

論文内容要旨

Osteophyte Cartilage as a Potential Source for Minced Cartilage Implantation: A Novel Approach for Articular Cartilage Repair in Osteoarthritis

(骨棘軟骨が細切軟骨移植の供給源となる可能性がある: 変形性関節症における関節軟骨修復のための新しいアプローチ)

Int J Mol Sci, 25(10): 5563, 2024.

主指導教員: 安達 伸生 教授

(医系科学研究科 整形外科学)

副指導教員: 砂川 融 教授

(医系科学研究科 上肢機能解析制御科学)

副指導教員: 中佐 智幸 准教授

(医系科学研究科 人工関節・生体材料学)

川端 紳悟

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

硝子軟骨での軟骨修復には培養軟骨細胞移植や細切軟骨片移植があるが、進行した変形性関節症（OA）では正常軟骨が少なく、軟骨欠損が広範囲のためこれらの術式は施行困難である。骨棘内には軟骨組織が存在し、これが利用できれば OA に対する軟骨修復が施行できる。本研究の目的は骨棘軟骨と関節軟骨の違いを解析し、軟骨修復への応用を検討することである。実験方法は 2 点で、膝 OA 患者の人工膝関節置換術の際に採取した関節軟骨(大腿骨外側顆)・骨棘軟骨を用いて組織学的解析、MTT アッセイで吸光度により増殖能を評価し、また遺伝子学的解析のため RNA-Seq を行った。

また同様に得た関節・骨棘軟骨をそれぞれ 1mm³以下に細切し、12.5mg の細切関節・骨棘軟骨を 100 μ l のアテロコラーゲンゲルに包埋した群を MC1、MO1 群、25mg の細切関節・骨棘軟骨を 100 μ l のゲルに包埋した群を MC2、MO2 群、また単離した関節・骨棘軟骨細胞 2 \times 10⁵ 個を 100 μ l のゲルに包埋した群を IC 群、IO 群とした。軟骨 100mg から平均約 2 \times 10⁵ 個の軟骨細胞が単離されることから、単離した軟骨細胞 2 \times 10⁵ 個を 100 μ l のゲルに包埋することは 100mg の細切軟骨片が使用されていることに相当する。これらを 3、6 週培養後 HE 染色、サフラニン O 染色を行い、軟骨細胞の遊走能を評価した。骨棘と関節軟骨の軟骨特性の違いの分析については蛍光免疫染色(chondromodulin; LECT1)を行い組織学的解析、GAG の測定を行った。

骨棘軟骨ではサフラニン O 染色で強く染まる軟骨層を認め、関節軟骨の中層と深層で見られる特徴と一致した。また骨棘・関節軟骨の軟骨層において II 型コラーゲンが強く染色され、プロテオグリカンの含有量が高いことが示された。X 型コラーゲンを発現する軟骨細胞は、骨棘軟骨の方が関節軟骨よりも密度が高かった。Ki67 陽性細胞（細胞分裂活性の指標）は、骨棘軟骨の中層および深層における Ki67 陽性細胞率が関節軟骨よりも有意に高かった。RNA 解析では、骨棘軟骨は関節軟骨と比べて、COL1A1、COL4A2、OLFML3、BASP1 などがアップレギュレーションされ、BMP2、S100B、SMOC2、ITM2A、MGP などがダウンレギュレーションされたが、COL2A1、ACAN、SOX9 は有意差を認めなかった。

MO1・MO2 群では、培養 3 週でサフラニン O 染色で軟骨片がよく染色されたが、6 週では染色の強度が減少した。一方、MC1・MC2 群では、培養 3 週でよく染色され、6 週でも染色の減少が穏やかだった。IC・IO 群ではサフラニン O 染色は認めなかった。また Bern スコア(染色の定量化指標)では、培養 3 週では MC 群が MO 群よりも有意に高かった。MO1・MO2 群の Matrix staining & cells スコアは、培養 3 週で MC1・MC2 群のスコアよりも有意に高値だったが、6 週目には全群間で有意差はなくなった。ゲル内での細胞の移動に関しては IC 群では軟骨細胞はゲルの辺縁に存在したが、IO 群では培養期間中にゲル内の細胞数が増加し、培養 3 週、6 週で IC 群よりも有意に多くなった。

軟骨片群では、全群で培養 3 週でゲル内の軟骨片の周囲に細胞が移動し、6 週にはゲル内の細胞数が増加した。また、MO1・MO2 群では、培養 3、6 週ともに MC1・MC2 群よりもゲル内の細胞数が有意に多かった。LECT1 陽性細胞の発現は、培養 3、6 週で全群に観察され、MC2 群では MC1 群よりも高く、MO2 群では MO1 群よりも有意に高かった。これは、軟骨片の数が多いほど、ゲル内での軟骨細胞の移動が促進される可能性があることを示唆した。6 週では軟

骨片包埋全群で LECT1 陽性細胞数に有意差を認めなかった。

MTT アッセイでは、骨棘軟骨細胞の細胞増殖が、48 および 72 時間で関節軟骨細胞より有意に高かった。また GAG 含有量の分析では培養 3、6 週共に全群で GAG を認めたが、MC2 群では MO2 群よりも有意に高い GAG 含有量を認めた。一方 MC1 群と MO1 群の間には GAG 含有量に差を認めなかった。培養 3~6 週の間で全群で GAG 含有量が増加した。

骨棘軟骨は GAG を含み、関節軟骨の特性を持ちながらも、細胞増殖能力が関節軟骨より高く、COLX などの骨要素も多く含んでいた。また遺伝子学的解析では各遺伝子が増減しているが、Col2A1 などは有意差がなく、これらは骨棘軟骨が関節軟骨よりも多くの骨要素を含むが、軟骨の重要な要素を関節軟骨同様に含んでいることを示唆した。細切骨棘軟骨を包埋したゲルは、軟骨細胞の移動とゲル内での GAG 産生を認めた。また細胞増殖能力の高さや GAG 産生の増加により、骨棘軟骨は関節軟骨の広範な欠損部を修復する可能性がある