

論文内容要旨

Evaluation of autologous skeletal muscle-derived factors for regenerative medicine applications

(自己骨格筋由来因子を利用する再生医療のための新規アプローチの検討)

Bone and Joint Research, 6 (5) 277-283, 2017.

主指導教員：安達 伸生教授

(医歯薬保健学研究科 整形外科学)

副指導教員：大段 秀樹教授

(医歯薬保健学研究科 消化器・移植外科学)

副指導教員：久保 忠彦准教授

(医歯薬保健学研究科 整形外科学)

好川 真弘

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【目的】

再生医療において前駆細胞、サイトカイン(CKs)と成長因子(GFs)は組織再生、修復に有効である。しかし多くの方法は、侵襲的で高コスト、時間を要すものが多い。術中に特別な処理なく、その場で組織修復を促す因子を得て、より良い術後成績を得られれば望ましい。以前の報告から、外傷後の骨格筋が骨髄前駆細胞、種々の CKs/GFs などの様々な因子を含む事が証明されている。また、骨格筋由来の細胞を用いた骨や軟骨修復についても報告されている。本研究の目的は、筋肉由来の抽出物内の細胞の特徴、CKs/GFs を確認し、臨床適用のため、細胞増殖能、骨形成および脈管形成促進を検討することである。

【方法】

膝前十字靭帯再建術時に通常廃棄される半腱様筋に注目した。半腱様筋腱から剥離した筋肉 500mg を生理食塩水 1ml に入れ破碎した。この上清に含まれる成長因子を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で vascular endothelial growth factor (VEGF)、insulin-like growth factor-1 (IGF-1)、basic fibroblast growth factor (bFGF)、stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) を、細胞成分をフローサイトメトリーで解析した。また骨髄間葉系幹細胞 (MSC) に上清を加え、MMT アッセイで細胞増殖に与える影響、また MSC に骨分化誘導を行い、培地交換の際に上清を加え、alizarin red 染色や、Real time PCR により Runt-related transcription factor 2 (RUNX2)、collagen type I alpha 1 (Col1a1)、オステオカルシンを計測し、骨分化への影響を検討した。また human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) を使用し、Tube formation assay を行い、脈管形成への影響も検討した。いずれも対照群として phosphate buffered saline (PBS) を使用した。

【結果】

ELISA にて VEGF が $3.80 \pm 8.16 \text{ pg/ml}$ 、SDF-1 が $3.58 \pm 8.50 \text{ pg/ml}$ 、bFGF が $325.6 \pm 210.2 \text{ pg/ml}$ 、IGF-1 が $82.0 \pm 58.2 \text{ pg/ml}$ 含まれており、中でも bFGF、IGF-1 は豊富に含まれていた。フローサイトメトリーでは CD34 陽性細胞を多く認めた。細胞増殖能は、上清群で 24 時間、72 時間後に対照の PBS 群と比較し有意に細胞増殖の亢進を認めた。骨分化誘導に関しても上清群では RUNX2、Col1a1、オステオカルシンの発現はいずれも有意に上昇し、alizarin red 染色の染色性も増加した。脈管形成においても同様に上清群は PBS 群と比較して total tube length の有意な増大を認めた。

【考察】

CKs/GFs が外傷後の骨格筋から放出される事が報告されており、我々は骨格筋は組織再生の自己由来組織候補であると考え。この研究において、我々は、骨格筋上清には様々な成長因子を含んでおり、これは細胞増殖、骨誘導と脈管形成に良好な生物学的影響を及ぼすことを示した。これは組織修復のために骨格筋上清が再生医療に有効であるという最初の報告である。多くの先行研究で bFGF は骨、軟骨、神経組織、創傷治癒に関して有効に働くことが示されている。上清に含まれる bFGF はすでに臨床で使用されている platelet-rich plasma (PRP) と比較しても多くの量が含まれている。この生物学的可能性に加えて、骨格筋は手術部位から容易に得ることが

でき、この筋組織から得られる上清は **CKs/GFs** を含み、骨形成および脈管形成に有用である事が示された。これは術中に簡便に作製し使用することで、軟骨、半月損傷の治癒促進、骨折治療後の骨癒合の促進など治療成績向上の可能性が示唆される。現在行われている再生医療の多くは侵襲的かつ高コストで時間のかかるものも多い中、術中に採取される筋組織を即時利用する本研究は今後の再生医療の一つの選択肢になりうる可能性がある。