

氏 名	三 村 朋 大
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 7 7 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 2 1 年 3 月 2 5 日
学 位 論 文 題 目	A novel exogenous concentration-gradient collagen scaffold augments full-thickness articular cartilage repair.  (濃度勾配コラーゲンをを用いた関節軟骨全層欠損の修復に関する研究)
審 査 委 員	主 査 教 授 山 本 学 副 査 教 授 田 中 俊 宏 副 査 教 授 村 上 節

## 論文内容要旨

※整理番号	582	(ふりがな) 氏名	みむら ともひろ 三村 朋大
学位論文題目	A novel exogenous concentration-gradient collagen scaffold augments full-thickness articular cartilage repair. (濃度勾配コラーゲンをを用いた関節軟骨全層欠損の修復に関する研究)		
<p>【目的】 高齢化に伴い変形性関節症の患者数は増加の一途をたどり、特に変形性膝関節症においては、その罹患率は本邦で 2400 万人以上と推定されており、厚生労働省の 2004 年度国民生活調査によると、要介護となる原因の 6.1%が変形性関節症で第 4 位、要支援の原因としては変形性関節症が 17.5%を占め、疾病の中では最も多い割合を占めています。国家の医療費を抑制し、高齢者の QOL を維持する上で変形性関節症の予防は極めて重要な課題になると思われます。関節軟骨損傷は特殊な環境にあるため一旦大きな損傷が起こると、元の硝子軟骨には戻らず軟骨の変性が進みその結果、変形性関節症になることが分かっています。</p> <p>関節軟骨に対する治療はまだ確立された方法が存在しません。マイクロフラクチャー法やドリリングを始めとして様々なアプローチが試みられていますが、いずれの方法でも元の硝子軟骨での修復は得られておりません。従来のマイクロフラクチャー法やドリリングにおいて、骨髄に含まれる骨髄間葉系幹細胞が重要な働きをすることが近年明らかになってきていますが、十分な骨髄間葉系幹細胞を損傷部に導入することができていない事が、その不完全な修復（繊維軟骨様組織での修復）の原因であると考えられます。我々は骨髄間葉系幹細胞のこの本来備わっている生理的な働きをさらに刺激、誘導する事による生体内組織工学的手法を用いた関節軟骨損傷の修復に取り組んでいます。</p> <p>再生医療の分野ですでに臨床にも応用されている scaffold のひとつであるコラーゲンは、軟骨再生に良好な働きをすることが過去に報告されており、我々も共同研究者の久保が、コラーゲンが濃度依存性に骨髄間葉系幹細胞を誘導し、コラーゲンが軟骨全層欠損を修復することを報告している。</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。

(続 紙)

今回の実験では、軟骨全層欠損部中央に有効に骨髄間葉系幹細胞をさらに効率よく誘導するための新しい濃度勾配を有するコラーゲングルを、軟骨全層欠損の修復を試み、その有用性を検討した。

**【方法】** 約 13 週齢の体重 2.5kg から 2.99kg の日本白色家兔を使用した。大腿骨膝蓋窩に直径 5mm、深さ 5mm の軟骨全層欠損をドリルを用いて作成し、関節軟骨全層欠損を作成した。コラーゲンは市販されている cellmatrix (0.3% type I collagen; Nitta gelatin Inc., Osaka, Japan) を用いた。濃度勾配コラーゲングルの作成方法は以下のとおりである。まず、直径 5 mm、深さ 5mm の欠損を掘削したアルミを錐形に用い、3.3 倍濃縮 PBS を用いて、cellmatrix : PBS : 緩衝液 (cellmatrix に付属) をそれぞれ 6 : 3 : 1 の比率で混合させ、0.18% のコラーゲングルを約 82  $\mu$ L 作成する。次に、10 倍濃縮 PBS を用い比率 8 : 1 : 1 で 0.24% に濃度調節しゲル化させたもの (直径 2.4mm, 高さ 4mm, 約 18  $\mu$ L) をペニシリンカップで作成する。0.18% のコラーゲングルの中心部に 0.24% コラーゲングルを移植し、total 約 100  $\mu$ L (直径 5mm、高さ 5mm) の 33% 濃度勾配が存在する濃度勾配コラーゲングルを作成する (33% 濃度勾配群)。同様の方法で濃度を調整し 0.27% コラーゲングルを作成し、中心上方部に 0.27% コラーゲングルを移植し、濃度勾配が 50% 存在する 50% 濃度勾配群を作成。さらに対照群として 0.18% コラーゲングルのみを移植した non-composite 群も作成した。1 週、2 週、3 週、4 週、8 週、12 週に sacrifice し、これら 3 群を組織学的に比較検討した。4 週までは BrdU 陽性細胞数を欠損部の中心と辺縁とで比較し、4 週以降ではトルイジンブルーで組織学的スコアを作成し、また type1、type2 collagen の免疫染色を行った。また In-vitro study として、濃度勾配差に対する骨髄間葉系幹細胞の遊走性を検証した。

**【結果】** 0.24% 勾配群では、他の群に比して欠損部の中心部で細胞が多く観察され、中心への細胞誘導効果が認められた。また 4 週以降の組織では 0.24% 勾配群で組織学的に優れた軟骨修復が得られた。骨髄間葉系幹細胞の遊走性には、コラーゲンの適切な濃度差が存在することが判明した。

**【考察】** この濃度勾配コラーゲングルによって、従来の単純なコラーゲングルより効率よく骨髄間葉系幹細胞を欠損部に誘導することができ、結果的にも良好な組織で修復されていた。しかし、それでも完全な硝子軟骨での修復が得られたとは言い難く、臨床応用に向けて今後さらに成長因子などを組み合わせた方法が必要と考えられた。

**【結論】** 濃度勾配を有するコラーゲンは欠損部中心への細胞誘導能を有し、関節軟骨再生への有用性が示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	582	氏名	三村 朋大
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>筆者は、ウサギの膝蓋大腿関節に 5mm の軟骨全層欠損を作成した後に、濃度勾配コラーゲングルを移植し、一定期間後に安楽死させ、BrdU 染色、トルイジンブルー染色、コラーゲンの免疫染色を行い、組織学的に評価した。その結果、33%の濃度勾配コラーゲンを用いると、2週の欠損部の中心で BrdU 陽性細胞が多く認められ、また 3 週の欠損部の辺縁では逆に陽性細胞は減少していた。また、4 週、8 週のトルイジンブルー染色では 33%の濃度勾配コラーゲンを用いた群で、有意差を持って良好に組織が修復されていた。以上から濃度勾配コラーゲンは辺縁部に集まった増殖細胞を早期に積極的に中心部へ誘導させ、次にその遊走した増殖細胞は軟骨への分化を開始し、その結果良好な組織での修復が行われたと考えられた。またその増殖細胞の遊走能が接触遊走によるものであることの可能性を in-vitro の実験で示している。</p> <p>本研究は、軟骨全層欠損の修復において、濃度勾配コラーゲンが増殖細胞を積極的に欠損中心部に誘導させることによって、軟骨修復を増強させる効果がある事を示したユニークな研究であり、博士 (医学) 授与に値するものと認める。</p>			
(平成 21 年 2 月 6 日)			