

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 草場 洋平

横浜市立大学大学院医学研究科医科 運動器病態学

審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科 リハビリテーション科学 主任教授 中村 健

副査 横浜市立大学大学院医学研究科 法医学 准教授 福家 千昭

副査 横浜市立大学大学院医学研究科 血液・免疫・感染症内科学 講師 松本 憲二

博士の学位論文審査結果の要旨

Bevacizumab promotes tenogenic differentiation and maturation of rat tendon-derived cells in vitro

(ベバシズマブは in vitro においてラット腱由来細胞の分化・成熟を促進する)

【序論】腱幹/前駆細胞 (TSPC) は、損傷した腱の修復において腱細胞の遊走、増殖、分化に重要な役割を果たしている。TSPC には、腱周囲膜由来の細胞 (PDCs) と腱実質由来の細胞 (TDCs) がある。これら二種類の TSPC は、損傷部位に応答し、腱特異的マーカーである Scleraxis (Scx) などの発現を通じて腱の修復を促進する。TSPC から腱特性を持つ細胞への分化を促進する治療戦略は、患者の治療能力を増強し、腱の修復を促す可能性がある。腱が損傷すると治癒過程の初期には血管新生が起こるが、腱が成熟する過程では血管が退縮することが知られている。我々は先行研究で、ラットのアキレス腱から単離した PDCs, TDCs に、血管新生に関与する Vascular endothelial growth factor (VEGF) を投与し培養した。その結果、成熟した腱細胞に発現する遺伝子マーカー Tenomodulin (Tnmd) が抑制されたことを示している。そこで本研究は、抗 VEGF 抗体であるベバシズマブを PDCs, TDCs に投与することで、腱幹/前駆細胞の分化・成熟が促進するという仮説をたて in vitro で検証することを目的とした。

【実験材料と方法】ラットの腱周囲膜と腱実質からそれぞれ別々に幹・前駆細胞を単離し、PDCs および TDCs として継代培養した。PDCs, TDCs をコラーゲンゲルに混入し 3 次元培養した。コントロール群とベバシズマブ群の遺伝子発現を 7 日目、14 日目に、Scx と Tnmd、腱を構成するコラーゲンのマーカー Colla1 を real-time PCR を用いて測定した。PDCs, TDCs を 14 日間培養し得られた腱様組織から組織切片を作製し、免疫蛍光染色により Tnmd の発現を評価した。VEGF のシグナル伝達に対する抗 VEGF 抗体の影響を確認するために、14 日目の腱様組織からタンパク質を抽出し Western blotting 法にて VEGF の主要なレセプターである VEGFR-1, VEGFR-2 のリン酸化を評価した。さらに、ベバシズマブの細胞毒性を評価するために、PDCs, TDCs の増殖、遊走、アポトーシスを調査した。

【結果】3D 培養においては、Scx の発現は 7 日目の PDCs, TDCs とともにベバシズマブ群が有意に増加した。Tnmd の発現は 14 日目の PDCs, TDCs においてベバシズマブ群が有意に増加した。Colla1 の発現は 14 日目の PDCs, 7 日目の TDCs においてベバシズマブ群が有意に増加した。免疫蛍光染色において 14 日目の PDCs, TDCs のいずれも、ベバシズマブ群で Tnmd の発現が有意に増加した。Western blotting 法では PDC, TDC とともに pVEGFR-2 タンパク質の発現が抑制された。細胞増殖において PDCs, TDCs とともにコントロール群とベバシズマブ群の間に有意差を認めなかった。遊走においても同様に 2 群間に有意差を認めなかった。アポトーシスに関しても 2 群間に有意差を認めず、ベバシズマブの PDCs, TDCs に対する細胞毒性は認めなかった。

【考察】本研究の最も重要な発見は、in Vitro でベバシズマブがラットのアキレス腱由来の二つの異な

る TSPC である PDCs,と TDCs の分化と成熟を促進したことである。ベバシズマブの作用により、VEGF-A の生物学的活性が抑制され、血管新生が抑制される。血管新生は創傷治癒における生理的過程であるが、無秩序な血管の成長や血管退縮の障害は癒痕形成につながる可能性がある。したがって、適切な腱修復のためには血管新生を制御することが重要である。動物モデルを用いた腱修復のための抗 VEGF 投与の臨床研究では、血管新生の減少と腱コラーゲン組織と機械的特性の改善が示された。これらの in vivo 研究では、血管新生の抑制が腱修復に関連する改善に役割を果たすことが結論付けられたが、TSPC への影響は示されていない。本研究は、ベバシズマブが 2 種類の TSPC である PDCs および TDCs の分化に及ぼす洞察を示すものである。これまでの研究で PDCs,TDCs が腱修復に寄与することが示されており、VEGF を抑制することによる PDCs,TDCs の分化と成熟の誘導は、腱修復を促進するための治療オプションとなる可能性がある。

学位論文審査にあたり上記内容について、研究報告の説明が行われた後、以下の質疑応答がなされた。

福家千昭副査からの質疑応答

1. ベバシズマブはどういう化合物か？何から作製されているか？

回答：ヒト化モノクローナル抗体で VEGF のレセプターではなくてリガンドに結合する。何から作製されているか答えられない。

2. ベバシズマブの濃度を 100 μ g/ml としているのはなぜか？

回答：先行研究、また実際の臨床で使用されている濃度を参考に決めている。また、10 μ g/ml、100 μ g/ml で投与したときに、後者の方がしっかりとしたデータを得た。

3. 実際に人に投与されているのか？

回答：抗癌剤として静脈内投与されている。

松本憲二副査からの質疑応答

1. Tnmd が VEGF を抑制するので、抗 VEGF 抗体を入れることで負のフィードバックなどが生じ Tnmd が亢進したと考えるのか？

回答：Tnmd が VEGF を抑制することは一般的に報告されていることだが、VEGF が Tnmd を抑制することは我々の先行研究で示した結果である。今回はその VEGF の作用を抗 VEGF で抑制することで Tnmd の発現が亢進するという仮説を立てた。

2. 抗 VEGF の投与のタイミングも重要か。

回答：腱の治癒過程では初期の段階では VEGF が必要であり、その後 VEGF が抑制され血管が退縮することが腱の成熟に重要となる。本研究では最初から抗 VEGF 抗体を投与しているが、投与時期は非常に重要と考えており、今後の研究課題となる。

3. 抗 VEGF 抗体を入れることで Scx が亢進し、それにより Tnmd が亢進したのか。

回答：PCR の結果で、まず Scx が増加しその後に Tnmd が増加している。Scx は Tnmd の転写活性因子なのでそのタイムラグがあると考える。

中村健主査からの質疑応答

1. PDCs と TDCs に VEGF を投与したときに Scx が抑制されていないのはなぜか？

これは 2D 培養の PCR 結果であるが、3D 培養で調べたら違う結果になるのか？

回答：VEGF 投与により Scx が抑制される結果が出れば論理的であるが、本研究結果ではそのようにならなかった。3D 培養で PCR をすれば Scx が抑制される可能性はあると考える。抗 VEGF 抗体投与により Scx が亢進するメカニズムを報告する論文は調べた範囲では分からず、今後の課題である。

2. 3D 培養で結果が変わる可能性があるとはどういうことか？

回答：腱細胞が成熟するときには一方向性にかかる牽引力が重要であると報告されている。本研究の 3D 培養をすることで、両側の人工靭帯にのみ細胞が接着するため牽引力がかかり、より腱様の性質が高まるため、異なる結果を得る可能性がある。

3. VEGF が直接 Tnmd を抑制するのではなくて、VEGF が Scx を抑制することにより結果として Tnmd が抑制された可能性はあるか？

回答：VEGF 投与により Tnmd が抑制された結果は PCR で得られたが、Scx が Tnmd の転写活性因子であることを考えると Scx が抑制されたために Tnmd が抑制された可能性はあると考える。

4. 抗 VEGF 抗体は VEGF レセプターにつき VEGF の効果を阻害するのか？

回答：抗 VEGF 抗体は VEGF に付着することで、VEGF がレセプターへ結合することを阻害する。直接レセプターには付着しない。

5. 抗 VEGF 抗体を投与することで PDCs の VEGF に影響がみられないのはどのように解釈しているのか？

回答：細胞内の VEGF がネガティブフィードバックなどにより増加しているので (TDCs ではそうになっている)、減少していない可能性はあるが、正確に解釈ができていない。VEGF のシグナル伝達が阻害されている確認が必要であり、Western Blotting でレセプターのリン酸化を調べた。

6. in vivo で抗 VEGF 抗体の腱損傷に対する効果がすでに報告されているが、今回 in vitro で示すのはどのような意味があるのか？

回答：in vivo での効果を今回 in vitro で研究することで、その機序を示すことができた。Tnmd、Scx は腱細胞の分化に特異的な遺伝子マーカーであり、腱幹・前駆細胞の PDCs、TDCs においてそれらのマーカーが亢進したことは抗 VEGF 抗体の作用機序の説明となる。

7. 腱の治癒過程でなぜ正常の過程ではなく血管が残るようなことが起こるのか。

回答：臨床の現場では、腱損傷後にしっかりと安静期間がとれず、機械的な刺激が持続する際などに血

管が残存している場合がある。

8. 人の腱損傷に対する抗VEGF抗体投与の研究はないか？ベバシズマブを臨床的に使用できるのか？

この研究は実際に使用するための研究ではないのか？

回答：人の腱損傷に投与することは行われていない。ベバシズマブは高価な薬剤、抗癌剤であり、実際の腱損傷に対してすぐに使用できるとは考えていない。in vitro で腱幹・前駆細胞の VEGF を抑制することが腱の分化を亢進するという機序を示せたことが意味のあることだと考えている。しかし、血管が残存する腱障害、難治例などに対し今後臨床応用する可能性は考えていきたい。

9. 今後研究をどのように発展させるのか？

回答：臨床でも使用している PRP と抗 VEGF 抗体を組み合わせ、腱細胞に対する効果を検証してみたい。

10. 今回の研究は自分で行ったのか？

回答：実験、解析等基本的に自分で行った。

以上の様な内容について質疑応答が行われ、各質問にたいして適切な回答がなされていた。本研究は、in Vitro で抗 VEGF 抗体がラットのアキレス腱由来の二つの異なる TSPC である PDCs と TDCs の分化と成熟を促進することを示した初めての研究であり新規性の高い研究である。抗 VEGF 抗体が腱損傷者の腱修復を促進するための治療オプションとなる可能性を示し、臨床医学の発展に広く寄与する研究であり高く評価できる。以上の理由より、審査の結果、本研究は博士（医学）の学位に値するものと判定された。