

氏 名 (本 籍)	久 保 充 彦 (滋賀県)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 4 4 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 9 年 3 月 2 6 日
学 位 論 文 題 目	Exogenous collagen enhanced recruitment of mesenchymal stem cells during rabbit articular cartilage repair (外因性コラーゲンはウサギの関節軟骨修復において間葉系幹細胞の動員を促進する)
審 査 委 員	主 査 教 授 山 本 学 副 査 教 授 服 部 隆 則 副 査 教 授 佐 藤 浩

## 論文内容要旨

*整理番号	550	(ふりがな) 氏 名	くぼ みつひこ 久保 充彦
学位論文題目	Exogenous collagen enhanced recruitment of mesenchymal stem cells during rabbit articular cartilage repair. (外因性コラーゲンはウサギの関節軟骨修復において間葉系幹細胞の動員を促進する)		
<p>「研究の目的」 関節軟骨疾患は現在ではまだ治療法が確立されていない整形外科疾患の一つである。外傷性損傷や離断性骨軟骨炎といった限局性の疾患から、また変形性関節症などの広範囲な変性疾患も含めるとその罹患率は非常に高く、今後その治療法の確立が望まれる。近年関節軟骨の修復、再生を目的として組織工学的的手法を用いた治療法が開発され臨床応用されているが、成績は十分でなく更なる基礎研究がなされている。組織工学においては足場、細胞、成長因子が主要な3要素であり、コラーゲンは基礎研究で最もよく利用され、また臨床においても用いられている足場である。軟骨修復に対する効果は認められているが、その効果発現についての詳細な機序の考察はない。この考察により今後軟骨修復においてコラーゲンの更なる適切な応用が行われることになると思う。</p> <p>「方法」 ウサギの大腿骨膝蓋溝に直径5mmの骨髄まで達する軟骨全層欠損を電動ドリルにて作成し、軟骨欠損モデルとした。コラーゲンは市販されており、臨床にも応用されている豚腱由来I型コラーゲンゲルを使用した。このコラーゲンゲルを左膝関節の欠損に充填しコラーゲン群とし、右膝関節はそのまま放置しコントロール群とした。一定期間(1, 2, 3, 4, 8, 12, 24週)の後に大腿骨顆部を摘出し水平断の標本を作成、組織学的評価を行った。トルイジンブルー染色にて既存のスケールによる修復組織の半定量的評価を、BrdU染色にて修復組織中の増殖細胞数を、TUNEL染色にてアポトーシス細胞数の評価を行った。TUNEL染色は疑陽性が多いため透過型電子顕微鏡にてアポトーシスの確認を行った。また、増殖細胞の種類を確認するために共焦点レーザー顕微鏡を用いての免疫染色を行った。骨髄間葉系幹細胞の単一マーカーは存在しないため、本研究では過去の報告よりCD44陽性、CD45陰性を骨髄間葉系幹細胞の条件と考えた。これとBrdUの三重染色を行った。以上の標本の観察からコラーゲンが欠損部周囲の骨髄から間葉系幹細胞を積極的に動員している可能性を考え、in vitroでmigration assayを行った。小孔を有する膜の下面に種々の濃度のコラーゲン溶液を塗布し上面にウサギより採取した骨髄由来間葉系細</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

胞と軟骨細胞を播種しその移動細胞数を計測した。

「結果」トルイジンブルー染色の判定的評価ではコラーゲン群で優位に修復が促進されていることが確認できた。増殖細胞は、コラーゲン群ではコントロール群に比べて多い傾向があり、欠損を辺縁部と中心部に分けて増殖細胞数を計測したところ、2週間の標本の辺縁部で有意にコラーゲン群が多かった。BrdU陽性細胞の多くはCD44陽性、CD45陰性であり骨髄由来間葉系幹細胞であると考えられた。TUNEL染色では2週間の標本で陽性細胞が出現し、その後は陽性細胞が激減するという傾向が両群ともに見られ、両群間に有意差は見られなかった。透過型電子顕微鏡ではアポトーシスに特徴的な像が確認できた。Migration assayではコラーゲン濃度に比例して細胞の移動が見られ、これは骨髄由来間葉系細胞で顕著であった。

「考察」関節軟骨は損傷がその下層の骨髄にまで達している場合にその面積が小さいと自然修復されることがある。その場合修復に携わるのは骨髄由来の間葉系幹細胞であり、これが軟骨細胞へと分化することが分かっている。今回の研究でも修復組織中には多数の間葉系幹細胞がありそれが増殖していることが確認できた。コラーゲンを移植することにより、1; その数が増加していたこと、2; Migration assayにてコラーゲン濃度依存性に骨髄由来間葉系細胞の移動が見られたことから、コラーゲンは周辺骨髄から軟骨欠損部に間葉系幹細胞を積極的に動員し増殖させるという機序で、軟骨修復に効果があると考えられた。増殖細胞が2週から3週の間で減少しており、この時期に間葉系幹細胞が増殖から分化へと移行したと考えられ、またこの時期にアポトーシス細胞が多く見られるということから、増殖した間葉系幹細胞が分化できずアポトーシスに陥ったと推測している。

「結論」関節軟骨損傷の修復においてコラーゲンは有効であるが、その効果発現の機序は周辺骨髄から間葉系幹細胞を積極的に動員させることであると考えられる。しかしすべての動員した細胞が軟骨細胞へ分化しきれていない可能性があり、骨髄間葉系幹細胞を軟骨細胞へ分化させる成長因子との組み合わせが、コラーゲンの軟骨再生への適切な応用であると考えられる。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	550	氏名	久保充彦
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>著者らは、ウサギの大腿骨膝蓋溝に作製した軟骨全層欠損部にコラーゲンを充填し、一定期間経過後にトルイジンブルー染色、BrdU 染色の他、CD44 陽性、CD45、BrdU の三重染色を行い、組織学的に評価した。その結果、2 週後に増加した増殖細胞の多くは骨髄由来間葉系幹細胞であることが確認された。さらに、in vitro で遊走試験を行った結果、コラーゲン濃度依存性に細胞移動が見られ、特に骨髄由来間葉系細胞において顕著であった。以上から、コラーゲンは周辺骨髄から軟骨欠損部に間葉系幹細胞を積極的に動員し増殖させると考えられた。また、増殖細胞が減少する時期に一致してアポトーシス細胞が多く認められたことは、増殖した間葉系幹細胞が分化できずアポトーシスに陥ったものと考えられ、今後、成長因子を組み合わせた検討が必要であることを示した。</p> <p>本研究は、軟骨修復において、コラーゲンが間葉系幹細胞を増加させており、そのメカニズムにはその濃度が関与していることを示唆したもので、博士(医学)授与に値するものと認める。</p>			
(平成19年2月7日)			