

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	松原 紀昌
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 Autologous meniscus fragments embedded in atelocollagen gel enhance meniscus repair in a rabbit model (ウサギモデルにおけるアテロコラーゲンを用いた細碎半月板は半月板修復を促進する)			
論文審査担当者			
主 査	教授	東 幸仁	印
審査委員	教授	木村 浩彰	
審査委員	准教授	平田 信太郎	
〔論文審査の結果の要旨〕 半月板損傷は、膝疼痛と膝機能低下を導き、しばしば手術が必要とされ、半月板切除術が施行される。しかし、半月板を切除すると、変形性関節症に進行しやすく、半月板再生の観点から新しい治療法の開発が望まれる。これまで、線維軟骨細胞や滑膜の間葉系幹細胞（MSCs）を用いて半月板の再生が可能であったという報告があるが、細胞単離と培養が必要で、2 度の手術が必要であるというデメリットがある。一方で、近年、細切半月板による半月板再生の報告もされており、一期的な手術が可能というメリットがある。一方、scaffold としてアテロコラーゲンは、その形態学的な安定性と様々な形に加工できるという特徴から、汎用されているが、アテロコラーゲンと細切半月板移植と組み合わせた報告はない。本研究の目的は、アテロコラーゲングル内のウサギ細碎半月板の細胞増殖能を <i>in vitro</i> で評価することと、アテロコラーゲングルに包埋したウサギ細碎半月板移植の半月板再生に対する影響を <i>in vivo</i> で評価することである。 <i>In vitro</i> 実験では、 <i>in vivo</i> で使用するアテロコラーゲン 100 μ l あたりの至適細切半月板量の検討を行い、アテロコラーゲングル内での細切半月板の細胞増殖能の評価を実施した。次に、細切半月板内の細胞の分化誘導実験を行った。ウサギより半月板を採取し、1 mm 以下に細切した半月板をアテロコラーゲングル 100 μ l に、25 mg、50 mg、125 mg の 3 群に分け、それぞれの容量のアテロコラーゲングルに包埋し、3 週培養後に、アテロコラーゲングル? の単位面積当たりの Ki-67 陽性細胞数と陽性細胞の比率を細胞増殖能の指標として算定した。すべての群で、細胞増殖及び細胞遊走が増強したが、3 群間で有意差を認めなかった。25 mg 群が、Ki-67 陽性細胞数、陽性細胞の比率が最も高値であったために、25 mg を <i>in vivo</i> 実験で用いる細切半月板の至適量とした。細胞増殖能の評価として、単位細切片あたりの細胞増殖能も評価した。細切半月板片をそのまま 2 次元培養をした群と、細切半月板片をアテロコラーゲングル 100 μ l に包埋し培養を行った 3 次元培養群に分け、それぞれ 2 週培養後に増殖細胞数を算定出した。細切半月板は、2 次元培養、3 次元培養に関わらず、細胞増殖能を有していることが確認できた。これら <i>in vitro</i> 実験の結果から、細切半月板内の細胞は、細胞増殖能と細胞遊走能を有し、半月板再生の細胞資源となりうることが示唆された。 <i>In vivo</i> 実験では、ウサギの半月板広範囲欠損モデルを作成した後に、欠損群、アテロコラーゲン単独移植群（アテロコラーゲン群）、細切半月板群とアテロコラーゲン複合体移植群（細切半月板群）の 3 群のモデルを作成した。移植した組織が移植部から逸脱していないかを 12 週間に渡って観察すること、肉眼的評価法と組織学的評価法を用いて 3 群間での肉眼的、組織学的な評価を移植後 8, 12, 16 週で行うこと、移植後 8 週での細切半月板群と positive control として骨髄組織の免疫染色（CD44 と CD271）を行う 3 点を評価項目とした。移植された細切半月板とアテロコラーゲンの複合体は、移植後 12 週に渡って、移植部に逸脱する事なく存在していることより、アテロコラーゲングルは、移植に用いる際の簡便さと欠損部における細胞の保持力を有する良好な scaffold であると考えられた。組織学的評価どちらにおいても、移植後 8, 12, 16 週いずれにおいても、細切半月板移植群が欠損群やアテロコラーゲン群と比較して、有意に良好な半月板修復が得られ			

た. 以上の結果より、アテロコラーゲンゲルと細切半月板の移植は、良好な半月板の再生を促進することが示唆された. さらに、半月板の再生に関して、細切半月板内細胞自身が結果に寄与しているのか、それとも、MSCs が寄与しているのかを評価した. *In vitro* の分化誘導実験の結果において、半月板内の細胞は、脂肪分化能や骨分化能を有していないが、軟骨分化能を有していることが確認された. MSC マーカーである CD44 と CD271 両者ともに出現は認めなかったことより、半月板の再生には、MSCs ではなく、半月板細胞自体が関与していると考えられた. 本研究により、形成的部分切除術が必要である外側円板状半月板の半月板断裂合併症例などに対して、切除した半月板を細切アテロコラーゲンゲルに包埋し半月板断裂部に移植すると、良好な成績が期待できる可能性が示唆された. 臨床的にも、半月板修復の新規治療法となることが期待される. 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.