



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

学位論文

脂肪由来幹細胞と足場材料を用いた 筋組織増生の試み

2023 年 3 月

大阪大学大学院歯学研究科口腔科学専攻

顎口腔病因病態制御学講座

口腔外科学第一教室

安部 友大

緒言

間葉系幹細胞 (以下、幹細胞) は骨髄や脂肪組織など様々な組織に含まれており、自己複製能と分化能を持つ^{1,2}。また幹細胞は、周囲組織の修復を促すサイトカインの分泌能も有しており、この特性を活かして、様々な疾患の治療に活用されている³。幹細胞のうち、脂肪由来間葉系幹細胞 (Adipose derived stem cells、以下 ASCs) は採取が比較的容易であり、免疫寛容性が高いことから、以前より同種他家移植の供給源として注目されてきた⁴。

当教室では、以前より口蓋裂治療に取り組んでおり、口蓋裂治療後の鼻咽腔閉鎖不全症に対し、軟口蓋の口蓋帆挙筋を増強させることが望まれている。軟口蓋に脂肪を注入することで鼻咽腔閉鎖不全を解消する治療法があるが、時間経過とともに脂肪は吸収してしまうため治療効果が減じてしまうことが知られている⁵。また、鼻咽腔閉鎖不全の治療には軟口蓋、特に口蓋帆挙筋の筋力増強が重要であることが示唆されていることから、本研究では ASCs を移植し筋力を増強させる方法について検討することとした⁶。

ASCs の移植による組織増生は、骨組織をはじめ多くの分野に及んでいる。ASCs を用いた筋組織の再生については、Mitsui や Forcales、Rigon、Zou らが報告しているが、幹細胞移植後の筋機能まで評価したものは Zou らのみである⁷⁻¹⁰。しかし、Zou らは遺伝子改変したマウスから採取した幹細胞を腓腹筋に移植し、局所の筋衛星細胞の活性化を観察しているが、遺伝子改変動物を使用しているため、安全性や倫理的な観点からヒトで同様の実験を行うのは困難である¹⁰。

幹細胞の移植経路としては全身投与と局所投与がある^{11,12}。前者は静脈注射による投与法が主であるが、後者は局所注入法や幹細胞シートによる移植法があり、さらに局所注入法には、細胞懸濁液による投与法、インジェクタブルゲルなどの足場を用いる方法の他、細胞凝集体の形態で移植する方法がある¹³⁻¹⁶。幹細胞移植を成功させるためには、いかに多くの細胞を局所に生着させるかが重要となってくるが、細胞懸濁液による注入は、移植幹細胞がその場にとどまらず流れ出てしまい、治療効果がなくなってしまう¹⁶。一方、インジェクタブルゲルなどの足場材料との併用方法は、移植した細胞の生着率の向上を期待することができるが、筋分化の誘導に必要な増殖因子を安定化させるためには、2液混合型にする必要があり、1液性の移植治療に比べて操作性が悪い^{7,17,18}。それに対し細胞凝集体は、細胞間相互作用を高めることで細胞増殖や分化促進が行われ、ゼラチンハイドロゲルマイクロ粒子などの足場を加えることにより酸素や栄養素も供給でき、細胞の活性化や生存率の向上が期待できる^{19,20}。さらに薬剤徐放性のゼラチンハイドロゲルマイクロ粒子を凝集体に組み込めば、一定期間、増殖因子の供給を維持させることも可能である。また、2液混合型にする必要もなく注入可能であるため、本研究では、細胞凝集体にハイドロゲルマイクロ粒子を含んだ形態で移植する方法を選択した。

当研究室では、過去に ASCs をインジェクタブルゲルに含有させ、多血小板血漿 (Platelet Rich Plasma、以下 PRP) などの増殖因子とともに咬筋へ移植することで ASCs を筋分化させることに成功している⁷。しかし、PRP は自己由来の成分であるため臨床応用しやすいとい

う利点がある一方、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こと、採血術者によって成分の含有量に差が生じるため安定した結果が得られにくいという欠点が報告されている²¹。この欠点を克服するため、まずは PRP に含まれる因子のうち ASCs の筋分化に関与するものについて検討し、ASCs の筋分化に最も効果的な因子を同定する必要があると考えた。

また、筋機能の向上には筋損傷が必要であることが報告されている²¹。筋損傷を加えることによって、筋衛星細胞の活性化および分化が促進し、筋線維増生が生じることで筋機能が向上する。筋損傷を加える方法としては、骨格筋線維の脱分極作用を有する細胞毒素であるカルジオトキシンの注入や、骨格筋の損傷を引き起こすトレッドミル走行による筋負荷があるが、後者の方がより実臨床に近い^{8,23}。トレッドミル走行では筋組織へ負荷を加えることによって筋線維の断裂を引き起こし、筋損傷を誘発することができる²⁴。

そこで、本研究では ASCs と筋分化促進因子を含浸させたゼラチンハイドロゲルマイクロ粒子の凝集体をマウス筋組織へ移植するにあたり、最も良い移植条件を探り、トレッドミル走行による筋負荷を加え、ASCs 移植により筋組織を増生させる方法を確立することを目的とした。

方法

本研究における実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の規定 (動物実験委員会承認番号：動歯-30-020-0) と動物の愛護および管理に関する法律を遵守して行った。

材料

・ゼラチンハイドロゲルマイクロ粒子

ゼラチンハイドロゲルマイクロ粒子 (以下、ハイドロゲル) は、田畑らの方法を一部改変して作製した²⁵。具体的には、40℃の恒温槽で温めたフラスコ内でオリーブオイル 600 ml (富士フィルム和光純薬工業株式会社、大阪、日本) と 10%の牛骨ゼラチン水溶液 30 ml (等電点 5.0、平均分子量 100,000) (新田ゼラチン株式会社、大阪、日本) を混和し、300 rpm にて 1 時間攪拌した。攪拌を継続しながらフラスコを 4℃まで冷却し、4℃のアセトン 200 ml を添加、さらに 30 分間攪拌し、ファルコンチューブに分注した。4℃、5000rpm にて 10 分間遠心分離し、オリーブオイルとアセトンの混合上清を廃棄し、ペレットになったゼラチンの粒子をアセトンで再懸濁する作業を二度繰り返した。アセトンで懸濁された粒子の懸濁液を、20、32、50、100、300 μm のマイクロシーク (大阪ケミカル株式会社、大阪、日本) に通してふるいにかけて、粒径が 5-20 μm の粒子のみを採取した。真空乾燥装置 (AURORA DN-30: 佐藤真空機械工業、埼玉、日本) を用いて 160℃、72 時間の熱架橋を行った。エッペンチューブに分注した粒子を ethylene oxide gas (EOG) 滅菌し、残留したガスは室温、72 時間

吸引脱気によって除去した。作製したハイドロゲルは4℃で保存した。

• ASCs

ASCs の単離は Mitsui らの方法を一部改変して行った⁷。具体的には、生後 8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを使用した。イソフルランを用いた吸入麻酔下、鼠径部に皮切を加え、鼠径部皮下脂肪を採取した。

採取した脂肪組織を Phosphate buffered saline (PBS) にてよく洗浄し、コラゲナーゼ (富士フィルム和光純薬工業株式会社) を PBS に溶解し 0.2% の濃度に調整し、37℃、45 分間振盪した後、10% fetal bovine serum (FBS) 添加、および 1% Penicillin-Streptomycin 添加 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (以下、基礎培地) にて懸濁し、40 μ m セルストレーナーを通して得られた抽出液を 200 G にて 10 分間遠心分離した。上清溶液を吸引除去し、得られた細胞ペレットを基礎培地にて懸濁し、10 cm Dish に播種した。基礎培地は 2 日ごとに交換し、3 継代目 ASCs を 0.25% トリプシン-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 溶液で回収し、実験に使用した。同単離方法で得られた ASCs は、骨、軟骨、脂肪への分化および cluster of differentiation (CD) 34、45 の陰性、CD29、73、90、105 の陽性が確認されている。

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索

PRP に含まれる因子のうち、Hepatocyte Growth Factor (HGF)、Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF)、Insulin-like Growth Factor (IGF)、Transforming Growth Factor- β (TGF- β)、Platelet Derived Growth Factor-AA (PDGF-AA) および PDGF-BB があり、いずれも筋衛星細胞の活性化に関与するとされるタンパクであった²⁶⁻³⁰。HGF、G-CSF、TGF- β (それぞれ R&D systems、ミネソタ、アメリカ合衆国)、IGF (Abcam, plc、ケンブリッジ、イギリス)、PDGF-AA および PDGF-BB (それぞれ富士フィルム和光純薬工業株式会社、大阪、日本) を用いて、0.1% FBS を含んだ PBS に添加した。さらにそれに 2 % fetal horse serum および 1% Penicillin-Streptomycin を添加した DMEM (以下、筋分化誘導培地) にそれぞれ 10, 30, 60, 100 ng/ml の濃度に調整し、溶液を作製した。

PRP の作製も行った。Acid-citrate-dextrose 液 (無水クエン酸 436 mg、クエン酸三ナトリウム二水和物 1322 mg、D-glucose 1470 mg を滅菌水 100 mL に溶解) 1 ml をあらかじめシリンジに採取しておき、イソフルラン (富士フィルム和光純薬工業株式会社) での吸入麻酔下で C57BL/6J 系マウス 8 週齢雄 (日本エスエルシー株式会社、静岡、日本) 15 匹の下大静脈から計 10 ml 採血を行った。その後、Matsui らの方法に準じて 20°C、800 G で 10 分間遠心分離し、血漿と buffy coat を採取した³¹。さらに 2100 G で 10 分間遠心分離し、上清を除去、計 1.4 ml の PRP を作製した。そこに 2% 塩化カルシウム溶液 0.2 ml を混和し、37°C、1 時間インキュベートして PRP 活性化した。得られた PRP を筋分化誘導培地に混和することで 10%PRP 溶液、20%PRP 溶液を作製した。

48 穴プレート内の各ウェルに ASCs を 1.5×10^4 個ずつ播種し、基礎培地を加え一晩 37°C インキュベーター内に静置した。翌日に培地を除去し、前述した筋分化促進因子を含有した筋分化誘導培地および 10%、20% PRP 溶液を $200\ \mu\text{l}$ ずつ加え ASCs を培養した。培地交換は 2 日ごとに行い、14 日目に免疫蛍光染色を行った。免疫染色は PBS にて細胞を洗浄した後、4%パラホルムアルデヒドにて 30 分間固定を行い、その後再度 PBS にて洗浄し、0.1 %Triton-PBS にて膜透過処理を 5 分間行った。1% bovine serum albumin にて 1 時間ブロッキングを行い、ウサギ抗マウス Myo-D ポリクローナル抗体 (#bs-2442R、Bioss Antibodies、マサチューセッツ、アメリカ合衆国) をイムノブロック (ケー・エー・シー株式会社、京都、日本) にて 1000 倍希釈したもので反応させ、その後 4°C で一晩静置した。一次抗体を除去した後、遮光下でヤギ抗ウサギ IgG 抗体-ALEXA FLUOR[®] 488 (#150113、Thermo Fischer Scientific、マサチューセッツ、アメリカ合衆国) をイムノブロックで 200 倍希釈し、2 時間反応させた。PBS にて洗浄後、5000 倍希釈した 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) を用いて核染色を行い、PBS にて洗浄後、蛍光顕微鏡 (BZ-X700:KEYENCE、大阪、日本) にて観察した。Green fluorescent protein (GFP) 用フィルター (励起波長 470 nm、吸収波長 525 nm) および DAPI 用フィルター (励起波長 360 nm、吸収波長 460 nm) を使用し、計 3 か所ずつ各ウェルの撮影を行い、DAPI および Myo-D 陽性細胞数を算出した。算出は計 2 回行った。また、ポジティブコントロールとしてマウス筋芽細胞である C2C12 (理化学研究所バイオリソース研究センター、茨城、日本) を筋分化誘導培地にて培養し、ネガティブコントロールとして ASCs

を基礎培地で培養し同様に実験を行った。

Myo-D 陽性率 = (Myo-D 陽性細胞数 / DAPI 陽性細胞数) × 100 と定義し、各群の陽性率を算出した。

I-2) ハイドロゲルの分解および PDGF-BB の徐放に関する検証

PDGF-BB をハイドロゲルに含浸させ、ハイドロゲルの分解とともに PDGF-BB が徐放されるかどうかを検討した。

PDGF-BB 溶液を 1 µg/mL に調整し、20 µl をハイドロゲル 2 mg に含浸させ、4°C、5000 rpm にて 5 分間遠心分離し粒子と溶液をなじませたのち、4°C にて一晩静置した。粒子内に溶液が含浸されたものを用いて実験を行った。

実験は Matsui らの方法を一部改変して行った³⁰。具体的には、ハイドロゲルを 300 µl の PBS に浸漬し、1、2、3、6、12、24 時間後に上清 150 µl を回収し、回収した上清と等量の PBS を添加した。24 時間後に上清回収してから、添加する溶液を PBS からコラゲナーゼ D (Sigma Aldrich、ミズーリ、アメリカ合衆国) を PBS に溶解したコラゲナーゼ溶液 (10 µg/ml) に変更した。コラゲナーゼ溶液に変更してから、1、2、3、6、12、24、36、60、72、84、96、時間後に上清を回収し、採取したサンプルは 4°C で保管した。

サンプル中に含まれるタンパク濃度を BCA タンパク質アッセイ (Thermo Fischer Scientific) にて、PDGF-BB の濃度を Enzyme-linked immune-sorbent assay (ELISA) キット

(R&D systems) を用いて測定した。すべてのサンプルに含まれるタンパクおよび PDGF-BB の濃度から、それぞれのサンプルに含まれる量を計測しその合計をそれぞれ 100%ハイドロゲル分解量、100%PDGF-BB 徐放量とした。各サンプルに含まれるタンパクおよび PDGF-BB 量を測定することで、PBS またはコラゲナーゼ溶液に浸漬してから回収するまでに分解されたハイドロゲルの割合および徐放された PDGF-BB の割合を算出した。

さらに、分解されたハイドロゲルの割合と徐放された PDGF-BB の割合の近似直線を作成し、決定計数を算出した。

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

動物実験で筋注を行う際、過去の報告では 26 または 27 ゲージ注射針を使用している^{32,33}。それらを参考に、本実験は 26 ゲージ針を使用し筋注を行うこととした。26 ゲージの注射針 (内径 $230 \pm 20 \mu\text{m}$) を用いて注入移植する際、細胞凝集体の大きさが重要となってくる。したがって本実験では、細胞移植をする際に ASCs とハイドロゲルを種々の割合で混合し、作製した細胞凝集体の大きさについて検討した。

10 g/l の Polyvinyl alcohol (PVA) 水溶液を作製し、U 底の 96 ウェルプレートに 100 μl ずつ分注しインキュベーター内で一晚静置することでウェル底を親水性にし、PBS にて洗浄した。

10 cm ディッシュに培養しておいた ASCs をトリプシン-EDTA を用いて剥離し、基礎培地

を加えて回収した後、200G、3 分間遠心分離することで細胞ペレットを得た。上清除去後、基礎培地を加えて懸濁し、セルカウンターを用いて細胞数を算出した。また、あらかじめハイドロゲル 2 μg に 20 μl の PBS を含浸させたハイドロゲルを基礎培地にて懸濁し、10 μl 中に含まれるハイドロゲルの個数を計数した。

PVA でコーティングした U 底の 96 ウェルプレートに基礎培地 100 μl を添加し細胞数 100、500、1000 個およびハイドロゲル 0、10、100、500、1000 個を組み合わせで播種し、2 日間インキュベーター内で静置した。得られた凝集体を顕微鏡にて撮影し、大きさの比較を行った。

I-4) 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に関する検討

本実験では、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 と Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)) の変化について検討した。HGF は筋衛星細胞の活性化、VEGF は血管新生に有効である。また、含有する細胞数を測定することで細胞あたりの増殖因子分泌量の算出も行った。

ASCs を 500 個および PBS または PDGF-BB (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含浸させたハイドロゲル 50 個を用いて実験を行った。前述の通りに細胞凝集体を作製し、①ASCs のみ (ASCs)、

②ASCs と PBS を含浸したハイドロゲルの凝集体 (ASCs+ゲル)、③ASCs と PDGF-BB を含浸したハイドロゲルの凝集体 (ASCs+PDGF-BB+ゲル) の 3 群を作製した。

細胞凝集体を作製した後、2、5、7 日目に上清の回収・基礎培地の添加を行った。回収した上清は 4℃にて保管し、それぞれの上清内に含まれる HGF、VEGF 濃度を ELISA (R&D systems) にて測定した。また、細胞凝集体に含まれる細胞数を算出するため、バイオマッシャーII (ニッピ株式会社、東京、日本) にて凝集体が目視で確認できなくなるまで破碎したのちに DNA 定量キット (BioAssay Systems、カリフォルニア、アメリカ合衆国) を用いて DNA 量を測定した。125、250、500、1000、2000 個の ASCs に対しても DNA 量の測定を行い、その結果をもとに凝集体に含まれる細胞数を算出した。HGF、VEGF 分泌量を得られた細胞数で割ることで細胞当たりの増殖因子分泌量を算定した。

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

本実験では、実験Iの結果を元に ASCs を実際に組織内に移植し組織内の細胞保持に関する検討を行った。一般細胞膜標識用 PKH26 赤色蛍光細胞リンカーキット (Merck) にて細胞膜を標識した ASCs を用いて①細胞懸濁液群、②細胞凝集体+PBS を含浸したハイドロゲル群(細胞凝集体(ハイドロゲル含有)) (細胞数とゲルの個数はそれぞれ 500 対 50) の 2 群作製した。細胞数はともに 5.0×10^4 個 (②は凝集体 100 個) とし、100 μ l の PBS に懸濁した後、

イソフルラン吸入麻酔下、それぞれを生後 8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスの後肢のヒラメ筋に注入した。注入 6、24、72、168 時間後にヒラメ筋を摘出し、ハサミにて十分細断した後 0.4 %コラゲナーゼ溶液 10 ml 内で 2 時間、37°Cで振盪した。セルストレーナー70 μm を通して得られた抽出液を 96 穴プレートに 100 μl 播種した。蛍光顕微鏡を用いてウェル内の 3 か所を撮影し PKH 陽性細胞数を計数し、各群の比較を行った。コントロールとして、摘出したヒラメ筋に対して 5×10^4 個の PKH 陽性細胞を移植した後に同様の操作を加え、得られた PKH 陽性細胞数を細胞保持率 100%として各群の細胞保持率を算出した。蛍光顕微鏡での撮影はそれぞれ 8 回ずつ行い、比較を行った。

II-2) 移植後の筋増生に対する筋負荷の効果

生後 8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用い、ASCs 凝集体の移植後の筋機能の変化について検討を行った。移植は①PBS のみ (PBS)、②PDGF-BB (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含浸したハイドロゲル (PDGF-BB+ゲル)、③ASCs+PBS を含浸したハイドロゲル含有細胞凝集体 (ASCs+ゲル)、④ASCs + PDGF-BB (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含浸したハイドロゲル含有細胞凝集体 (ASCs+PDGF-BB+ゲル) の 4 群 (n=5) を作製した。凝集体に含まれる細胞数とハイドロゲルの個数は 500 対 50 とし凝集体は 100 個移植した。それぞれ 100 μl の PBS に懸濁し、イソフルランにて吸入麻酔下、両側のヒラメ筋へ ASCs の他家移植を行った。

筋負荷はマウス・ラット兼用トレッドミルシステム (TMS-10N:有限会社メルクエスト、

富山、日本) にて行った。筋負荷開始前に、マウスをトレッドミル走行に慣れさせるために週 3 回トレッドミル走行を実施し、移植を行った 2 日後より筋負荷を開始した。筋負荷は 15 m/min、20 分間を週 5 日間実施した。

筋機能測定はデジタルフォースゲージ (FGJN-5:株式会社ミスミ、東京、日本) を用いて行った。移植 2 日後を 0 日目として 0、7、14、21、28 日目に筋力測定を実施した。マウスの体重測定後、前肢および四肢の筋機能測定をそれぞれ 5 回ずつ行い、最も高かった数値を体重で割ることで筋力値を得た。また、筋負荷を加えない群として①PBS、② ASCs+PDGF-BB+ゲルの 2 群の比較も行った。

II-3) 筋線維径の組織学的評価

28 日目の筋機能測定後にイソフルランの過剰投与にてマウスを安楽死させ、ヒラメ筋を摘出、4%パラホルムアルデヒド (富士フィルム和光純薬株式会社) にて固定し、段階的にスクロース溶液に置換した。ヒラメ筋の筋線維走行を縦断するように分割し、ティッシュテック O.C.T コンパウンド (サクラファインテック、東京、日本) で包埋し、凍結ブロックを作製した。10 μ m の薄切切片を作製し、ヘマトキシリンに 10 分間浸漬した後 10 分間水洗いし、エオジンに 2 分間浸漬した後エタノールにて脱水、キシレンにて透徹を行うことで Hematoxylin-Eosin 染色 (HE 染色) を行った後、各群の筋線維径を比較した。組織切片を顕微鏡で撮影し、Image J (アメリカ国立衛生研究所、メリーランド、アメリカ合衆国) を用いて

筋線維長径の測定を行った。各マウス 100 線維ずつ測定し、各群計 500 本の線維径の比較を行った。

II-4) 免疫染色による筋分化の評価

術後 7 日目における移植した PKH26 にて細胞膜を標識した ASCs および周囲組織の Myo-D 発現を観察した。Myo-D は筋分化マーカーで主に活性化した筋衛星細胞や筋芽細胞に発現する。10 μ m の厚さで作製した凍結切片を PBS にて洗浄後、イムノブロックを用いて室温下で 20 分間ブロッキングを行い、ウサギ抗マウス Myo-D モノクローナル抗体 (Bioss Antibodies、ボストン、アメリカ合衆国) をイムノブロックで 100 倍希釈し、各切片に滴下し 4°Cで一晩静置した。PBS で洗浄後、ヤギ抗ウサギ IgG 抗体-ALEXA FLUOR® (Thermo Fisher Scientific) をイムノブロックで 1000 倍希釈し、各切片に滴下、室温下で 1 時間静置した。PBS で洗浄した後、DAPI 入り封入材 (VECTASHIELDH-1500)(VECTOR、カリフォルニア、アメリカ合衆国) を各組織に滴下しカバーガラスをのせ 30 分間静置した。免疫染色の切片は蛍光顕微鏡を用いて観察し、撮影した。TRITC 用フィルター、GFP 用フィルターおよび DAPI 用フィルターを使用し、それぞれ PKH、Myo-D、核の蛍光を観察し、倍率 200 倍にて撮影した。

統計学的解析

各実験結果は平均値±標準偏差 (S.D) の形で表示し、2 群間の比較検定は、Mann-Whitney's U test を用いた。独立した多群の差の検定には Bartlett test と single-factor ANOVA にて分散分析を行い、群間比較は Tukey-Kramer 法を用いて post hoc test にて統計学的解析を行った。有意水準は 5 %とした。

結果

実験I 筋機能増生を目的とした 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索

各筋分化誘導培地を用いて ASCs を培養した際の Myo-D 陽性率を図 1 に示す。100 ng/ml PDGF-BB 群が最も高い Myo-D 陽性率を示し、他群に比べて有意に高値を示した (各群 n=6, $p<0.01$, Tukey-Kramer post hoc test)。60 ng/ml PDGF-BB 群との間には有意差がみられなかった (各群 n=6, $p=0.37$, Tukey-Kramer post hoc test)。

I-2) ハイドロゲルの分解反応および PDGF-BB 徐放能の検証

ハイドロゲルの分解と PDGF-BB の徐放および相関図を図 2, 3 に示す。ハイドロゲルに PBS を加えると、全サンプルに含まれるハイドロゲルのうち $13.4\pm2.1\%$ (n=3) が溶出した (図 2A)。また、コラゲナーゼ溶液に変更すると全サンプルに含まれるハイドロゲルの $64.6\pm2.5\%$ が 24 時間で分解した。PDGF-BB に関しても同様に、全サンプルに含まれる PDGF-BB のうち PBS 中では $16.4\pm1.3\%$ (n=3) が徐放し、コラゲナーゼ溶液中では全サンプルに含まれる PDGF-BB のうち $75.8\pm0.5\%$ が 24 時間で徐放した (図 2B)。

分解されたハイドロゲルの割合と徐放された PDGF-BB の割合の近似曲線から決定計数を算出すると、 $R^2=0.9758$ となった (図 3)。

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

ASCs およびハイドロゲルを含む細胞凝集体を図 4 に示す。ASCs 100 個とハイドロゲル 100 個以下、ASCs 500 個とハイドロゲル 50 個以下の群が 26 G 注射針に通過可能な大きさとなった。ASCs 1000 個の細胞凝集体は 26 G 注射針に通過不可能な大きさで、ハイドロゲルの個数が 500 個の条件では細胞凝集体の作製ができなかったことから、ハイドロゲル含む最適な細胞凝集体の条件である ASCs 500 個、ハイドロゲル 50 個として実験 I -4 以降の実験に適応した。

I-4) 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に関する検討

DNA 定量キットを用いて細胞数を測定した結果を図 5 に示す。細胞凝集体を作製した後の 2 日目では各群の細胞数に有意差は認められなかったが、5、7 日目においては ASCs+ゲル群、ASCs+PDGF-BB+ゲル群が ASCs 群より有意に多くの細胞数を含有していた。

細胞凝集体から分泌された HGF および VEGF の分泌濃度を図 6, 7 に示す。ともに細胞凝集体作製後 2、5、7 日目を通して ASCs+PDGF-BB+ゲル群が他群より有意に高い HGF、VEGF 分泌量を示した。

細胞当たりの HGF、VEGF 分泌量を図 8、9 に示す。HGF、VEGF 分泌量を、DNA 定量キットを用いて測定した細胞数で割ることで細胞あたりの分泌量を比較したところ、

ASCs+PDGF-BB+ゲル群が他群より有意に高い HGF、VEGF 分泌能を示した。

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比較

移植後 6、24、72、168 時間の細胞懸濁液群および細胞凝集体 (ハイドロゲル含有) 群の細胞保持率を図 10 に示す。細胞凝集体 (ハイドロゲル含有) 群は細胞懸濁液群に比べて有意に高い細胞保持率を示した。

II-2) 移植後の筋増生に対する筋負荷の効果

筋負荷のプロトコルおよび筋力測定方法を図 11 に示す。筋負荷を加えた後の筋力変化について、前肢に関しては各群有意差を認めなかった (図 12)。四肢の筋力比については、負荷開始 28 日目において ASCs+PDGF-BB+ゲル群が他群より有意に高値を示した (図 13)。

また筋負荷を加えない群においては、28 日目でも前肢・四肢ともに 2 群間に有意差は認められなかった (図 14)。

II-3) 筋線維径の組織学的評価

筋負荷群において各群の筋線維長径を比較した結果、ASCs+PDGF-BB+ゲル群が他群より有意に大きな値を示した (図 15, 16)。また、ハイドロゲルや細胞凝集体は組織切片にて観

察できなかった。

II-4) 免疫染色による筋分化の評価

ASCs+PDGF-BB+ゲル群では、移植した細胞凝集体そのものの周囲に Myo-D 発現を認めた (図 17)。また、移植した ASCs にもわずかに Myo-D の発現が認められた。このことから、ASCs+PDGF-BB+ゲル群では移植した ASCs および周囲組織の筋分化を促進したことが示唆された。また、PDGF-BB+ゲル群も移植先の組織で Myo-D 発現を認めたが、ASCs+ゲル群および PBS 群では Myo-D 発現は認められなかった。

考察

筋組織は再生能力が高い組織である。運動などで筋が損傷を受けると筋衛星細胞が活性化し、筋芽細胞へ分化、その後、筋管細胞と融合し、筋線維に成長して筋組織が増強する^{22, 27}。

一方、筋組織は運動負荷をかけないと廃用萎縮する³⁴。したがって、筋組織の増生および機能の維持のためには、持続的な筋負荷が必要である。Mitsui らは、ASCs の移植を行って Myo-D の発現を検出したが、筋負荷は行わず筋力評価も行っていなかったため、実際の程度、筋組織の増強が達成できたか不明であった⁷。そこで本研究は筋力増強を可能とする ASCs 移植の条件を探るとともに、移植後に筋負荷をかけることでより確実に筋組織を増強させることができないか検討した。

まず、ASCs の移植前に、移植にかかわる最適条件を *in vitro* で確認した。ASCs の筋分化に有効な因子の検索をしたところ、PDGF-BB が有効であることが明らかとなった。PDGF-BB はすでに臨床応用されているタンパクであり、歯科分野においては骨再生を目的とした GEM21S®(LYNCHBIOLOGICS、テネシー、アメリカ合衆国) が存在する。PDGF-BB 以外に PDGF-AA も比較的有効であった。PDGF レセプターには PDGF Receptor (PDGFR)– $\alpha\alpha$ 、 $\alpha\beta$ 、 $\beta\beta$ 、の 3 種類が存在し、PDGF には AA、AB、BB、CC、DD の 5 種類のアイソフォームが存在する³⁵。PDGF-BB はいずれのレセプターにも結合できることが知られていることから、より強い作用があった可能性が考えられる^{35,36}。また、PDGF は Janus Tyrosine Kinase –

Signaling Transducer and Activator of Transcription (JAK/STAT) シグナル伝達経路を刺激することが知られており、この経路が Myo-D 発現に関与していることが知られていることから、ASCs の筋分化においても同様のメカニズムが働いた可能性が考えられる^{36,37}。一方、TGF- β 群においては 100 ng/ml の濃度で最も低い Myo-D 陽性率を示した。TGF- β は幹細胞の筋分化を促進するという報告があるが、筋分化を抑制するという報告もある^{29,38}。したがって、TGF- β は濃度によって筋分化作用が変化する可能性が考えられる。

筋分化誘導因子について、本研究では単剤での筋分化作用について検討した。複数の筋分化誘導因子を組み合わせの方がより効果的な筋分化を促進することができる可能性が考えられるため、今後この点についても検討していく必要がある。

当研究室の先行研究において、ASCs を PRP とともに生体内へ移植することで ASCs の筋分化が促進されるという結果が得られている⁷。しかし、本研究で ASCs を PRP とともに培養した結果、Myo-D 陽性率は低値となり、筋分化が促進されないという相反する結果が得られた。これは、PRP は筋分化を促進する一方、抑制するという文献も散見され、PRP が様々な増殖因子のカクテルであり、成分の含有量が一定しないことに起因すると考えられる³⁹。さらに PRP の中には basic Fibroblast Growth Factor (b-FGF) などの増殖因子が含まれており、それらが筋分化を抑制することが報告されている⁴⁰。したがって、効果が一定しない PRP よりも本実験の結果より効果が明らかとなった PDGF-BB 単体を使用の方が望ましいと考えられる。

PDGF-BB の徐放試験およびハイドロゲルの分解試験では、両者には強い相関 ($R^2=0.9758$) が見られた。このことからコラゲナーゼ溶液内においては、ハイドロゲルの分解とともに PDGF-BB が徐放されることが示された。

26 ゲージ針 (内径 $230 \pm 20 \mu\text{m}$) に通過可能な細胞凝集体の大きさに関する検証では、可及的多くの細胞を移植しつつ多くのハイドロゲルを含ませることを目的とした。その結果、ASCs 500 個、ハイドロゲル 50 個の割合となった。過去の文献では、実験的に幹細胞の筋組織注射で用いられる移植細胞数は、 4.0×10^4 個以上としているものが多く散見される¹⁶⁻¹⁸。本実験でも過去の文献を参考に、前述の細胞凝集体を 100 個移植することとした。臨床において、ヒトの軟口蓋への脂肪注入には 18 ゲージ針 (内径 $0.82 \pm 0.03\text{mm}$) が使用されている⁴¹。したがって、ヒトへの応用については細胞凝集体の大きさについてはさらなる検討が必要である。

細胞凝集体は二次元培養する場合に比べ、細胞間相互作用を高めることで細胞機能の向上を期待できるほか、ハイドロゲルなどの足場を加えることで細胞活性や生存率を改善できることが知られている¹⁶。本研究においても足場としてのハイドロゲルがある方がない場合に比べて細胞数増加が確認されたこと、HGF や VEGF の分泌量増加や細胞当たりの液性因子分泌能の向上が確認できたことから細胞活性の改善がみられ、過去の報告と同様の傾向を示した。さらに PDGF-BB を加えたことによって ASCs の液性因子分泌能がさらに向上し、PDGF-BB が幹細胞の液性因子分泌能の向上に寄与したことも、過去の文献と

同様の傾向を示した⁴²。

実験II-1)では、細胞保持率および筋機能改善に関する検討を行った。細胞移植を行ってもそこに留まる工夫をしなければ流れ出てしまい、移植による十分な効果が得られない。本研究においても ASCs 凝集体および懸濁液をマウス骨格筋へ移植すると、細胞凝集体群では有意に高い細胞保持率を示し、過去の報告と同様の傾向を示した⁴³。

トレッドミル走行による筋負荷は、各群、前肢の筋力に有意差はみられなかったが、四肢の筋力では ASCs+PDGF-BB+ゲル群のみ有意に高値を示した。本実験では下肢のみの筋力測定を行っていないが、この2つの結果は下肢の筋力が増強されたことを示唆している。蛍光免疫染色では、ASCs+PDGF-BB+ゲル群は、7日目において移植した凝集体がわずかに Myo-D 発現を示し、さらに周囲組織にも Myo-D 発現が認められた。一方、ASCs+ゲル群においては ASCs および周囲組織に Myo-D 発現はみられなかった。これは、ASCs+PDGF-BB+ゲルから放出される HGF などの液性因子により、周囲の筋衛星細胞が活性化された可能性が考えられる。また、PDGF-BB+ゲルのみの移植群でも Myo-D 発現がみられたものの筋機能を向上させるには至らなかったことから、移植した ASCs そのものの筋分化や液性因子の分泌が筋機能向上に重要である可能性が考えられる。各群の筋線維径を比較した結果からも、ASCs+PDGF-BB+ゲル群が筋機能向上に関与したことが考えられる。一方、筋負荷を加えないで ASCs+PDGF-BB+ゲルを移植しても筋機能が向上しないことから、ASCs 移植による筋機能向上には、筋負荷が必要であることが示唆された。

筋衛星細胞は、筋細胞へ分化していくとともに発現マーカーが Pax7 から Myo-D やミオゲニンなどへと変化していく⁴⁴。本研究では PKH26 で染色した細胞における長期間の経過観察が困難なため、移植細胞の Myo-D 発現を確認したが、今後は、移植した細胞の経過を長期間追えるような実験系を確立し、検討を加えていく必要がある。また、本研究では筋電図等での生理学的評価ができていないため、今後の課題となる。

ASCs は臨床においても多分野で活用されているが、筋分化への活用は心筋や膀胱括約筋のみである^{45,46}。心筋は心筋シートや臓器再生の研究が活発に進められており、一部は臨床応用されているが、それ以外の分野での筋再生医療は、いまだ臨床応用されていない⁴⁷。まだ臨床応用するには、さらなる研究が必要ではあるが、将来的には軟口蓋の口蓋帆挙筋に ASCs を含んだハイドロゲルを注入し、筋の増強を行うことを目標としている。さらにこの技術は、心筋等、他部位の局所的な筋組織の増強にも応用することにより筋組織再生の選択の幅が広がり、患者の生活の質向上に貢献できると考えている。

結語

PRP に含まれる因子のうち PDGF-BB は ASCs の筋分化に最も効果があり、ハイドロゲルに PDGF-BB を含浸させた ASCs の凝集体を移植することで、移植時の細胞保持率を向上させることができた。また移植後の筋負荷は、移植効果を高め、筋組織の増強に有効であることが明らかとなった。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えて頂き、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を受け賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座 (口腔外科学第一教室) 田中 晋教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の立案ならび進行にあたり、終始御教示、御指導いただきました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座 (口腔外科学第一教室) 磯村恵美子准教授、京都大学ウイルス・再生医科学研究所 (生体材料学分野) 田畑泰彦教授に深甚なる謝意を表します。

本研究は、研究資金の一部を 2021 年度「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」共同研究課題から提供していただき、研究機材を京都大学ウイルス・再生医科学研究所にて使用させていただきました。また、研究材料の一部を新田ゼラチン株式会社から提供して頂きました。御配慮、御協力に対し、深甚なる謝意を表します。

最後に本研究の円滑な進展のため、御配慮、御協力を頂きました京都大学ウイルス・再生医科学研究所 (生体材料学分野) 桑原寿江様、大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座 (口腔外科学第一教室) 中川記世子先生、松川 誠先生ならびに教室員諸兄に深甚なる謝意を表します。

引用文献

1. Zuk, PA, Zhu M, et al. (2001): Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, **7**, 211-228.
2. Wang X, Wang Y, et al. (2013): Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review. *Int Orthop*, **37**, 2491-2498.
3. Trounson A, McDonald C. (2015): Stem cell therapies in clinical trials: progress and challenges. *Cell Stem Cell*, **17**, 11-12.
4. Izquierdo MR, Cabeza L, et al. (2019): An updated review of adipose derived-mesenchymal stem cells and their applications in musculoskeletal disorders. *Expert Opin Biol Ther*, **19**, 233-248.
5. Imperieri D, Tonseth KA, et al. (2019): Autologous fat transplantation to the velopharynx for treating mild velopharyngeal insufficiency: A 10-year experience. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, **8**, 1403-1410.
6. Emiko TI, Makoto M, et al. (2020): Endoscopic soft palate augmentation using injectable materials in dogs to ameliorate velopharyngeal insufficiency. *PLoS One*, **9**, e0238646.
7. Mitsui R, Matsukawa M, et al. (2021): Efficient cell transplantation combining injectable hydrogels with control release of growth factors. *Regen Ther*, **18**, 372-383.

8. Forcales SV. (2015): Potential of adipose-derived stem cells in muscular regenerative therapies. *Front Aging Neurosci*, **7**, 123.
9. Rigon M, Hörner SJ, et al. (2020): Effects of ASC application on endplate regeneration upon glycerol-induced muscle damage. *Front Mol Neurosci*, **13**, 107.
10. Zou K, Huntsman HD, et al. (2015): Mesenchymal stem cells augment the adaptive response to eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc*, **47**, 315-325.
11. Bang OY, Lee JS, et al. (2005): Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol*, **57**, 874-882.
12. Qazi TH, Duda GN, et al. (2019): Cell therapy to improve regeneration of skeletal muscle injuries. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, **10**, 501-516.
13. Qi, Y, Du Y, et al. (2012): Cartilage repair using mesenchymal stem cell (MSC) sheet and MSCs-loaded bilayer PLGA scaffold in a rabbit model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, **22**, 1424-1433.
14. Pers YM, Rackwitz L, et al. (2016): Adipose mesenchymal stromal cell-based therapy for severe osteoarthritis of the knee: a phase I dose-escalation trial. *Stem cells transl Med*, **5**, 847-856.
15. Farrell K, Joshi J, et al. (2017): Injectable uncross linked biomimetic hydrogels as a candidate scaffold for neural stem cell delivery. *J Biomed Mater Res A*, **105**, 790-805.

16. Hsu TW, Lu YJ, et al. (2021): Transplantation of 3D MSC/HUVEC spheroids with neuroprotective and proangiogenic potentials ameliorates ischemic stroke brain injury. *Biomaterials*, **272**, 120765.
17. Young SA, Sherman SE, et al. (2018): Mechanically resilient injectable scaffolds for intramuscular stem cell delivery and cytokine release. *Biomaterials*, **159**, 146-160.
18. Lin W, Qi X, et al. (2020): A barrier against reactive oxygen species: chitosan/acellular dermal matrix scaffold enhances stem cell retention and improves cutaneous wound healing. *Stem Cell Res Ther*, **11**, 383.
19. Hayashi K, Tabata Y. (2011): Preparation of stem cell aggregates with gelatin microspheres to enhance biological functions. *Acta Biomater*, **7**, 2797-2803.
20. Inoo K, Yamamoto M, et al. (2020): Preparation of cell aggregates incorporation gelatin hydrogel microspheres of sugar-responsive water solubilization. *J Tissue Eng Regen Med*, **8**, 1050-1062.
21. Kawase T. (2015): Platelet-rich plasma and its derivatives as promising bioactive materials for regenerative medicine: basic principles and concepts underlying recent advances. *Odontology*, **103**, 126-135.
22. Schoenfeld BJ. (2012): Does exercise-induced muscle damage play a role in skeletal muscle hypertrophy? *J Strength Cond Res*, **26**, 1441-1453.

23. Shiao SYL, Huang MC, et al. (1976): Mechanism of action of cobra cardiotoxin in the skeletal muscle. *J Pharmacol Exp Ther*, **196**, 758-770.
24. Machida S, Booth FW. (2004): Insulin-like growth factor 1 and muscle growth: implication for satellite cell proliferation. *Proc Nutr Soc*, **63**, 337-340.
25. Tabata Y, Nagano A, et al. (1999): Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor. *Tissue Eng*, **5**, 127-138.
26. Tatsumi R, Anderson JE, et al. (1998): HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev Biol*, **194**, 114-128.
27. Li H, Chen Q, et al. (2019): Muscle-secreted granulocyte colony-stimulating factor functions as metabolic niche factor ameliorating loss of muscle stem cells in aged mice. *EMBO J*, **38**, e102154.
28. Yoshida T, Delafontaine P. (2020): Mechanisms of IGF-1-mediated regulation of skeletal muscle hypertrophy and Atrophy. *Cells*, **9**, 1970.
29. Delaney K, Kasprzycka P, et al. (2017): The role of TGF- β 1 during skeletal muscle regeneration. *Cell Biol Int*, **41**, 706-715.
30. Kurek JB, Bower JJ, et al. (1999): The role of leukemia inhibitory factor in skeletal muscle regeneration. *Muscle Nerve*, **20**, 815-822.
31. Matsui M, Tabata Y, et al. (2012): Enhanced angiogenesis by multiple release of platelet-

- rich plasma contents and basic fibroblast growth factor from gelatin hydrogels. *Acta Biomater*, **8**, 1792-1801.
32. Park S, Sun SH. (2015): Single-dose intramuscular-injection toxicology test of water-soluble carthami-flos and cervi cornu parvum pharmacopuncture in a rat model. *J Pharmacopuncture*, **18**, 42-48.
 33. Hara M, Shinsuke Y, et al. (2011): G-CSF influences mouse skeletal development and regeneration by stimulating myoblast proliferation. *J Exp Med*, **4**, 715-727.
 34. McKendry J, Strokes T, et al. (2021): Resistance exercise, aging, disuse, and muscle protein metabolism. *Compr Physiol*, **11**, 2249-2278.
 35. Boor P, Ostendorf T, et al. (2014): PDGF and the progression of renal disease. *Nephrol Dial Transplant*, **29**, 45-54.
 36. Simon AR, Takahashi S, et al. (2002): Role of the JAK-STAT pathway in PDGF-stimulated proliferation of human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **6**, 1296-1304.
 37. Begue G, Douillard A, et al. (2013): Early activation of rat skeletal muscle IL-6/STAT1/STAT3 dependent gene expression in resistance exercise linked to hypertrophy. *PLoS One*, **2**, e57141.
 38. Girardi F, Taleb A, et al. (2021): TGF β signaling curbs cell fusion and muscle

regeneration. *Nat Commun*, **12**, 750.

39. Takase F, Inui A, et al. (2017): Effect of platelet-rich plasma on degeneration change of rotator cuff muscles: in vitro and in vivo evaluations. *J Orthop Res*, **8**, 1806-1815.
40. Spizz G, Hu JS, et al. (1987): Inhibition of myogenic differentiation by fibroblast growth factor or type β transforming growth factor does not require c-myc expression. *Dev Biol*, **123**, 500-507.
41. Cristiano B, Peter DR, et al. (2015): Effectiveness and safety of autologous fat grafting to the soft palate alone. *Ann Plast Surg*, **4**, 190-192.
42. Zammit PS, Partidge TA, et al. (2006): The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J Histochem Cytochem*, **11**, 1177-1191.
43. Bauer M, Kang L, et al. (2012): Adult cardiac progenitor cell aggregates exhibit survival benefit both *In vitro* and *In vivo*. *PLoS One*, **7**, e50491.
44. Dumont NA, Bentzinger CF, et al. (2015): Satellite cells and skeletal muscle regeneration. *Compr Physiol*, **3**, 1027-1059.
45. Matsuura K, Masuda S, et al. (2013): Cell sheet-based cardiac tissue engineering. *Anat Rec (Hoboken)*, **297**, 65-72.
46. Smolar J, Horst M, et al. (2019): Predifferentiated smooth muscle-like adipose-derived stem cells for bladder engineering. *Tissue Eng Part A*, **26**, 979-992.

47. Miyagawa S, Domae K, et al. (2017): Phase I clinical trial of autologous stem cell-sheet transplantation therapy for treating cardiomyopathy. *J Am Heart Assoc*, **6**, e003918.

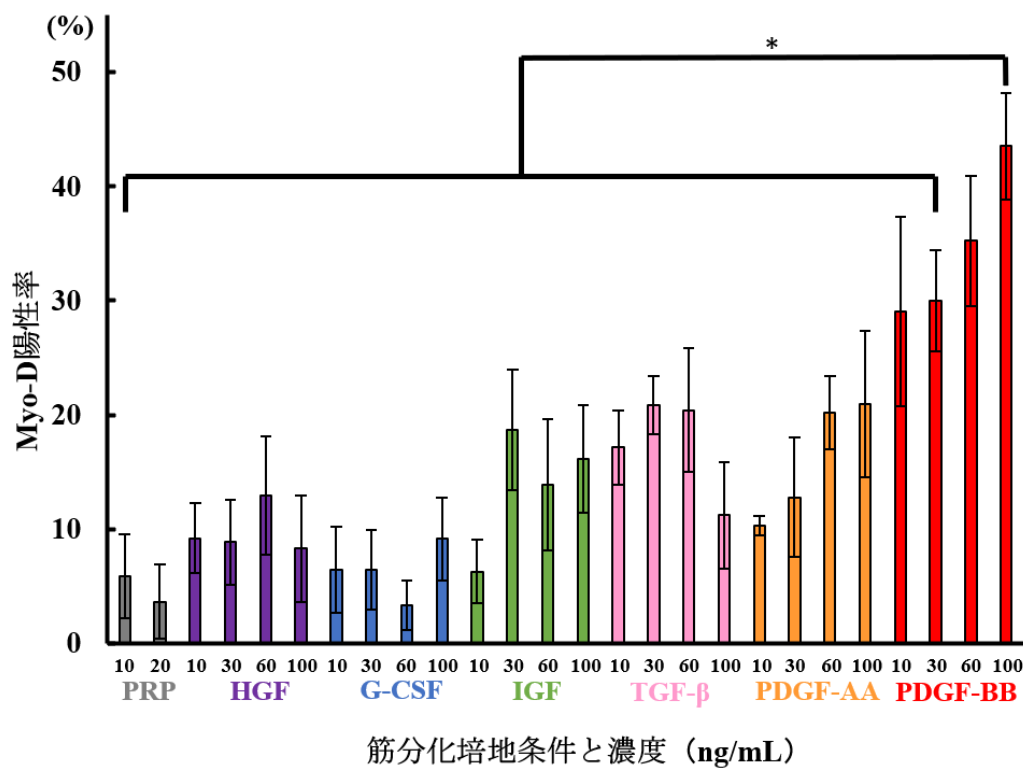


図 1: ASCs の筋分化における Myo-D 陽性率

14 日間の細胞培養後の各群における Myo-D 陽性率を示す (各群 n=6)。PDGF-BB の 100ng/ml で培養した際に最も高い Myo-D 陽性率を示したが、60ng/ml 群との間に有意差は認められなかった。ポジティブコントロールおよびネガティブコントロールの Myo-D 陽性率はそれぞれ 100%、0%であった。* $p<0.05$ (Bartlett test, single-factor ANOVA, Tukey Kramer 法)

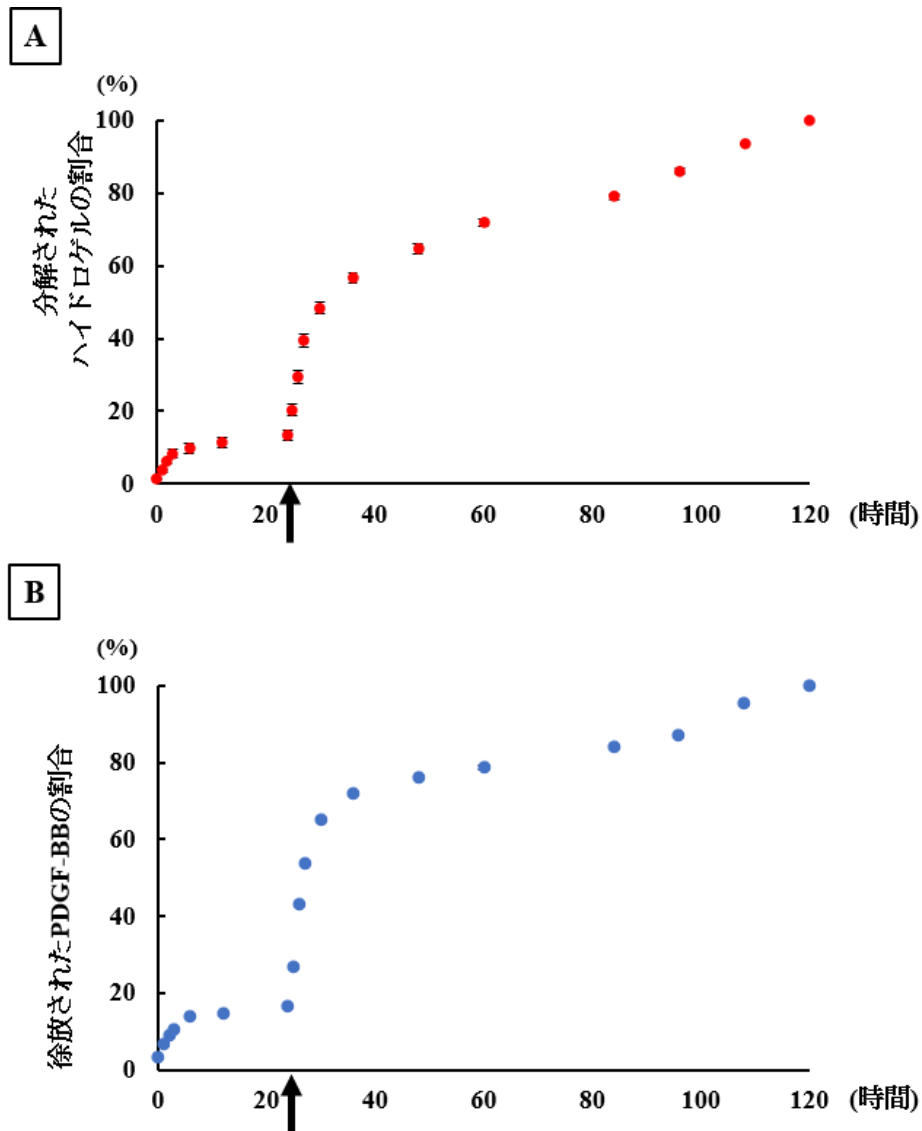


図 2: 分解されたハイドロゲルの割合と徐放された PDGF-BB の割合

A: ハイドロゲルの分解試験

作製したハイドロゲルを PBS に浸漬し、架橋に関与しないハイドロゲルを除去した後コラゲナーゼ溶液中に浸漬し、分解試験を行った(n=3)。矢印は PBS からコラゲナーゼ溶液に切り替えた時間を示す。コラゲナーゼ溶液に切り替えた時点からハイドロゲルの分解が促進されたことが示唆された。

B: PDGF-BB 徐放試験

PDGF-BB を含浸させたハイドロゲルを PBS に浸漬し、取り込まれなかった PDGF-BB を除去した後コラゲナーゼ溶液に浸漬し、徐放試験を行った(n=3)。矢印は PBS からコラゲナーゼ溶液に切り替えた時間を示す。コラゲナーゼ溶液に切り替えた時点から PDGF-BB の徐放が促進されたことが示唆された。

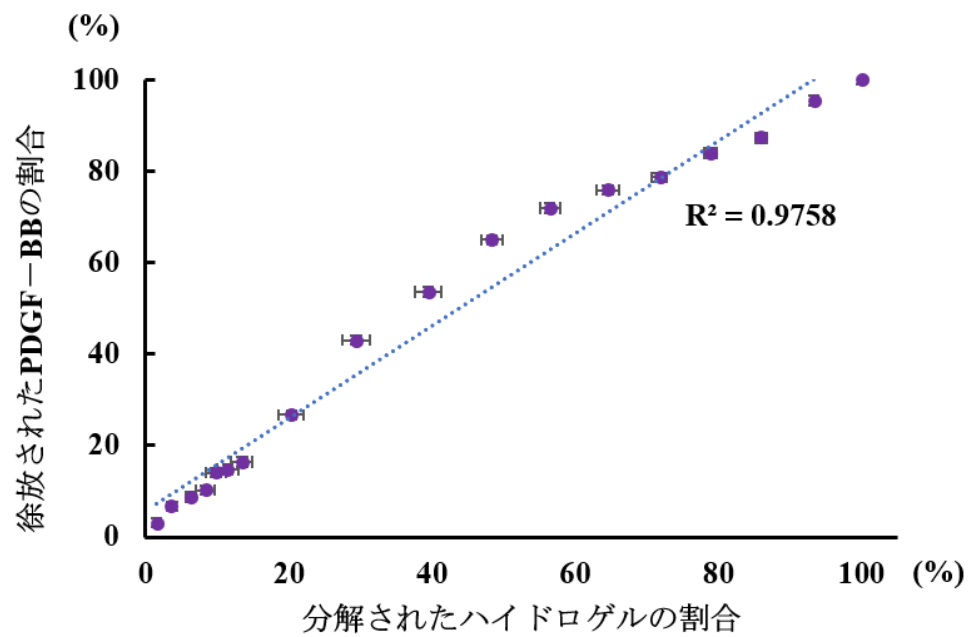


図 3:分解されたハイドロゲルの割合と徐放された PDGF-BB の割合の相関

図 2 の結果の相関を示す。分解されたハイドロゲルの割合と徐放された PDGF-BB の割合には高い相関がみられ、決定計数 $R^2=0.9758$ であった。このことから、ハイドロゲルの分解とともに PDGF-BB が徐放されることが示された。

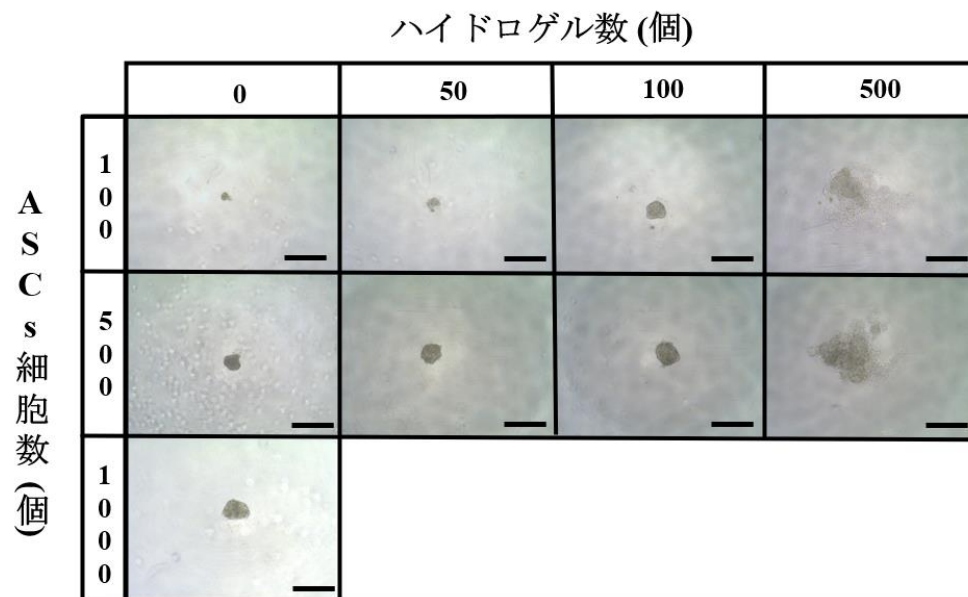


図 4:細胞凝集体の大きさの検討

ASCs を 100、500、1000 個、ハイドロゲル数を 0、50、100、500 個に分けてそれぞれの組み合わせで細胞凝集体を作製した。細胞数およびハイドロゲルを最も多く含み、26 ゲージ注射針に通過可能な大きさの細胞凝集体は ASCs 500 個、ハイドロゲル 50 個であった。スケールバーは 500 μ m を示す。

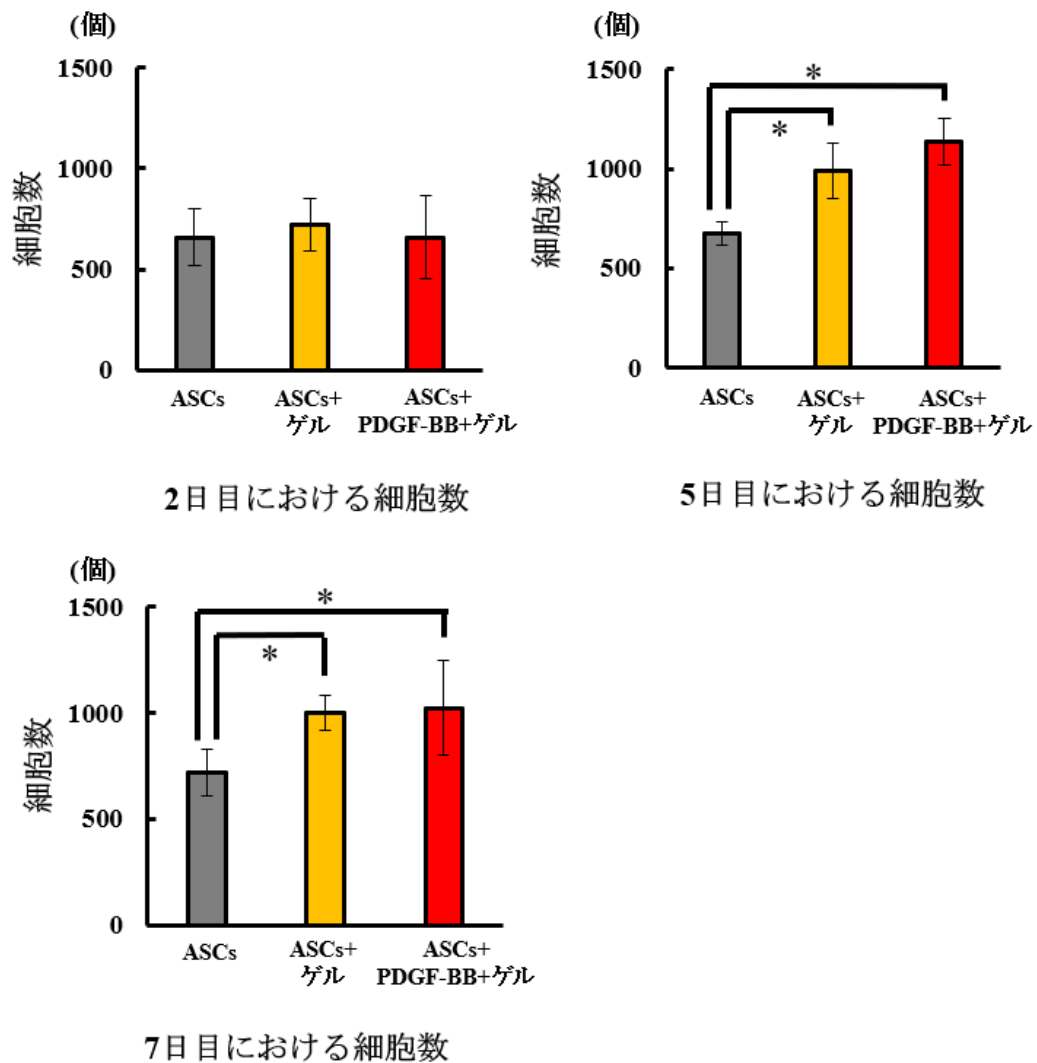
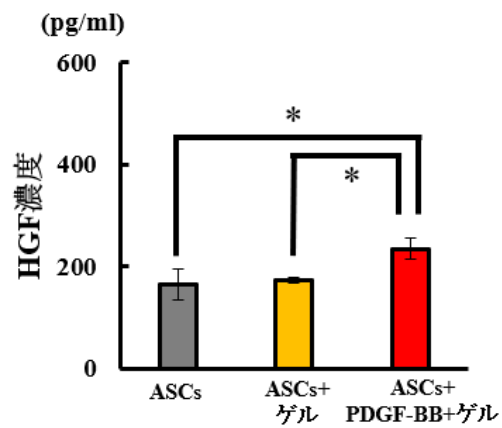
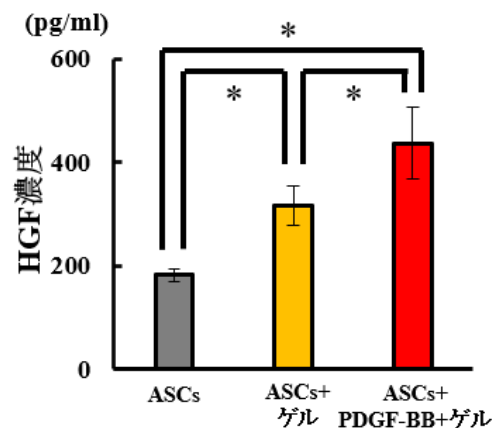


図 5:細胞凝集体に含まれる細胞数の検討

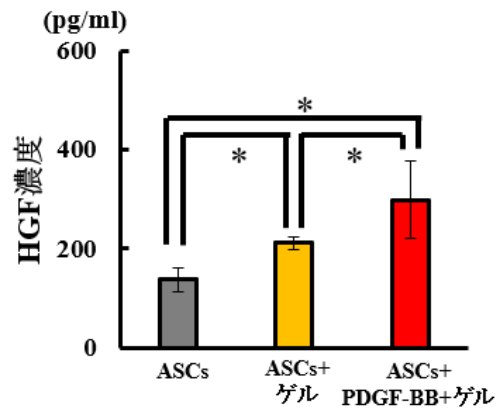
細胞凝集体作製後 2、5、7 日目に含まれる細胞数を、バイオマッシャーにて凝集体を破砕後に DNA 定量キットにて測定した (各群 n=4)。5 日目以降では、細胞凝集体にハイドロゲルを含有させた群 (黄と赤) が有意に多くの細胞を含む結果が得られた。このことから、凝集体として培養した際にハイドロゲルを含有させた方が細胞が増加することが示唆された。 * $p<0.05$ (Bartlett test, single-factor ANOVA, Tukey Kramer 法)



2日目のHGF分泌濃度



5日目のHGF分泌濃度



7日目のHGF分泌濃度

図 6:HGF 分泌能の検討

細胞凝集体作製後 2、5、7 日目における細胞凝集体から分泌された HGF 濃度を比較した (各群 n=4)。2、5、7 日目において ASCs+PDGF-BB+ゲル群は有意に高い HGF 分泌能を示したことから、PDGF-BB が細胞凝集体の HGF 分泌能向上に影響した可能性が示唆された。 * $p<0.05$ (Bartlett test, single-factor ANOVA, Tukey Kramer 法)

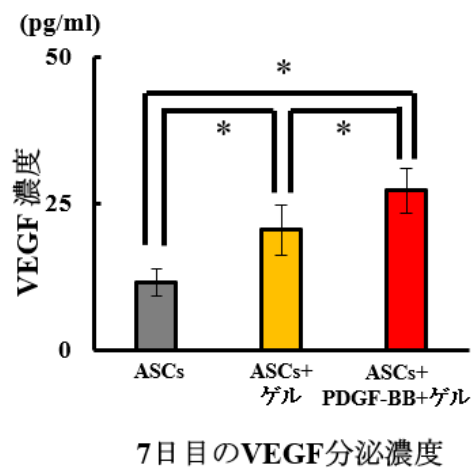
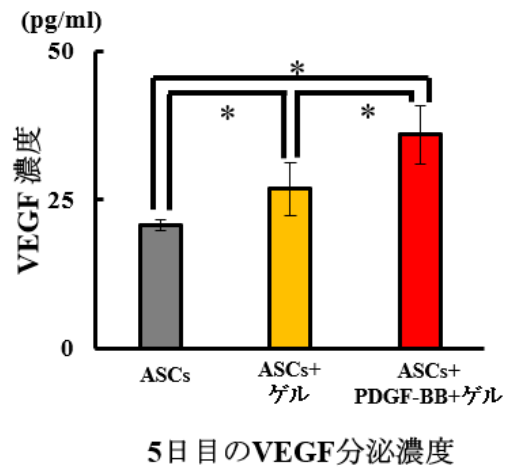
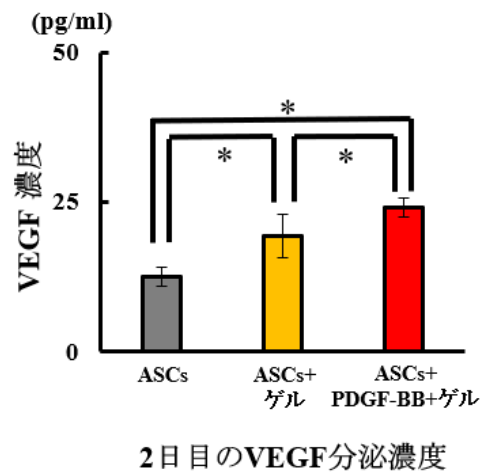


図 7: VEGF 分泌能の比較

細胞凝集体作製後 2、5、7 日目における細胞凝集体から分泌された VEGF 濃度を各群比較した (各群 n=4)。2、5、7 日目において ASCs+PDGF-BB+ゲル群は有意に高い VEGF 分泌能を示したことから、PDGF-BB が細胞凝集体の VEGF 分泌能向上に影響した可能性が示唆された。* $p < 0.05$ (Bartlett test, single-factor ANOVA, Tukey Kramer 法)

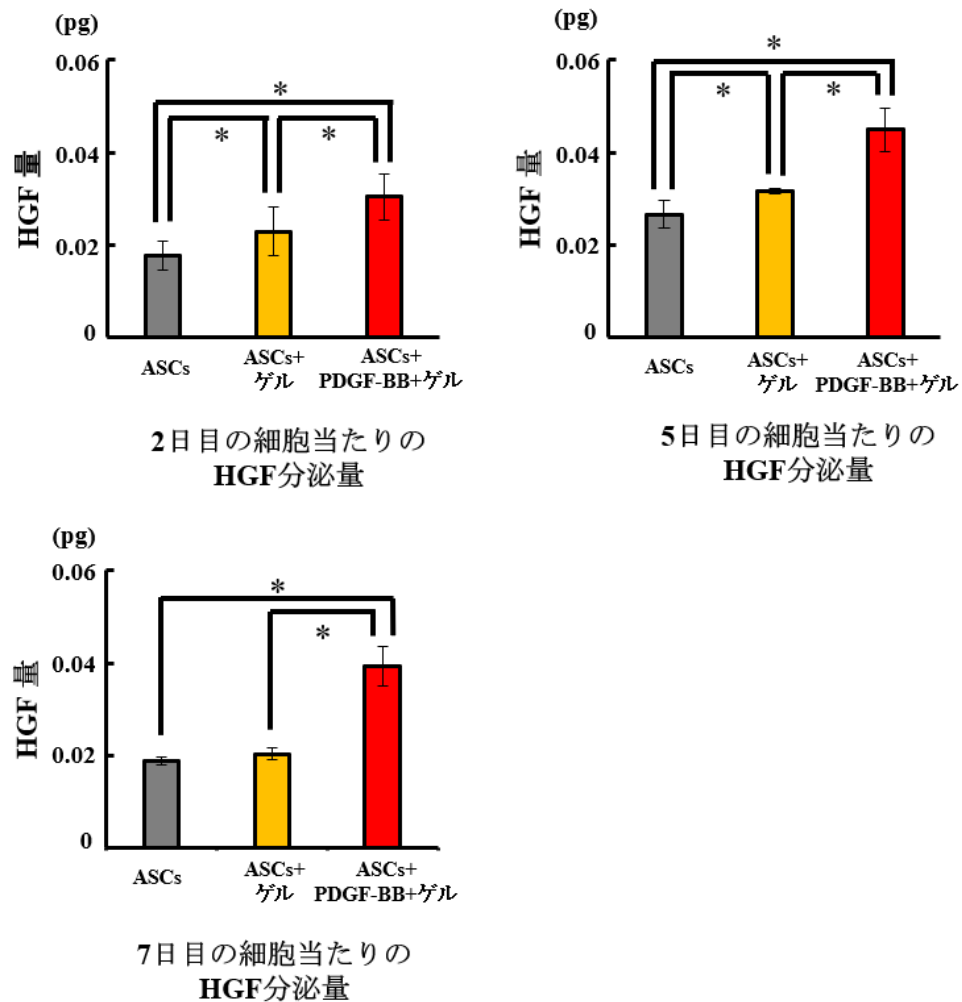


図 8:細胞当たりの HGF 分泌量の比較

細胞凝集体作製後 2、5、7 日目における細胞凝集体から分泌された HGF 濃度から、細胞当たりに分泌された HGF 量を算出した (各群 n=4)。ASCs+PDGF-BB+ゲル群は有意に高い HGF 分泌能を示したことから、PDGF-BB が ASCs の HGF 分泌能向上に影響した可能性が示唆された。* $p < 0.05$ (Bartlett test, single-factor ANOVA, Tukey Kramer 法)

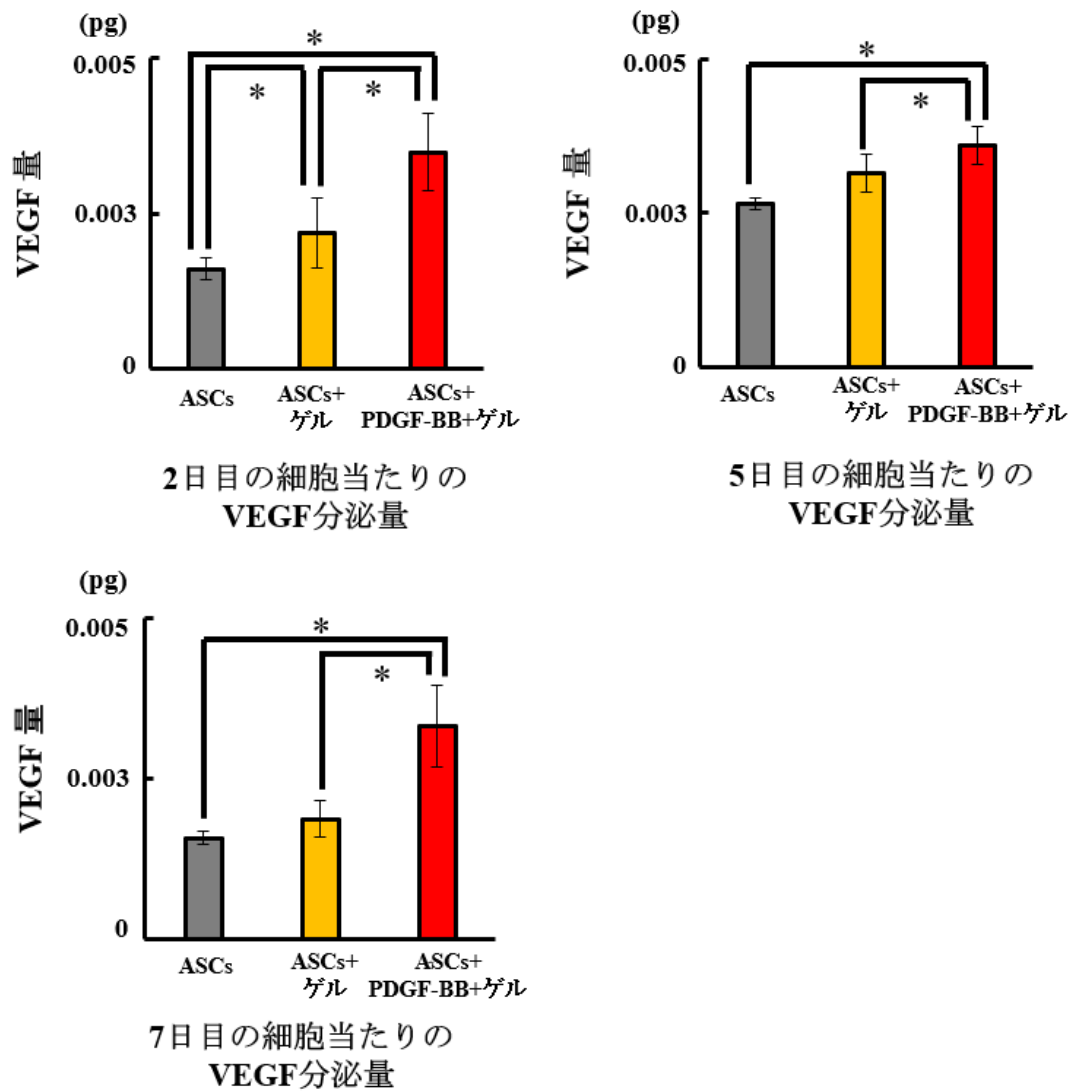


図 9:細胞当たりの VEGF 分泌能の比較

細胞凝集体作製後 2、5、7 日目における細胞凝集体から分泌された VEGF 濃度から、細胞当たり分泌された VEGF 量を算出した (各群 n=4)。ASCs+PDGF-BB+ゲル群は有意に高い VEGF 分泌能を示したことから、PDGF-BB が ASCs の VEGF 分泌能向上に影響した可能性が示唆された。* $p < 0.05$ (Bartlett test, single-factor ANOVA, Tukey Kramer 法)

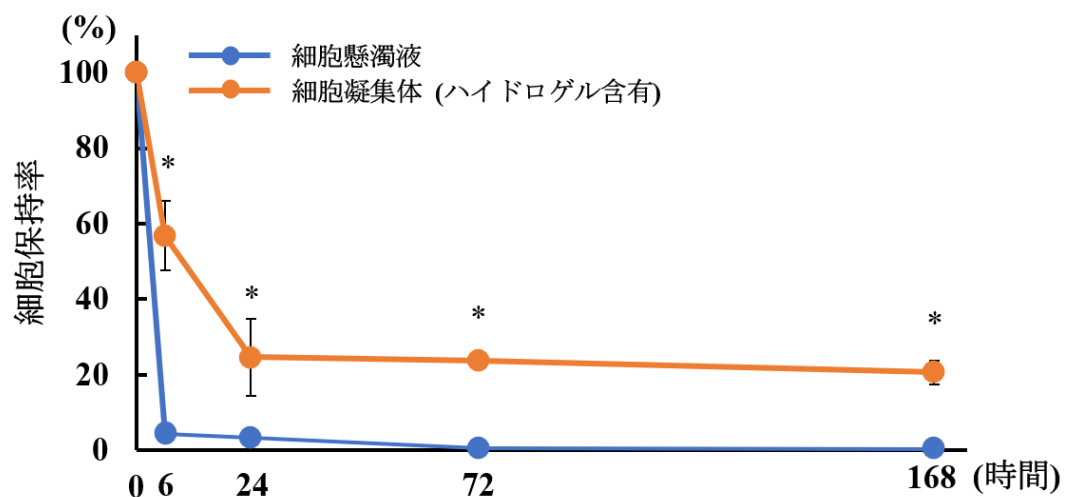


図 10:細胞懸濁液と細胞凝集体(ハイドロゲル含有) 注入後の細胞保持率

細胞凝集体または細胞懸濁液筋注後の細胞保持率に関する比較を行った (各群 n=8)。細胞凝集体群は移植後 6 時間で約 60%の細胞保持率を示したのに対し、細胞懸濁液群では 10%未満となった。その後両群とも低下し続けるが、168 時間後で細胞凝集体群は約 20%の細胞保持率を示したのに対し、細胞懸濁液群では約 0%となった。細胞を組織内へ留めておくには、懸濁液よりも凝集体にする方が有利であることが示唆された。

* $p < 0.05$ (Mann-Whitney's U test)

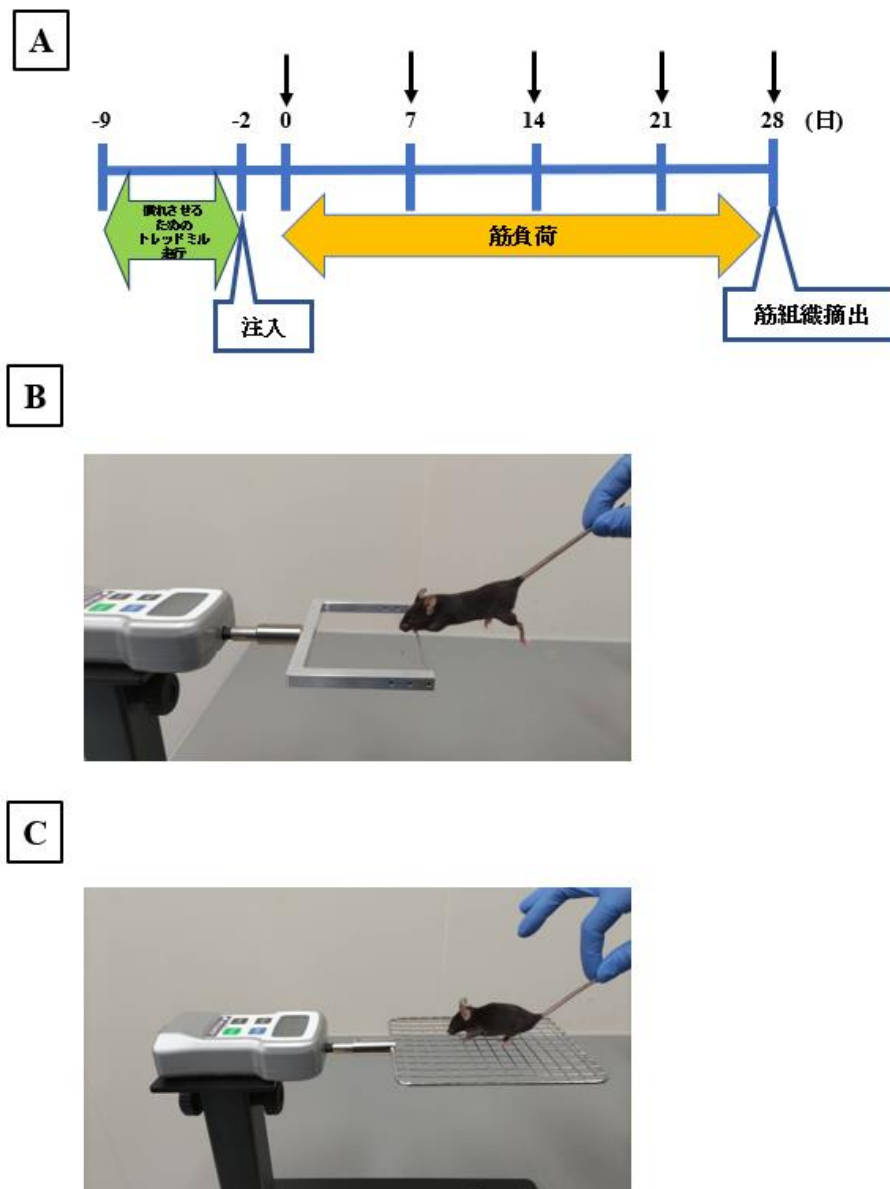


図 11:筋負荷のプロトコルおよび筋力測定方法

A: 筋負荷のプロトコル

移植 2 日前までに週 3 回マウスにトレッドミル走行させ、慣れさせた後に細胞凝集体およびハイドロゲル、PBS を移植した。移植 2 日後より 20 m/min を 20 分間、週 5 回の筋力負荷を開始した。矢印は筋力測定日を示す。

B: 前肢の筋力測定

マウスをグリップに掴まらせ徐々に後方へ引っ張っていき前肢を離すまでの最高筋力値を記録した。測定は 5 回行い、最高値を前肢の筋力値とした。

C: 四肢の筋力測定

マウスを四肢用網に掴まらせ徐々に後方へ引っ張っていき、四肢を離すまでの最高筋力値を記録した。測定は 5 回行い、最高値を四肢の筋力値とした。

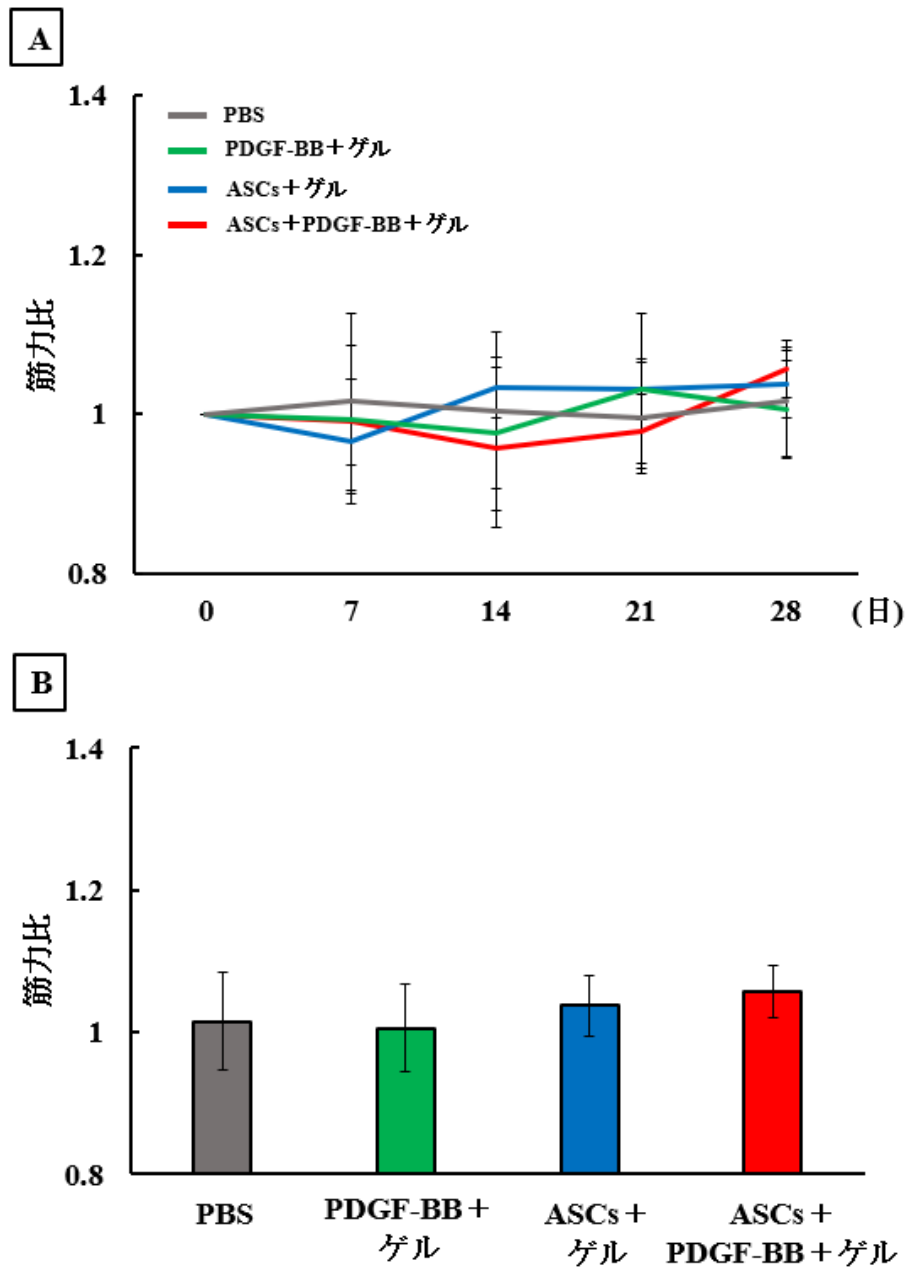


図 12: 筋負荷時の前肢筋力比の推移および 28 日目の筋力比

A: 筋力比の推移

0 日目に対する筋力比の推移を示す (各群 n=5)。各群に有意差は認められなかった。

B: 28 日目の筋力比

0 日目に対する 28 日目の筋力比を示す (各群 n=5)。各群に有意差はみられなかった。トレッドミルによる筋負荷は前肢の筋力向上に影響しないことが示唆された。(Bartlett test, single-factor ANOVA, Tukey Kramer 法)

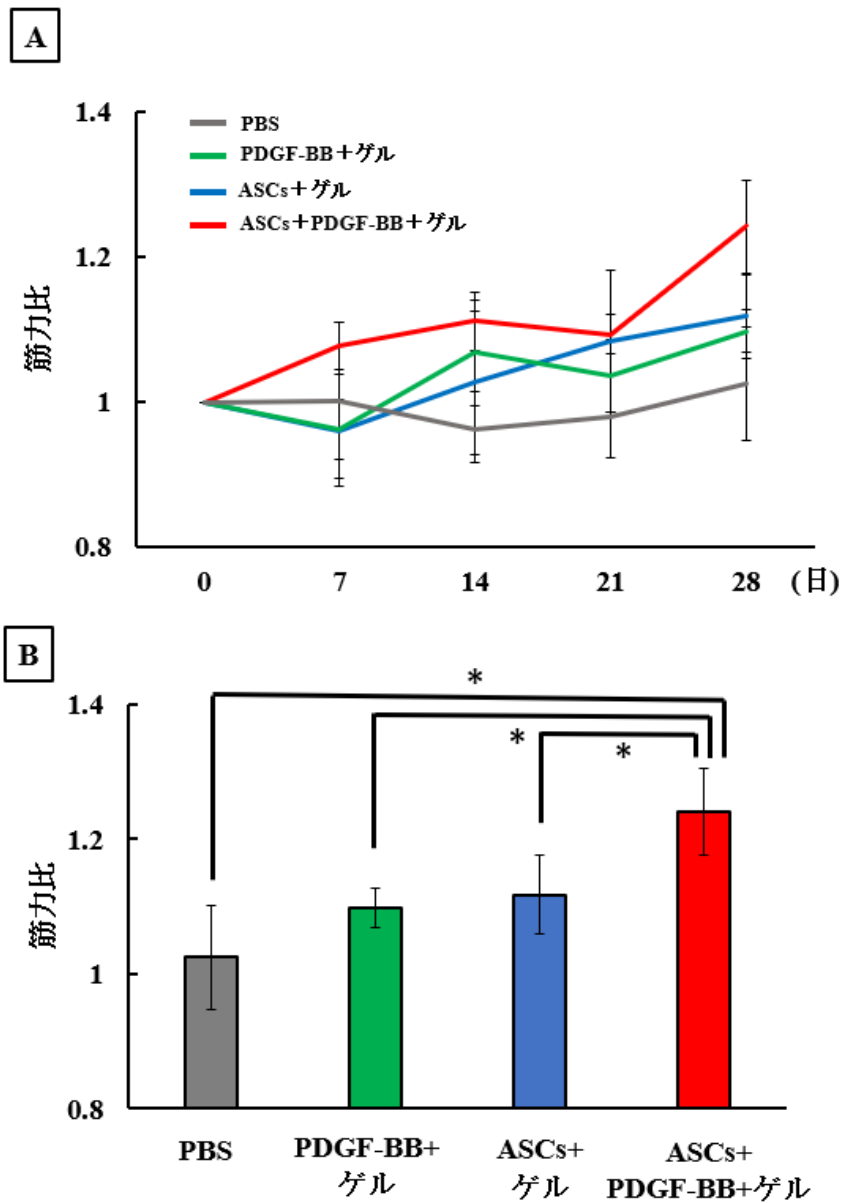


図 13:筋負荷時の四肢筋力比の推移および 28 日目の筋力比

A:筋力比の推移

0 日目に対する筋力比の推移を示す (各群 n=5)。28 日目において、ASCs+PDGF-BB+ゲル群は他群より有意に高い筋力比を示した。

B:28 日目における筋力比

28 日目における各群の筋力比を示す。ASCs+PDGF-BB+ゲル群のみ高い筋力比を示した。前肢の筋力は向上せず四肢の筋力が向上したことから、ASCs+PDGF-BB+ゲル群は下肢の筋力が増強した可能性が示唆された。* $p<0.05$ (Bartlett test, single-factor ANOVA, Tukey Kramer 法)

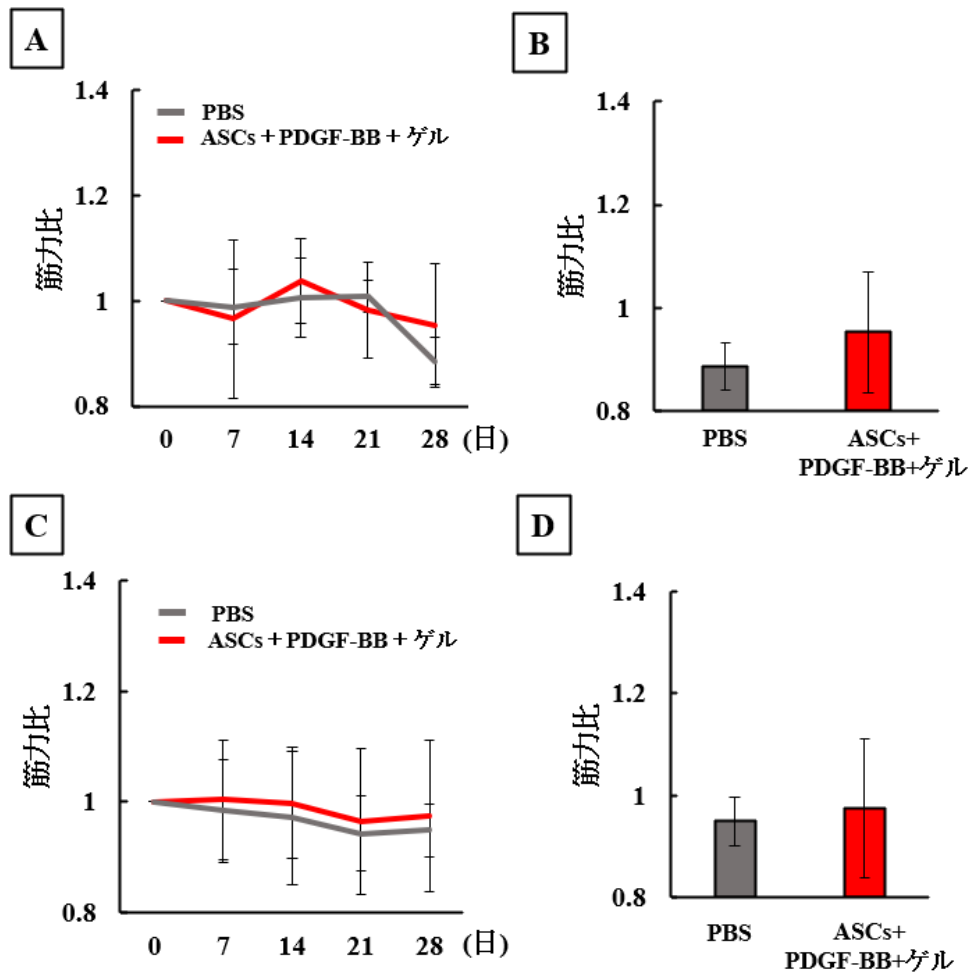


図 14: 非筋負荷群における前肢および四肢の筋力比の推移および 28 日目の筋力比

A: 前肢筋力比の推移

0 日目に対する前肢筋力比の推移を示す (各群 n=5)。両群ともに有意差を認めなかった。

B: 28 日目の前肢筋力比

28 日目における各群の前肢筋力比を示す。

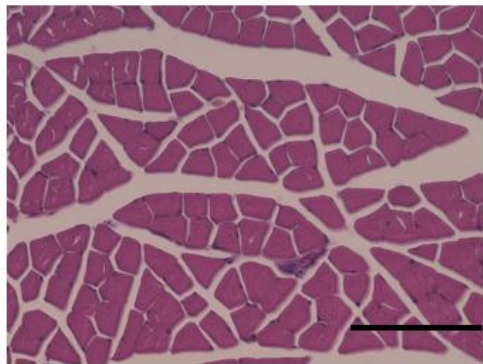
C: 四肢筋力比の推移

0 日目に対する四肢筋力比の推移を示す (各群 n=5)。両群ともに有意差を認めなかった。

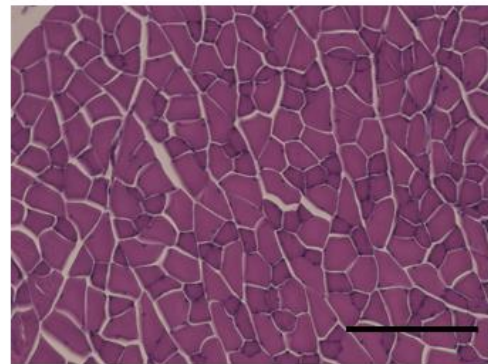
D: 28 日目の四肢筋力比

28 日目における各群の四肢筋力比を示す。

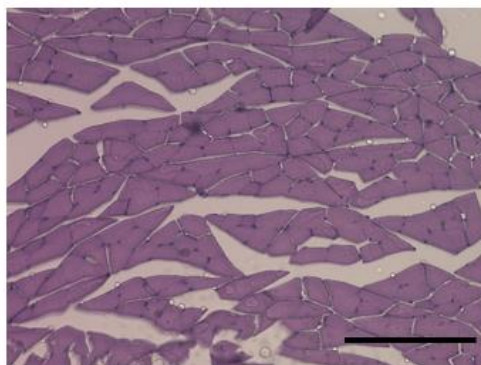
前肢・四肢ともに両群間に有意差を認めなかったことから、下肢の筋力も有意差がないことが考えられる。以上より、筋負荷を加えないと筋力増強できないことが示唆された。(Mann-Whitney's U test)



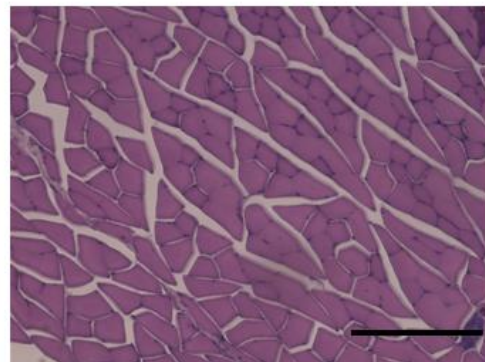
PBS



PDGF-BB+ゲル



ASCs+ゲル



ASCs+PDGF-BB+ゲル

図 15:筋負荷群における摘出したヒラメ筋の HE 染色組織像

筋負荷開始後 28 日目に摘出したヒラメ筋の筋線維像を示す。PDGF-BB+ゲル投与群や細胞凝集体投与群 (ASCs+ゲル、ASCs+PDGF-BB+ゲル) においてハイドロゲルや細胞凝集体の残存はみられなかった。各群の筋線維長径を ImageJ を用いて測定した。スケールバーは 250 μm を示す。

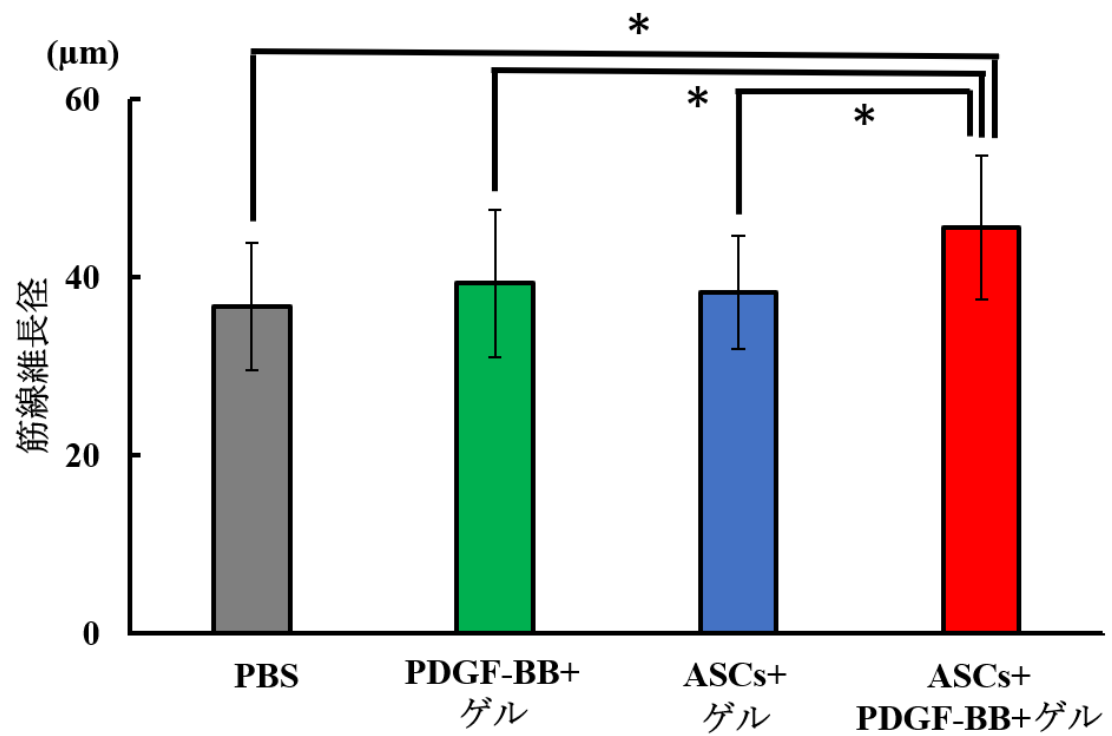


図 16:筋負荷群における筋線維長径の比較

測定した筋線維長径を示す (各群 n=500)。ASCs+PDGF-BB+ゲル群のみ有意に大きい筋線維長径を示した。このことから、ASCs+PDGF-BB+ゲル群のヒラメ筋筋力が増強したことが示唆された。(Bartlett test, single-factor ANOVA, Tukey Kramer 法)

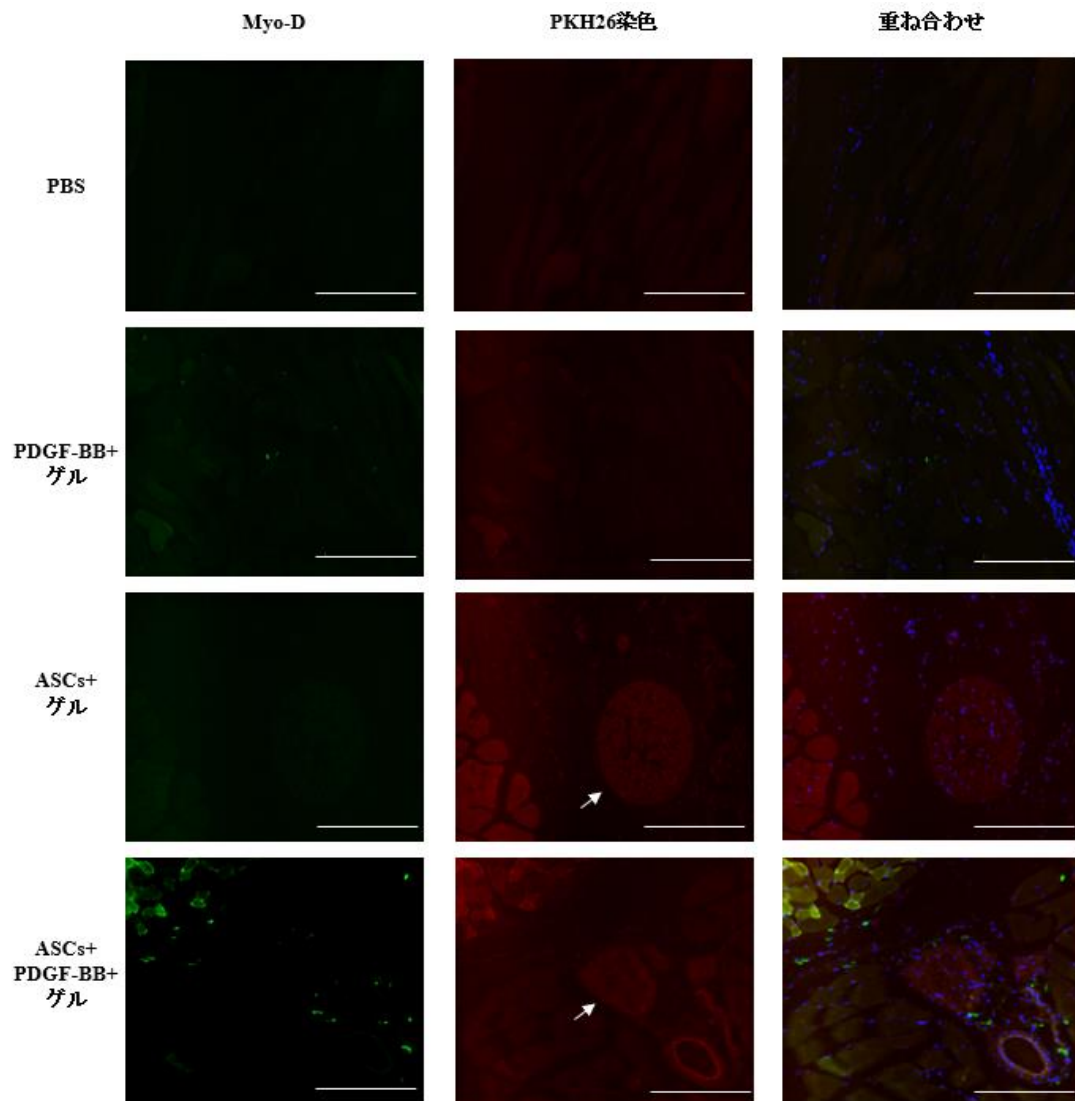


図 17: 蛍光免疫染色による筋分化の評価

移植後 7 日目の蛍光免疫染色像を示す。ASCs+PDGF-BB+ゲル群では、移植した細胞凝集体そのものの周囲に Myo-D 発現を認めた。また、移植した ASCs にもわずかに Myo-D の発現が認められた。このことから、ASCs+PDGF-BB+ゲル群では移植した ASCs および周囲組織の筋分化を促進したことが示唆された。矢印は細胞凝集体を示す。スケールバーは 200 μ m を示す。