

(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

Flexor Tendon Healing in the Rat: A Histologic and Gene Expression Study

(ラット屈筋腱の治癒過程：組織学的研究および遺伝子発現解析)

氏 名 大城 亘 

論文要旨

(1)

【目的】 屈筋腱治癒過程の分子生物学的機序を研究するためのラット屈筋腱切断・修復モデルを開発すること。

【対象と方法】 Lewis ラット 70 匹を用いた。両側後肢の第 2-5 趾の深趾屈筋腱を切断・修復し、修復部が離開しないように修復部の近位で再度腱切断を追加した。修復腱を 0 (切断前)、3、7、14、21、28、42、56、84 日目に採取した。

組織学的評価 (0 ~ 84 日) : 採取時に修復腱の状態を手術用顕微鏡下に観察した。修復腱を 10% ホルマリン固定、パラフィン包埋後に 6 μ m の薄切標本を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色にて観察した。

遺伝子発現解析 (0 ~ 28 日) : 採取した修復腱を採取時期ごとに集め、ホモジナイズし Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform 法にて RNA を抽出した。半定量的 RT-PCR 法を用いて I、III、V、XII 型コラーゲンとマトリクスメタロプロテアーゼ (MMP)-2、-3、-9、-13、-14 の

mRNA 発現量の経時的推移を比較検討した。

【結果】組織学的評価：修復腱の明らかな離開や高度の癒着は認めなかった。腱切断部表層は7日目には数層の細胞層で覆われた。切断部のコラーゲン線維は修復後7～21日目にかけて変性し、28日目には新たなコラーゲン線維により切断部が架橋された。修復部におけるコラーゲン線維の再構築は84日目まで認められた。

遺伝子発現解析：I型コラーゲンの mRNA 発現量は修復後一時的に減少したが、28日目には切断前のレベルまで回復した。III、V、XII型コラーゲンの mRNA は修復後に発現量が増加した。MMP-9、-13の mRNA は修復後7、14日目に強く発現し、その後低下した。MMP-2、-3、-14の mRNA も同様に修復後発現量が増加したが、28日目においても高値を示した。

【考察】他の動物モデルと比較してラットモデルには、低価格で取り扱いが容易なこと、ラット蛋白に対する各種抗体が市販されている

ること、ラットの遺伝子情報が詳細に研究・公開されていることなど、いくつかの利点があげられる。開発したラット屈筋腱切断・修復モデルは修復部の離開や高度の癒着を認めず、屈筋腱修復のほぼ全過程を組織学的に観察することができた。組織学的評価と遺伝子発現解析の結果から屈筋腱修復過程には III、V、XII 型コラーゲンが何らかの役割を担っていることが推察された。さらに、損傷したコラーゲン線維の変性には MMP-2、-3、-9、-13、-14 が関与し、新たなコラーゲン線維の再構築には MMP-2、-13、-14 が重要な役割を果たしていることが示唆された。

【結論】新しく開発したラット屈筋腱切断・修復モデルにより屈筋腱修復過程を組織学的に観察できた。腱修復過程において MMP-9、-13 は主に損傷したコラーゲン線維の変性に、MMP-2、-3、-14 はそれに加えて新しいコラーゲン線維の再構築にも関与していると考えられた。

報告番号	* 課程博 論文博	第 号	氏名	大城 亙
			平成 16 年 1 月 6 日	
論文審査委員	主査教授		荻谷 研一	
	副査教授		安登 文興	
	副査教授		小杉 忠誠	
(論文題目)				
Flexor Tendon Healing in the Rat: A Histologic and Gene Expression Study				
(論文審査結果の要旨)				
<p>上記論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義、学術的水準につき慎重かつ公正に検討し、以下のような審査結果を得た。</p>				
<p>1. 研究の背景と目的</p> <p>腱鞘内手指屈筋腱断裂は日常多く見られる外傷であるが、その臨床成績は良好とは言えない。縫合腱が機能する為には周囲と癒着せずに腱が癒合する事が必要であるが癒着を防ぐ早期運動が縫合部の再断裂を招くためである。また屈筋腱治癒過程を解明するための適当な動物モデルが開発されていない事もその一因である。本研究は従来用いられてきた犬・家兎・鶏モデルと比べて、分子生物学的手法がより利用しやすいラット屈筋腱修復モデルを開発し、その治癒過程を組織学的に評価し、各種コラーゲンとマトリクスメタロプロテアーゼ (MMP) の遺伝子発現について検討する事を目的とした。</p>				

- 備考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書とすること。
 - 2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。
 - 3 *印は記入しないこと。

2. 研究内容

雄 Lewis ラット 70 匹を使用した。両側後肢の第 2～5 趾の深趾屈筋腱を切離・修復し、修復部が離開しないように修復部の近位で腱切離を追加した。修復腱を 0 (正常腱)、3、7、14、21、28、42、56、84 日目に採取した。

修復腱は離開や高度な癒着を認めなかった。ヘマトキシリン・エオジン染色を用いた組織学的検討 (0～84日) では腱修復後 7～21 日目にかけて、コラーゲン線維束の変性が、また21日目以降に新生コラーゲン線維のリモデリングが観察された。

半定量的 RT-PCR 法を用いた遺伝子発現解析では、I 型コラーゲン mRNA 発現量が修復後一時的に減少し 28 日目には 0 日目 (正常腱) のレベルまで回復する事、III、V、XII 型コラーゲン mRNA 発現量が修復後に増加する事、MMP-9、-13 mRNA が修復後 7、14 日目に強く発現する事、MMP-2、-3、-14 mRNA 発現量が修復後 7～28 日目にかけて高値となる事を明らかにした。

3. 研究成果の意義と学術的水準

他の動物モデルと比べて、ラットモデルは、低価格で取り扱いが容易な事、遺伝子情報が公開され、ラット蛋白に対する各種抗体が入手可能な事などの利点があり、分子生物学的研究により適していると思われる。ラットモデルにより観察された屈筋腱の修復過程は報告されている犬・鶏を用いた報告と同様の所見であった。本研究の結果から屈筋腱修復過程には III、V、XII 型コラーゲンが関与し、MMP-9、-13 がコラーゲン線維束の変性に、MMP-2、-13、-14 はコラーゲン線維束の変性に加えて新生コラーゲン線維のリモデリングにも関与している事が示唆された。本研究は、従来用いられなかったラットモデルを初めて開発した点、さらに屈筋腱修復過程における V、XII 型コラーゲンおよび各種 MMP の mRNA 発現量の経時的推移を世界に先駆けて報告した点において、国際的にも高く評価されるものであると判断される。

以上により本論文は学位授与に十分に値するものであると判断した。

- 備考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書とすること。
 - 2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。
 - 3 *印は記入しないこと。