



Administrations of peripheral blood CD34-positive cells contribute to medial collateral ligament healing via vasculogenesis

鄭, 克 真

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4667

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004667>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	鄭 克 真
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 4667 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Administrations of peripheral blood CD34-positive cells contribute to medial collateral ligament healing via vasculogenesis(末梢血 CD34 陽性細胞の投与による血管新生を通じた内側側副靱帯損傷の治癒促進)

審 査 委 員

主 査	教 授	横野 浩一
	教 授	藤澤 正人
	教 授	林 祥剛

<Introduction>

Revascularization plays an essential role in the initial phase of ligament healing. Adult human circulating CD34+ cells, an endothelial/hematopoietic progenitor-enriched cell population, have been reported to contribute to neoangiogenesis, however the therapeutic potential of CD34+ cells for ligament healing is still unclear. Therefore, we performed a series of experiments to test our hypothesis that ligament healing is supported by CD34+ cells via vasculogenesis.

<Materials and Methods>

Animal Model & Cell transplantation

64 female athymic nude rats (F344/N Jcl rnu/rnu, 8~12W) were used in this study. After creating medial collateral ligament injury, 1×10^5 human granulocyte-stimulating factor mobilized peripheral blood (GM-PB) CD34+ cells (CD34+ group) or mononuclear cells (MNC group) (Cambrex Bio Science Inc.) were transplanted with a bolus of atelocollagen (n=32 for each group) in the experimental knee. Atelocollagen without cells was transplanted in the injured MCL of the contralateral knee as a control group. The institutional animal care and use committees of Kobe University approved all animal procedures including human cell transplantation.

Detection of human cells derived vasculogenesis

Immunohistochemical staining (n=5 in each group) was performed at week 1 with following human-specific antibodies; human leukocyte antibody (HLA)-ABC (BD Pharmingen) and human-specific Ulex europaeus lectin type 1 (UEA-1) (Vector Laboratories, Inc) for human endothelial cells (ECs). The number of cells was morphometrically evaluated. Total RNA was obtained from the rat tissues at the peri-injury site of MCL at week 1, and examined by RT-PCR with hCD31, hVE-cadherin, and hGAPDH (n=3 in each group).

Evaluation of neovascularization

Immunohistochemistry for isolectin B4 (Vector Laboratories) as a rat EC marker was visualized with fluorescence, and capillary density was morphometrically evaluated (n=5 in each group). And molecular biologically, real time RT-PCR analysis was performed with rat VEGF at week 1 (n=3 in each group).

Assessment of MCL healing

To evaluate MCL healing, in 6 knees from each group euthanized at 2 and 4 weeks after surgery, the cut portions of MCLs were inspected macroscopically. Real time RT-PCR analysis was also performed with rat tenomodulin (rTeM) and rat collagen 1A2 (rCol1A2) at week 1. Furthermore, bio-mechanical tensile test of injured ligament was performed (n=6 in each group, each period).

<Results>

Detection of human cell-derived vasculogenesis

In immunohistochemical staining for UEA-1 and HLA, the existence of survived human cells and the phenomenon of human cell-derived vasculogenesis were detected. The number of the cells in the CD34+ group was significantly higher than the MNC group at the peri-injury site. The molecular approach strongly revealed the gene expression of human-specific EC markers (hCD31 and hVE-cad) in the CD34+ group.

Evaluation of recipient's neovascularization

Neovascularization assessed by capillary density was significantly enhanced in the CD34+ group compared with the the MNC and the control group. Furthermore, Gene expression of rVEGF was significantly increasing in the CD34+ group compared with the other groups.

Assessment of MCL healing

Assessment of ligament healing by macroscopic inspection and demonstrated that the ligament was significantly healed in the CD34+ group compared with the MNC group and the control group (2W: CD34+, 33% (2/6); MNC, 16% (1/6); Control, 0% (0/6), 4W: CD34+, 100% (6/6); MNC, 33% (2/6), Control, 33% (2/6)). Molecular biologically, gene expressions of both rTeM and Col1A2 were significantly higher in the CD34+ group compared with the other groups. Bio-mechanical test demonstrated that the ligament was significantly strengthened in the CD34+ group compared with the MNC group and the control group.

Assessment of MCL healing by inhibition of intrinsic angiogenesis

To investigate the hypothesis that neovascularization is essential to support endogenous ligament healing, an antiangiogenic agent, sFlit1, known to inhibit proliferation of endothelial cells, was injected for 14 days. Ligament healing assessed by macroscope and histology as well as neovascularization assessed by capillary density was significantly inhibited in the sFlt group compared with the PBS group.

<Discussion>

In this study, we proved that human PB CD34+ cells were survived and also identified in vivo differentiation into ECs in the nude rat model of MCL injury. The environmental contribution of CD34+ cells results in ligament healing confirmed by not only morphological but also bio-mechanical assessment. This microenvironmental interaction between vasculogenesis and ligament healing was dependent, at least in part, on autocrine/paracrine regulatory factors, but also direct cellular communications in developing CD34+ cells. Our study suggests that peripheral blood CD34+ cells have significant potential for therapeutic application to the damaged ligament. Cell harvest from peripheral blood does provide positives in that it is less invasive and safer than aspiration from bone marrow or embryo as cell sources.

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 2 0 0 5 号	氏 名	鄭 克真
論 文 題 目 Title of Dissertation	Administrations of peripheral blood CD34-positive cells contribute to medial collateral ligament healing via vasculogenesis 末梢血CD34陽性細胞の投与による血管新生を通じた内側側副靱帯損傷の治癒促進		
審 査 委 員 Examiner	主 査 横 野 浩 一 Chief Examiner 副 査 蔭 澤 正 人 Vice-examiner 副 査 林 祥 剛 Vice-examiner		

(要旨は1, 0 0 0字～2, 0 0 0字程度)

膝靱帯損傷は高頻度にかかるスポーツ外傷であるが、外傷前状態までの完全な治癒に至らぬ事、時間を要する事が問題であり、現在、多くの施設で様々な研究がなされている。一方、損傷靱帯・移植腱の再構築における血管侵入の重要性が指摘されており、他の領域の分野では、造血前駆細胞である末梢血 CD34 陽性細胞の移植により、心臓や虚血下肢などにおける血管新生の促進が報告されている。そこで、研究者は“末梢血 CD34 陽性細胞は、血管再生を通じて膝内側側副靱帯損傷における靱帯治癒を促進する”という仮説を立て、ヒト末梢血 CD34 陽性細胞をラットの膝内側側副靱帯(MCL)損傷に局所移植し、その有用性を検討した。
64 匹の免疫不全ラットを用い、両側の膝に MCL 損傷を作成した。片側には、アテロコラーゲンゲルに包埋した G-CSF 動員ヒト末梢血 CD34 陽性細胞 1×10 ⁵ を局所移植し (CD34 群)、反対側には PBS とアテロコラーゲンを移植し、これをコントロール群とした。さらに細胞対照群として、片側に G-CSF 動員ヒト末梢血単核球細胞 1×10 ⁵ を局所移植した (MNC 群)。術後 1,2,4 週において、靱帯の治癒状態を経時的に肉眼的、分子生物学的、組織学的、及び力学的張力試験を行い、比較検討した。組織学的評価として、ヘマトキシリン・エオジン染色にて靱帯治癒状態を評価し、免疫学的組織染色にて血管の増生の評価を行った。分子生物学的評価としては、リアルタイム RT-PCR を用いて血管の増生、靱帯結合組織の増生評価を行った。さらに、力学的評価として、摘出した大腿骨・内側側副靱帯・脛骨複合体に対して張力試験を行い、比較検討した。
肉眼的および組織学的評価では、術後 4 週までに MNC 群、コントロール群では靱帯損傷の治癒が 33%で認めたのに対して、CD34 群では 100%に良好な治癒を認めた。分子生物学的評価では、RT-PCR、免疫染色にて、CD34 群にヒト特異的血管内皮マーカーのより強い発現を認めた。Real time RT-PCR による内在性 VEGF の発現量、および免疫染色による損傷部の内在性微小血管密度の定量評価においても、MNC 群、コントロール群に比べ、CD34 群に有意に亢進しており、CD34 陽性細胞は血管内皮細胞への分化だけでなく内在血管の再構築にも貢献していることを確認した。Real time RT-PCR において、腱・靱帯などの強靱結合組織に特異的に発現される Tenomodulin、Collagen1A2 が治療群

に有意に増加を認め、力学的張力試験では、術後2週の時点でCD34群では、他のグループに比べて有意に靱帯の強度が増加していた。G-CSF 動員ヒト末梢血 CD34 陽性細胞を膝 MCL 損傷部に局所移植することによって、血管再生・新生を通じて靱帯治癒に対して適正な環境を誘導し、これに貢献していた。骨髄より採取する Mesenchymal stem cell などと比べ、CD34 陽性細胞は末梢血から低侵襲でかつ簡便に採取できる cell source であり、整形外科領域の再生医療に有用である可能性を示唆した。

本研究は、靱帯損傷について、その治癒促進について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった末梢血 CD34 陽性細胞の局所投与による血管再生・新生を通じた靱帯損傷の治癒促進の有用性について、重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。