

第8号様式

論文審査の要旨

|  |                |    |     |
|--|----------------|----|-----|
| 博士の専攻分野の名称   | 博士（医学）         | 氏名 | 森 亮 |
| 学位授与の要件  | 学位規則第4条第①・2項該当 |    |     |
| 論文題目   |                |    |     |
| Promotion of skeletal muscle repair in a rat skeletal muscle injury model by local injection of human adipose tissue-derived regenerative cells<br>(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)  |                |    |     |
| 論文審査担当者  |                |    |     |
| 主査   | 教授             | 瀧原 | 義宏  |
| 審査委員   | 教授             | 木村 | 浩彰  |
| 審査委員   | 教授             | 横田 | 和典  |
| 〔論文審査の要旨〕  |                |    |     |
| <p>骨格筋損傷は、スポーツ活動においてしばしば遭遇する疾患であり、軽傷の場合は保存療法で自然修復が可能であるが、損傷が広範囲に及ぶと癒痕組織が形成され筋萎縮、筋力低下などの機能障害を生じる。さらにトップアスリートにおける骨格筋損傷においても一般と同様に保存療法が主体であり、競技からの長期離脱を余儀なくされパフォーマンスの低下、怪我の再発、競技寿命の短縮などが危惧される。そこで我々は脂肪由来幹細胞（ASC）に着目した。ASC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の一つ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。そこで特殊な条件の酵素と遠心分離（Celution）によって単離した脂肪組織由来再生細胞（adipose tissue-derived regenerative cells: ADRCs）を用い骨格筋損傷後の筋再生促進効果について明らかにすることを本研究の目的とした。</p> <p>移植細胞としてヒトADRCsとヒト単核球（MNCs）を準備し、実験動物は9週齢の雌ヌード</p> |                |    |     |

ラットを用いた。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の筋腹中央部に長さ 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  $1 \times 10^5$  個のヒト ADRCs を注入した (ADRC 群)。またコントロールとして  $1 \times 10^5$  個のヒト単核球を投与した群 (MNC 群) と 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、癒痕組織の定量的評価と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。

結果は以下の通りである。肉眼的評価では、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。損傷後 1 週と 4 週のマッソントリクローム染色での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く、損傷部の癒痕面積においてはコントロール群よりも有意に小さかった。更に腓骨神経電気刺激時の筋収縮力においても ADRC 群は損傷後 1 週・4 週共にコントロール群と比べ有意に大きくなった。筋再生マーカーと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、筋修復部においてヒト由来細胞はほとんど見られなかった。

ADRCs は CD34 陽性細胞が約 70% を占め、ASC、血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞、周皮細胞などヘテロな細胞の集合体である。ヒト ADRCs 移植によって比較的早期に筋再生効果を認めたが、この筋修復促進効果は移植細胞自体の分化よりも主に ADRCs に含まれる幹細胞が分泌するサイトカインにより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。

以上の結果から、本論文は骨格筋損傷に対するヒト脂肪組織由来再生細胞 ADRCs の移植は骨格筋を早期かつ良好に機能回復させ、臨床応用できる新たな可能性を示しており、整形外科の発展に貢献することが大きい。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値のあるものと認めた。