

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	林 聖樹
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 Chondrocyte Cell-Sheet Transplantation for Treating Monoiodoacetate-Induced Arthritis in Rats. (モノヨード酢酸関節炎モデルに対する軟骨細胞シート移植治療)			
論文審査担当者			
主査	教授 杉山 英二	印	
審査委員	教授 今泉 和則		
審査委員	講師 河合 幹雄		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>細胞シート技術の開発により、細胞外基質を維持したまま培養細胞を移植することが可能となった。整形外科領域では、軟骨細胞シートを用いた骨軟骨損傷に対する臨床試験が開始された。しかし、臨床試験の対象は部分的軟骨損傷であり、変形性膝関節症の様な広範囲軟骨変性に対する治療適応はなく、これまで広範囲軟骨変性に対する軟骨細胞シート移植の有用性を示した報告もない。そこで著者らは、モノヨード酢酸（以下 MIA）を用いて広範囲軟骨変性を伴う関節炎モデルを作製し、軟骨細胞シート移植の有効性について検討した。</p> <p>コントロール群には 50 <math>\mu</math>l の生理食塩水，MIA 関節炎群には生理食塩水 50 <math>\mu</math>l で溶解した MIA1mg を関節内に注射し、関節炎モデルの軟骨変性評価のために注射後 1 週（以下 1w-MIA），3 週（以下 3w-MIA）後に、OARSI/Mankin スコアで関節軟骨の組織学的評価を行った。</p> <p>次に GFP トランスジェニック発現ラットの軟骨を採取・培養し、軟骨細胞シート（GFP 軟骨細胞シート）を作製して、Safranin-O 染色で組織学的評価を行った。また蛍光顕微鏡下で、GFP のシグナルを確認した。続いて、1w-/3w-MIA モデルに対して軟骨細胞シートを移植し、その治療効果を判定した。実験群を①大腿骨内顆部軟骨を 1x3mm の面積で全層切除した Refresh (R)群、②R 群に軟骨化骨に骨孔をあけるドリリングを追加した RD 群、③RD 群に 2x4mm のシートを移植した RDS 群の 3 群に分類した。術後 4 週/12 週で関節軟骨の肉眼スコアによる評価と Safranin-O 染色切片の ICRS スコアによる組織学的評価を行った。また、移植したシートの局在を確認するため、抗 GFP 抗体染色での評価も行った。</p> <p>また、SD ラット由来の軟骨細胞シートを作製後、XenoLight DiR で標識して各モデルに移植し、in vivo イメージングによる関節内の信号強度を評価した。</p> <p>組織学的評価において、1w-/3w-MIA モデルともに、コントロール群に比較して著明な Safranin-O の染色性低下と著明な関節症性変化を認め、3w-MIA では 1w-MIA モデルに比較</p>			

して OARSI 及び Mankin スコアが低値で、経時的な軟骨変性の進行が示唆された。作製した軟骨細胞シートは Safranin-O に良染し、GFP 蛍光も確認された。

術後 4 週の肉眼評価において、R 群では軟骨全層切除した部分で軟骨下骨の露出を認めただのに対し、RD 群では瘢痕様組織による被覆を認め、RDS 群では軟骨様再生組織による修復を認めた。肉眼スコアは 3w-MIA モデルにおいて、RDS 群で他群と比較して有意に高値を示した。1w-MIA モデルの組織学的評価では、RDS 群は部分的に硝子軟骨による修復を認めたが、R/RD 群では線維性の修復であった。一方 3w-MIA モデルでは、RDS 群では大部分が線維性軟骨で被覆されていたが、R/RD 群では著明な関節症性変化を認めた。3w-MIA モデルでも同様であった。術後 12 週の肉眼スコアは、1w-MIA モデルでは 3 群間の有意差を認めなかったが、3w-MIA モデルでは RDS 群が他群と比較して有意に高値を示した。組織学的評価では、1w-/3w-MIA モデルにおいて、R/RD 群で著明な関節症性変化を認める一方、RDS 群では部分的に硝子軟骨を含む線維軟骨で修復され、ICRS スコアは RDS 群において R/RD 群と比較して有意に高い値を示した。

In vivo イメージングでは、移植軟骨細胞シートは 2 群とも術後 28 日目まで関節内に残存していたが、すべての切片で軟骨修復部に GFP の蛍光を認めなかった。

本検討において、広範囲軟骨変性を伴う MIA 関節炎モデルに対する軟骨細胞シート移植の有効性を示した。肉眼評価では、3w-MIA モデルにおいて RDS 群が他群と比較して有意に高い値を示した。組織学的評価では、R/RD 群では骨棘形成や表面不整等の変形を伴って瘢痕様組織で修復されていたのに対し、RDS 群では部分的に硝子軟骨を認め、その周囲は線維性軟骨で被覆されていた。これらの結果より、広範囲に軟骨変性が進んでいるような病態においても、軟骨細胞シート移植の有効性が示唆された。また、in vivo イメージングでは術後 28 日目まで関節内に軟骨細胞シートの局在を認めたが、軟骨修復部の GFP の蛍光を認めなかった。これは、修復組織が移植軟骨細胞シート由来ではない事を示唆するが、他群と比較して組織学的評価が良好であったことから、移植軟骨細胞シートのパラクライン効果はその修復機序に寄与したと考えられた。

以上の結果から、本論文では広範囲軟骨変性を伴う関節炎モデルにおいて軟骨細胞シート移植が有効であること、その機序として、軟骨細胞シートのパラクライン効果が重要であることが明らかになった。本研究は変形性関節症などの軟骨変性疾患に対する軟骨細胞シートによる新たな治療の可能性を示しており、学術的および臨床応用の観点から高く評価される。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あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	林 聖樹
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 Chondrocyte Cell-Sheet Transplantation for Treating Monoiodoacetate-Induced Arthritis in Rats. (モノヨード酢酸関節炎モデルに対する軟骨細胞シート移植治療)			
論文審査担当者			
主 査	教授 杉山 英二	印	
審査委員	教授 今泉 和則		
審査委員	講師 河合 幹雄		
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
上記の審査委員会委員が出席のうえ、平成29年8月3日の第70回広島大学研究科発表会（医学）及び平成29年7月27日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った			
1. 修復された再生組織がシート由来か骨髄由来かの検討			
2. MIAモデルの特徴および移植細胞シートに対する影響			
3. 移植した細胞シートの関節内における動態			
4. 細胞シート移植がもたらすパラクライン効果の詳細			
5. 今後の臨床応用への展望			
これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。			