

第8号様式

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 医 学 )	氏名	濱西 道雄
学位授与の要件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
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)			
論文審査担当者			
主 査	教 授	木村 浩彰	
審査委員	教 授	青山 裕彦	
審査委員	教 授	瀧原 義宏	
〔論文審査の要旨〕			
<p>関節軟骨損傷に対する軟骨下骨のドリリングは、出血により軟骨損傷部に骨髄由来成分を誘導し、損傷部の修復をもたらす。しかしながら、多くの場合、硝子軟骨の再生は得られない。その理由の一つとして、ドリリング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。著者は、ラット膝関節の軟骨欠損部にドリリングを施行した後、アテロコラーゲン膜にて被覆し、軟骨修復に対する影響を検討した。</p> <p>12週齢Sprague-Dawleyラットの膝関節を展開し、膝蓋骨溝にφ2mm生検パンチにて軟骨欠損を作製した後、(1)軟骨欠損のみの対照群、(2)軟骨下骨にφ0.2mm drillにて深さ5mmのドリリングを5ヶ所施行したドリリング群、(3)(2)と同じ方法で軟骨下骨をドリリングした後、軟骨欠損部周囲を、ヒトコラーゲン遺伝子組換え酵母細胞由来のアテロコラーゲン膜(recombinant peptide(RCP)膜)で被覆した被覆群を作成した。術後1週、4週でドリリング群、被覆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週で対照群、ドリリング群、被覆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スコアを用いた再生組織の評価を行った。またTGF-β、Sox9、Runx2、Osteocalcin、I型コラーゲン、II型コラーゲンの免疫染色を行った。</p>			

Real-time PCRでは、1週で測定した6つの遺伝子全てについてドリリング群が被覆群に対して有意に高値であったが、4週ではTGF- $\beta$ 、Runx2、Col1a1はドリリング群の方が、Sox9、Osteocalcin、Col2a1は被覆群の方が有意に高値であった。術後4週の肉眼所見により、軟骨欠損部に対照群で線維組織、ドリリング群で軟骨様組織、被覆群で骨組織を認めた。Safranin O染色では、対照群で軟骨欠損部に線維組織、ドリリング群で線維組織の深層に硝子軟骨、被覆群で骨組織を認めた。Pinedaスコアは、対照群は平均11点、ドリリング群は平均6.2点、被覆群は平均12.7点となり、3群間に有意差を認めた。免疫染色では、TGF- $\beta$ は対照群、被覆群では陽性反応を認めず、ドリリング群では再生軟骨より表層に陽性反応を認めた。Sox9は対照群では再生線維組織の深層に、ドリリング群では再生軟骨部に、被覆群では再生骨組織に陽性反応を認めた。Runx2は、対照群では陽性反応を認めず、ドリリング群では再生軟骨、被覆群では再生骨組織の浅層に陽性反応を認めた。Osteocalcinは、対照群では再生線維組織の浅層、ドリリング群では再生軟骨、被覆群では再生組織全体に陽性反応を認めた。I型コラーゲンに対しては、対照群では陽性反応を認めず、ドリリング群では再生線維組織、被覆群では再生骨組織の浅層に陽性反応を認めた。II型コラーゲンに対しては、対照群では陽性反応を認めず、ドリリング群では再生軟骨、被覆群では再生骨組織に陽性反応を認めた。

軟骨欠損に対しドリリング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- $\beta$ 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- $\beta$ 、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週において調べた6遺伝子全て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- $\beta$ 、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は、軟骨形成に有利に働く骨髄由来成分の関節液内への拡散を阻止する一方、それを阻害する物質を被覆内部に保持し、また軟骨形成に働く関節内成分の軟骨欠損部への浸入を阻止するため、軟骨形成が阻害され、骨形成が優位になったものと考えられる。

以上の結果から、本論文は軟骨修復における微小環境の重要性を示しており、整形外科の発展に貢献するところが大きい。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士(医学)の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。