

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	三藤 建志
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
Angiogenic conditioning of peripheral blood mononuclear cells promotes fracture healing (生体外血管新生能増幅ヒト末梢血単核球は骨折治癒を促進する)			
論文審査担当者			
主査	教授	菅野 雅元	印
審査委員	教授	吉栖 正生	
審査委員	准教授	仲 一仁	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>ヒト末梢血単核球（peripheral blood mononuclear cell:PBMNC）は骨再生や血管再生を目的とする細胞療法の細胞ソースとして低侵襲、低コストを実現する非常に有用なソースと考えられるが、その治療効果は低い。PBMNC の質を改善する新たな培養方法（無血清培地に SCF(Stem Cell Factor), Flt-3(Flt-3 ligand), TPO(Thrombopoietin), IL-6(Interleukin-6), VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor)を添加し、7日間培養する方法：Quality and Quantity conditioning culture(QQ culture)）が報告されており、ラット下肢虚血モデルを用いた血管再生の効果において良好な成績が報告されている。この培養方法で、機能を増強したPBMNC (QQMNC)を用い、その血管新生及び骨癒合促進能を検討し、ラット大腿骨難治性骨折モデルにおいて骨形成が促進されるかについても検討することを目的とした。</p> <p>方法は、健常成人の末梢血から比重遠心法により PBMNC を分離し、SCF, Flt-3, TPO, IL-6, VEGF を含む無血清培地にて7日間 QQ culture を行った。細胞数をカウント後、フローサイトメトリーで細胞表面抗原(CD34、VEGFR2、CCR2、CD206)の発現を、real-time PCR で血管新生関連遺伝子(VEGF、Angiopoietin1、Angiopoietin2)の発現を評価し、培養前後で比較した。また、QQMNC の骨分化促進作用を評価するためにヒト間葉系幹細胞（MSC）と共培養した状態で骨分化誘導を行い、コントロール群、PBMNC 群、QQMNC 群の3群に分け、共培養後3, 7日における骨関連遺伝子発現(1型コラーゲン、RUNX2、オステオカルシン)を real-time PCR にて評価し、共培養後14日目に、アリザリンレッド染色を行い、染色面積を評価した。血管新生の評価として、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)との共培養を行い、tube formation assay を用いて、コントロール群、PBMNC 群、QQMNC 群の3群にて、血管新生を評価した。In vivo として、免疫不全ラット大腿骨骨折癒合不全モデルを作製し、コントロール群、PBMNC 群、QQMNC 群の3群に分け、レントゲン、μCT、組織学的評価を行った。a smooth</p>			

muscle actin (α SM) 染色にて血管新生、トルイジンブルー染色にて骨癒合を評価した。術後 2 週の骨折部周囲組織を real-time PCR で血管新生関連因子(VEGF、FGF2)と骨関連遺伝子(1 型コラーゲン、RUNX2、オステオカルシン)を評価した。

細胞数は QQ culture 後に約 30%に減少したが、フローサイトメトリーにて前駆・幹細胞集団としての CD34 陽性細胞は約 7 倍に、抗炎症細胞である CD206 陽性細胞は約 26 倍に増加し、VEGFR2 陽性細胞は約 0.33 倍に、炎症細胞である CCR2 陽性細胞は約 0.5 倍に減少した。血管新生関連因子として、VEGF、Angiopoietin2 は培養前後で比較し、培養後で有意に増大していた。MSC との共培養において、共培養後 3 日目においては、QQMNC 群は他の 2 群と比較して、1 型コラーゲン、RUNX2 の発現が有意に高く、7 日目においては、QQMNC 群は他の 2 群と比較し、オステオカルシンの発現が有意に高かった。共培養後 14 日のアリザリンレッド染色では、QQMNC 群がコントロール群と比較し、有意に染色面積が大きかった。HUVEC との共培養において、QQMNC 群の tube formation の全長は他の 2 群と比較し、有意に長かった。In vivo において、移植後 2 週の組織学的評価から QQMNC 群では他の群と比較して有意に血管新生の亢進が確認でき、8 週のレントゲン撮影で PBMNC 群は 12.5% (1/8)に、QQMNC 群は 62.5%(5/8) に骨癒合を認めた。μCT、組織学的評価においても同様の骨癒合が確認できた。また、骨折部周囲組織の遺伝子解析から、QQMNC 群で有意に VEGF、FGF2 の発現が上昇していた。

本研究において QQ culture で培養した PBMNC は in vitro における血管新生及び骨癒合促進能が有意に増強されることが示された。また、In vivo においても、骨折周囲の血管新生を有意に亢進させることで、骨癒合が、有意に促進されることが推測された。血管新生、骨癒合が促進した理由として、培養後、CD34 陽性細胞数の増加が関与していると考えられたが、フローサイトメトリーの結果から、組織修復、抗炎症、骨癒合促進に関与する M2 マクロファージの細胞表面抗原である CD206 陽性細胞数が増加していたため、M2 マクロファージの増加も骨折治癒を促進したと考えられた。CD34 陽性細胞を用いたラットの実験では、今回の実験よりも高い骨癒合率を認めているが、QQMNC は低侵襲で比較的容易に調整可能であるため、今後の骨折、偽関節治療の一つの選択肢として期待できると考える。

以上の結果から、本論文は生体外で血管新生能を増幅する培養方法で培養したヒト末梢血単核球は免疫不全ラット大腿骨偽関節モデルにおける骨癒合を促進し、今後、臨床応用できる可能性があり、整形外科領域の発展に資すること大である。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するのに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	三藤 建志
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
Angiogenic conditioning of peripheral blood mononuclear cells promotes fracture healing (生体外血管新生能増幅ヒト末梢血単核球は骨折治癒を促進する)			
最終試験担当者			
主査	教授	菅野 雅元	印
審査委員	教授	吉栖 正生	
審査委員	准教授	仲 一仁	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判定合格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成29年11月2日の第71回広島大学研究科発表会（医学）及び平成29年10月30日の本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 培養ヒト末梢血単核球治療の骨癒合率を上昇させる方法 2. CD34陽性細胞の骨癒合への関与 3. 生体外で血管新生能を増幅する培養方法の改善方法 4. M2マクロファージの骨癒合への関連 5. 本研究の臨床応用 <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			