東海大学大学院平成 29 年度博士論文

骨格筋由来多能性幹細胞シート・ペレットによる筋-腱移行部完全断裂の再生：“バイオ・ボンド”としての応用

指導　　玉木　哲朗教授

橋本　紘行

・この学位申請論文は、PeerJ に掲載された主要公刊論文を基に作成された。

・PeerJ に掲載された主要公刊論文の一部を学位申請論文に用いることに加えて、学位申請論文を機関リポジトリ［電子書庫システム］で公開することの承諾を得ている。

２．Summary

【目的・背景】　筋腱移行部（MTJ）の完全断裂では、筋-腱という組織特性上の質の違いや縫合糸保持能力等から、確実な縫合方法が確立されておらず、十分な機能回復が望めないケースがしばしばある。このようなケースでは組織癒着能に頼らざるを得ないのが現状である。一方、著者らのグループは末梢の筋・血管・神経系をユニットとして再構築できる多能性幹細胞群が骨格筋間質に存在することを報告し、その臨床応用を目指して研究を進めてきた。この骨格筋間質由来多能性幹細胞群（Sk-MSC）は線維芽細胞も含有し、結合組織を形成することも可能である。さらに、Sk-MSC をシート化して利用する方法（シート・ペレット法）を開発し、組織の局所に移植細胞を限局する方法（パッチ・トランスプランテーション法）も確立している。本研究ではこの Sk-MSC シート・ペレットを“bio-bond”

として利用し、完全断裂したMTJを、筋・末梢神経・血管網の再構築と同時に機能的に接着することを試みた。

【方法】EDTA を用いて、7 日間増幅培養したGFP トランスジェニックマウス(C56BL/6N, EGFP-Tg)に由来するSk-MSCを、細胞間接着を維持した状態でシート・ペレットして分離処理した。同系正常レシピエントマウスの左後肢前脛骨筋に MTJ 完全断裂モデルを作製し、シート・ペレットを移植、右脚を機能・組織回復の標準（筋）とした。また移植対照群（C 群）には、無細胞培地を同一量移植した。シート・ペレット移植（SP）群は、短期（4-8 週）と長期（14-18 週）回復群とした。移植後の各時点で、坐骨神経の電気刺激による前脛骨筋強縮張力を測定し、機能回復の指標とした。組織学的評価は、蛍光免疫組織化学的に、移植生着したGFP陽性組織・細胞の同定によるにより行った。

【結果】　SP短期回復群は、対側を基準とし筋質量で平均64%の回復、及び筋張力で36%の回復を示した。同様に、SP長期回復群は、筋質量で77%、筋張力で49%とさらなる回復を示した。これらに対し対照群は筋肉と腱の間で連続性が回復されず、術後 4-8 週間経過時点で重度の筋萎縮と脛骨への癒着が認められた。組織学的検討か

らもSP群の機能的回復を裏付ける結果が示された。即ち、移植細胞は骨格筋細胞、シュワン細胞、血管平滑筋と血管内皮細胞等に分化するとともに、線維芽細胞にも分化し、神経・脈管系ネットワークを含む結合組織を形成すると同時に筋線維を再生し、断裂した腱-筋を架橋していた。

【結論】　骨格筋間質由来多能性幹細胞シート・ペレットは、腱と筋線維間を神経・脈管系ネットワークを含む結合組織で架橋する能力を示し、まさに生体内で「bio-bond」として利用出来ることが示唆された。この架橋能力は、手術後や様々なMTJ断裂の治療法、あるいはこれまでの治療を補助する有効な方法として期待される。

３．Introduction

骨格筋とは、筋-腱複合体として骨に付着し、関節を可動させることで、身体運動を担っている。また、身体の皮下から深部に渡る領域に位置することから、身体に外力が加わった際には内部を保護するショックアブソーバーの役割も担っている。したがって、外部からの強い圧迫（挫傷）や過度に牽引より筋肉損傷（断裂、裂け目、裂傷）が引き起こされることが多い。

それらは損傷程度によって以下の 3 つの grade に分類される。

・Grade-I（mild）損傷は筋内の限られた数の線維だけに起こり、通常、痛みと圧痛が翌日に遅れて生じ、痛みの強さは関節の自動・他動域に影響するものではない。

・Grade-Ⅱ（moderate）概ね半分の筋線維が断裂し、急性で激しい疼痛があり、腫脹と軽度の筋力低下を伴う。

・Grade-Ⅲ（severe）筋肉は完全断裂し二分される。高度の腫脹と激しい疼痛を伴い、機能はほとんど失われている。損傷は、筋腹、MTJ、腱断裂と損傷部位によって分類される(4, 7)。

通常、Grade-I と Grade-Ⅱ損傷には、保存的治療が適用される。しかし Grade-Ⅲ損傷の場合、基本的に外科的処置が必要となる(16, 28, 35)。腱の完全断裂治療に対する縫合技術には様々な報告ある(11, 20, 23, 35, 50)。しかし筋腹や MTJ を含む断裂に関しては合理的な縫合方法は確実されていない(8, 16, 28, 34)。筋腹断裂に関してはいくつかの方法が提案されているが、筋-腱移行部での完全断裂は特に困難であり、現状、組織癒着に頼らざるを得ない状況である(14, 15, 16)。特に、筋-腱の連続性の回復が最重要課題である。しかし、MTJ には張力が集中するため、外科的縫合処置あるいは保存的

治療の双方で、再断裂の危険性は拭えず、組織癒着特性の強化は必要不可欠と考えられる(13, 52)。

加えて、MTJ の断裂は微小血管や神経ネットワークにも損傷をあたえ、軽微な出血、疼痛や麻痺を引き起こすことでも知られている。したがって、O_2 や他の栄養分の供給、あるいは CO_2 や他の廃棄物の除去を維持するためにも、末梢神経と血管の早期再建は、筋-腱単位の修復過程にとって重要である(1, 2, 26)。さらに、腱断裂の修復には血小板由来成長因子（PDGF）(10)、トランスフォーミング成長因子（TGF）-β(12)、インシュリン様成長因子（IGF-1）(17)、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）(3)、血管内皮成長因子（VEGF）(53)等が再生促進因子として関与することが示唆されており、それぞれ単独で治療応用されている。したがって、これらの因子を同時に応用することは筋-腱単位の再建のためにさらに有利であるとも考えられる。これらの事実は、筋肉を腱につなぐことができる有能な接着剤の応用は MTJ 損傷に対する優良な治療戦略になり得ることを示している。

その様な接着効果を期待して、いくつかの scaffold が腱-腱単独の治療目的に適用されている。例えば、scaffold だけの場合と細胞

＋scaffold の場合と比較して、後者の方が効果のあることが示唆されている(30, 31, 51)。この場合、共移植細胞としては骨髄由来間葉系幹細胞が一般的に応用されているが、細胞着床に関して不確定要素が多く（生着が確認されていない)、当然、細胞分化に関しても未確認のまま治療結果だけは良好なものとして報告されている(5, 9, 19, 29, 47)。脂肪由来幹細胞もまた腱修復に応用されており、tenocytes と血管内皮細胞への分化することで「受動的な伸長張力」が増加することが報告されている(46)。同様に、皮膚由来 tenocyte 類似細胞が膝蓋腱修復術に応用され、疼痛軽減と機能改善に貢献すると報告されている(6)。しかしながら、これらは腱-腱どうしの修復に応用されているものであり、MTJ 断裂への効果については未だに明らかにされていない。

我々は、骨格筋間質由来多能性幹細胞（Sk-MSCs）が筋肉-神経-血管系の再構築に寄与する能力が大であり、骨格筋細胞、シュワン細胞、神経周膜/神経内膜細胞、血管周皮細胞、血管平滑筋細胞と内皮細胞への細胞分化能力があることを報告している(41, 45)。近年、我々は末梢神経と血管組織を含む結合組織ネットワークを構築可能な Sk-MSC シート・ペレットを応用した 3D gel patch システム

を開発した(43)。この Sk-MSC シート・ペレットは様々な神経成長/栄養因子と血管誘導要因 mRNA を発現しており、神経-血管ネットワークを含む筋-腱ユニットの再建に有益な条件を備えていると考えられる(37, 43)。

本研究では、マウス前脛骨筋（TA）の MTJ に完全断裂モデルを作成し、Sk-MSC シート・ペレットを「bio-bond」として応用して、筋-腱ユニットの機能回復を試みた。機能回復は坐骨神経を介した電気刺激による筋張力測定で評価し、移植細胞の動向は免疫組織化学的に解析した。シート・ペレットのパラクライン効果に関しては、骨格筋、神経、血管系の成長・栄養因子に対する mRNA とタンパク発現により解析した。

Ⅲ　研究方法

実験動物

GFP-Tg マウス(C57/B6TgN[act EGFP]Osb Y01, provided by Okabe et　al. (27), Osaka University [Japan]; 4–8 週齢; n =6 ）をドナー、同系正常マウス(C57BL/6N，8–12 週齢 ， n =26)をレシピエントとした。全ての実験は東海大学医学部動物実験委員会の認可を受けて行われた（153015)。

骨格筋間質由来幹細胞の分離・増幅培養，シート・ペレットの作成

Sk-MSCの分離・増幅培養，シート・ペレットの作成は、先行研究にしたがって行った(43)。ペントバルビタール麻酔(overdose 60 mg/kg, Schering Plough, combined with butorphanol tartrate 2 mg/kg, Meiji Seika, Tokyo, Japan, i.p.)の後、GFP-Tgマウスから下肢骨格筋群（前脛骨筋、長趾伸筋、ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋、大腿四頭筋）を採取した。採取した筋群は512±67mg/マウスであった。筋肉は0.1%コラゲナーゼで１時間処理、個々の筋線維を分離した（ただし，筋肉は決してミンスしない)。セルストレイナーで大型のデブリスを濾し取り、コラゲナーゼをPBSで洗浄、分離した筋線維群をフラスコで3日間培養（IMDM／20% FCS／ペニシリンG 100 unit/ml・ストレプトマイシン100μg/ml・ゲンタマイシン 10μg/ml／0.1 mM βメルカプトエタノール）し、筋間質の細胞群を総合的に増幅培養した。その後、トリプシンEDTAで37度10分処理し、筋線維群と増幅細胞群を分離、再びセルストレーナー（70、40、20μm）を用いて、筋線維及びデブリスを除去。得られた細胞群を、再び4日間増幅培養して細胞コンフルエントを形成させた。

このコンフルエントに対して、EDTA単独処理（トリプシンを

使用しない）を行い、細胞同士の接着を維持した状態で浮遊・回収し、これらを試験管に集積・遠心して幹細胞シート・ペレットを作成した。シート・ペレットの収量は120±17mg/マウスであった。出来上がったシート・ペレットはゲル状の性質を示しピンセットでつまみ上げることが可能である（**Fig.1A、B**）。

RT-PCR による細胞分化能の検索

調整されたシート・ペレットの質、細胞分化能、サイトカインの相対的分泌量を RT-PCR と抗体アレーを用いて解析した。シート・ペレットに含まれる細胞群を RT-PCR に、その培養上清に対して抗体アレーを行い、mRNA 及びタンパクレベルでサイトカインの分泌に関する解析を行った。培養により得られた細胞群に対して、血管・末梢神経の分化・誘導、栄養因子等の RT-PCR を網羅的に行った。解析したマーカーと使用目的、プライマーセットを **Table 1** に示した。

シート・ペレットは移植直前に溶解し、QIAGEN RNeasy マイクロ・キットを使用して total-RNA を抽出した。単鎖 cDNA 合成は dT30 含有プライマーを用いた Invitrogen SuperScript III system

で行い、特異的 PCR(94℃で 30 秒、60-65℃で 30 秒、72℃で 2 分の 35 サイクル)は Ex-Taq バッファ、ExTaq-HS-polymerase 0.8U、specific sense and antisense primers 0.7μM、dNTP 0.2mM、と cDNA0.5μl を含む 15μl で行った(43)。

同時に、筋・血管系の再生関連因子を抗体アレー(Proteome Profiler, ARY013, R&DSystems, Minneapolis, MN)を用いて、タンパクレベルで解析した。シート・ペレット培養上清500μlを解析に使用、同量の培地/20% FCSを解析上のバックグランドチェッカーとして用いた。以下に掲げた12のサイトカインの相対的分泌量を測定した。即ち、①interleukin-6 (IL-6), ②insulin-like growth factor-1 and 2 (IGF-1 and 2) 、③～⑦IGF-1関連受容体タンパクIGF binding protein-1, 2, 5, and 6 (IGFBP-1, 2, 5 and 6), これらは筋細胞分化に対する重要な調節因子である。さらに⑧～⑨マクロファージの調節/促進因子であるchemokine (C-C motif) ligand 2 (MCP-1)とマクロファージコロニー刺激因子macrophage colony stimulating factor 1 (M-CSF)、⑩ 多くの細胞の調整/活性化因子である fibroblast growth factor-21 (FGF-21)、⑪メタロプロテアーゼの組織抑制因子 tissue inhibitor of metalloproteinase 1(TIMP-1); そして ⑫血管内

皮細胞成長因子vascular endothelial growth factor (VEGF) である。

筋-腱移行部完全断裂モデルとシート・ペレット移植

筋-腱移行部完全断裂モデルとして、正常マウス左前脛骨筋（TA）（n=19）を用いた。本項における全ての手術手技は、吸入麻酔下（(Isoflurane; Abbot, Osaka, Japan)で行われた。手術のアウトラインを**図 1** に示した。まず、TA　を露出し（**1C, F ステップ 1**）、遠位端の腱から筋線維を TA 全長の半分近くまで、綿棒を使って剥ぎ取った（**1D, F ステップ 2**）．この時、剥離に伴い壊死した筋線維は切り取った（**F ステップ 3**）。切り取った筋線維は 21.5 ± 1.8 g,であり、これは正常 TA の約 40%の重量に相当する。そして、その欠損部分にシート・ペレットを接着し（**F ステップ 4、SP グループ n=14**）、その後皮膚を縫合した。右足は筋重量・機能回復の基準として保存した。非細胞移植群(C 群、n=10)には、同量の培養培地を移植し、同様に右足を保存した。移植後、全てのマウスは自由にケージ内を動き回れるように考慮した。

移植後の機能測定

術後の機能解析は、短期回復群（4～8週間）、長期回復群（14

～18週間）に分けて行った。最初の測定は第4週にSP群、C群から各々一匹ずつ行い、その後0.5～1.5週間隔で同様の測定形式を繰り返し、両群を策定した。測定は、先の報告を参考にし(45)、吸入麻酔下で体温を36±1°Cに維持した状態で、左（基準側）右（術側）の脚で行い、回復率を決定した。測定の概要は（**図1G**）に示した。　坐骨神経とTAを露出し、TA遠位端の腱にトランスデューサー(FD-Pickup, TB-611T; Nihon Kohden, Tokyo, Japan)、坐骨神経に刺激電極(Ag/Ag)を装着、1msecのスクエアーパルスを基準とした単収縮及び完全強縮を測定した（**図1G**）。

実体顕微鏡を用いたマクロ観察と蛍光免疫組織化学

上記機能測定終了後、5～10週後のマウスに関して実体蛍光顕微鏡観察、及び免疫組織化学的検索を行った。マウスにペントバルビタール麻酔を施し(overdose, 60 mg/kg, combined with butorphanol tartrate 2 mg/kg, i.p.)、最初に実体顕微鏡による観察（GFP）をin-situの状態で行い、その後36° Cに暖めた0.01M PBSで心臓穿刺による環流を行った。続いて、4%パラホルムアルデハイド（4%paraformaldehyde/0.1 M phosphate buffer；4% PFA/PB,

Wako, Osaka, Japan)による環流固定を行った。一晩固定した筋は、5～25%グルコース/PBSで脱水後、液体窒素で冷却したイソペンタン中で急速凍結した。凍結した筋から厚さ7μmの切片を切り出し、以下の染色を行った。

筋肉系の染色: anti-skeletal muscle actin (αSkMA; dilution, 1:200; incubation, room temperature for 2 h; Abcam, Cambridge, UK).
末梢神経系の染色 : 軸索染色、rabbit polyclonal anti-Neurofilament 200 (N-200, dilution, 1:1000; incubation, room temperature for 1 h; Sigma, St. Louis, MO, USA). シュワン細胞染色、anti-p75 (rabbit polyclonal, 1:400, 4°C overnight; CST, Boston, MA, USA).
血管系 : 血管内皮細胞、rat anti-mouse CD31 (1:500, 4°C overnight; BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) monoclonal antibody, 血管平滑筋、mouse monoclonal α-smooth muscle actin (αSMA, Cy3-conjugated; 1:1500; room temperature for 1 h; Sigma, St. Louis,MO, USA).
筋線維と結合組織の結合性の証明：ジストロフィン染色goat anti-dystrophin polyclonal antibody (1:50, 4 °C, overnight; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA).
神経-筋接合部 : 形成された筋線維の有効性を示すために神経-筋接合部の染色を行った。α-bungarotoxin (Alexa Fluor 594 conjugated, 1:100, room temperature,1 h; Molecular Probes, Eugene, OR,

USA).

核染色はDAPI (4,6-diamino-2-phenylindole)で行った。

さらに、必要に応じて以下の2次抗体を使用した：Alexa Fluor-594-conjugated goat anti-rabbit and anti-rat antibodies (1:500, room temperature, 2 h; Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

統計方法

短期群－長期群間の差はStudent's t-test（対応無し）で検定し、有意差レベルを$p<0.05$とした。本文中の値は平均±標準誤差で表記した。

IV　結果

Sk-MSCシート・ペレットのクオリティーと期待される治療能力

まず、Sk-MSCシート・ペレットのクオリティーと期待される治療能力に関してRT-PCRによるmRNAの発現を検討した（**図2**）。

移植直前のSk-MSCシート・ペレットは骨格筋特異的マーカー (MyoD, Myf5, Pax7, Myogenin, c-met, Mcad, MyH, Desmin, and IGF-1)、神経栄養・成長・誘導因子(NGF, BDNF, GDNF, CNTF, LIF, Ninjurin, Galectin, Nestin, and Sox10)、さらに血管成長・誘導因子

(VEGF, HGF, PDGF, TGF-β, EGF, and FGFb)を発現していた（**図2A**）。　今回のシート・ペレットもこれまでの報告同様のクオリティーと治療能力を有していると考えられた（43)。

加えて、筋肉の成長・分化に必要不可欠と考えられるミオカイン（IL-6 and IGF-1 and 2）(25, 33)、さらにそれらの上位調整因子であるIGFBP-2, 3, 5 and 6、単球/マクロファージの調整因子であるMCP-1とM-CSF(32, 36)、多くの細胞の調整/活性化因子であるFGF-21 and TIMP-1(21, 48)の発現がタンパクレベルで確認され、Sk-MSCシート・ペレットのパラクライン能力の高さが示唆された（**図2B**）。

機能回復

機能評価の結果概要を**Table 2**に示した。さらに、SP短期回復群、長期回復群の群間比較と個体別プロットを**図3**に示した。SP短期回復群は平均筋湿重量で64%、筋張力（強縮）で28%の回復を示した（**図3A、B**）。これに対しSP長期回復群は、筋湿重量で77%、筋張力で49%の回復を示した（**図3A、B**）。ここで重要な点は、回復4週の時点で培養培地だけを移植した非移植群C群は、SP群に比べ

て有意に低い筋重量（萎縮率）を示し（**図3A**）、この極端な筋萎縮で脛骨に張り付くような状態になっていたことである（**後述の図4I, K参照**）、この症状は回復期6週に向けてさらに進行していた。　また、この極端な筋萎縮により長期群の筋質量測定、及び機能測定は不可能であった。

両群内の個体別プロットを見ると長期群における筋湿重量、機能回復ともに非常にきれいな直線関係が成立していた（**図3C, D**）。これは、動物のケージ内行動が8週以降活発になった点（飼育観察によるdata not shown）を鑑みて、トレーニング効果の現れではないかと考えられた。即ち、「行動量の増加に伴い機能が回復してきた」ものと推察される。

実体顕微鏡を用いたマクロ観察

術後4～10週のSP群におけるGFP陽性組織の着床状態を蛍光実体顕微鏡で観察した（**図4**）。In-situのマクロ的観察でGFP陽性組織の明らかな着床を認め、それらは5つのパターンに分類することが出来た。

・<u>パターン1</u>は最も多く認められた形式（5/13）であり、厚くて広範囲のGFP陽性組織が腱から筋腹中央まで認められる（**図4A-C**）。GFP

陽性組織中には血管網も認められ（**arrows, 図4B**）、筋-腱の連続性が明らかである（**図4C**)。なお、このパターンでは結合組織が主な構成要素であった。

・パターン2はレアーケースであり（1/13）MTJの中腹より筋上部にかけて主に筋線維で構成され、結合組織が非常に少ないケースである（**図4D**）。

・一方、パターン3もレアーケース（1/13）であるが、逆に筋腹中央部からMTJにかけてほとんど結合組織で埋まっている（**図4E**）。

・パターン4（3/13）とパターン5（3/13）は筋線維と結合組織の混合パターンと言える（**図4F-4H**）。しかし、パターン4はGFP陽性筋線維が比較的少なく、結合組織も少ない（**図4F**）。かたやパターン5は2つの組織がほぼ等しく分布する（**図4G**）。

追記事項として、全てのパターンで、GFP陽性組織中あるいは周辺では活発な血管形成が認められるのが特徴である（**図4B, 4D-4H、さらに、その拡大画像を図5に示した**）。一方、強烈な筋萎縮がC群の筋には認められ（**図4I, 4J**)，このケースは全C群7/7に認められた。In vivoでTA外側部は明らかにへこんだ状態で（**図4I、白矢印**）、筋肉らしき組織はほとんど無い。逆に明らかな脂肪化が認められる（**図**

4J)、と同時に筋−腱の連続性が乏しいことがうかがえる(図4J, 4K)。図4Kの状態では、張力発生はもはや困難であると考えられ、この萎縮傾向は期間が長くなるにつれて強くなっていった。

着床細胞の免疫組織化学的検索

術後4〜10週の筋肉（SP群）における着床細胞の動向を、免疫組織化学的に解析した。図6はパターン1の筋肉を解析したものである。厚めのGFP陽性組織が筋線維の近傍を埋めている（図6A)。このGFP陽性組織はファンギーソン弾性繊維染色に陽性であり、腱の周囲も取り囲んでいる（図6B)。この事実は、着床したGFP陽性細胞が結合組織（弾性繊維）のネットワークを形成し、筋線維と腱を架橋した、即ち、“bio-bond”として機能したことを示している。加えて、GFP陽性細胞/組織の腱への侵入/埋入と血管内皮細胞への分化

（CD31+GFP、白矢印、6C）も明らかである（図6C)。同様の傾向が筋線維サイドでも認められる（図6D,点線以下)。さらに、N200陽性の神経軸索に寄り添うGFP陽性細胞も筋線維、結合組織双方で多数認められる（図6D)。それらの軸索近郊細胞の多くは、p75陽性であり、シュワン細胞であると考えられた（図6E, 点線右側)。これら

のデータはGFP陽性細胞と神経系との関係性を表しているものと考えられる（**図6D**）。

GFP陽性の結合組織・腱・筋線維の関係は**図6F**でさらに顕著である。腱と筋線維を架橋するGFP陽性の結合組織にはジストロフィンの発現が認められ、筋線維と結合組織とのジストロフィンによる結合様式が示唆された。

同様にパターン5の筋に対する長軸切片の様相を**図7**に示した。やはり、GFP陽性の結合組織は筋線維と結合する（**図7A**）と同時に、GFP陽性の筋線維も認められる（**図7B**）。さらに結合組織中には、GFP陽性の血管平滑筋も認められ、比較的大きめの血管系再生にも貢献していたと思われる（**図7C, GFP+SMA,矢印**）。ここでもやはり神経軸索とGFP陽性細胞の密な関係が見られ（**図7D**）、それらはp75陽性のシュワン細胞であった（**図7E、矢印、GFP+p75**）。同様に、GFP陽性細胞と筋線維、神経線維、神経-筋接合部の関係性も確認され（**図7F、点線円内、神経-筋接合部染色α-bungarotoxin陽性**）、GFP陽性細胞が末梢神経の延長に貢献し、神経-筋接合部（運動神経末端）まで到達していることが示唆された。これらのデータは、移植されたシート・ペレットは主に結合組織を形成しつつ、1）断裂し

た腱と筋線維を架橋し、2）筋線維にも分化しつつ、3）腱と筋線維とを接着し、4）末梢神経・血管系のネットワークを形成することを示していた。

追記事項として、GFP陽性細胞と血管系マーカー（CD31, SMA）のco-stainingに関して拡大写真を図8に示した。両者の関係がより明確である。さらに、GFP陽性細胞とp75（シュワン細胞マーカー）の関係についても、拡大写真を示した（図9）。GFP陽性細胞のp75発現が明らかである。

4．Discussion

筋腹あるいはMTJの傷害に対する手術は整形外科医にとって一つのチャレンジだといえる。それは今なお合理的な縫合方法が確立されていないからである(8, 16, 28, 34)。即ち、生体における筋-腱ユニットの役割は骨に付着し、関節を動かす力を発揮することで、言い換えれば筋-腱の連続性が必然である。今回、我々はSk-MSCシート・ペレットを“bio-bond”として利用し、TAのMTJ完全断裂の治療を試みた。その結果、Sk-MSCシート・ペレットは断裂した筋と腱をよく接着し、その連続性を回復することで有意な機能回復に貢献

した。着床したSk-MSCsは主に神経・血管のネットワークを含みながら結合組織を形成し筋と腱を架橋、同時に骨格筋細胞、シュワン細胞、血管平滑筋、血管内皮細胞へ分化していた。これらの細胞分化能に関しては、ほぼ期待通りの結果であったといえる。それは、シート・ペレットを形成する細胞が多能性のSk-34(CD34+/45-)細胞(38, 45)、およびSk-DN(CD34-/45-)細胞(39, 41, 42)であるためで、なおかつ今回の移植直前のRT-PCRの結果は(図2A)、以前より報告されていた結果と等しいからである。さらに、GFP陽性線維芽細胞様細胞の侵入/埋入は、腱内及び筋線維間に広がり、力学的にも丈夫な形で筋-腱を架橋していた。この架橋状況がまさに“bio-bond”様作用と言える。特に、筋線維をホールドする力はMTJにおけるジストロフィン形成から裏付けられる。即ち、コラーゲンネットワーク中のジストロフィンージストログリカン（α、β）複合体の役割からも明らかである(24, 49)。 図10にその役割の模式図を示した。我々のSk-MSCの先行研究では、シート・ペレット移植では神経・血管系の再構築には促進的に働くが、骨格筋系の分化能が幾分低下することが示されていた(37, 43)。しかし、本研究では培養期間をできるだけ短くする（特に最初のfiber cultureの期間を短くする）ことで骨格筋

系への分化能力も維持されたものと考えられ、今回のケースではこのことがより優位な条件として働いたものと考えられる。

今回の研究では、SP短期群で36%、長期群で49%の筋張力回復が認められた。これを、GFP陽性組織着床パターンで見るとパターン4及び5（**図4F, 4G**）で比較的高めの回復が認められた。即ち、筋線維と結合組織の混合タイプで高い傾向が見られたことになる。さらにパターン5では、免疫組織化学的検索においても神経-筋接合部付近まで運動神経の伸展が認められていた(**図7F、パターン5**)。したがって、これらの状況も機能回復と関係している可能性は高い。今回、我々は「受動的伸長強度テストthe tensile strength test」は行っていない。しかし、繰り返される張力測定中に断裂した筋肉はゼロであり、張力の平均値はグラム表示では約38ｇであり、マウスの平均体重約34ｇ（長期群）をはるかに上回っている。したがって、マウスのケージ内運動時の筋伸長強度としては十二分であったと確信している（単独筋としての強度で体重を上回っており、実際の動作では複数の筋に力は分散されるため）。これらのデータを総合して次のように考えられる。　即ち、回復が進むにつれてケージ内活動量が増加し、このことが一種のリハビリテーション効果となり長

期群における極めて高い質量・機能回復の相関関係（時間軸との直線関係）を生み出したものと考えられる（**表2，及び図3参照**）。このことに関連して、我々はマウスにおける日々のケージ内活動量が回復期8週を目安に活発化していたことを観察しており（data not shown）、おそらくこの時期を境に痛みの軽減も起こったものと推察している。

一方、非細胞移植C群では、筋-腱ユニットの再架橋は達成されなかった。このことは、今回のMTJ完全断裂モデルが自然治癒の達成されないイリバーシブルモデルであったことを示している（**図4, 表2**）。これに関連した報告として、腱断裂に対してできるだけ早期の縫合による受動張力負荷の再開が、その後の腱の質を大きく左右し、受動張力負荷再開が遅れれば腱組織そのものの再構築が極めて困難になるとされている(18, 22)。したがって、今回のC群ではこれと同様の機序が働き、強烈な筋-腱の萎縮と脂肪化を導いたものと考えており（**図4**）、同時にシート・ペレット移植はこの悪影響も阻止したことになる。

さらに、結合組織や腱の再構築には、関連する末梢神経、血管系のできるだけ早期の再生が必要であること(1, 2)、靭帯の再生に

も血管新生が必要不可欠であることも報告されている(26)。神経-血管系再生を通じた血管運動性angiokinesis (vasodilation-constriction)の回復も当然、組織再生には必要不可欠である(1)。今回のSk-MSCシート・ペレット移植はこれらの点を全て網羅しており、Sk-MSC移植の神経-血管系再生促進効果もすでに明らかにされている(40, 41, 43, 45)。Sk-MSCの移植前後における、神経-脈管系成長・栄養因子のパラクラインに関しても神経断裂モデルの実験ですでに報告されており(40)、同様の効果が今回のケースでも発揮され有利に働いたことは十分に推察されることから、Sk-MSCシート・ペレットのパラクライン効果（ドナー、レシピエント双方）への期待も大きい。

近年我々は、ヒト骨格筋由来幹細胞の最適な抽出・分離・増殖法を開発、報告した(44)。この方法でヒト骨格筋由来幹細胞は2種類の前駆細胞/幹細胞に分類できることが明確となった、即ち、1）骨格筋系に特化した分化能を示す細胞群（CD45-/CD34-/CD29+細胞群；Sk-DN/29+細胞群）、2）神経-血管系細胞系譜に複合的に分化できる細胞群（CD45-/CD34+；Sk-34細胞）である。そして、これら2つの細胞群が持つ細胞分化能力を複合すると、これまでのマウス

Sk-MSCと同様の細胞分化能力を有することが明らかとなった(44)。これはヒトの場合、治療目的によって細胞群を使い分けることが可能であることを示している。即ち、骨格筋が必要な場合、神経-血管系だけが必要な場合、両方が必要な場合で移植細胞群を振り分けることが可能であり、より臨床的といえる。さらに、ヒトでは筋肉の種類・部位（脚の筋や腹直筋）で細胞の分化・再生能力に違いが無いことも明らかとなった(44)。

5. Conclusion

Sk-MSCシート・ペレット移植は、骨格筋MTJ完全断裂に対して筋-腱間を結合組織で架橋し、同時に骨格筋細胞、シュワン細胞、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞に分化することが明らかとなった。この結合組織は腱の中及び筋線維間に埋入し双方の組織をホールドする、あたかも“bio-bond”として働いていた。加えて、移植細胞の持続的なパラクライン効果による、神経-血管系組織・細胞への再生促進効果も大いに期待できる。おそらく、3ｇ程度の筋肉をビキニラインより下の腹直筋から採取し、自家移植に応用することのリスクはさほど大きなものではないだろうと予測される。近年のヒトSk-MSC

の分離・精製・増幅法の開発と相まって、整形外科領域における筋-腱傷害の新たな治療法として期待したい。さらに、これまでの縫合術、scaffoldの利用と本法との共利用も、筋-腱の接合強度を少しでも高めるための努力として有効ではないかと考えている。