

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

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

氏名 國分冴子

### [背景]

アキレス腱のオーバーユー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と非付着部アキレス腱症に分類される。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。一般患者にも発症し、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。腱変性の要因には外的要因と内的要因がある。外的要因である過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。腱組織は細胞や血管に乏しく代謝活性が低いいため、健全に治癒することが難しい。

腱症の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。これに対して化学誘導モデルは主にコラゲナーゼ注入が用いられ、ヒトでの発生機序とは異なるものの、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。また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。

アキレス腱症で見られる退行性変化はインターロイキン 1- $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ : IL-1 $\beta$ )や腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor- $\alpha$ : TNF- $\alpha$ )といった炎症性サイトカインが病態に影響することが示唆されている。とくに IL-1 $\beta$  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)の発現を促進するとともに、I型コラーゲンの産生を減少させる。さらに IL-1 $\beta$  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、腱組織の軟骨様変性が軟骨内骨化を経て異所性骨化に至る機序が報告されている。

また低酸素状態は腱症で生じる異所性骨化と関連することが示唆されている。低酸素状態では腱細胞の低酸素誘導因子(hypoxia-induced factor-1 $\alpha$ : HIF-1 $\alpha$ )経路が活性化され、腱細胞のアポトーシスを引き起こす。腱は損傷後早期に解糖系および乳酸産生を増加させるが、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。

腱症における血管新生は退行性変化のひとつであり、血管数の増加は疼痛と関連する。一方で血管新生は損傷後組織への栄養供給を促進するために不可欠であり、腱修復における血管新生の役割は議論が分かれている。腱組織における血管新生のメカニズムや経時的变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戦略として細胞治療の応用が注目されており、腱症における間葉系幹細胞移植による組織修復の有効性は動物モデルで多数報告されている。脂肪由来幹細胞 (Adipose-derived stem cells: ASCs)は細胞治療に用いる間葉系幹細胞の候補のひとつであり、採取が比較的容易で細胞の供給量が多い特徴をもち、サイトカインや成長因子の分泌により創傷治癒や血管新生を促進することが報告されている。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、*in vivo* における ASCs の投与が腱炎やそれに随伴する異所性骨化を抑制する機序の解明はいまだ不十分である。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]

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、6週齢 C57BL/6J マウスのアキレス腱にコラゲナーゼ溶液を注入した。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、組織学的評価および $\mu$ CT解析を行った。

次に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。6週齢 EGFP マウス鼠径部より脂肪組織を採取し、コラゲナーゼ処理により得られた間質血管細胞群を培養し、2回継代して ASCs を得た。6週齢 C57BL/6J マウスを用いたコラゲナーゼ誘導アキレス腱炎モデル作製より1週間後、PBSに懸濁した ASC 溶液を患部に注入し(ASCs 群)、コントロール群では PBS のみを注入した。モデル作製から9日後、2週間後、4週間後に組織を回収し、 $\mu$ CT 解析および組織学的評価を行った。移植した EGFP マウス由来 ASC の追跡、炎症性サイトカイン、低酸素状態および血管新生の評価を免疫組織化学染色により行った。

#### [結果]

コラゲナーゼ誘導2週間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、4週間後と8週間後のすべての組織で、2週間後の所見に加えて線維走行の乱れ、円形細胞や軟骨様基質、異所性骨化、血管新生をみとめた。 $\mu$ CT では4週間後に7匹中6匹で異所性骨化の発現(発症率 85.7%)をみとめたことから、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。

次にコラゲナーゼ誘導アキレスモデルへ EGFP マウス由来 ASCs を移植し、組織学的評価を行った。HE 染色ではコントロール群で誘導 2 週間後および 4 週間後に細胞数増加、コラーゲン線維配向性の消失が見られた。また 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。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。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、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。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。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。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 群は誘導 2 週間後、4 週間後においてコントロール群と比較して退行性変化の数値は有意に低値を示した。コラゲナーゼ誘導アキレス腱炎において ASCs は腱炎における退行性変化を抑制し、コラーゲン線維を回復させることを示した。

つぎに、誘導 4 週間後に回収した組織を  $\mu$ CT にて撮影し、ASCs による異所性骨化の抑制効果の評価した。コントロール群と比較して ASC 群では石灰化物の体積は有意に減少した。ASCs の移植は腱症における異所性骨化を抑制することが示された。

移植した ASCs を抗 GFP 抗体を用いて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 陽性細胞は腱鞘側腱実質にみとめ、移植 7 日後 (誘導 2 週間後) では腱周囲結合組織にみとめた。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。これらの所見より ASCs は腱細胞への直接分化ではなく、腱症組織にパラクライン作用を示すことが考えられた。

誘導 9 日後に両群で細胞数増加をみとめたことから、損傷部位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 $\beta$  に対する免疫組織化学染色を行った。ASC 群ではコントロール群と比較して IL-1 $\beta$  の発現が有意に減少した。

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 Glucose transporter 1 (GLUT1) と Carbonic anhydrase 9 (CA9)、また血管新生の指標として Vascular endothelial growth factor (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。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。これらの所見により ASCs は検証誘導後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。

#### [考察]

本研究では ASCs が腱症において組織修復および異所性骨化の抑制に対して有効性を示すことを示した。また ASCs は早期の IL-1 $\beta$  発現抑制や低酸素状態の改善を示した。さらに、一般的に腱症において慢性期でみられる血管新生は病態のひとつであると考えられて

きたが、ASCs のパラクライン作用によって早期に生じる血管新生が腱炎の治癒に有効であることが示唆された。一方で、腱損傷早期において IL-1β の発現はコントロール群と比較して ASC 群で有意に減少することを示したが、ASCs による IL-1β 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、あるいは腱細胞における IL-1β 発現の直接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。またアキレス腱症の経時的変化を示したものの、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 の局在は時間経過とともに変化すると考えられ、連続的な経時的変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。今後、損傷した組織のサイトカインや増殖因子発現、移植した ASCs の動態に対する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。

#### [結語]

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した。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。