



Title	脂肪由来幹細胞と足場材料を用いた筋組織増生の試み
Author(s)	安部, 友大
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/91833
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (安部 友大)	
論文題名	脂肪由来幹細胞と足場材料を用いた筋組織増生の試み
論文内容の要旨 【研究背景・目的】 脂肪由来幹細胞 (ASCs) は、多血小板血漿 (PRP) とともに生体内の筋組織へ移植することで筋分化することが報告されている。しかし、PRPは様々な増殖因子のカクテルであり、成分の含有量に個人差があるため安定した結果が得られにくく、ASCs移植後に筋機能まで評価した文献は少ない。一方、移植細胞は凝集体にすることによって移植後の保持率をよくし、細胞機能の向上を期待できることが知られている。本研究では、脂肪由来幹細胞とハイドロゲルマイクロ粒子 (ハイドロゲル) の凝集体の移植により筋組織増生を誘導することを目的とし、そのための条件を検索した。 【方法】 実験Ⅰ 筋機能増生を目指したASCs移植における最適条件の検索 I-1) ASCsの筋分化に有効な因子の検討 HGF、G-CSF、IGF、TGF-β、PDGF-AA、PDGF-BBの6種タンパクを2%ウマ血清含有DMEM培地を用いて、それぞれ10、30、60、100 ng/mLの濃度に調整し、各種筋分化誘導培地を作製した。生後8週齢の雄性C57BL/6Jマウスより単離したASCs 1.5×10^4個を48ウェルプレートに播種し、前述の筋分化誘導培地をそれぞれ200μLずつ添加した。培地交換は2日に1度行い、14日後蛍光免疫染色にてASCsのMyo-D発現を観察した。DAPI染色にて核を染色し、Myo-D陽性率 = (Myo-D陽性細胞数/DAPI陽性細胞数) $\times$ 100と定義して、各群のMyo-D陽性率を算出した。また、生後8週齢の雄性C57BL6/Jマウスから採取したPRPを用いて10%PRP, 20%PRP含有DMEM培地を作製し、同様の実験を行った。 I-2) ゼラチンハイドロゲルマイクロ粒子の分解反応およびPDGF-BB徐放能の検証 牛骨ゼラチンをオリーブオイル中で攪拌し、アセトンで置換後ふるいにかけ、熱架橋を加えることでハイドロゲル (5-20μm) を作製した。1 μg/mLのPDGF-BBを含浸させたハイドロゲルにPBS溶液の添加と回収を繰り返し、24時間後からPBS溶液をコラゲナーゼ溶液に変え、一定時間後に同様の操作を繰り返した。回収した上清のPDGF-BB含有量をELISAにて、タンパク含有量をBCAアッセイにて測定した。 I-3) 組織への注入が可能なASCsの細胞凝集体の作製および大きさの検討 U底の96ウェルプレートにポリビニルアルコールを添加し、親水性にした後にウェル底をPBSで洗浄、それにASCsとハイドロゲルを播種することで細胞凝集体を作製した。26 G注射針に通過可能な凝集体の大きさの検討を行うためにASCsとハイドロゲルを種々の割合で混合した。 I-4) 足場の有無およびPDGF-BBを含浸したハイドロゲルを用いた細胞凝集体における増殖因子分泌能に関する検討 細胞凝集体における足場としてのハイドロゲルの有無および筋分化促進因子であるPDGF-BBの有無による細胞凝集体の増殖因子分泌能 (HGF, VEGF) の変化について検討した。また含有する細胞数を測定することで細胞当たりの増殖因子分泌能の算出も行った。 実験Ⅱ マウス筋組織へのASCs移植による細胞保持率および筋力増強に関する検証 II-1) 細胞懸濁液および細胞凝集体注入による細胞保持の違い 細胞凝集体の組織注入後における歩留まりの評価を行うために、5×10^4個のASCsの細胞膜をPKH26にて標識した後に (a) 細胞懸濁液、(b) 細胞凝集体+PBSを含浸したハイドロゲル群の2群を作製し、インフルランにて全身麻酔下、C57BL6/Jマウスヒラメ筋に (a) (b) をそれぞれ注入した。注入6時間後、1、3、7日後にヒラメ筋を摘出、組織をハサミで細断した後に5 mLの0.4 wt%コラゲナーゼ溶液内にて2時間振盪させ、70 μmセルストレーナーを通して得られた抽出液100 μLを96ウェルプレートに滴下、蛍光顕微鏡下でPKH陽性細胞数を観察した。	

II-2) 移植後の筋増生に対する筋負荷の効果

(a)PBSのみ (PBS)、(b) PDGF-BBを含む浸したハイドロゲル (PDGF-BB+ゲル)、(c) ASCs+PBSを含む浸したハイドロゲルマイクロ粒子含有細胞凝集体 (ASCs+ゲル)、(d)ASCs+PDGF-BBを含む浸したハイドロゲル含有細胞凝集体 (ASCs+PDGF-BB+ゲル) の4群作製し、これらの100 μ L懸濁液をそれぞれC57BL6/Jマウスの両側ヒラメ筋へ注入した。注入後、トレッドミルを用いて15 m/min、20 min、5回/週のプロトコルで筋負荷を加え、0,7,14,21,28日後に四肢の筋力測定 (マウス・ラット用握力測定装置 GPM-101B/V) を行った。得られた測定値を体重当たりに換算することで筋力値を算出した。

II-3) 筋線維径の組織学的評価

②で作成したマウスの実験モデルは、28日目の筋力測定後、ヒラメ筋を摘出し組織切片標本 (HE染色) を作成の上、imageJにて筋線維長径の計測を行い、各群の比較を行った。

II-4) 免疫染色による筋分化の評価

移植7日目でのASCsおよび周囲組織のMyo-D発現について、作製した凍結切片を用いて蛍光免疫染色を行った。染色した組織像におけるPKH、Myo-D、核の蛍光を観察、倍率200倍で撮影し各群の比較を行った。

【結果】

実験I 筋機能増生を目指したASCs移植における最適条件の検索

I-1) PDGF-BB 100 ng/mL群が、他群と比較して高いMyo-D陽性率を示した。また、PDGF-BB 60 ng/mL群とは有意差は認められなかった。

I-2) 回収した上清中に含まれるPDGF-BB徐放率とゼラチン徐放率には強い相関がみられたことから、ゼラチンの分解とともにPDGF-BBが徐放されていることが示唆された。

I-3) ASCs:ハイドロゲルを500:50の割合で凝集体を作製したものが26G注射針を通過可能で最も多くのASCsおよびハイドロゲルを含んでいることが示唆された。

I-4) ASCsの細胞凝集体では、ハイドロゲルを含有させた方が細胞増殖および液性因子分泌能向上に有利に働く可能性が示唆された。さらにハイドロゲルにPDGF-BBを含む浸させることによってさらにASCsの液性因子分泌能を向上させられることが示唆された。

実験II マウス筋組織へのASCs移植による検証

II-1) 細胞懸濁液の状態で組織注入してもほとんど組織内に留まっていないのに対し、細胞凝集体の状態では有意に高い細胞保持率を示した。

II-2) 各群前肢の筋力比に有意差が認められなかったことに対し、ASCs+PDGF-BB+ゲル群は他群よりも有意に高い四肢筋力比を示した。このことから、ASCs+PDGF-BB+ゲル群のみ下肢の筋力が増強したことが示唆された。また、筋負荷を加えないと筋力が増強されない可能性が示唆された。

II-3) ASCs+PDGF-BB+ゲル群が他群よりも有意に大きな筋線維長径を示した。このことから、PDGF-BB含有細胞凝集体群のみ下肢の筋力が増強されたことが示唆された。

II-4) ASCs+PDGF-BB+ゲル群にはわずかにMyo-D発現がみられ、また周囲組織にもMyo-D発現が認められた。

【考察】

足場材料を含有した細胞凝集体は、増殖因子分泌能が向上し、組織注入後の細胞保持率も良好となった。また、PDGF-BB含有ハイドロゲルを凝集体に組み込むことで移植したADSCの筋分化を促進し、周囲組織のMyo-D発現も誘導した。さらに、筋負荷を加えることにより下肢の筋力が増強した可能性が示唆された。

今後は移植したASCsの成熟した筋細胞への分化の観察や、筋電図測定など生理学的な検討を行い、さらなる検討が必要であると考えられる。

【結語】

PRPに含まれる因子のうち、PDGF-BBはASCsの筋分化に有効であった。また、PDGF-BBをハイドロゲルマイクロ粒子に含浸させてASCsの凝集体を作製し、筋組織へ移植し、筋負荷を加えることで筋力増強をはかることができる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (安 部 友 大)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	田中 晋
	副 査	教授	村上 伸也
	副 査	准教授	伊藤 祥作
	副 査	講師	佐々木 淳一
論文審査の結果の要旨 本研究は、骨格筋増生を目的とした脂肪由来幹細胞 (ASCs) の筋組織への移植において、ASCs の分化に有効な多血小板血漿中の増殖因子と、ゼラチンハイドロゲルマイクロ粒子との凝集体の有効性について検討したものである。 その結果、多血小板血漿中の他の増殖因子と比較して、PDGF-BB が ASC s に Myo-D の発現を強く誘導し、PDGF-BB を含浸したハイドロゲルマイクロ粒子を含む ASC s 凝集体は、HGF, VEGF の分泌を有意に増加させた。また、マウス下肢筋への移植において、細胞凝集体は細胞懸濁液と比較して高い細胞保持率を示し、筋負荷を併用することで筋線維長径の増大と筋力値を上昇させることが明らかとなった。 以上の結果は、骨格筋増生を目的とした ASC s の移植において、PDGF-BB を含む細胞凝集体と筋負荷を併用することの有用性を示すものであり、博士(歯学)の学位論文として価値のあるものと認める。			