

論文内容要旨

Promotion of skeletal muscle repair in a rat skeletal muscle injury model by local injection of human adipose tissue-derived regenerative cells

(ヒト脂肪組織由来再生細胞を用いたラット骨格筋
損傷モデルの骨格筋再生の促進)

Journal of tissue engineering and regenerative medicine,
in press.

主指導教員：越智 光夫 教授

(統合健康科学部門 整形外科学)

副指導教員：下瀬 省二 准教授

(統合健康科学部門 整形外科学)

副指導教員：大段 秀樹 教授

(応用生命科学部門 消化器・移植外科学)

森 亮

(医歯薬学総合研究科 展開医科学専攻)

【目的】脂肪由来幹細胞は採取に際する危険や倫理的問題が少なく、再生医療における移植細胞ソースとして有望視されている。筋再生への応用として、これまでも皮下に筋組織を作る報告や心筋再生への利用研究の報告はあるが、骨格筋損傷モデルの再生に応用した報告はない。また、培養による脂肪由来幹細胞の樹立が多く報告されているが、時間を要するために骨格筋再生にとって重要なタイミングを逃してしまう可能性が高い。そこで本研究は特殊な条件の酵素と遠心分離によって脂肪組織内の再生に有効な細胞を単離する機械 (Celution) を用いた。Celution によって単離された脂肪組織由来再生細胞 (adipose tissue-derived regenerative cells: ADRCs) は培養による幹細胞の樹立が不要で、脂肪 1ml あたり 3×10^5 個もの ADRCs が約 2 時間程度で単離可能である。本研究の目的は免疫不全ラットを用いた骨格筋損傷モデルに対し、ヒト ADRCs を移植することで血管再生、筋再生効果の確認、及び骨格筋の機能的再生を証明することであった。

【材料と方法】実験動物は 9 週齢雌ヌードラットを用いた。移植細胞としてヒト ADRCs とヒト単核球 (bone marrow mononuclear cells: MNCs) を準備した。ADRCs は Cytori Therapeutics 社からヒト皮下脂肪組織より Celution を用いて単離されたものを購入し、MNCs は Lonza 社から購入した。骨格筋損傷モデルはラットの前脛骨筋筋腹中央部に長さ 6 mm、幅 4 mm、深さ 5 mm の損傷を加え作成し、筋膜縫合を行った後に損傷部に $30 \mu\text{l}$ の phosphate-buffered saline (PBS) に懸濁した 1×10^5 個のヒト ADRCs を注入した (ADRC 群)。また細胞コントロールとして $30 \mu\text{l}$ の PBS に懸濁した 1×10^5 個のヒト単核球を損傷部に移植した群 (MNC 群) と陰性コントロールとして $30 \mu\text{l}$ の PBS のみを損傷部に注入した群 (PBS 群) を作製した。

評価として、移植部の肉眼的評価、患健側比による筋湿重量の計測、腓骨神経電気刺激による筋収縮力評価 (単縮及び強縮) を移植後 1 週と 4 週で行った。さらに組織学的評価としてマッソントリクローム染色を行い、矢状断における癒痕組織の定量的評価と水平断における再生筋線維の筋径の計測を移植後 1 週・4 週で評価した。免疫組織学的評価においては移植後 1 週で評価し、新生血管の定量的評価として rat endothelial cell antigen-1 (RECA-1)、von Willebrand factor (vWF)、筋再生の定量的評価として Desmin、移植細胞の確認にヒト特異的ミトコンドリア (h-mit) を用いた。

【結果】肉眼的評価では、移植後 1 週、4 週共に ADRC 群において有意に損傷部の治癒を認めた。しかしながら筋湿重量比では各群において有意差を認めなかった。腓骨神経電気刺激時の筋収縮力でも単縮、強縮共に ADRC 群は移植後 1 週・4 週でコントロール群と比べ有意に大きくなった。損傷後 1 週と 4 週のマッソントリクローム染色での損傷部の癒痕面積において ADRC 群はコントロール群より有意に小さく、筋修復部の筋径において ADRC 群はコントロール群より有意に大きかった。Desmin による筋再生マーカーと RECA-1 による血管再生マーカーを用いた免疫染色では ADRC 群の方がコントロール群と比べ有意に筋再生効果、血管再生効果に優れていたが、vWF と h-mit による免疫二重染色では二重陽性細胞の数は少数であった。

【考察】骨格筋損傷モデルに ADRCs を移植することで、比較的早期から癒痕形成の抑制、筋再生と血管新生作用が促進されていることが分かった。

脂肪幹細胞は血管内皮細胞や筋管細胞へ分化することが報告されているが、一方で血管新生作用や癒痕形成抑制作用を持つ VEGF や、筋再生に重要な筋衛星細胞を刺激する HGF を分泌することにより、血管新生や筋再生を促進したり、癒痕形成を抑制したりするいわばパラクライン効果も持ち合わせていると報告されている。

ヒト特異的ミトコンドリアを用いた免疫組織学的評価において ADRCs は自身の細胞分化を認めたが、その数は少数であったことから、ヒト ADRCs 移植による筋修復促進効果は移植細胞自体の分化よりも主にパラクライン効果を介したものと推測された。ADRCs はすでに美容外科分野の臨床で使用されており、再生医療分野でも臨床応用しやすい細胞ソースの一つと考えられる。

【結語】骨格筋損傷モデルにおけるヒト脂肪組織由来再生細胞の移植は血管新生や筋形成を促進することで機能的な骨格筋再生に寄与していた。