

# 論文内容要旨

The Benefit of Minced Cartilage Over Isolated Chondrocytes in Atelocollagen Gel on Chondrocyte Proliferation and Migration

(アテロコラーゲンゲル包埋細切軟骨片の単離軟骨細胞に対する細胞増殖能、遊走能における有用性の検討)

Cartilage, 2018, in press.

主指導教員：安達 伸生教授

(医歯薬保健学研究科 整形外科学)

副指導教員：大段 秀樹教授

(医歯薬保健学研究科 消化器・移植外科学)

副指導教員：久保 忠彦准教授

(医歯薬保健学研究科 整形外科学)

露口 勇輔

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

## 【目的】

関節軟骨は一度損傷すると修復が困難であり、関節軟骨の損傷は変形性関節症を惹起し、関節機能の低下や疼痛の原因となる。そのため、損傷した軟骨に対する適切な治療が求められており、**Britteberg** らは広範な軟骨損傷に対する治療法として自家培養細胞軟骨移植術（以下 **ACI**）を初めて報告した。**Ochi** らは、アテロコラーゲンゲルを足場として 3 次元的に培養軟骨様組織を作製する、第 3 世代 **ACI** を開発した。この手法は **Britteberg** らの方法で懸念された移植部からの細胞漏出や不均衡な細胞分布という問題点を解決し、良好な臨床成績が報告されている。しかし、この手法にも改善点が存在し、軟骨の採取と移植という二期的手術を必要とする点、軟骨細胞を単離するため細胞障害性のある酵素を用いた処理を必要とする点、軟骨細胞を単離するため正常の軟骨基質を破壊する点が挙げられる。

本研究では、アテロコラーゲンゲルを足場として細切軟骨を包埋した群と単離した軟骨細胞を包埋した群における、ゲル内への細胞遊走能、細胞増殖能、基質産生能を比較検討することで、細切軟骨を用いた軟骨治療法が広範な軟骨損傷に対する新規治療法になり得ると証明することを目的とした。

## 【方法】

変形性膝関節症に対して人工膝関節置換術（以下 **TKA**）を施行した 7 例（全例女性、平均年齢 79.1 歳）から軟骨を採取し、それぞれメスをを用いて軟骨片が  $1\text{mm}^3$  となるように軟骨を細切した。**12.5mg** の細切軟骨を  $100\ \mu\text{l}$  のゲルに包埋した群を **M1 群**、**25mg** の細切軟骨を  $100\ \mu\text{l}$  のゲルに包埋した群を **M2 群** とした。また、単離した軟骨細胞  $2 \times 10^5$  個を  $100\ \mu\text{l}$  のアテロコラーゲンに包埋した群を作製し、**isolated chondrocyte group** (以下 **IC 群**) とした。それぞれ 3 週間培養後に評価を行った。

**HE** 染色、**サフラニン O** 染色を施行し、**Bern score** および細胞数の計測により、軟骨細胞の遊走能、増殖能、基質産生能を評価した。また、**Ki-67**、**LECT-1**、**TGF- $\beta$** 、**Type1**・**Type2** コラーゲンの免疫学的染色を施行した。軟骨基質の評価として、**グリコサミノグリカン**（以下 **GAG**）/**DNA ratio** を測定した。

## 【結果】

軟骨細胞数は、**IC 群**では平均 15.2 個、**M1 群**で平均 24.9 個、**M2 群**で平均 35.4 個であり、全群間で有意差を認めた ( $p < 0.01$ )。 **Bern score** は、**IC 群**で平均 2.3、**M1 群**で平均 3.9、**M2 群**で平均 4.4 であり、全群間で有意差を認めた ( $p < 0.01$ )。 **K-67** 陽性細胞率は、**IC 群**で平均 58.1%、**M1 群**で平均 89.6%、**M2 群**で平均 94.9%であった。**IC 群**と比較して **M1 群**、**M2 群**とも有意差をもって陽性細胞率が高かったが ( $p < 0.01$ )、**M1 群**、**M2 群**間では有意差を認めなかった。**TGF- $\beta$**  および **LECT-1** の免疫染色において、**LECT-1**、**TGF- $\beta$**  とも全群で発現を認め、**IC 群**と比較して **M1 群**、**M2 群**のほうがより強く染色された。**Type1** コラーゲン染色について、アテロコラーゲンゲルは良好に染色されたが、細切軟骨片は染色されなかった。一方、**Type2** コラーゲン染色では、**Type1** と対照的に、軟骨片が良好に染色された。ゲル内の軟骨細胞も **Type2** コラーゲンにて染色されていた。また、**M2 群**において **GAG-to-DNA ratio** が 3 群の中で最も高く、

IC 群よりも M1 群で高く、それぞれ有意差を認めた ( $p<0.01$ )。

#### 【考察】

本研究において、単離した軟骨細胞をアテロコラーゲンゲルに包埋した群に比べて、細切軟骨片をアテロコラーゲンゲル内に包埋した群は、軟骨細胞の増殖、遊走、軟骨基質の産生について優れていることが示された。つまり、アテロコラーゲンゲルに細切軟骨片を包埋する手法は、単離した軟骨細胞を包埋する手法に比べて、軟骨欠損を修復するためにより良い特徴を有することが証明された。

酵素処理し単離した軟骨細胞を包埋したゲルと比較して、細切軟骨片を包埋したゲルでは有意差をもって多くの軟骨細胞を認め、より多くの Ki67 陽性細胞を認めた。この結果はトリプシンやコラゲナーゼによる酵素処理の工程が軟骨細胞に損傷を与えることを示し、酵素を用いる必要がない細切軟骨片群ではより良い細胞増殖能が保たれ、より広い範囲の軟骨欠損の修復に有効である可能性が示唆された。

また、本研究の結果より、細切軟骨片を用いる手法は従来 ACI と比較してより広い範囲の軟骨修復が可能であることが証明された。IC 群では、 $2 \times 10^5$  個の軟骨細胞を  $100 \mu\text{l}$  のアテロコラーゲンゲル内に包埋した。これまでの研究結果より、TKA の症例から採取した軟骨片 100mg 中には平均  $2 \times 10^5$  個の軟骨細胞が含まれているため、IC 群では  $100 \mu\text{l}$  中に 100mg の軟骨片が含まれていると考えられる。最も細胞増殖能および Bern score が優れていた M2 群は  $100 \mu\text{l}$  のアテロコラーゲンゲル内に 25mg の細切軟骨を含み、これは IC 群に用いられた軟骨の量の 1/4 であった。つまり、アテロコラーゲンゲルに包埋した細切軟骨片は従来の ACI と同量の軟骨片を用いた場合、4 倍広い範囲の軟骨欠損を覆うことができる可能性が示唆された。

本研究において、アテロコラーゲンゲルに包埋した細切軟骨片は単離した軟骨に比べて良好な細胞遊走や細胞増殖を認め、多くの GAG を含み、アテロコラーゲンゲル包埋細切軟骨移植が一期的な新規軟骨治療法となる可能性を示した。