

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	好川 真弘
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 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)			
論文審査担当者			
主査	教授	青山 裕彦	印
審査委員	教授	秀 道広	
審査委員	准教授	仲 一仁	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>再生医療において，前駆細胞の存在や，各種の成長因子(GFs)やサイトカイン(CKs)の産生は，組織の再生や修復の点で重要である。しかし，現在実施されている多くの方法は，侵襲的であり，あるいは高いコストや時間を要するものである。外科領域における実臨床では，術中簡単に得られ，特別な処理を必要とせず，より良い組織修復と術後成績をもたらす材料の利用が望ましい。これまでに，外傷後の骨格筋が骨髄前駆細胞ならびに種々のCKs/GFsなどの組織修復を促進する因子を含むことが報告されている。また，骨格筋由来の細胞による，骨や軟骨の修復促進についての報告もある。本研究では，筋肉由来の抽出物に含まれる細胞の特徴と，組織抽出液の持つ，細胞増殖，骨形成および脈管形成の促進能を解析し，再生医療への適応の可能性を検討した。</p> <p>膝前十字靭帯再建には半腱様筋腱が用いられる。その際，腱から剥離した筋は通常廃棄される。著者はこれに着目した。半腱様筋腱から剥離した筋肉500mgを細切り生理食塩水1mlに入れ攪拌した。この上清に含まれる成長因子として，VEGF，IGF-1，bFGF，SDF-1をenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)で，細胞成分をフローサイトメトリーで解析した。その結果，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$82.0 \pm 58.2 \text{ pg/ml}$含まれていることを確認した。フローサイトメトリーではCD34陽性細胞を多く認めた。</p> <p>またこの上清の生物活性を骨髄間葉系幹細胞(MSC)およびヒト臍帯静脈内皮細胞を用いて検討した。細胞増殖に与える影響を調べるため，筋組織上清を加えた培</p>			

養液，および対照として PBS を加えた培養液で，MSC を培養し，24 時間後，72 時間後に細胞数を測定した．細胞数の測定は，MTT アッセイの変法（MTT の代わりに WST-8 を用いる）により行った．いずれの培養時間においても，筋組織上清群は対照群に対して有意に細胞数が多く，上清による MSC 細胞増殖の促進が示唆された．また MSC に骨分化誘導を行ったのち，培地に上清を加えたところ，アリザリンレッドの染色性が増強し，また，リアルタイム PCR による計測では，RUNX2，Colla1，オステオカルシンの発現が，いずれも有意に上昇していた．さらに，ヒト臍帯静脈内皮細胞のチューブフォーメーションアッセイでも，上清群では PBS 群と比較して有意に脈管総長が増大していた．以上より，骨格筋抽出物は幹細胞の増殖や分化の促進，および血管形成の促進に有効であることが示された．

これまで，外傷後の骨格筋から，種々の CKs/GFs の放出が報告されている．本研究においても，前十字靭帯再建に用いられる半腱様筋腱から剥離した骨格筋の上清が，VEGF や，IGF-1，bFGF，SDF-1 といった成長因子を含んでいることを確認した．bFGF は，多くの先行研究で，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．すでに臨床で使用されている多血小板血漿にも bFGF が含まれているが，今回，骨格筋上清には，より多量の bFGF が含まれていることが示された．

本論文は，骨格筋上清が組織修復，そして再生医療に有効であることを示す最初の報告である．本法では，手術部位から容易に採取できる骨格筋から，その場で，比較的簡便な方法により抽出物が得られ，それにより，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，治療成績の向上が期待される．

以上の結果から，本論文は，術中に採取され，通常は廃棄される筋組織を即時利用する，非侵襲的，低コスト，短時間で実施可能な再生医療の手法の開発に繋がるものであり，整形外科領域研究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	好川 真弘
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 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)			
最終試験担当者			
主査	教授	青山 裕彦	印
審査委員	教授	秀 道広	
審査委員	准教授	仲 一仁	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年1月4日の第72回広島大学研究科発表会（医学）及び平成29年12月28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。			
1. 骨格筋上清のサイトカインの発現機序			
2. 骨格筋上清の投与量の決定法			
3. 骨格筋上清の投与により間葉系幹細胞の増殖と分化が共に増進した機序			
4. 骨格筋上清が骨分化促進に及ぼした影響とその機序			
5. 骨格筋組織以外の組織を使用した場合とその比較			
6. 本研究の臨床応用			
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。			