

審査の結果の要旨

氏名 國分 冴子

本研究は腱症に対する脂肪幹細胞（Adipose-derived stem cells: 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移植実験を行い、以下の結果を得ている。

1. マウス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経皮的にコラゲナーゼ溶液を注入した。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週後と同様の所見に加え、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。μCTでは4週後に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。
2. コラゲナーゼによるアキレス腱症誘導から1週間後にEGFPマウス由来のASCsを移植し、誘導9日後、2週間後、4週間後の組織学的評価を行った。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みられた。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、退行性変化を示した。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、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、ASC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。組織学的評価の半定量化によるスコアリングでは、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。
3. 誘導4週間後に回収した組織をμCTにて撮影し、ASCsによる異所性骨化の抑制効果を評価した。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。
4. 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、EGFP マウス由来 ASCs は腱細胞への直接分化ではなくパラクライン作用により腱修復に作用したことが示唆された。

5. 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、誘導 9 日後に炎症性サイトカインである **Interleukin-1 $\beta$ (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ていた。
6. 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 **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。

以上、本論文は、ASCs が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ことを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、腱症に対する ASCs の治癒促進メカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。