

論文内容要旨

Treatment of cartilage defects by subchondral drilling combined with covering with atelocollagen membrane induces osteogenesis in a rat model.

(軟骨下ドリリングを施行したラット膝関節軟骨欠損をアテロコラーゲン膜にて被覆すると、欠損部に骨新生が誘導される)

Journal of Orthopaedic Science, Volume 18, pp 627-635, 2013

主指導教員：越智 光夫 教授

(統合健康科学部門 整形外科)

副指導教員：下瀬 省二 准教授

(統合健康科学部門 整形外科)

副指導教員：大段 秀樹 教授

(応用生命科学部門 消化器・移植外科学)

濱西 道雄

(医歯薬総合研究科 展開医学専攻)

【目的】 関節軟骨損傷に対する軟骨下骨のdrillingは、出血により軟骨損傷部に骨髄由来成分を誘導し、線維軟骨の形成を促すことで損傷部の修復をもたらす。しかしながら、多くの場合、修復は線維軟骨によってもたらされ、硝子軟骨の再生は得られない。その理由の一つとして、drillingによる出血の一部は関節液内に拡散し、軟骨損傷部に十分な骨髄由来成分が留まらないことが考えられる。今回我々は、ラット膝関節の軟骨欠損部にdrillingを施した後、アテロコラーゲン膜にて被覆し、軟骨形成に対する影響を検討した。

【方法】 12週齢Sprague-Dawleyラットの膝関節を内側アプローチにて展開し、patella grooveにφ2mm biopsy punchにて軟骨欠損を作成した後、(1)軟骨欠損のみのcontrol群(2)軟骨下骨にφ2mm drillにて深さ5mmのdrillingを5ヶ所施したdrilling群(3)(2)と同じ方法で軟骨下骨にdrillingを施した後、軟骨欠損部周囲をrecombinant peptide(RCP)膜で被覆したcovering群、を作成した。術後1週、4週で治療群の軟骨欠損部に生じた組織を採取し、real-time PCRにてTGF-β, Sox9, Runx2, Osteocalcin, Colla1, Col2a1のmRNAの発現を調べた。また術後4週でcontrol群, drilling群, covering群の肉眼所見の評価, safranin O染色による組織学的評価, 及びPineda's scoreを用いた再生組織の評価を行った。またDAB法を用いTGF-β, Sox9, Runx2, Osteocalcin, Type I collagen, Type II collagenの免疫染色を行った。【結果】 Real-time PCRでは、1週で全ての項目がdrilling群で有意に高値であったが、4週ではTGF-β, Runx2, Colla1がdrilling群, Sox9, Osteocalcin, Col2a1がcovering群で有意に高値であった。術後4週の肉眼所見は、control群で表面平滑な半透明組織、drilling群で表面平滑な正常軟骨様組織、covering群で表面不整な骨組織様組織を認めた。Safranin O染色では、control群で線維性組織drilling群で線維性組織の深層に硝子軟骨様組織、covering群で骨性組織を認めた。Pineda's scoreはcontrol群は平均11点、drilling群は平均6.2点、covering群は平均12.7点で3群間に有意差を認めた。免疫染色では、TGF-βはcontrol群, covering群では免疫活性を認めず、drilling群では再生軟骨より表層に免疫活性を認めた。Sox9はcontrol群では再生線維組織の深層、drilling群では再生軟骨部、covering群では再生骨組織に免疫活性を認めた。Runx2は、control群では免疫活性を認めず、drilling群では再生軟骨、covering群では再生骨組織の浅層に免疫活性を認めた。Osteocalcinは、control群では再生線維組織の浅層、drilling群では再生軟骨、covering群では再生組織全体に免疫活性を認めた。Colla1は、control群では免疫活性を認めず、covering群では再生線維組織、covering群では再生骨組織の浅層に免疫活性を認めた。Col2a1は、control群では免疫活性を認めず、drilling群では再生軟骨、covering群では再生骨組織に免疫活性を認めた。

【考察・結論】 軟骨欠損に対しdrilling後に被覆を行った場合、軟骨再生は得

られず、骨組織の新生を生じた。TGF- β は、Runx2の機能を抑制することにより、骨芽細胞の分化を抑制する一方、軟骨細胞の増殖を促進するとされる。また、Runx2は、未熟軟骨細胞→成熟軟骨細胞への分化を促進する一方、未熟骨芽細胞→成熟骨芽細胞→骨細胞への分化を抑制するとされる。このことから、TGF β 、Runx2の発現の抑制により、軟骨形成は抑制され、骨形成に傾くと考えられる。本研究では、術後1週において全てのfactorの発現が被覆により抑制されていたが、術後4週においては、軟骨形成因子であるSox9,Col2a1の発現が亢進する一方、骨形成因子であるOsteocalcinの発現も亢進を認めた。また、TGF- β 、Runx2については術後1週、4週ともに発現が抑制されており、これらにより組織学的レベルでは軟骨形成が抑制・骨形成が促進され、結果として欠損部の軟骨修復に有利には作用しなかったと推察された。RCP膜による軟骨欠損部の被覆により、骨髄由来成分の関節液内への拡散を阻止できる一方、関節内成分の軟骨欠損部への浸入が阻止されたため、骨形成に優位に働いたと推察した。