

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 北山聡一郎

学位論文題名

マクロファージ遊走阻止因子遺伝子の欠損が膝内側側副靭帯損傷の治癒に与える影響

【背景と目的】

マクロファージ遊走阻止因子 (Macrophage migration inhibitory factor : MIF) は、活性型Tリンパ球より分泌されるリンフォカインとして報告され(引用)、マクロファージを炎症部位に留まらせ、炎症性サイトカインの発現を惹起する液性因子である。近年、MIFは、組織損傷の修復や形成に関与することが明らかとなっている。しかし、MIF遺伝子が靭帯の損傷治癒に与える影響を検証した研究はない。本研究の目的は、MIF遺伝子の欠損が、膝内側側副靭帯 (MCL) 損傷後の治癒過程で生じる線維組織の力学的特性に与える影響を明らかにすることである。

【材料と方法】

1. MCL実質部損傷モデルの作製

実験動物として10週齢の雌BALB/Cマウス72匹を使用した。Wild-type (WT群) とMIF-KOマウス (KO群) をそれぞれ6匹ずつ用いた。MCL損傷の作製は、Wrightらの方法に従って行った。右膝関節内側に1cmの縦切開を加え、MCLを展開し、MCL実質部を注意深く関節包より分離し、大腿脛骨関節の高さで鋭的に全層切離した。術後は外固定を行わずに制限を設けずに飼育した。

2. 力学的試験

MCL損傷作製後4週で両群ともに6匹ずつ屠殺し、引っ張り試験を行った。屠殺後、採取した標本は、MCL以外の軟部組織を全て取り除き、直径6mmのアルミニウム製ポッドに大腿骨および脛骨をPolymethyl methacrylate resinを用いて包埋した。MCLの断面積の計測は、digital caliper (Mitutoyo社製)を用いて長方形に近似して測定した。引っ張り試験はYamamotoらの報告した方法に従い、Micro-tensile testerを用いて行った。大腿骨-MCL-脛骨 (FMT) 複合体は、Micro-tensile testerに連結された特製の把持具に固定し膝屈曲45度でMCLが引っ張り方向に一致する位置で設置し、FMT複合体に対して0.01Nのpreloadを与え、preconditioningとして2%ひずみを10回与えた後、10 mm/minのCross-head速度 (UPD566TG30-A, Orientatal Motor, Tokyo, Japan)にて破断にいたるまで引っ張り試験を行った。靭帯実質部のひずみの計測は、Video dimension analyzer (HTV-V、浜松フォトニクス、浜松)とCCDカメラ (WV-BD400、パナソニック、大阪)を用いて計測した。

3. RT-PCR

WT群、KO群の両群で両側後肢に対しMCL損傷作製後3, 7, 14, 28日目にそれぞれ3匹ずつ、またコントロールとして手術操作を加えていないものを両群より3匹ずつ屠殺し、両側のMCLを採取し、治癒組織のMIF、TNF- α 、VEGF、MMP-2、MMP-9、MMP-13のmRNAの遺伝子発現をPT-PCRにより定量的に評価した。RNA抽出はRNeasy ミニキット (Qiagen社製)を使用し行われ、RT-PCRは、SYBR SYBR Premix Ex Taq™ II (TakaraBio)を用いて、Thermal Cycler Dice TP800 (TakaraBio)を使用し行われた。これらの結果は、Thermal Cycler Dice Real Time System ソフトウェアプログラムを使用して評価された。GAPDHプライマーをデータの標準化に使用した。

4. 組織学的評価

MCL損傷作製後7, 14, 28, 56日それぞれ3匹ずつ、コントロールとして手術操作を加えていないもの3匹ずつを両群より屠殺し治癒過程にあるMCLを摘出し、HE染色を行った。組

織標本を用いて、治癒過程にある MCL の厚み、血管数、細胞密度の変化を経時的に、かつ定量的に評価した。また MCL 両端で確認できる血管数も測定した。

5. 統計学的評価

両群間の比較には t-test、ANOVA を使用し、有意水準を 5 % とした。

【結果】

1. 力学的試験

断裂形態は全て腱実質部での断裂であった。両群の MCL の力学特性を比較するため、我々は先ず、健側の損傷していない MCL の構造特性と材料特性を測定した。両群の健側の MCL の力学特性に有意差は認めなかった。この結果により両群の MCL 損傷後の治癒組織の力学特性は直接比較することが可能であることが分かった。次に我々は損傷後 28 日目の靭帯の治癒組織の力学特性を WT 群と MIFKO 群で比較を行った。構造特性に関しては、最大破断荷重は MIFKO 群は WT 群に比し、有意に低値を認めた (WT; 4.71 ± 0.94 N, MIFKO; 2.81 ± 0.99 N, $p=0.0065$)。剛性も MIFKO 群は WT 群に比し、有意に低値を認めた (WT; 4.44 ± 0.26 N/mm, MIFKO; 2.83 ± 0.74 N/mm, $p=0.0005$)。材料特性に関しても、引張強度で MIFKO 群は WT 群に比し、有意に低値を認め (WT; 33.15 ± 11.34 MPa, MIFKO; 11.06 ± 4.47 MPa, $p=0.013$)、接線弾性係数でも MIFKO 群は WT 群に比し、有意に低値を認めた (WT; 339.90 ± 77.19 MPa, MIFKO; 116.38 ± 15.92 MPa, $p<0.0001$)。最後に我々は全てのパラメーターにおいて損傷側の値を、健側の値で除し、患健側比を測定した。全てのパラメーターにおいて MIFKO 群は WT 群に比し、有意に低値を認め ($p=0.0079$, $p=0.0105$, $p=0.0027$, and $p=0.0003$, respectively)。

2. RT-PCR

両群の治癒組織の遺伝子発現に関しては、WT 群において損傷後 3 日目で有意な MIF の mRNA の上昇を認めた ($p=0.0101$)。MMP-2 の mRNA の遺伝子発現は、損傷後 14 日まで両群ともに次第に上昇するが、損傷後 28 日目では MIFKO 群は WT 群と比較し有意に低値を認めた ($p=0.014$)。MMP-13 の mRNA 遺伝子の発現レベルは WT 群では損傷後 7 日目でピークを迎える。この時点での MIFKO 群の MMP-13 の mRNA の発現は WT 群と比し、有意に低値であった ($p<0.0001$)。

(3.3) 組織学的検討

WT 群においては損傷部位の厚みと細胞密度の増加は損傷後 14 日目まで続き、損傷後 28、56 日目には次第にその値は減少した。MIFKO 群は、損傷部位付近の厚み、細胞密度は損傷後 14 日目に上昇し、損傷後 28 日目になっても上昇したままであった。さらに組織標本を用いて行った量的評価では、治癒組織の厚みと細胞密度の上昇は WT 群で損傷後 7 日目でピークを迎えるのに対し、MIFKO 群では損傷後 14 日目でピークを迎えた。これらのパラメーターに関して、WT 群は損傷後 28、56 日目ではほぼ正常のレベルまで低下するのに対し、MIFKO 群は損傷後 56 日目になっても有意に WT 群に対し高値のままであった。組織の厚みに関しては、損傷後 28 日目で MIFKO 群は WT 群に対し、有意に高値を認めた (WT: $94.95 \pm 21.28 \mu\text{m}$, MIFKO; $233 \pm 4.95 \mu\text{m}$, $p<0.0001$)。細胞密度に関しては、損傷後 14、28 日目で MIFKO 群は WT 群に対し、有意に高値を認めた ($p=0.0014$, $p=0.0084$)。治癒組織周囲にまばら新生血管を認めるが、これに関しても、損傷後 14 日目で MIFKO 群は WT 群に対し、有意に低値を認めた ($p=0.0073$)。

【考察】

力学的評価では MIFKO マウスで、正常マウスと比較し、損傷後 28 日目で有意に力学特性の低下を認めた。さらに、MIF ノックアウトマウスは損傷後 7 日目と 28 日目で MMP-2 と MMP-13 の遺伝子発現の有意な低下を認めた。組織学的評価でも MIF ノックアウトマウスでは、正常マウスと比較し、長期にわたり治癒組織は肥厚し、新生血管も少なく、細胞密度の増加を認めた。これらの結果から、MIF ノックアウトマウスの MCL 損傷後の治癒は遅延し、これは MMP-2 と MMP-13 の遺伝子発現の低下により起こったことが示唆された。

【結論】

MIF 遺伝子の欠損は MCL 損傷後の治癒を遷延させた。