

# 学位論文抄録

**TGF- $\beta$ 1 Improves Biomechanical Strength by Extracellular Matrix Accumulation Without Increasing the Number of Tenogenic Lineage Cells in a Rat Rotator Cuff Repair Model**  
(TGF- $\beta$ 1は腱細胞系譜の増幅を伴わずに細胞外基質の蓄積を介してラット腱板修復モデルの力学強度を上昇させる)

有村 仁志

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻整形外科学

指導教員

水田 博志 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻整形外科学

## Abstract of the Thesis

**Background:** Transforming growth factor  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) positively regulates the tenogenic marker genes scleraxis (*Scx*) and tenomodulin (*Tnmd*) in mesenchymal progenitors in vitro. However, little is known about the effect of TGF- $\beta 1$  on the expression of tenogenic markers during rotator cuff (RC) healing in rats.

**Hypothesis:** TGF- $\beta 1$  improves the biomechanical properties and histological maturity of reparative tissue in a rat RC repair model by stimulating the growth of tenogenic cells.

**Methods:** Adult male Sprague-Dawley rats (N = 180) underwent unilateral supraspinatus tendon-to-bone surgical repair and were randomly treated with a gelatin hydrogel presoaked in TGF- $\beta 1$  (100 ng) or phosphate-buffered saline. The effects of TGF- $\beta 1$  on RC healing were investigated at 2, 4, 6, 8, and 12 weeks postoperatively by immunostaining for proliferating cell nuclear antigen, by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and in situ hybridization or immunostaining for enthesis-related markers (SRY-box containing gene 9 [*Sox9*], *Scx*, and *Tnmd*), and by real-time RT-PCR and immunostaining for Type I and III collagen. At 6 and 12 weeks postoperatively, biomechanical testing, micro-computed tomography, and biochemical analysis were also performed. At 2 and 4 weeks postoperatively, mesenchymal stem cell (MSC)-related markers, phospho-Smad2 (p-Smad2), and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and MMP-13 were assessed by immunostaining.

**Results:** The TGF- $\beta 1$ -treated group had significantly higher ultimate load-to-failure and tissue volume at 6 and 12 weeks postoperatively and a higher collagen content at 12 weeks. Tendon-related gene expression, histological maturity, cell proliferation, and MSC-related marker immunoreactivity were not affected by exogenously administered TGF- $\beta 1$  at all time points. In the TGF- $\beta 1$ -treated group, the percentage of p-Smad2-positive cells within the healing tissue increased, whereas the expression of MMP-9 and MMP-13 significantly decreased at 2 and 4 weeks postoperatively.

**Conclusion:** TGF- $\beta 1$  enhances formation of tough fibrous tissues at the healing site by inhibiting MMP-9 and MMP-13 expression to increase collagen accumulation, but without the growth of tenogenic lineage cells.

## 学位論文抄録

[ 背景 ] 細胞培養系において、間葉系未分化細胞への Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 の投与により、腱関連マーカーである Scleraxis (*Scx*) と Tenomodulin (*Tnmd*) の発現が増加することが示されている。しかし、ラット腱板修復過程において TGF- $\beta$ 1 の投与が腱関連マーカーの発現に及ぼす影響に関してはほとんど知られていない。

[ 仮説 ] TGF- $\beta$ 1 のラット腱板修復モデルへの投与により、腱細胞系譜の増幅刺激を介し、修復組織の力学強度上昇と組織学的成熟が促進される

[ 方法 ] 成熟 SD ラットの雄 (N = 180) を用い、片側棘上筋腱を腱骨間にて切離後に再縫着したラット腱板修復モデルを作製し、ゼラチンハイドロゲル担体に TGF- $\beta$ 1 (100ng) または PBS を腱骨間に含浸させ投与した 2 群を作製した。術後 2、4、6、8、12 週に標本を採取し、細胞密度・血管数・コラーゲン配列からなる組織成熟度を評価し、増殖期細胞を proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の免疫染色により評価した。また、腱骨移行部に関連する分子マーカーである SRY-box containing gene 9 (*Sox9*)、*Scx*、*Tnmd* の発現を定量 PCR、免疫染色、および *in situ* hybridization により評価し、I 型・III 型コラーゲンの発現を定量 PCR と免疫染色で評価した。術後 6、12 週において、生体力学試験により最大破断力、修復部断面積、剛性、最大破断応力を評価し、マイクロ CT により修復部組織体積を、生化学的解析により修復組織中のコラーゲン含有量を評価した。また、術後 2、4 週において、mesenchymal stem cell (MSC) 関連マーカー、phospho-Smad2 (p-Smad2)、matrix metalloproteinase (MMP) -9、MMP-13 の発現を免疫染色により評価した。

[ 結果 ] TGF- $\beta$ 1 群では、術後 6、12 週において最大破断力と修復組織体積が有意に上昇しており、術後 12 週において修復組織中のコラーゲン含有量が有意に増加していた。腱関連マーカーの発現、組織学的成熟度、増殖期細胞、MSC 関連マーカーの発現に関しては、TGF- $\beta$ 1 の投与による明らかな影響は認められなかった。TGF- $\beta$ 1 群では術後 2、4 週における p-Smad2 陽性細胞が有意に増加していた一方で、MMP-9、MMP-13 の発現が有意に低下していた。

[ 結論 ] ラット腱板修復部への TGF- $\beta$ 1 の投与では、腱細胞系譜の増幅は認めない一方で、MMP-9、MMP-13 の発現抑制を介したコラーゲン蓄積と強靱な線維性組織の形成に寄与することが示唆された。