

|               |  |
|---------------|--|
| 氏 名           | 西 澤 和 也  |
| 学 位 の 種 類     | 博 士 (医 学)  |
| 学 位 記 番 号     | 博 士 第 6 4 3 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 3 年 3 月 1 0 日  |
| 学 位 論 文 題 目   | In-advance trans-medullary stimulation of bone marrow enhances spontaneous repair of full-thickness articular cartilage defects in rabbits<br><br>(事前骨髓操作が初中期の関節軟骨再生過程に及ぼす影響についての検討) |
| 審 査 委 員       | 主 査 教 授 谷 徹<br>副 査 教 授 西 克 治<br>副 査 教 授 江 口 豊  |

## 論文内容要旨

|  |   |              |                   |
|--|---|--------------|-------------------|
| ※整理番号  | 648   | (ふりがな)<br>氏名 | にしざわ かずや<br>西澤 和也 |
| 学位論文題目   | <p>In-advance trans-medullary stimulation of bone marrow enhances spontaneous repair of full-thickness articular cartilage defects in rabbits</p> <p>(事前骨髄操作が初中期の関節軟骨再生過程に及ぼす影響についての検討)</p> |              |                   |
| <p>【目的】関節軟骨には神経や血管が存在せず、また軟骨細胞自体も極めてサイレントな細胞であるために自己修復能力が乏しいということは以前よりよく知られている。これまで関節軟骨を修復するために関節軟骨と骨髄を交通させることにより、軟骨への分化能をもつ骨髄間葉系幹細胞（以下 MSCs）が関節軟骨を修復すべく分化増殖することが分かってきた。このことは現在臨床の場においても応用され、軟骨修復術として中心的役割を担っている。しかし一方でこの修復能力にも限界があり、一般的に関節軟骨欠損の大きさによるとされている。これは修復する関節軟骨損傷部に集まる MSCs の量に依存するためと考えられる。こうした事実を踏まえ、現在 MSCs をはじめとする様々な細胞移植法が関節軟骨再生分野でも行われてきている。一方当教室ではこれまで自己の MSCs を如何に有効に関節軟骨欠損部に動員するかに注目して、関節軟骨の再生に挑戦してきた。今回は関節軟骨欠損部と骨髄を交通させるよりも事前に関節軟骨下骨髄を刺激することで MSCs が軟骨下骨髄内で増殖し、その後作成した関節軟骨損傷部と骨髄との連絡によって、より多くの軟骨前駆細胞が軟骨欠損部に集まり、良好な関節軟骨修復がなされるのではないかと考えた。</p> <p>【方法】日本白色家兎の大腿骨膝蓋窩に径 5mm、深さ 5mm の軟骨全層欠損を作成（一般的軟骨全層欠損モデル）し、以下の 3 群に分けて調査した。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・事前骨髄刺激を行い、4 日後に軟骨全層欠損を作成する群（ATS 群）</li> <li>・事前骨髄刺激後、骨髄内に basic FGF (以下 bFGF) を投与し、4 日後に軟骨全層欠損を作成する群（ATS+bF 群）</li> <li>・事前骨髄刺激を行わずに軟骨全層欠損を作成する群（non -ATS 群: negative control）</li> </ul> <p>ATS: in-advance trans-medullary stimulation</p> <p>bFGF には MSCs を増殖させる作用があるとされており、骨髄刺激を修飾する目的で使用した。軟骨全層欠損作成後、1, 2, 3, 4, 8 週で屠殺し組織を採取。以下の評価を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Bromodeoxyuridine (BrdU)+CD44+CD45 の三重染色にて BrDU 陽性、CD44 陽性、CD45 陰性細胞の割合を評価</li> </ol> |   |              |                   |

- (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)

2. 軟骨全層欠損修復部を中央と辺縁部に分け、集積した BrdU 陽性細胞 (増殖細胞) 数の推移、量を比較、検討
3. Type I, Type II コラーゲン免疫染色、トルイジンブルー染色による組織学的評価

**【結果】**

1. 修復組織に存在する BrdU 陽性細胞の約半数が CD44 陽性、CD45 陰性の細胞であった。
2. Non-ATS 群では、術後 1 週目には欠損辺縁部に増殖細胞が出現していたが、中央部にはほとんど存在しなかった。その後徐々に集積しはじめ、術後 3 週目でピークを迎えた。ATS 群では non-ATS 群よりも早期から辺縁および中央部に出現し始め、2.5 週目でピークを迎えた。ATS+bF 群ではさらに早期から、より多くの増殖細胞が出現し、術後 1 週目にはすでに欠損中央部に多くの増殖細胞が集積していた。術後 2 週目にはすでにピークを迎え、そのピーク値はその他の群と比較して有意に多かった。
3. Non-ATS 群では欠損辺縁部にわずかに Type II コラーゲンの染色性を認めるのみで、中央部および辺縁の大部分が Type I コラーゲン陽性となった。ATS 群は辺縁、中央ともに Type II コラーゲン染色陽性であったが、中心部には染色性がなく、一方で Type I コラーゲン染色陽性であった。ATS+bF 群では辺縁部、中央部ともに Type II コラーゲンが強く発現していた。トルイジンブルー染色においては、non-ATS 群は基質の染色性に乏しく、全体的に線維性組織様であった。ATS+bF 群では線維軟骨組織で修復されているようであったが、中央部の基質の染色性は低かった。一方で、ATS+bF 群は硝子軟骨様組織で修復されており、基質の染色性も良好であった。修復された関節軟骨の厚さも正常部と同等であった。既存の軟骨修復スコアで評価すると ATS+bF 群は術後 8 週目で有意に改善を認めた。

**【考察】** 事前に骨髄刺激を行った群は、行わなかった群と比較して、より早期により多くの BrdU 陽性細胞を軟骨欠損部へ誘導することが示された。また bFGF を投与することで、その作用は増強された。BrdU 陽性細胞のうち、約半数は CD44 陽性、CD45 陰性であり、MSCs 由来の軟骨前駆細胞と考えられた。また術後 8 週の組織において骨髄刺激群 (bFGF 投与群) では有意に良好な軟骨修復を認めた。このことは軟骨欠損部に、より早期により多くの軟骨前駆細胞を導入することで良好な軟骨修復がもたらされることを示唆した。

**【結論】** 関節軟骨損傷に対する治療法に関節軟骨穿破術 (e.g. microfracture)が行われるが、未だ様々な問題点を残している。今回、事前骨髄刺激を行うことで関節軟骨欠損部により多くの軟骨前駆細胞を誘導することができ、有意に良好な軟骨修復が行われた。このことは臨床においても関節軟骨穿破術より事前に骨髄刺激を行うことで、これまで以上に関節軟骨修復が期待できるのではないかと考えている。

## 学位論文審査の結果の要旨

|  |     |    |       |
|--|-----|----|-------|
| 整理番号   | 648 | 氏名 | 西澤 和也 |
| 論文審査委員   |     |    |       |
| <p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11 ポイント、600 字以内で作成のこと。)</p> <p>以前より関節軟骨の自然修復は困難であることが知られている。その理由として軟骨細胞は非常にサイレントな細胞である点や、関節軟骨が無血管、無神経組織である点などがあげられる。関節軟骨の修復には骨髄からの間葉系幹細胞 (MSCs) の関与が必須であるため、現在臨床では軟骨修復のために様々な骨髄穿破術がなされている。しかしそうした治療を行っても完全な硝子軟骨での修復は困難となっている。この理由として骨髄から供給される MSCs 量が不十分である点などがあげられる。</p> <p>そこで今回は骨髄内を操作、刺激することで、骨髄内の MSCs を事前に増殖させておくことができないうかどうか、またそうした細胞が関節軟骨再生に寄与するかどうかについて検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 事前骨髄刺激を行うことで骨髄内の増殖細胞を増やすことができる。</li> <li>2) Basic FGF を使用することで事前骨髄刺激を修飾することができる。</li> <li>3) 増殖細胞の約半数は骨髄由来 MSCs 由来細胞である。</li> <li>4) 事前刺激によって増えた MSCs はより早期に関節軟骨欠損部へ誘導される。</li> <li>5) 早期に誘導された MSCs は関節軟骨修復に寄与する。</li> </ol> <p>本論文は、関節軟骨再生治療に新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 559 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 23 年 1 月 27 日 )</p> |     |    |       |