、MMP-13のmRNAの遺伝子発現をPT-PCRにより定量的に評価した。RNA抽出はRNeasyミニキット(Qiagen社製)を使

用して行われ、RT-PCR は、SYBR SYBR Premix Ex Taq™ II (TakaraBio) を用いて、Thermal Cycler Dice TP800 (TakaraBio) を使用し行われた。これらの結果は、Thermal Cycler Dice Real Time System ソフトウェアプログラムを使用して評価された。GAPDH プライマーをデータの標準化に使用した。

4. 組織学的評価

MCL 損傷作製後 7, 14, 28, 56 日でそれぞれ 3 匹ずつ、コントロールとして手術操作を加えていないもの 3 匹ずつを両群より屠殺し治癒過程にある MCL を摘出し、HE 染色を行った。組織標本を用いて、治癒過程にある MCL の厚み、血管数、細胞密度の変化を経時的に、かつ定量的に評価した。また MCL 両端で確認できる血管数も測定した。

5. 統計学的評価

両群間の比較には t-test、ANOVA を使用し、有意水準を 5 % とした。

【結果】

1. 力学的試験

断裂形態は全て腱実質部での断裂であった。両群の MCL の力学特性を比較するため、我々はまず、健側の損傷していない MCL の構造特性と材料特性を測定した。両群の健側の MCL の力学特性に有意差は認めなかった。この結果により両群の MCL 損傷後の治癒組織の力学特性は直接比較することが可能であることが分かった。次に我々は損傷後 28 日目の靱帯の治癒組織の力学特性を WT 群と MIFKO 群で比較を行った。構造特性に関しては、最大破断荷重は MIFKO 群は WT 群に比し、有意に低値を認めた (WT; $4.71 \pm 0.94\text{N}$, MIFKO; $2.81 \pm 0.99\text{N}$, $p=0.0065$)。剛性も MIFKO 群は WT 群に比し、有意に低値を認めた (WT; $4.44 \pm 0.26\text{N/mm}$, MIFKO; $2.83 \pm 0.74\text{N/mm}$, $p=0.0005$)。材料特性に関しても、引張強度で MIFKO 群は WT 群に比し、有意に低値を認め (WT; $33.15 \pm 11.34\text{MPa}$, MIFKO; $11.06 \pm 4.47\text{MPa}$, $p=0.013$)、接線弾性係数でも MIFKO 群は WT 群に比し、有意に低値を認めた (WT; $339.90 \pm 77.19\text{MPa}$, MIFKO; $116.38 \pm 15.92\text{MPa}$, $p<0.0001$)。最後に我々は全てのパラメーターにおいて損傷側の値を、健側の値で除し、患健側比を測定した。全てのパラメーターにおいて MIFKO 群は WT 群に比し、有意に低値を認め ($p=0.0079$, $p=0.0105$, $p=0.0027$, and $p=0.0003$, respectively)。

2. RT-PCR

両群の治癒組織の遺伝子発現に関しては、WT 群において損傷後 3 日目で有意な MIF の mRNA の上昇を認めた ($p=0.0101$)。MMP-2 の mRNA の遺伝子発現は、損傷後 14 日まで両群ともに次第に上昇するが、損傷後 28 日目では MIFKO 群は WT 群と比較し有意に低値を認めた ($p=0.014$)。MMP-13 の mRNA 遺伝子の発現レベルは WT 群では損傷後 7 日目でピークを迎える。この時点での MIFKO 群の MMP-13 の mRNA の発現は WT 群と比し、有意に低値であった ($p<0.0001$)。

(3.3) 組織学的検討

WT 群においては損傷部位の厚みと細胞密度の増加は損傷後 14 日目まで続き、損傷後 28, 56 日目には次第にその値は減少した。MIFKO 群は、損傷部位付近の厚み、細胞密度は損傷後 14 日目に上昇し、損傷後 28 日目になっても上昇したままであった。さらに組織標本を用いて行った量的評価では、治癒組織の厚みと細胞密度の上昇は WT 群で損傷後 7 日目でピークを迎えるのに対し、MIFKO 群では損傷後 14 日目でピークを迎えた。これらのパラメーターに関して、WT 群は損傷後 28, 56 日目ではほぼ正常のレベルまで低下するのに対し、MIFKO 群は損傷後 56 日目になっても有意に WT 群に対し高値のままであった。組織の厚みに関しては、損傷後 28 日目で MIFKO 群は WT 群に対し、有意に高値を認めた (WT: $94.95 \pm 21.28 \mu\text{m}$, MIFKO; $233 \pm 4.95 \mu\text{m}$, $p<0.0001$)。細胞密度に関しては、損傷後 14, 28 日目で MIFKO 群は WT 群に対し、有意に高値を認めた ($p=0.0014$, $p=0.0084$)。治癒組織周囲にまばら新生血管を認めるが、これに関しても、損傷後 14 日目で MIFKO 群は WT 群に対し、有意に低値を認めた ($p=0.0073$)。

【考察】

力学的評価では MIFKO マウスで、正常マウスと比較し、損傷後 28 日目で有意に力学特性の低下を認めた。さらに、MIF ノックアウトマウスは損傷後 7 日目と 28 日目で MMP-2 と MMP-13 の遺伝子発現の有意な低下を認めた。組織学的評価でも MIF ノックアウトマウスでは、正常マウスと比較し、長期にわたり治癒組織は肥厚し、新生血管も少なく、細胞密度の増加を認めた。これらの結果から、MIF ノックアウトマウスの MCL 損傷後の治癒は遅延し、これは MMP-2 と MMP-13 の遺伝子発現の低下により起こったことが示唆された。

【結論】

MIF 遺伝子の欠損は MCL 損傷後の治癒を遷延させた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鐙 邦 芳

副 査 教 授 安 田 和 則

副 査 教 授 上 出 利 光

副 査 准教授 遠 山 晴 一

副 査 教 授 久 下 裕 司

学 位 論 文 題 名

マクロファージ遊走阻止因子遺伝子の欠損が

膝内側側副靱帯損傷の治癒に与える影響

損傷靱帯の治癒はスポーツ医学や生体力学の分野で最も大きな関心を集める焦点の一つであり、内側側副靱帯（以下 MCL）損傷は靱帯損傷の治癒を研究するモデルとして多く用いられてきた。靱帯の完全治癒には長期間を要するという事実は、臨床において大きな問題であり、多くの研究者たちは、靱帯損傷の治癒機転を促進するため、成長因子の投与、細胞治療、遺伝子治療などの方法を研究してきた。しかしながら、現時点で、損傷靱帯を機能的かつ形態学的に元の正常な状態に戻す臨床的治療法はいまだ開発されていない。マクロファージ遊走阻止因子（以下 MIF）は皮膚基底膜、眼球のレンズ、発育過程の脳等において、組織損傷後の細胞の増殖に重要な役割を示すことが知られている。しかし、MIF の皮膚創傷治癒における役割はいまだ議論の分かれるところであり、損傷靱帯の治癒過程での発現や役割について研究した報告はこれまで皆無である。

申請者が行った本研究の目的は、MIF遺伝子の欠損が膝内側側副靱帯（MCL）損傷後の治癒過程で生じる線維組織の力学的特性に与える影響を明らかにすることである。実験動物にはBALB/Cマウス72匹（Wild-type（WT群）およびMIF-KOマウス（KO群）それぞれ36匹）を使用した。MCL損傷の作製はWrightらの方法に従った。力学的試験にはMicro-tensile testerを用い、損傷後28日目における損傷部に形成された治癒組織の構造的および力学的特性を計測した。組織学的評価では7、14、28、56日目にMCLの厚み、血管数、細胞密度の変化を評価した。RT-PCR解析では3、7、14、28日目に治癒組織のMIF、TNF- α 、VEGF、MMP-2、MMP-9、MMP-13のmRNAの遺伝子発現を評価した。各時期においてWT群およびKO群を比較し、t-testおよびANOVAを用いて検定した。

その結果、力学的評価では損傷後 28 日目において、損傷 MCL 治癒組織の最大破断荷重、線形剛性、引張強度、および接線弾性係数が KO 群で有意に低値であった。組織学的評価では、WT 群を比べて KO 群の治癒組織は、厚みに関しては損傷後 28 日目で有意に高値を、新生血管に関しては 14 日目で有意に低値を、細胞密度に関しては 14 および 28 日目で有意に高値を認め、治癒の遅延を認めた。RT-PCR 解析では、WT 群においてのみ、損傷後 3 日目に有意な MIF mRNA の上昇を認めた。KO 群の MMP-13 mRNA 発現レベルは 7 日目で WT 群と比べ

て有意に低値であった。また KO 群の VEGF mRNA および MMP-2 mRNA 発現は、28 日目で WT 群と比べて有意に低値であった。TNF- α と MMP9 に関しては両群に有意差はなかった。

これらの結果は MIF 遺伝子の欠損は MCL 損傷後の治癒過程で生じる線維組織の構造的および力学的特性の正常化を遅延させることを示した。またその機序として、MIF 遺伝子の欠損は MMP-13 遺伝子発現の抑制を介して血管新生を抑制し、また MMP-2 遺伝子発現の抑制等も介して組織のリモデリングを障害することを示唆した。

口頭発表の後、副査の遠山准教授から、VEGF の発現と組織における血管数の関係、および他の MMP の測定の必要性、等について質問があった。次に副査の上出教授から、MIF が最も重要な作用をする時期、MIF 欠損によって引き起こされた生物学的カスケードが治癒組織の構造的および力学的特性へ与える効果の機序、MMP-2 と MMP-13 を分泌する細胞、等について質問があった。次に副査の安田教授から生体力学的計測の要となる断面積測定に関してこの研究で採用した方法と他の方法との差異、等について質問があった。最後に主査鑑より、断面積の計測高位と誤差、MCL と他の靱帯との差異、等について質問した。いずれの質問に対しても申請者は、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 MIF 遺伝子の欠損が線維組織再生による MCL 損傷の治癒を遅延させることを生体力学的および組織学的に明らかにした初の報告であり、さらにその MMP-2 および 13 遺伝子発現の抑制を介する機序を示して、今後の靱帯損傷の治癒を促進する新たな治療の開発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、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者は博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。