

## 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	川端 紳悟
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 ① 2 項該当		
論文題目			
<p>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)</p>			
論文審査担当者			
主査	教授	日向 信之	印
審査委員	教授	平田 信太郎	
審査委員	講師	兒玉 祥	
<p>〔論文審査の結果の要旨〕  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(OA)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軟骨細胞移植術(以下 ACI)を初めて報告した。Ochi らは,アテロコラーゲンを足場として 3 次元的に培養軟骨様組織を作製して移植する第 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。これらを改善するために当教室より Tsuyuguchi, Matsushita らが,アテロコラーゲンを足場として用い,細切関節軟骨片移植の有用性を報告した。  しかし,正常軟骨の殆どない進行した OA にはこの手法は困難であり,我々は骨棘軟骨に軟骨組織が存在することに注目し,骨棘軟骨が細切軟骨片移植の材料になり得るのではないかと考えた。  膝 OA に対して人工膝関節置換術 (以下 TKA)を施行した 22 例(男性 7 例,女性 15 例,平均年齢 76.6 歳)から関節軟骨,骨棘軟骨を採取し,それぞれメスを用いて軟骨片が 1mm 以下となるように軟骨を細切した。関節軟骨と骨棘軟骨の軟骨特性の違いを組織学的分析(サフラニン O 染色,HE 染色,免疫染色; Type1,2,10 コラーゲン,Ki-67),遺伝子学的解析(RNA sequence),細胞増殖能(MTT assay)を行い解析した。  また 12.5mg の細切関節軟骨,骨棘軟骨を 100<math>\mu</math>l のゲルに包埋した群を MC1,MO1 群,25mg の細切関節軟骨,骨棘軟骨を 100<math>\mu</math>l のゲルに包埋した群を MC2,MO2 群とした。また,単離した関節軟骨,骨棘軟骨細胞 2<math>\times</math>10<sup>5</sup>個を 100<math>\mu</math>l のアテロコラーゲンに包埋した群を IC,IO 群とした。それぞれ 3,6 週間培養後に評価を行った。サフラニン O 染色,HE 染色を行い Bern score および細胞数の計測により,軟骨細胞の遊走,増殖能を評価した。また基質の評価としてグリコサミノグリカン(GAG)を測定し,また Ki-67,LECT-1,Type1,2,10 コラーゲンを免疫組織学的に染色した。  サフラニン O 染色では関節軟骨で染色が強い軟骨層が,骨棘軟骨では染色が弱く,Type1 コラーゲン陽性の線維軟骨層で覆われているのが観察された。また関節軟骨では,表層は染色が弱い,中間層と深層は染色が強く,骨棘と関節軟骨の軟骨層では Type2 コラーゲンが強く染色され,プロテオグリカン含有量が高いことが観察された。Type10 コラーゲンを発現している軟骨細胞は,骨棘と関節軟骨の深層に分布したが,主に骨棘軟骨に広く分布した。半定量分析では,Type1,2 コラーゲンは骨棘と関節軟骨の間で有意差はなかったが,Type10 コラーゲンは骨棘軟骨の方が関節軟骨より有意に高値だった。骨棘軟骨の Ki67 陽性細胞は軟骨層全体に分布し,クラスター内の軟骨細胞に豊富に発現した。関節軟骨では,Ki67 発現細胞は表層に多いが,表層の Ki67 陽性細胞率は骨棘と関節軟骨の間で有意差を認めず,中層および深層の Ki67 陽性細胞率は骨棘軟骨の方が関節軟骨よりも有意に高値だった。</p>			

RNA sequence は、骨棘軟骨が関節軟骨に比べて上方制御される遺伝子は COL1A1, COL4A2, OLFML3, BASP1 で、下方制御される遺伝子は BMP2, S100B, SMOC2, ITM2A, MGP だが、軟骨特異的遺伝子である COL2A1, ACAN, SOX9 の発現に有意差は認めなかった。

アテロコラーゲンゲルに包埋、培養したゲルについて、サフラニン O 染色は、細切骨棘軟骨片を包埋したゲルは、培養 3 週ではゲル中の軟骨片が染色されたが、6 週では染色は減少した。しかし、細切関節軟骨片を包埋したゲルでは、3 週で軟骨片はよく染色され、6 週でも染色の減少は骨棘軟骨片よりも穏やかだった。

Bern score は培養 3 週では、細切関節軟骨群と細切骨棘軟骨 MO が単離関節・骨棘軟骨細胞 IC と IO よりも有意に高値だった。培養 3 週では MO2 が MC2 より有意に高値だったが、他群では有意差は認めず、6 週では、MO2 と MC2 の差が有意でなくなったことを除いて、結果は 3 週と同じだった。

細胞数は単離骨棘軟骨細胞を包埋した IO の細胞数は 3 週と 6 週で単離関節軟骨細胞を包埋した IC 群よりも有意に高値だった。細切骨棘軟骨片を包埋した MO1 と MO2 はともに、培養 3 週と 6 週において細切関節軟骨片を包埋した MC1 と MC2 よりもゲル内の細胞数が有意に多かった。LECT1 陽性細胞は 3 週と 6 週ともすべての群で観察された。3 週では、LECT1 陽性細胞率は MC2 の方が MC1 よりも、MO2 の方が MO1 よりも有意に高く、軟骨片が多いほどゲル内での軟骨細胞の移動が促進されることが示唆されたが、6 週では LECT1 陽性細胞数は細切軟骨片群の群間で有意差は認めなかった。

細胞増殖能を MTT assay を用いて評価したが、骨棘由来の軟骨細胞の細胞増殖は、48 時間および 72 時間で関節軟骨由来の軟骨細胞より有意に増加した。

GAG に関して培養 3 週と 6 週では、全群で GAG 含有量を認め、MC2 では MO2 よりも有意に高値だった。ただし、MC1 と MO1 の間では GAG 含有量に有意差は認めなかった。3 週と 6 週では、細切関節、骨棘軟骨の GAG 含有量は単離軟骨細胞 IC, IO 群よりも有意に高かった。また 3 週から 6 週にかけて、全群で GAG 含有量が増加した。

本研究において、骨棘軟骨は関節軟骨よりも Type10 コラーゲンの発現が高いことが明らかになった。これは骨棘軟骨には明らかな軟骨組織が存在するにも関わらず、骨棘軟骨は関節軟骨よりも骨の特徴が強く、また骨棘軟骨由来の軟骨細胞は関節軟骨由来の軟骨細胞よりも増殖能が優れていることが示された。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。また遺伝子発現分析により、骨棘と関節軟骨の間には異なる遺伝子発現プロファイルが特定されたが、COL2A1, ACAN, SOX9 の発現レベルに有意差はなかったことから、骨棘軟骨には関節軟骨と軟骨の要素は同等に含まれていることが証明された。

また本研究の結果より、細切骨棘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明らかになった。IC, IO 群では、 $2 \times 10^5$  個の軟骨細胞を 100 $\mu$ 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, IO 群では 100 $\mu$ l 中に 100mg の軟骨片が含まれていると考えられる。最も細胞増殖能が優れていた MO2 群は 100 $\mu$ l のアテロコラーゲンゲル内に 25mg の細切骨棘軟骨を含み、これは IO 群に用いられた軟骨の量の 4 倍であった。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骨棘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骨棘軟骨片移植が一次的な新規軟骨治療法となる可能性が示された。

以上のとおり、本論文は細切骨棘軟骨片をアテロコラーゲンゲルに包埋する手法が一次的な新規軟骨治療法として有用と示唆し、今後、臨床応用できる可能性があり、高度変形性関節症の新たな治療戦略創出への貢献が期待されることから本論文は高く評価される。

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。