



Age-Related Differences in Anterior Cruciate Ligament Remnant Vascular-Derived Cells

Uefuji, Atsuo

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2015-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6269号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006269>

※ 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。



学位論文の内容要旨

Age-Related Differences in Anterior Cruciate Ligament Remnant Vascular-Derived Cells

膝前十字靱帯血管由来細胞の細胞特性における年齢による差異の検討

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
整形外科学
(指導教員：黒坂 昌弘教授)

上藤 淳郎

Age-Related Differences in Anterior Cruciate Ligament Remnant Vascular-Derived Cells

膝前十字靱帯血管由来細胞の細胞特性における年齢による差異の検討

上藤淳郎, 松本知之, 松下雄彦, 上羽岳志, 張樹蓉, 黒坂昌弘, 黒田良祐

[背景]

膝前十字靱帯（以下 ACL）損傷はスポーツ障害の中でも頻度が多く、損傷されると前後方向における膝不安定性をきたし、スポーツ復帰への大きな支障となる。一般的に ACL 組織は自然治癒能が乏しく、膝安定性の再獲得のためには自家移植腱を使用した ACL 再建術が必須とされている。しかし、再建後の自家移植腱の成熟過程に長期間を要し、スポーツ復帰を遅らせる一つの要因となっている。近年様々な靱帯再生による早期スポーツ復帰をターゲットとしたアプローチが試みられており、その一つに幹細胞がある。我々は急性期の ACL 損傷膝における ACL 損傷組織中に見られる血管内皮前駆細胞である CD34 陽性細胞によって ACL 組織が自然治癒能をもつ可能性について報告した。ヒト ACL 損傷部細胞を免疫不全ラットの ACL 再建部に移植するモデルで、損傷部由来の CD34 陽性細胞のみならず非分離細胞群においても骨・腱間結合治癒を促進すること、犬による ACL 再建モデルにおいても ACL 由来組織移植は血管新生・骨新生を亢進させ、骨孔の拡大を軽減させることを報告した。さらに ACL 損傷部組織をグラフトに縫合した ACL 再建臨床試験においても動物実験と同様に術後 1 年における CT 評価で手術中に作成した骨孔の縮小化が確認され、骨・腱間結合治癒における治癒の促進効果が確認された。今後、臨床試験での更なる成績向上を目指し、細胞の特性解析が必須となる。動物において成熟した動物より未熟な動物の方が ACL の高い再生能を備えることが報告されており、ヒトの骨髄細胞においても加齢によって増殖能、骨分化能が低下することが報告されている。そこで本研究の目的は、ヒトの ACL 組織由来細胞の増殖能、分化能の年齢による差異を検討することとした。

[方法]

対象は ACL 再建術中に ACL 組織を採取した 28 例、10 歳代 10 例（平均年齢 16.6 歳）、20 歳代 10 例（平均年齢 23.8 歳）、30 歳代以降 8 例（平均年齢 35.8 歳）であった。受傷から手術までの期間は 3 群でそれぞれ平均 11.2 週、12.8 週、13.0 週であり 3 群間に有意差は見られなかった。採取した ACL 組織の一部を免疫組織染色し CD34 陽性細胞の局在を評価、その他の ACL 組織は細胞分離し、得られた細胞をフローサイトメトリーにて表面マーカー陽性率を評価した。表面マーカーとしては血球、血管系マーカーとして CD34、CD146、CD45、間葉系マーカーとしては CD44、CD29、Stro-1 を評価した。さらに細胞増殖能を評価し、骨、血管内皮、軟骨、脂肪への分化能を Passage3 の細胞群を用いて評価した。細胞増殖能は Population doubling にて評価した。骨分化能は ALP 染色、アリザリンレッド

染色、ALP 活性、リアルタイム PCR による Osteocalcin、ALP、Runx2 の mRNA 発現量で評価した。血管内皮分化は血管内皮細胞に特徴的に染色される acetylated low-density lipoprotein (acLDL) と Ulexeuropaeuslectin (UEA1) の染色、Tube Length 形成、リアルタイム PCR による CD31、VE-cadherin の mRNA 発現量で評価した。軟骨分化は pellet 培養しトルイジンブルー染色、サフラニン O 染色で評価し、脂肪分化はオイルレッド O 染色にて評価した。

[結果]

CD34陽性細胞は組織の血管内皮に沿って存在していた。

血球、血管系、間葉系の表面マーカー陽性率を経時的に比較したところ、Passage3では Passage0と比較して血球、血管系表面マーカーにおいてCD34陽性率が有意に低下し、間葉系表面マーカーにおいてはすべての細胞マーカーにおいて陽性率が有意に増加していた。またPassage0の細胞群を年代別で比較したところ、CD34陽性率において10歳代は30歳代以降より有意に高値を示していた ($p<0.05$)。

増殖能を比較したところ10歳代は他の年代より高い傾向があり、passage3において30歳代以降より有意に高い増殖能が見られていた ($p<0.05$)。

骨分化能では、ALP染色、アリザリンレッド染色で年齢とともに染色能力が低下する傾向がみられ、ALP活性、リアルタイムPCRでのOsteocalcin、ALP、Runx2のmRNA発現率においても年齢とともに低下する傾向が見られた。特にALP活性、Osteocalcin発現量では10歳代が30歳代以降と比較し有意に高い骨分化能が見られた ($p<0.05$)。

血管内皮分化能では、血管内皮細胞に特徴的に染色された1視野あたりの細胞数において10歳代は20歳代、30歳代以降と比較して有意に高い血管内皮分化能がみられ ($p<0.05$)、Tube length形成においても10歳代で30歳代以降と比較して有意に高い血管内皮分化能が見られた ($p<0.05$)。VE-cadherin、CD31発現率に有意差は見られなかった。

軟骨分化能ではトルイジンブルー染色、サフラニンO染色、脂肪分化能ではオイルレッドO染色で、それぞれの分化能が年齢とともに低下する傾向が見られた。

[考察]

CD34陽性細胞は幹細胞/前駆細胞とされ、分化とともに間葉系細胞へと形質転換するとされているが、本研究においてもそれに矛盾しない結果が得られた。CD34陽性細胞は若年者に多く見られ、年齢とともに低下した。ACL損傷組織には、高い増殖能、多分化能を有する細胞群を備えているが、年齢が高くなるほどその細胞群が減少し増殖能、分化能などの細胞特性が低下している可能性が示唆された。近年、死体膝におけるACL細胞研究でも高齢者での間葉系細胞マーカー陽性率低下、増殖能、分化能の低下が報告されており、年齢により異なる細胞特性を示すことが明らかになりつつある。これらのことはACLの治療メカニズムにだけでなく、ACL再建術という治療方法にも重要な見識を与えることになる。我々は、CD34陽性細胞はACL非損傷部よりも損傷部に多く存在すること報告したが、本研究にて年齢とともに組織による治癒能力が減少することが示された。これは年齢がACL再

建術中に損傷組織を使用するか否かの重要な因子となることを示している。今後、年齢によりACL損傷組織を用いた（移植腱に損傷組織を縫合した）ACL再建術を施行することを考慮する必要がある。

さらなる治療成績の向上を目指し、受傷から手術までの期間、性別、またはその他の細胞特性に影響を及ぼす因子の解析を行う必要がある。本研究ではPassage3の細胞を用いて分化能を評価したが、継代することによりCD34陽性細胞は減少するため、Passage0の細胞を用いればさらに良い結果が示される可能性がある。

[結語]

本研究では年齢がACL損傷の治癒を促進するために重要な因子であることが示された。若年者のACL損傷組織にはCD34陽性細胞が多くみられ、増殖能、分化能が優れているため、ACL損傷組織を用いたACL再建術を施行する際は年齢を考慮するべきである。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2469 号	氏 名	上藤 淳郎
論文題目 Title of Dissertation	<p>Age-Related Differences in Anterior Cruciate Ligament Remnant Vascular-Derived Cells</p> <p>膝前十字靱帯血管由来細胞の細胞特性における 年齢による差異の検討</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 具 英成 Chief Examiner</p> <p>副 査 市田 康一 Vice-examiner</p> <p>副 査 小川 渉 Vice-examiner</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

膝前十字靱帯（以下 ACL）損傷はスポーツ障害の中でも頻度が多く、損傷されると前後方向における膝不安定性をきたし、スポーツ復帰への大きな支障となる。一般的に ACL 組織は自然治癒能が乏しく、移植腱を使用した ACL 再建術が必須とされている。しかし、再建後の移植腱の成熟過程に長期間を要し、スポーツ復帰を遅らせる要因となっている。研究者らは急性期の ACL 損傷膝における組織中に見られる幹細胞によって ACL 組織が自然治癒能をもつ可能性について報告した。ヒト ACL 損傷部細胞を免疫不全ラットの ACL 再建部に移植するモデルで、損傷部由来の CD34 陽性細胞のみならず非分離細胞群においても骨・腱間結合治癒を促進すること、犬による ACL 再建モデルにおいても ACL 由来組織移植は血管新生・骨新生を亢進させ、骨孔を縮小させることを報告した。さらに ACL 損傷部組織をグラフトに縫合した ACL 再建臨床試験においても術後 1 年における CT 評価で手術中に作成した骨孔の縮小化が確認され、骨・腱間結合治癒における治癒の促進効果が確認された。今後、臨床試験での更なる成績向上を目指し、細胞の特性解析が必須となる。そこで本研究では、ヒトの ACL 組織由来細胞の特性における年齢による差異を検討することとした。

[方法]

対象は ACL 再建術中に ACL 組織を採取した 28 例、10 歳代 10 例（平均年齢 16.6 歳）、20 歳代 10 例（平均年齢 23.8 歳）、30 歳代以降 8 例（平均年齢 35.8 歳）であった。受傷から手術までの期間は 3 群でそれぞれ平均 11.2 週、12.8 週、13.0 週であり 3 群間に有意差は見られなかった。採取した ACL 組織の一部を免疫組織染色し CD34 陽性細胞の局在を評価、その他の ACL 組織は細胞分離し、得られた細胞をフローサイトメトリーにて表面マーカー陽性率を評価した。さらに細胞増殖能を評価し、骨、血管内皮、軟骨、脂肪への分化能を評価した。

[結果]

CD34陽性細胞は組織の血管内皮に沿って存在していた。

血球系、間葉系の表面マーカー陽性率を経時的に比較したところ、Passage3ではPassage0と比較して血球系表面マーカーにおいてCD34陽性率が有意に低下し、間葉系表面マーカーにおいてはすべての細胞マーカーにおいて陽性率が有意に増加していた。またPassage0の細胞群を年代別で比較したところ、CD34陽性率において10歳代は30歳代以降より有意に高値を示していた（ $p<0.05$ ）。

増殖能を比較したところ10歳代は他の年代より高い傾向があり、passage3において30歳代以降より有意に高い増殖能が見られていた（ $p<0.05$ ）。

骨分化能では、ALP染色、アリザリンレッド染色で年齢とともに染色能力が低下する傾向がみられ、ALP活性、リアルタイムPCRでのOsteocalcin、ALP、Runx2のmRNA発現率においても年齢とともに低下する傾向が見られた。特にALP活性、Osteocalcin発現量では10歳代が30歳代以降と比較し有意に高い骨分化能が見られた（ $p<0.05$ ）。

血管内皮分化能では1視野あたりの血管内皮細胞数において10歳代は20歳代、30歳代以降と比較して有意に高い血管内皮分化能がみられ ($p<0.05$)、Tube length形成においても10歳代で30歳代以降と比較して有意に高い血管内皮分化能が見られた ($p<0.05$)。

軟骨分化能ではトルイジンブルー染色、サフラニンO染色、脂肪分化能ではオイルレッドO染色で、それぞれの分化能が年齢とともに低下する傾向が見られた。

[考察]

CD34陽性細胞は幹細胞/前駆細胞とされ、分化とともに間葉系細胞へと形質転換するとされているが、本研究においても、経時的にCD34陽性率が低下し間葉系細胞マーカーの陽性率が上昇しており、形質転換とする報告に矛盾しない結果が得られた。近年、死体膝におけるACL細胞研究でも高齢者での間葉系細胞マーカー陽性率低下、増殖能、分化能の低下が報告されており、年齢により異なる細胞特性を示すことが明らかになりつつある。

本研究では年齢がACL損傷の治癒を促進するために重要な因子であることが示された。若年者のACL損傷組織にはCD34陽性細胞が多くみられ、増殖能、分化能が優れているため、ACL損傷組織を用いたACL再建術を施行する際は年齢を考慮するべきである。

本研究は、ACL再建術における治療成績の向上を目標としてACL損傷組織について研究したものであるが、従来ほとんど解析されていなかった組織由来細胞の特性に影響を及ぼす因子について重要な知見が得られ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。