

博士論文

マウスアキレス腱症モデルにおける脂肪幹細胞を用いた細胞療法の有効性およびメカニズムの解析

國分 冴子

マウスアキレス腱症モデルにおける脂肪幹細胞を用いた
細胞療法の有効性およびメカニズムの解析

東京大学大学院医学系研究科

医学博士課程 外科学専攻

口腔顎顔面外科学分野

指導教員 星 和人

平成 28 年 4 月入学

國分冴子

要旨

腱症に対する脂肪幹細胞(ASCs)の治癒促進効果およびそのメカニズムを解明するため、マウスコラゲナーゼ誘導アキレス腱症モデルへのASCs移植実験を行った。誘導2週間後、4週間後に、コントロール群では軟骨様・骨様変性を示したが、ASC群ではコラーゲン線維が回復し、異所性骨化が有意に減少した。ASCsは移植2日後に腱実質腱鞘側、1週間後に周囲結合組織に存在したが、3週間後には消失した。誘導9日後のASC群ではIL-1 β 、GLUT1とCA9の発現が有意に減少し、VEGFとCD31陽性血管数は有意に増加した。ASCsはアキレス腱症の異所性骨化を抑制し、パラクライン作用による早期の炎症抑制および血管新生促進により腱修復を促すことが示唆された。

序文

アキレス腱のオーバークラスによる慢性障害は病変部位により腱付着部アキレス腱症(insertional Achilles tendinopathy)と非付着部アキレス腱症(non-insertional Achilles tendinopathy)に分類される[1]。

腱実質部に生じる非付着部アキレス腱症(以下アキレス腱症)は主にランニング競技のアスリートに起こり、疼痛や腫脹による機能障害や二次的損傷により早期引退に陥ることがある。また、一般患者にも発症するが、特に高齢者で罹患率が高く、歩行時の運動性低下や疼痛により ADL 低下をまねく。パラテノンに炎症を起こすアキレス腱周囲炎に対して、アキレス腱症は腱の変性および退行性変化が主な病態である。腱変性の要因には外的要因と内的要因がある。外的要因としては腱への過負荷があげられ、腱は外傷や慢性の負荷により微小断裂が起こり、その修復過程において腱の良好な修復が阻害され変性が生じると考えられている。一方、内的要因としては加齢、性別、体重や脂質異常症、糖代謝疾患などがある[2][3]。腱組織は細胞や血管に乏しく代謝活性が低いため、健全に治癒することが難しい[4][5]。

アキレス腱症の病理組織学的所見は炎症ではなく変性が中心である。特徴的

な所見としては、コラーゲン線維の破壊、細胞数増加、血管新生、軟骨変性や異所性骨化などの退行性変化があげられる。腱の変性は疼痛とも関連し、高度な変性により腱の力学強度が低下し、二次的損傷をきたすことが多い。

アキレス腱症の病態はいまだ不明な点が多く、理由のひとつとして臨床的には終末的な慢性期の病理組織しか得られないことがあげられる。病態解析には早期の腱症の病態を理解することは重要であるが、非侵襲的に組織を得ることはできない。病態の進行を経時的あるいは空間的に捉えるために、動物モデルの開発がすすめられてきた。アキレス腱症の動物モデル作製法はおもに物理学的誘導と化学的誘導の二種類がある。物理学的誘導モデルはおもにトレッドミルランニングを用いて腱のオーバーユース障害を引き起こすもので、ヒトでの発生機序と類似しているが、再現性が乏しく急性期の反応を捉えることが難しいという問題点がある[6]。これに対して化学誘導モデルは主にコラゲナーゼにより腱組織のコラーゲン線維の微細断裂を引き起こすことで、慢性期には物理学的誘導モデルと同等の所見を得られる。コラゲナーゼによる微細断裂はヒトでの発生機序とは異なるものの、モデル作製の操作が簡便で再現性が高く、急性期には炎症性細胞浸潤などの炎症反応を観察することが可能である[7]。

慢性期の腱症は病理学的には炎症反応ではなく変性所見が中心であるため、腱症は非炎症性疾患として捉えられてきた。しかしながら、近年の分子生物学的研究手法の発展により腱症発生の過程で炎症反応の制御が退行性変化や慢性化に影響することが指摘されている。炎症性サイトカインであるインターロイキン 1- β (interleukin-1 β : IL-1 β)や腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor- α : TNF- α)は内在性の腱細胞や細胞外マトリックス、炎症性細胞に作用することが示唆されている。とくに IL-1 β は腱細胞においてマトリックスメタプロテアーゼ (matrix-metalloproteinases: MMPs)の発現を促進し、また I 型コラーゲンの産生を減少させる [8]。さらに IL-1 β は腱組織から単離した腱先駆/幹細胞 (Tendon progenitor/ stem cells: TPSCs)の腱分化能を抑制する一方で軟骨・骨分化能を促進し [9]、腱組織の軟骨様変性は軟骨内骨化を経過して異所性骨化に至る機序が報告されている。

また炎症反応のほかに腱症の退行性変化を促進する機序として低酸素状態の関連が示唆されており、とくに腱症で生じる軟骨様変性や異所性骨化と関連する。In vitro において、低酸素状態では腱細胞において低酸素誘導因子 (hypoxia-induced factor-1 α : HIF-1 α)経路が活性化され、腱細胞のアポトーシス

を引き起こす[10]。 腱は損傷後早期に解糖系および乳酸産生を増加させる。

損傷後の腱における乳酸産生の抑制はコラーゲン線維配向性を改善し、軟骨基質産生や異所性骨化の発現を抑制することが報告されている[11]。また HIF-1 α により血管内皮増殖因子が誘導され、腱実質への血管新生が促進される。

血管新生はアキレス腱症で特徴的な退行性変化である。血管新生に伴って知覚神経線維が進入することで腱の構造を弱め、神経線維からの疼痛伝達物質が過剰に産生されることにより鋭敏な疼痛の要因となる[12]。しかしながら損傷組織の栄養供給を促進するために血管新生は不可欠であり、その意義については議論が分かれている[13]。 腱症における血管新生のメカニズムや経時的変化を理解することは新たな治療法を確立していくうえで有益であると考えられる。

腱症に対する新たな治療ストラテジーとして間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells: MSCs)を用いた再生医療や細胞治療の応用が注目されており、動物モデルでの検討が多数報告されている[14] [15]。MSCsは自己複製能を有し、骨細胞・軟骨細胞・脂肪細胞などに分化する体性幹細胞である。障害組織への集積性があり、分化可塑性や細胞接触、液性因子の分泌を介して組織修復・再

生能を発揮する。細胞工学や細胞治療に用いる MSCs の細胞源として脂肪由来幹細胞(Adipose-derived stem cells: ASCs)は候補のひとつとなっている。ASCs は基礎研究や実用化がもっとも進んでいる骨髄由来間葉系幹細胞と比較して採取時の侵襲性が低く、細胞の供給量が多いことから臨床応用上の利点が多いと考えられている。また ASCs は炎症サイトカインや成長因子の分泌により様々な組織の治癒を促進することが報告されている[16][17]。腱損傷動物モデルにおいて、ASCs 投与による腱の物理的性質の向上や健全なコラーゲン線維再構成が示され[18][19]、また ASC の腱細胞への分化や炎症性細胞に対する制御機能などが報告されている[20][21]。しかしながらこれまでに腱症で生じる異所性骨化に対する ASCs の抑制効果は一件のみしか報告されておらず[18]、異所性骨化を含めた退行性変化に対して ASCs が有効性を示すかどうかはいまだ十分に示されていない。また、ASCs のアキレス腱症に対する有効性発現機序としてこれまでに組織腱細胞への直接分化や炎症制御機能が示されているが、それに随伴する異所性骨化を抑制する機序や、in vivo における ASCs による IL-1 β や低酸素状態の制御に関しては明らかになっていない。さらに、腱障害に対して、ASCs は血管新生を介して治癒を促進するという報告があるが[19]、慢

性的な血管数の増加との違いは議論されていない。

我々は、腱症モデルにおいて、ASCs が細胞間接触や液性因子によって炎症や低酸素状態を制御することで、TPSCs の健全な分化の環境を整備し、コラーゲン線維の回復や退行性変化の抑制効果を発揮するとの仮説を立てた。

本研究の目的は、コラゲナーゼ誘導アキレス腱症モデルを用いて ASCs のアキレス腱症で生じる異所性骨化に対する抑制効果を検討し、アキレス腱症に対する ASCs の治癒促進メカニズムを明らかにすることである。

方法

1. コラゲナーゼ誘導アキレス腱症モデル作製および評価

1-1 コラゲナーゼ誘導アキレス腱症モデル作製

本研究は東京大学の動物実験委員会により承認されている (医-P15-019)。コラゲナーゼ誘導アキレス腱症モデルを確立するために、マウスアキレス腱に対してコラゲナーゼ注入を行った。アキレス腱症モデル C57BL6J マウス(♂) 6 週齢(日本生物化学センター, Japan)にイソフルラン吸入麻酔を行い、下肢の毛を脱毛し、アルコールで清拭した。左側アキレス腱に 1%コラゲナーゼ溶液 in PBS(Wako, Japan)を経皮的に 30G 針で 20 μ l 注入し、右側には PBS 溶液を注入した。注入量については、マウスアキレス腱に経皮的に注入可能な容量が限られており、注射器で測定可能な最低容量が 20 μ l であったことから注入量を 20 μ l に決定した。モデル作製から 2 週間後、4 週間後、8 週間後で組織を回収した。

1-2 コラゲナーゼ誘導アキレス腱症モデルの評価

アキレス腱及びその周囲組織に対して、HE 染色にて組織学的評価を行い、アキレス腱症に特徴的な退行性変化であるコラーゲン線維の配向性の乱れや消失、細胞数増加や軟骨細胞に類似した円形細胞の増加、軟骨基質産生、血管新生の有無[7]を検討した。

また異所性骨化の有無を評価するために μ CT(Inspexio; 島津サイエンス東日本株式会社, Japan)で 75kV, 140mA の条件下で撮影した。

2. コラゲナーゼ誘導アキレス腱症モデルへの ASCs 移植

2-1 EGFP マウスからの ASCs の採取・培養

投与した ASCs を追跡可能とするために、6 週齢 EGFP(Enhanced-green fluorescence protein)マウス(理化学研究所 C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)C14-Y01-FM131Osb)を用いた。ASCs の採取は過去の報告を参考にして行った[22]。マウス鼠径部から得られた脂肪組織をハサミで細切し、0.1%コラゲナーゼ(Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan))溶液に投入して 30 分攪拌し、セルストレーナー(70 μm , pore size, BD Falcon, Japan)に通して、間質血管細胞群(stromal vascular fraction: SVF)を得た。これを 250G で 5 分間遠心分離して培養液に懸濁した。1.0 $\times 10^6$ cell を 100 mm²ディッシュに播種し、37°C 5%CO₂ 下で培養液 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F- 12 (DMEM/F12; (Sigma-Aldrich Co., USA) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum and 1% Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich))で培養した。90%コンフルエントに達した後、10%トリプシン/EDTA in PBS 溶液(Sigma-Aldrich)で細胞を剥離し、再播種した。2 回目の passage で得られた細胞を移植に使用した。

2-2 コラゲナーゼ誘導アキレス腱症モデルへの ASCs 移植

コラゲナーゼ誘導アキレス腱症モデルに対し、ASCs 懸濁液を移植した。細胞濃度は文献より [18] 10^7 cell/ml に調整した。作製したコラゲナーゼ誘導アキレス腱症モデルをランダムに 2 群に分けて移植実験を行い、治療群を ASC 群、非治療群をコントロール群とした。コラゲナーゼ誘導アキレス腱症モデルを作製してから 1 週後に、24G 針で左側アキレス腱部に細胞懸濁液を経皮的に 20 μ l 注入した(ASC group)。コントロール群には PBS のみ注入した(Control group)。モデル作製から 9 日後、2 週後、4 週後（移植から 2 日後、1 週後、3 週後）に各タイムポイント各群で 6 匹の組織を回収した。4°C で 4%パラホルムアルデヒドで 24 時間固定し、PBS に浸漬して保存した。

2-3 μ CT による異所性骨化の評価

4 週後に回収した組織を μ CT (Inspexio; 島津サイエンス東日本株式会社, Japan) で 75kV, 140mA の条件下で撮影した。異所性骨化の部位に対して画像解析を行い、体積を測定した。

2-4 Histology

固定した組織をパラフィン包埋し、5 μm の厚さで薄切して切片を作製した。キシレンでパラフィンを除去し、エタノールにてキシレン除去および水和した後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。また2週後の切片ではトリジンブルー染色、4週後の組織ではアリザリンレッド染色を行った。標本は透過型正立顕微鏡(Olympus)で観察した。

2-5 Semiquantitative Bonar Histopathological Scale Analysis

染色した切片について、Bonar histopathological scale を一部改変したスケールで半定量的評価を行った[23]。スケールは項目ごとに、グレード 0、1、2、3 で評価した：(1)Fiber structure (2)Rounding of the nuclei (3)Ground substance(4)Vascularity および(5)Total score により解析した。

	0	1	2	3
(1) Fiber structure	Continuous, long fiber	Slightly fragmented fiber	Moderately fragmented fiber	Severely fragmented fiber
(2) Rounding of the nuclei	Long spindle-shape cells	Slightly rounded	Moderately rounded	Severely rounded
(3) Ground substance (Toluidin Blue staining)	No stainable ground substance	Stainable mucin between fibers but bundle still discrete	Stainable mucin between fibers with loss clear demarcation of bundles	Abundant mucin throughout with inconspicuous collagen staining
(4) Vascularity	<10%	10-20%	20-30%	>30%

2-6 Immunohistochemical staining

脱パラフィン後、PBS で洗浄し、抗原賦活化をプロテイナーゼ K にて行い、内在性ペルオキシダーゼ活性ブロッキングは過酸化水素 3 % in メタノールにて行い、非特異的エピトープのブロッキングに 5 %FBS in PBS を使用した。PBS で洗浄し、一次抗体 (GFP(1:2000; Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), IL-1 β (1:200 Abcam, Cambridge, USA), glucose transporter 1 (GLUT1)(1:200; Abcam), Carbonic Anhydrase 9(CA9)(1:1000; Abcam), Vascular Endothelial Growth Factor(VEGF)(1:100; Abcam), CD31(1:20; Abcam)) を 4°C で overnight で反応させた。ビオチン標識二次抗体(1:100)を室温で 30 分、Vectastain Elite ABC を室温で 30 分反応させ、DAB (Vector Laboratories (CA, USA))にて染色した。対比染色にはヘマトキシリン溶液を使用した。

顕微鏡下に 200 倍視野で観察し、各切片の 3 か所をランダムに選択して DAB 面積を Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Md.)[24]を用いて解析した。免疫染色の定量化には ImageJ の color deconvolution のプラグインを使用した。自動的に DAB のみを検出した画像に対して勾配範囲を指定し、同一染色

内では勾配範囲は固定して Area(%)を算出した。

2-7 統計解析

データの統計解析は Bonar scale に対して Mann-Whitney U test を行った。

μ CT の石灰化領域および免疫組織化学染色に対する定量評価に対しては Student's t-test を行った。 $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありとした。

結果

1. コラゲナーゼ誘導アキレス腱症モデルの確立

通常の腱の組織学的所見では緊密なコラーゲン線維の走行が見られ、紡錘形の細胞が細胞密度は小さく線維に平行に存在する。コラゲナーゼの注入によるマウス腱症モデルを確立するために、モデルの作製後に組織学的評価および μ CTの撮影を行った。液体注入自体の侵襲性の有無を確認するために対照群でPBSのみを注射したところ、2週間後、4週間後、8週間後で緊密なコラーゲン線維の走行、紡錘形の細胞が線維に平行に存在し、通常の腱組織と同等の所見が得られた(図 1A-C)。コラゲナーゼを投与して2週(n=7)、4週(n=7)および8週後(n=3)で組織学的評価を行った。2週後のすべての組織で細胞数増加とコラーゲン線維の消失、軟骨様基質をみとめた(図 1D)。4週後と8週後ではすべての組織でコラーゲン線維の消失、細胞数増加、線維走行の乱れ、円形細胞や軟骨様基質、異所性骨化、血管新生をみとめた(図 1E, F)。

μCT では 4 週後で n=6/7 で異所性骨化の発現をみとめた(発症率 85.7%)(図 1G-J)。以上の病理学的所見および画像評価により、コラゲナーゼ誘導腱症モデルは妥当であり、十分な再現性を保持すると判断した。

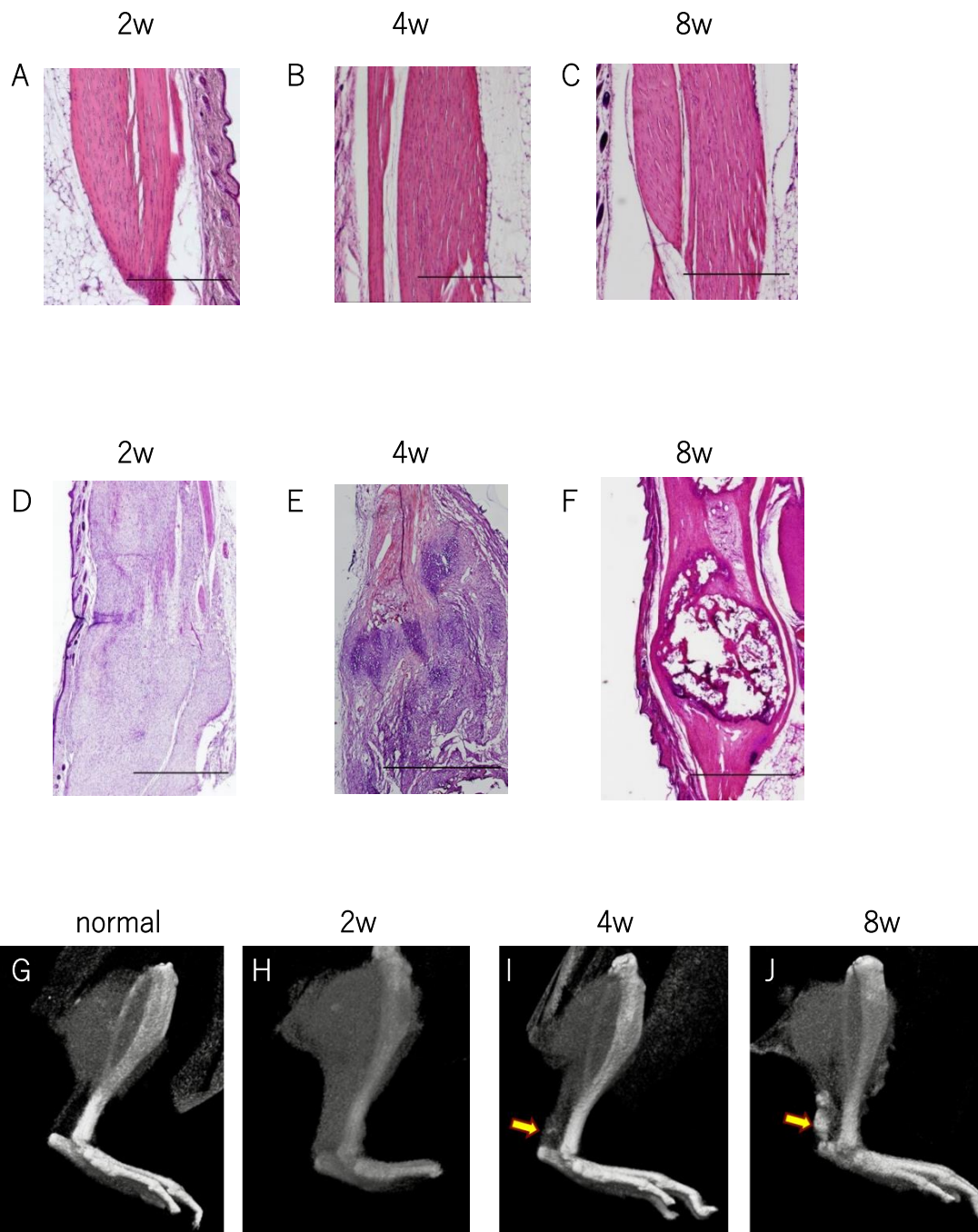


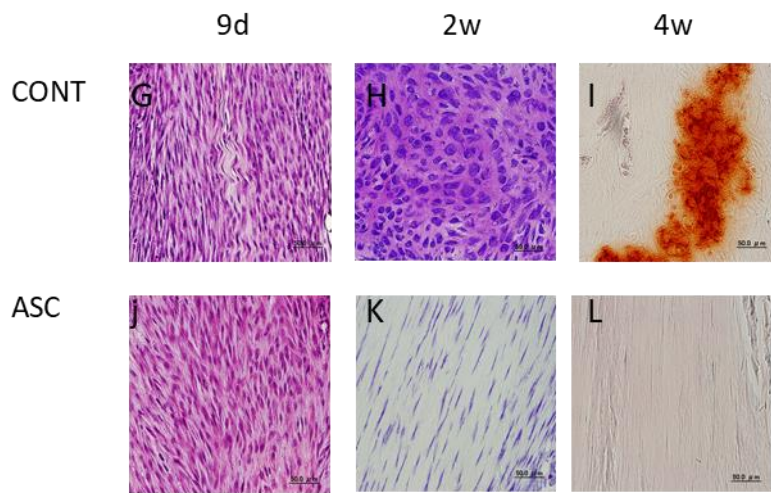
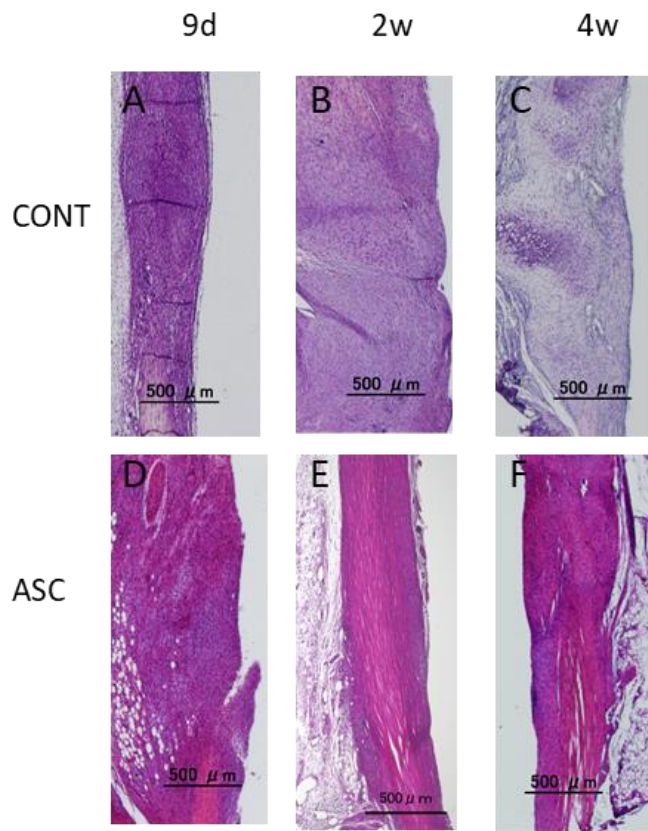
図1：アキレス腱症モデルの組織学的評価およびμCT（それぞれ代表例）
 (A-F)HE染色(A,B,C)PBSのみ注射した組織。(D,E,F)1%コラゲナーゼ投与した組織。(G-I)μCT。矢印：異所性骨化
 (A-C) Scale bar = 500 μm, (D-F) Scale bar = 1 mm

2. コラゲナーゼ誘導アキレス腱症モデルへの ASCs 移植

2-1 ASCs はアキレス腱症における退行性変化を減少させる

アキレス腱症モデルにおける腱及び周囲組織の経時的変化を確かめるために、HE 染色、トルイジンブルー染色、アリザリンレッド染色により組織学的評価を行った。回収時期については、モデル作製の検討において、 μ CT で4週以降で異所性骨化を確認したため、最終期間を4週後とし、中間の2週間、移植直後の急性期として9日後を設けた。HE 染色において、コントロール群ではすべての観察時点で細胞数増加、誘導2週間後および4週間後にコラーゲン線維配向性の消失が見られた(図2 A,G,B,C)。2週間後には軟骨様細胞および軟骨様基質、4週間後には骨様組織をみとめた(図2 H,I)。一方、ASC 群では誘導2週間後、4週間後においてコントロール群で見られたこれらの退行性変化が抑制されていた。例えば、ASC 群では誘導9日後にコントロール群と同様に細胞数増加をみとめたものの(図2 D,J)、2週間後、4週間後においてはコラーゲン線維が回復していた(図2 E,F)。また誘導2週間後のトルイジンブルー染色では、ASC 群ではコントロール群と比較してメタクロマジー陽性の軟骨基質沈着が減少した(図2 K)。さらに誘導4週間後のアリザリンレッド染色では、ASCs 群ではコン

トロール群と比較してカルシウム沈着量が減少した(図 2 L)。HE 染色した切片は 4 つの基準により腱組織評価を行い、半定量化してスコアを求めた。ASC 群は 2 週間後、4 週間後においてコントロール群と比較して total score が有意に低値を示した(図 2 M)。



M

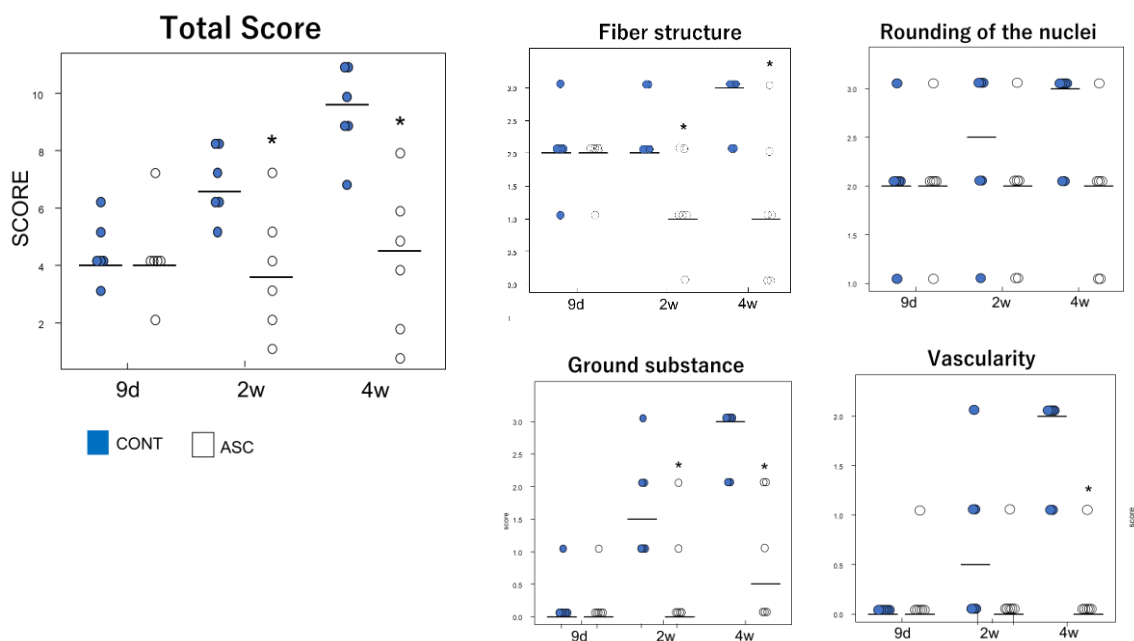


図2：組織学的評価

(A-F) 低倍率下の ASC 群とコントロール群の腱組織の HE 染色。(G,I)誘導 9 日後における HE 染色。(H,K)誘導 2 週間後におけるトリイジンプルー染色。(I,L)誘導 4 週間後におけるアリザリンレッド染色。(M)改変 Bonar scale スコア。

(A-F) Scale bar = 500 μ m, (G-L) Scale bar = 50 μ m,

(M)* $p < 0.05$ (each group n=6), 中央値(-)

2-2 ASCs は腱症における異所性骨化の発現を減少させる

つぎに、誘導 4 週間後に回収した組織を μ CT にて撮影し、ASCs による異所性骨化の抑制効果を評価した。結果として、コントロール群、ASC 群の両群で、異所性骨化の発現をみとめた(図 3 A, B)。しかし、異所性骨化領域を定量評価したところ、ASC 群ではコントロール群と比較して石灰化物の体積は有意に減少した(図 3 C)。

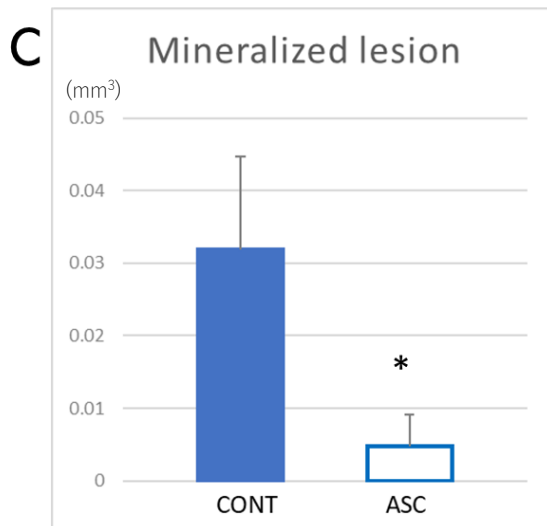
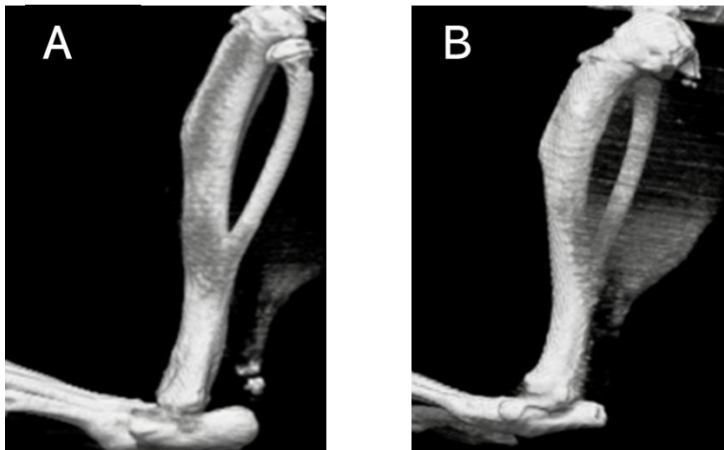


図 3 : μ CT による評価

(A) 誘導 4 週間後のコントロール群。(B) 誘導 4 週間後の ASC 群。

(C) 石灰化領域の体積。(* $p < 0.05$) (each group: $n=6$)

2-3 移植細胞の追跡

移植した ASCs を、抗 GFP 抗体を用いた免疫組織化学染色により追跡した。移植 2 日後(誘導 9 日後)では GFP 陽性細胞は髄鞘側髄実質にみとめ、移植 7 日後(誘導 2 週間後)では髄周囲結合組織にみとめた(図 4 A, B)。しかし、GFP 陽性細胞は移植 3 週間後(誘導 4 週間後)にはみとめられなかった(図 4 C)。これらの所見より、GFP 由来 ASCs は髄細胞への直接分化ではなくパラクライン作用により髄修復に作用したことが示唆された。

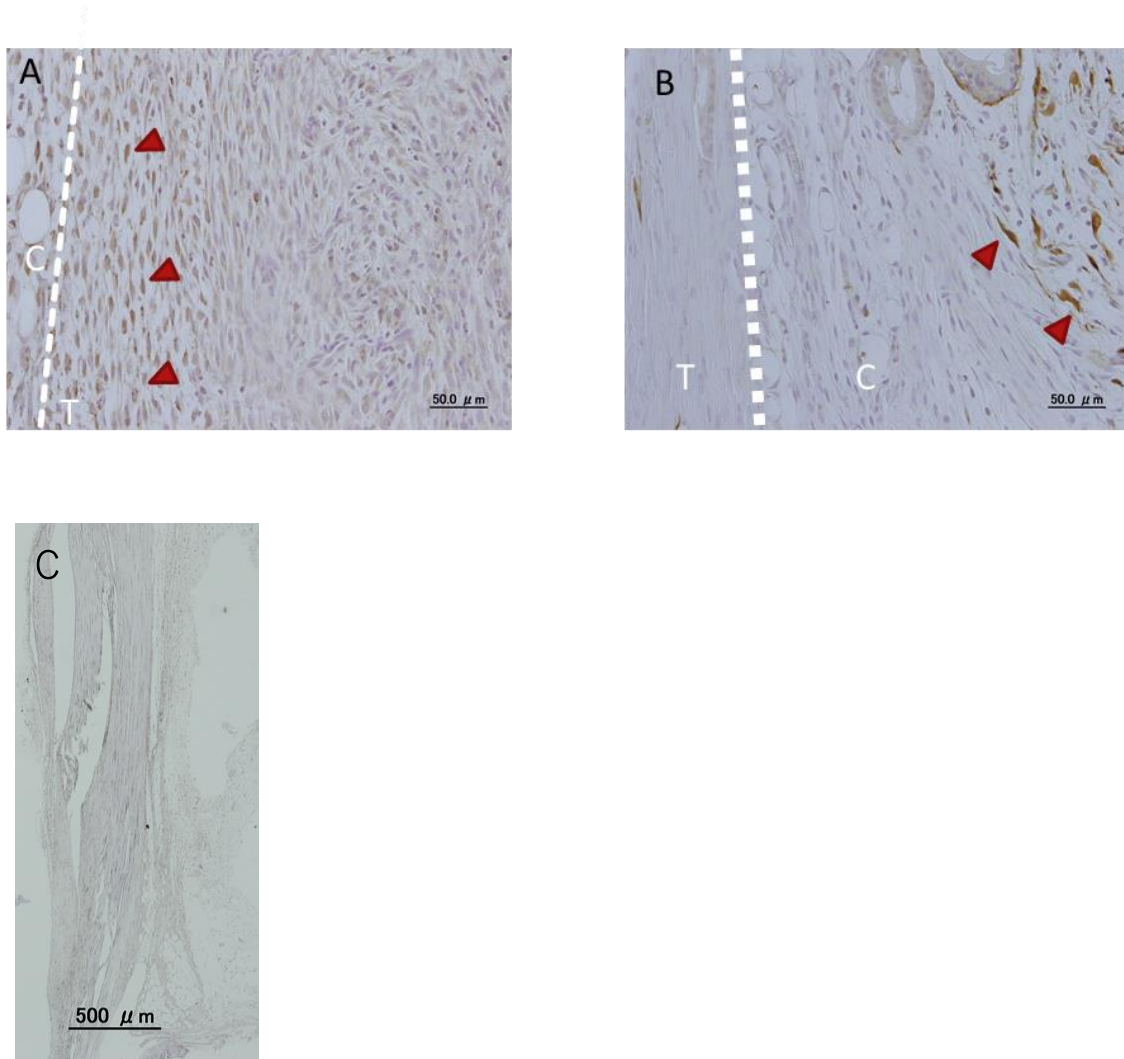


図4：抗 GFP 抗体を用いた免疫組織化学染色による移植 ASCs の追跡
 (A) 移植 2 日後(誘導 9 日後)。(B)移植 7 日後(誘導 2 週間後)。T: tendon, C:
 connective tissue(矢頭：GFP 陽性細胞) (C)移植 2 1 日後(誘導 4 週後)
 (A,B) Scale bars = 50 μm (C)Scale bar=500 μm

2-4 アキレス腱症誘導後早期の炎症反応の評価

誘導 9 日後に両群で細胞数増加をみとめたことから、アキレス腱症誘導後早期における炎症反応を評価するために、炎症性サイトカインである IL-1 β に対する免疫組織化学染色を行った。結果、ASC 群ではコントロール群と比較して IL-1 β の発現が有意に減少していたことから(図 5 A, B, C)、ASCs の移植は急性期における IL-1 β 発現を抑制させることが示された。

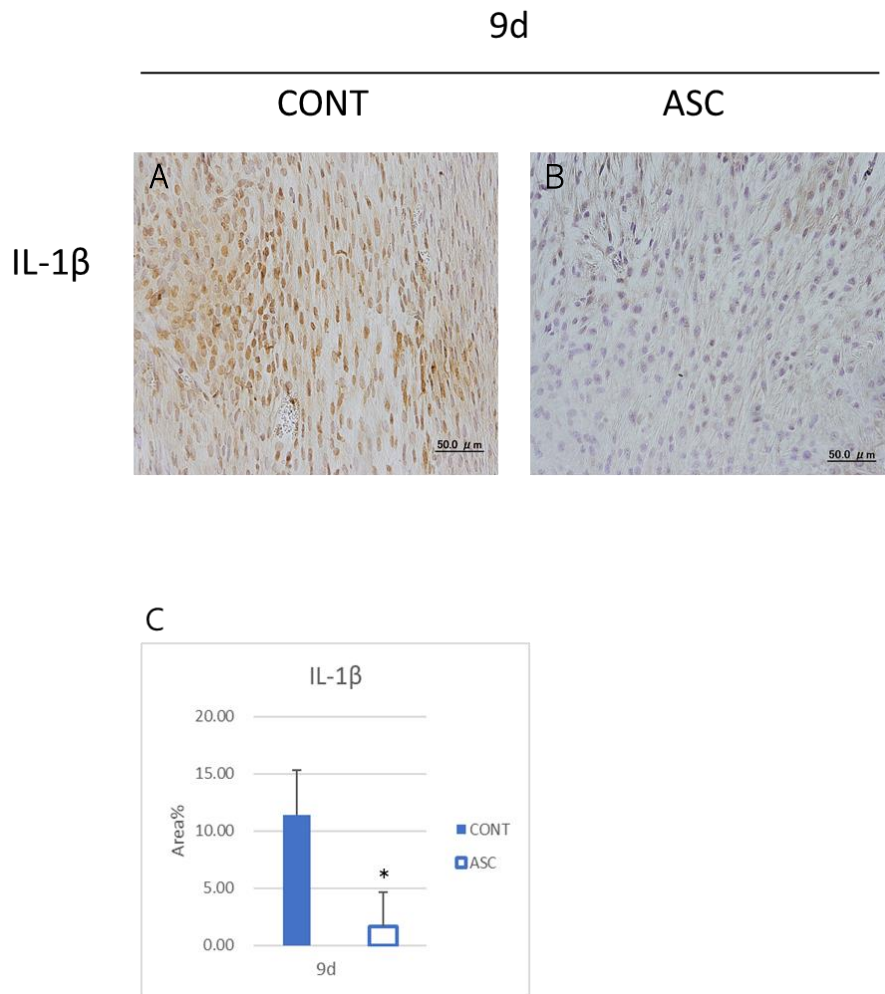


図5：免疫組織化学染色によるアキレス腱症誘導後早期の炎症反応 (A,B)IL-1 β に対する免疫染色。(C) IL-1 β 発現領域の定量化。
Scale bars = 50 μ m, * p < 0.05 (each group n=3)

2-5 アキレス腱症誘導後早期の低酸素状態および血管新生の評価

腱症誘導後早期の低酸素状態や血管新生に対する ASCs の影響を検討するために、低酸素マーカーとして GLUT1 と CA9、また血管新生の指標として VEGF と CD31 に対する免疫化学染色を誘導 9 日後、2 週間後で行った。誘導 9 日後の GLUT1 と CA9 の発現は ASC 群でコントロール群と比較して有意に減少した(図 6 A-H, Q, R)。これに対し、9 日後の VEGF の発現と CD31 陽性血管数は ASC 群で有意に増加した(図 6 I-P, S, T)。これらの所見により ASCs は腱修復早期において低酸素状態の制御と血管新生の促進の役割を果たすことが示唆された。

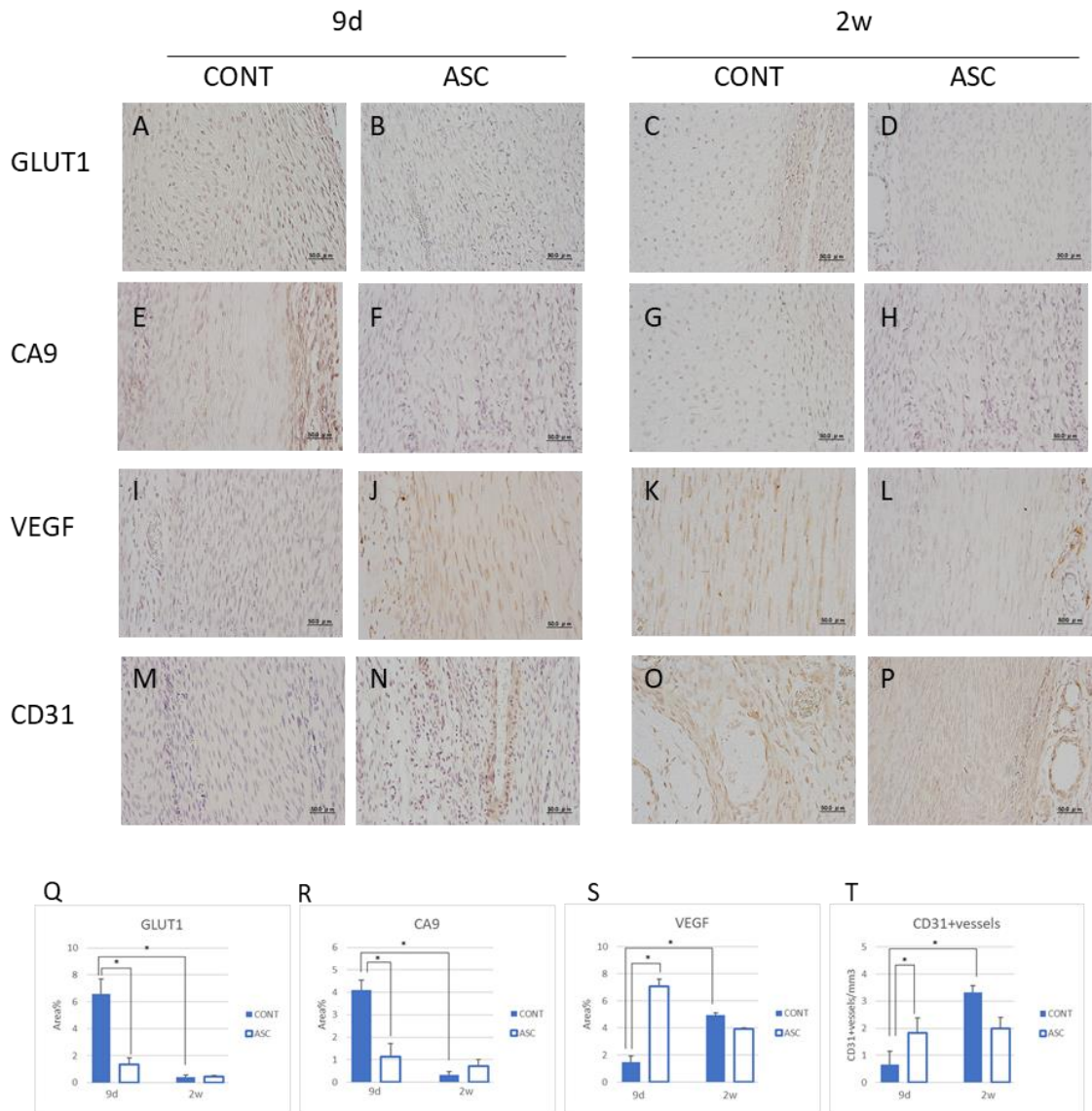


図6：免疫組織化学染色による低酸素状態および血管新生の経時的変化 (A-D)誘導9日後、2週間後の GLUT1 発現。(E-H) 誘導9日後、2週間後の CA9 発現。(I-L) 誘導9日後、2週間後の VEGF 発現。(M-P) 誘導9日後、2週間後の CD31 陽性血管数。(Q-T) GLUT1, CA9, VEGF 陽性領域および CD31 陽性血管数。

Scale bars = 50 μm, * $p < 0.05$ (each group n=3)

考察

本研究では ASCs の投与はコラゲナーゼ誘導マウスアキレス腱症において修復を促進し、異所性骨化の発現を減少させることを示した。また ASCs は損傷後早期の IL-1 β の発現抑制や低酸素状態の改善、血管新生の促進により腱修復に働くことが示唆された。

細胞治療で用いられる MSCs として骨髄由来細胞(BMSCs)や ASCs がある。過去の報告が多い BMSCs と比較して、ASCs は採取時の侵襲性の低さや採取可能な細胞数が多いことから、細胞治療の細胞リソースとして今後臨床応用への利用可能性が高いと考え、ASCs を選択した。ASCs と同様に採取が容易で得られる細胞数が多い細胞源として線維芽細胞があげられる。線維芽細胞は MSCs の分化が進んだ細胞と考えられているが、近年になり MSCs との類似性が示唆されている。MSCs に特徴的な表面マーカーや多分化能は線維芽細胞にも共通していることが明らかになっている。また、MSCs の特徴である液性因子による免疫制御や血管新生作用についても、MSCs には劣るものの、一部の線維芽細胞では同様の働きを持つという報告がある[25]。しかしながら線維芽細胞の分化の程度や採取方法により機能は異なるため、単純に MSCs と線維芽細胞を比較

することは困難である[26]。本研究では ASCs 投与のみを検討したが、今後 ASCs と線維芽細胞など異なる種類の細胞移植との比較が必要であると考えられる。

本研究の予備実験として C57BL6J マウスより SVF を採取・培養し、P2 で得られた細胞の特性としてフローサイトメーターで ASC に特異的な表面マーカーを評価すると、平均的な所見では血球系マーカー CD45、CD34、CD146 すべて陰性の細胞が 99.5%、間葉系幹細胞マーカーはそれぞれ CD90 陽性が 94.5%、CD105 陽性が 77.8%であった。腱切断損傷モデルに対する先行研究[27]では P5 の ASCs を用いて、CD90 陽性が 90%、CD105 陽性が 95%であり、本研究で用いた P2 の細胞は継代数の多いものに比較して CD105(+)のポピュレーションはやや小さい結果であったものの、ASCs を豊富に含む細胞群と考えられた。今後 ASCs の機能を維持するために適切な継代数や培養法や最適化の検討が必要であると考えられる。

本研究において、コラゲナーゼ誘導アキレス腱症モデルでは、2週間後には軟骨基質が産生され、4週間後のアキレス腱は異所性骨化を生じるが、ASCs はこれらの発現を減少させることを示した。しかしながら誘導後早期ではコントロール群と ASC 群でともに細胞数増加像が得られた。炎症存在下の腱組織では炎

症性細胞の浸潤に加えて腱先駆/幹細胞(Tendon progenitor/stem cells: TPSCs)が増殖する[28][29]。TPSCsは腱の治癒で重要な役割を果たすが、炎症存在下で腱特異的遺伝子の発現が抑制され、軟骨細胞に特異的な遺伝子の発現が亢進することが報告されている[30]。軟骨様細胞に分化したTPSCsは基質を産生し、最終的に軟骨内骨化を生じ異所性骨化に至る[31]。これらの既存の報告と合わせ、ASCsの投与は腱修復早期のTPSCsに何らかの影響を与えたことが示唆される。

局所投与されたASCsは損傷部で産生されるケモカインにより炎症部位に遊走する[32]。ASCsはインテグリン $\beta 1, \alpha 4$ やCD106、CD166などの接着分子をもつことから[33]、細胞外マトリックスへの結合やcell-cell-contactにより組織中に存在することが考えられる。本研究では移植1週間後の所見で紡錘形のGFP陽性細胞がみられ、ECMへの結合が示唆された。ASCsを追跡した結果、移植2日後(誘導9日後)ではASCsは腱鞘から腱周囲結合組織に存在していた。また移植1週間後(誘導2週間後)にはASCsは腱周囲結合組織に存在し、移植3週間後(誘導4週間後)には消失していた。過去の同様の研究ではラベリングした幹細胞は数週間後には消失したと報告されており、本研究はこれらと

一致している[29][34]。移植された ASCs は長期の観察では最終的に組織中の細胞として分化・生存しないことが多くの研究で報告されているが、ASCs の培養上清や ASCs により産生されるエクソソームの投与が細胞移植と同様の効果を発揮するという報告があることから[35]、ASCs は比較的短期の生存期間においても腱治癒効果を発揮できると考えられる。インターフェロン γ などで刺激された ASCs の培養上清やエクソソームは炎症抑制や血管新生を促進することが報告されている[36]。細胞移植に対して臨床的なハードルが低い培養上清やエクソソームの投与は多くの研究が試みられており、腱症に対する細胞投与との比較は今後の課題であると考えられる。

腱症誘導早期において IL-1 β の発現はコントロール群と比較して ASC 群で有意に減少した。IL-1 β は腱細胞で物理的ストレスにより分泌され、MMP 産生を促進し、またコラーゲン線維の産生を減弱する[5][37]。過去の研究では動物モデルにおいて IL-1 β のアンタゴニストは腱炎の進行を抑制することが報告されている[38]。また IL-1 β を受容した腱細胞はさらに自らも IL-1 β を産生しポジティブフィードバックが起きることが明らかとなっている[39]。IL-1 β の産生に寄与する細胞として炎症性の M1 マクロファージがあり、動物モデルにより M1

マクロファージは腱の健全な治癒を妨げることが示唆されている[40][41]。一方、ASCs は炎症下で Prostaglandin E2(PGE2)や Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)を分泌し、マクロファージ(M0)を抗炎症性 M2 マクロファージへ誘導することにより、組織修復を促進する[42]。M2 マクロファージが分泌する IL-10 はマクロファージや T 細胞に作用し、炎症性メディエーターの産生を抑制する[43]。糖尿病モデルマウス由来の M1 マクロファージを ASCs 由来のエクソソームで刺激すると活性化 M1 の指標である inducible nitric oxide synthase (iNOS)や TNF α の遺伝子発現が抑制されたと報告されている[44]。腱損傷モデルにおいても、ASCs 移植により M2 マクロファージが誘導されたことや、抗炎症性サイトカイン IL-10 が増加したことが報告されている。これらの知見から、ASCs は M2 マクロファージを誘導することにより M1 マクロファージによる IL-1 β 産生を減少させることが考えられた。本研究で見られた ASCs による IL-1 β 発現抑制が、炎症性マクロファージの抑制を介するものなのか、あるいは腱細胞の制御によるものなのかを明らかにするためには、今後さらなる研究が必要である。

腱組織の退行性変化を引き起こす機序として前項の IL-1 β に加えて低酸素状

態の関連が示唆されている。腱断裂モデルでみられるアキレス腱の異所性石灰化は軟骨分化を介した内軟骨骨化によって引き起こされるが、低酸素状態は間葉系細胞の軟骨分化を促進することが過去の研究で示されている[44][45]。また、マウスアキレス腱切断モデルによる異所性骨化において HIF-1 α 、Sox-9、Runx2、TGF- β 3、bone morphogenetic protein (BMP)が発現上昇することが報告されており、低酸素状態は嫌氣的解糖系を生じて腱の代謝に影響することが示唆される[46]。さらに、IL- β による TPSCs の腱細胞分化能抑制では乳酸産生が促進され、間接的に嫌氣的解糖系を阻害することにより腱分化能が回復したことが示されている[9]。このように、嫌氣的解糖系を引き起こす低酸素状態は間葉系幹細胞の軟骨分化を促進することから、著者は低酸素状態が腱の退行性変化に寄与すると推測した。本研究ではまず低酸素マーカーとして一般的な HIF-1 α の免疫組織化学染色を検討したが、陽性反応を検出できなかった。しかしながら HIF-1 α は染色性が低く観察が難しいことが抗体の販売会社である abcam 社のデータシートに記載されていたため、同じく低酸素マーカーである GLUT1 および CA9 に着目した。GLUT1 は赤血球や脳血管内皮細胞で通常時に発現するが、低酸素下で HIF-1 α に付随し、腫瘍細胞で過剰発現する[47]。

CA9 は膜貫通型タンパク質であり、ごくわずかな胃粘膜上皮細胞の細胞膜でのみ通常時に発現し、HIF-1 α に誘導されて腫瘍で過剰発現する [48]。本研究においては、誘導 9 日後の ASC 群ではコントロール群と比較して、これらの低酸素マーカーの発現が有意に減少したことから、ASCs は腱修復早期において低酸素状態を改善することで、腱修復を促進したことが示唆される。

損傷組織では血液供給が低下するため組織修復において血管新生は不可欠である [49]。一方で、慢性化した腱炎組織において血管侵入が退行性変化として捉えられることから、腱症における血管新生の意義については議論が分かれている [50]。本研究では誘導 4 週後の血管数が、コントロール群において ASC 群に比べて有意に高値となった。しかしながら、誘導 9 日後ではコントロール群と比較して ASC 群で VEGF の発現が有意に増加し、CD31 陽性を示す血管数は ASC 群で有意に高値を示した。2 週間後において VEGF の発現は両群では差がなかったものの、コントロール群では 9 日後から 2 週間にかけて増加傾向であるのに対し ASC 群では減少傾向であった。一般的に VEGF は低酸素によって誘導されるため低酸素マーカーのひとつとされるが、タンパクレベルでは GLUT1 や CA9 に遅れて発現するという報告がある [51][52]。また VEGF の発現は低酸

素のほかに線維芽細胞増殖因子(Fibroblast growth factor: FGF)などの増殖因子によっても誘導される[53]。ASCsは炎症下で血管新生因子となるVEGF、FGF、肝細胞増殖因子(Hepatocyte Growth Factor: HGF)、血小板由来増殖因子(Platelet-derived growth factor :PDGF)などの増殖因子を分泌する[33][54]。

ASCsは腱症誘導後早期に複数の増殖因子を分泌することにより、あるいは腱細胞やTPSCsのVEGF発現を誘導することによって血管新生を促進した可能性がある。腱と同様に血管の乏しい組織である軟骨の再生において、早期の一時的な血管侵入が組織再生に重要であるという報告があり[55]、腱症発症後で生じる血管新生のタイミングが腱修復あるいは退行性変化に影響する可能性がある。

本研究ではアキレス腱症の経時的变化を示したものの、別個体の組織をそれぞれの時期で回収したため断続的観察であった。炎症反応の時期や炎症に伴う環境変化により移植されたASCsの局在は変化すると考えられ、連続的な経時的变化をとらえることが望ましく、これらは有効なASCsの移植タイミング(急性期, 亜急性期, 慢性期)を検討するのに必要である[56][57]。今後、腱症を誘導した組織のサイトカインや増殖因子発現、移植ASC動態の生体イメージングが可能となれば、アキレス腱症の病態解明や細胞療法への応用に役立つと考えら

れる。

本研究は腱症に対する治療法としての ASCs 投与の臨床応用に寄与することが期待される。アキレス腱症に対する現行の治療は急性症状に対する消炎処置、変性病変に対する運動療法や物理療法など保存療法が主体で、4 ～6 カ月間継続して保存療法に抵抗性を示す難治例に対しては手術療法も行われる。保存療法は対症療法が主であり有効性が実証されているとは言い難く、手術療法は治療成績は良いとされるものの侵襲性や一部で異所性骨化が生じることが問題である。自己多血小板血漿療法（platelet rich plasma ; PRP）などの新たな治療がわが国でも行われるようになり有効性が期待されているが、いまだエビデンスに乏しい現状がある。ASCs の腱修復に対する効果が PRP よりも優位であるかどうかは検討が必要であると考えられる。

ASCs による細胞治療は口腔領域における歯根膜再生に応用できる可能性がある。口腔領域では難治性骨髄炎や抜歯後疼痛、顎関節症や慢性歯周炎などの炎症性疾患および創傷治癒不全が臨床的に多くみられるが、これらに対する病態の解明やエビデンスに基づく治療法の開発はいまだに不十分な現状にある。

MSCs を用いた細胞治療は様々な疾患への応用を目指し広く研究されているが、

口腔領域における慢性炎症性疾患に対しても ASCs の有効性が期待される。歯牙を支える歯周組織には歯槽骨、歯肉、歯根膜がある。歯根膜は歯周靭帯ともよばれる歯牙と歯槽骨をむすぶ線維性結合組織で、歯根膜の細胞には腱や靭帯で特異的な膜タンパク質であるテノモジュリンが発現する[58]。歯根膜は歯周病原細菌が引き起こす炎症に加えて過度な咬合力が微細損傷を引き起こすことにより損傷し、慢性歯周炎やアンキローシス(歯牙の骨製癒着)が生じることから、歯根膜炎と腱症は病態的に類似性がある可能性が示唆される。現行の歯根膜炎の治療は、歯周病原細菌に対する原因療法として抗菌薬投与や歯周ポケットのデブリードメント(Scaling and Root Planning: SRP)、咬合力コントロールとして就寝時・スポーツ時のマウスピース装着があげられるが、進行度によっては治療に苦慮する症例は多く、新たな治療法の開発が求められている。歯根膜炎に対する ASCs を用いた細胞治療は、歯周組織修復に対する新たな早期治療となる可能性が示唆される。

ASCs は様々な炎症性疾患や虚血性疾患に効果が示されており、ASCs の腱症に対する効果の機序解明により他の組織への移植においても共通する ASCs の病態での細胞動態や液性因子を明らかにすることが可能となり、今後の細胞治

療の発展に貢献すると考えられる。

結論として、ASCs は腱症における異所性骨化を抑制し、組織修復に有効性を示す。また ASCs は早期に炎症性サイトカインの発現を抑制し、血管新生を促進して酸素環境を改善することにより腱修復を促進することが示唆された。

参考文献

1. Li HY, Hua YH. Achilles Tendinopathy: Current Concepts about the Basic Science and Clinical Treatments. *Biomed Res Int* 2016;1-9,2016
2. Nourissat G, Berenbaum F, Duprez D. Tendon injury: from biology to tendon repair. *Nat Rev Rheumatol* 11:223-33,2015
3. Uquillas CA, Guss MS, Ryan DJ, Jazrawi LM, Strauss EJ. Everything Achilles: Knowledge Update and Current Concepts in Management: AAOS Exhibit Selection. *J Bone Joint Surg Am* 97:151187-95,2015
4. Liu CF, Aschbacher-Smith L, Barthelery NJ, Dymment N, Butler D, Wylie C. What we should know before using tissue engineering techniques to repair injured tendons: a developmental biology perspective. *Tissue Eng Part B Rev* 17:165-76,2011
5. de Albornoz PM, Aicale R, Forriol F, Maffulli N. Cell Therapies in Tendon, Ligament, and Musculoskeletal System Repair. *Sports Med Arthrosc Rev* 26:48-58,2018
6. Lake SP, Ansorge HL, Soslowsky LJ. Animal models of tendinopathy. *Disabil Rehabil* 30:1530-41,2008
7. Perucca Orfei C, Lovati AB, Viganò M, Stanco D, Bottagisio M, Di Giancamillo A, Setti S, de Girolamo L. Dose-Related and Time-Dependent Development of Collagenase-Induced Tendinopathy in Rats. *PLoS One* 11:1-12,2016

8. Millar NL, Murrell GAC, McInnes IB. Inflammatory mechanisms in tendinopathy - towards translation. *Nat Rev Rheumatol* 13:110-1226,2017.
9. Zhang K, Asai S, Yu B, Enomoto-Iwamoto M. IL-1beta irreversibly inhibits tenogenic differentiation and alters metabolism in injured tendon-derived progenitor cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 463 :667-72,2015.
10. Liang M, Cornell HR, Zargar Baboldashti N, Thompson MS, Carr AJ, Hulley PA. Regulation of hypoxia-induced cell death in human tenocytes. *Adv Orthop* 2012:1-12,2012.
11. Zhang K, Hast MW, Izumi S, Usami Y, Shetye S, Akabudike N, Philp NJ, Nissim I7, Soslowsky LJ, Enomoto-Iwamoto M. Modulating Glucose Metabolism and Lactate Synthesis in Injured Mouse Tendons: Treatment With Dichloroacetate, a Lactate Synthesis Inhibitor, Improves Tendon Healing. *Am J Sports Med* 46:2222-31,2018.
12. Sahin H, Tholema N, Petersen W, Raschke MJ, Stange R. Impaired biomechanical properties correlate with neoangiogenesis as well as VEGF and MMP-3 expression during rat patellar tendon healing. *J Orthop Res* 30:1952-7,2012.
13. Sharma P, Maffulli N. Tendinopathy and tendon injury: The future. *Disabil Rehabil* 30:1733-45,2008.
14. Okamoto N, Kushida T, Oe K, Umeda M, Ikehara S, Iida H, et al. Treating Achilles tendon rupture in rats with bone-marrow-cell transplantation therapy. *J Bone Joint Surg Am* 92:2776-84,2010.

15. C Uysal, M Tobita, H Hyakusoku, Mizuno H. Adipose-derived stem cells enhance primary tendon repair: biomechanical and immunohistochemical evaluation. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg* 65 :1712-9,2012.
16. Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells* 30:804-10,2012.
17. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211–28,2001.
18. Oshita T, Tobita M, Tajima S, Mizuno H. Adipose-Derived Stem Cells Improve Collagenase-Induced Tendinopathy in a Rat Model. *Am J Sports Med* 44:1983–9,2016.
19. Uysal CA1, Tobita M, Hyakusoku H, Mizuno H. Adipose-derived stem cells enhance primary tendon repair: biomechanical and immunohistochemical evaluation. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 65:1712-9,2012Lee SY, Kwon B,
20. Lee K, Son YH, Chung SG. Therapeutic Mechanisms of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Rat Tendon Injury Model. *Am J Sports Med* 45:1429–39,2017.
21. Shen H, Kormpakis I, Havlioglu N, Linderman SW, Sakiyama-Elbert SE, Erickson IE, Zarembinski T, Silva MJ, Gelberman RH, Thomopoulos S. The effect of mesenchymal stromal cell sheets on the inflammatory stage of flexor tendon healing. *Stem Cell Res Ther* 7:1–13,2016.
22. Yu G, Wu X, Kilroy G, Halvorsen YD, Gimble JM, Floyd ZE. Isolation of

- murine adipose-derived stem cells. *Methods Mol Biol* 702:29-36,2011.
23. Cook JL, Feller JA, Bonar SF, Khan KM. Abnormal tenocyte morphology is more prevalent than collagen disruption in asymptomatic athletes' patellar tendons. *J Orthop Res* 22:334–8,2004.
 24. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671-5,2012.
 25. Soundararajan M, Kannan S. Fibroblasts and Mesenchymal Stem Cells: Two Sides of the Same Coin? *J Cell Physiol* 233:9099-9109,2018
 26. Denu RA, Nemcek S, Bloom DD, Goodrich AD, Kim J, Mosher DF, Hematti P. Fibroblasts and Mesenchymal Stromal/Stem Cells are Phenotypically Indistinguishable. *Acta Haematol* 136: 85–97,2016
 27. de Aro AA, Carneiro GD, Teodoro LFR, da Veiga FC, Ferrucci DL, Simões GF, Simões PW, Alvares LE, de Oliveira ALR, Vicente CP, Gomes CP, Pesquero JB, Esquisatto MAM, de Campos Vidal B, Pimentel ER. Injured Achilles Tendons Treated with Adipose-Derived Stem Cells Transplantation and GDF-5. *Cells* 7:1-22,2018
 28. Tan Q, Lui PPY, Lee YW. In vivo identity of tendon stem cells and the roles of stem cells in tendon healing. *Stem Cells Dev* 22:3128–40,2013.
 29. Lui PPY, Kong SK, Lau PM, Wong YM, Lee YW, Tan C, et al. Allogeneic tendon-derived stem cells promote tendon healing and suppress immunoreactions in hosts: in vivo model. *Tissue Eng Part A* 20:2998–3009,2014.

30. Asai S, Otsuru S, Candela ME. Tendon Progenitor Cells in Injured Tendons Have Strong Chondrogenic Potential: The CD105-Negative Subpopulation Induces Chondrogenic Degeneration. *Stem Cells* 32:3266–77,2014.
31. Lui PP1, Fu SC, Chan LS, Hung LK, Chan KM. Chondrocyte phenotype and ectopic ossification in collagenase-induced tendon degeneration. Chondrocyte phenotype and ectopic ossification in collagenase-induced tendon degeneration. *J Histochem Cytochem* 57:91-100,2008
32. Nitzsche F, Müller C, Lukomska B, Jolkkonen J, Deten A, Boltze J. Concise Review: MSC Adhesion Cascade—Insights into Homing and Transendothelial Migration. *Stem Cells* 35: 1446–60,2017.
33. J Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther* 5:103–10,2010.
34. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 109:1543–9,2004.
35. Heidari M, Pouya S, Baghaei K, Aghdaei HA, Namaki S, Zali MR, Hashemi SM. The Immunomodulatory Effects of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells and Mesenchymal Stem Cells-Conditioned Medium in Chronic Colitis. *J Cell Physiol* 233:8754-8766,2018
36. Zhao H, Shang Q, Pan Z, Bai Y, Li Z, Zhang H, Zhang Q, Guo C, Zhang L, Wang Q. Exosomes from Adipose-Derived Stem Cells Attenuate Adipose

- Inflammation and Obesity through Polarizing M2 Macrophages and Beiging in White Adipose Tissue. *Diabetes* 67: 235–47,2018
37. Morita W, Dakin SG, Snelling SJB, Carr AJ. Cytokines in tendon disease: A Systematic Review. *Bone Joint Res* 6:656-664,2017.
 38. Berkoff DJ, Kallianos SA, Eskildsen SM, Weinhold PS. Use of an IL1-receptor antagonist to prevent the progression of tendinopathy in a rat model. *J Orthop Res* 34:616–22,2016.
 39. Tsuzaki M, Guyton G, Garrett W, Archambault JM, Herzog W, Almekinders L, Bynum D, Yang X, Banes AJ. IL-1 β induces COX2, MMP-1, -3 and -13, ADAMTS-4, IL-1 β and IL-6 in human tendon cells. *J Orthop Res* 21:256–64,2003.
 40. Hays PL, Kawamura S, Deng XH, Dagher E, Mithoefer K, Ying L, et al. The role of macrophages in early healing of a tendon graft in a bone tunnel. *J Bone Joint Surg Am* 90:565–79,2008
 41. Sugg KB, Lubardic J, Gumucio JP, Mendias CL. Changes in macrophage phenotype and induction of epithelial-to-mesenchymal transition genes following acute Achilles tenotomy and repair. *J Orthop Res* 32:944–51,2014
 42. Regmi, Shobha, Shiva Pathak, Jong Oh Kim, Chul Soon Yong, and Jee Heon Jeong. Mesenchymal Stem Cell Therapy for the Treatment of Inflammatory Diseases: Challenges, Opportunities, and Future Perspectives. *Eur J Cell Biol* 98:1-19,2019
 43. Shang, Qianwen, Yang Bai, Guannan Wang, Qiang Song, Chun Guo, Lining

- Zhang, and Qun Wang. Delivery of Adipose-Derived Stem Cells Attenuates Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance in Obese Mice Through Remodeling Macrophage Phenotypes. *Stem Cells Dev* 17: 2052–64,2015
44. Leijten J, Georgi N, Teixeira LM, Van Blitterswijk CA, Post JN, Karperien M. Metabolic programming of mesenchymal stromal cells by oxygen tension directs chondrogenic cell fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:13954–9,2014.
 45. Schipani E. Posttranslational modifications of collagens as targets of hypoxia and Hif-1 α in endochondral bone development. *Ann NY Acad Sci* 1192:317–21,2010.
 46. Lin L, Shen Q, Xue T, Yu C. Heterotopic ossification induced by Achilles tenotomy via endochondral bone formation: Expression of bone and cartilage related genes. *Bone* 46:425–31,2010.
 47. Szablewski L. Expression of glucose transporters in cancers. *Biochim Biophys Acta* 1835:164–9,2013.
 48. Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G, Merrill MJ, Proescholdt MA, Oldfield EH, Lee J, Zavada J, Waheed A, Sly W, Lerman MI, Stanbridge EJ. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol* 158:905–19,2001.
 49. Fenwick SA, Hazleman BL, Riley GP. The vasculature and its role in the damaged and healing tendon. *Arthritis Res* 4:252–60,2002.
 50. Li HY, Hua YH. Achilles Tendinopathy: Current Concepts about the Basic

Science and Clinical Treatments. *Biomed Res Int* 2016;1-9,2016.

51. Wang Y, Heilig KO, Minto AW, Chen S, Xiang M, Dean DA, Geiger RC, Chang A, Pravtcheva DD, Schlimme M, Deb DK, Wang Y, Heilig CW. Nephron-deficient Fvb mice develop rapidly progressive renal failure and heavy albuminuria involving excess glomerular GLUT1 and VEGF. *Lab Invest* 90: 83–97,2010.
52. Bencini L, Ospedaliero A, Careggi U, Crociani O, Messerini L. hERG1 Channels and Glut-1 as Independent Prognostic Indicators of Worse Outcome in Stage I and II Colorectal Cancer : A Pilot Study. *Transl Oncolo* 5:105-112, 2012.
53. Masaki I, Yonemitsu Y, Yamashita A, Sata S, Tanii M, Komori K, Nakagawa K, Hou X, Nagai Y, Hasegawa M, Sugimachi K, Sueishi K. Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2. *Circ Res* 90:966–73,2002.
54. Bajek A, Gurtowska N, Olkowska J, Kazmierski L, Maj M, Drewa T. Adipose-Derived Stem Cells as a Tool in Cell-Based Therapies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 64:443–54,2016.
55. Takebe T, Kobayashi S, Suzuki H, Mizuno M., Chang YM, Yoshizawa E, Kimura M, Hori A, Asano J, Maegawa J, Taniguchi H. Transient vascularization of transplanted human adult-derived progenitors promotes self-organizing cartilage. *J Clin Invest* 124:4325-34,2014.

56. Kavanagh DP, Robinson J, Kalia N. Mesenchymal stem cell priming: fine-tuning adhesion and function. *Stem Cell Rev Rep* 10:587-99,2014.
57. Najjar M, Krayem M, Merimi M, Burny A, Meuleman, N. Bron D, Raicevic G, Lagneaux L. Insights into inflammatory priming of mesenchymal stromal cells: functional biological impacts. *Inflamm Res* 67: 467-477,2018.
58. Komiyama Y, Ohba S, Shimohata N, Nakajima K, Hojo H, Yano F, Takato T, Docheva D, Shukunami C, Hiraki Y, Chung UI. Tenomodulin Expression in the Periodontal Ligament Enhances Cellular Adhesion. *PLoS One* 10:1-11,2013

謝辞

本研究の遂行にあたり、ご指導をいただいた星和人先生に深謝いたします。

また多くの知識や示唆をいただいた疋田温彦先生、稲木涼子先生、実験のご協力

をいただいた坂本友朋昭氏、そして多くのご指摘を下さいました東京大学ティ

ッシュ・エンジニアリング部の皆様に感謝いたします。