



Age-Dependent Healing Potential of Anterior Cruciate Ligament Remnant-Derived Cells

Nakano, Naoki

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2016-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6540号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006540>

※ 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。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Age-Dependent Healing Potential of Anterior Cruciate Ligament Remnant-Derived Cells

膝前十字靭帯再建術後治癒能力の年齢による差異に関する検討

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)

中野 直樹

【背景・目的】

膝前十字靭帯(以下 ACL)の損傷は高頻度に生じるスポーツ外傷の一つである。ACL 損傷は自然治癒しないとされ、活動性の高い患者に対しては自家腱を用いた関節鏡視下 ACL 再建術が最も標準的な治療法であり良好な中長期成績が報告されている。Hamstrings 腱を用いた ACL 再建術においては、術後早期には骨孔と移植腱の接合部が力学的負荷に対し最も脆弱な部分である。強固な骨孔-腱間の癒合が、早期の積極的なリハビリ開始や仕事・スポーツへの復帰には不可欠であり、通常スポーツ復帰には術後約 9~12 か月間が必要である。

これまでの研究で、成人末梢血中の CD34 陽性細胞は血管内皮前駆細胞としての性質を持ち虚血部に取り込まれ血管新生に関与すること、CD34 陽性細胞は血管新生を促進する作用に加え高い増殖能・多分化能を備えていること、ヒト ACL 組織内にも CD34 陽性細胞は存在し ACL 損傷の際には損傷部組織で健常部に比べより多くの CD34 陽性細胞が認められ、治癒を促進する役割を担っていると考えられることが報告されている。また in vivo での研究では、ヒト ACL 遺残組織由来の CD34 陽性細胞が免疫不全ラットを用いた ACL 再建モデルにおいて骨-腱間癒合を有意に促進すること、イヌ ACL 再建モデルにおいて自家 ACL 遺残組織を移植腱に縫合すると骨-腱間の癒合促進が見られたことが報告されている。さらにより臨床に即した研究においては、ヒト ACL 損傷患者において術中に ACL 遺残組織を Hamstrings 腱に縫合して移植すると術後骨孔体積の有意な縮小が見られたことが報告されている。これらより、ACL 遺残組織由来細胞は Hamstrings 腱を用いた ACL 再建術の際に骨-腱間の癒合を促進し、これには ACL 遺残組織内の CD34 陽性細胞が貢献している可能性がある。

患者ごとの ACL 再建術後の経過を予測できれば適切なリハビリテーションメニューの作成や仕事・スポーツへの復帰時期の目安を得ることが可能となり、患者へのメリットが大きい。患者ごとの個性の一つとして手術時の年齢が挙げられるが、自家腱を用いた ACL 再建術後には若年者ほど早期の機能的回復が得られる傾向にあることが日常臨床上経験される。ただしこの真偽や詳細については不明であり、解明が求められている。我々は過去にヒト ACL 由来細胞の増殖能・多分化能(骨新生・血管新生)及び CD34 陽性細胞の割合は加齢と共に低下することを in vitro にて示した。本研究では ACL 損傷患者の遺残靭帯由来細胞の患者年齢による治癒促進能力の違いを、免疫不全ラットの ACL 再建モデルを用いて検討した。

【方法】

初回 ACL 損傷に対して鏡視下 ACL 再建術を施行された 10 歳代の患者 5 名および 30 歳代の患者 5 名、計 10 名を対象とした。鏡視下 ACL 再建術中に ACL 損傷

部より組織を採取し、その後細胞を分離抽出した。10歳代の5名は平均年齢15.6歳、30歳代の患者は平均年齢35.4歳であった。男女比、および受傷から手術までの期間において2群間で有意差は無かった。動物モデルとして免疫不全ラット(ヌードラット、メス、10週齢、計60匹)の片側ACLを人為的に切断し、同側の自家長趾屈筋腱を移植腱としてACL再建術を施行した。その後、上記2群(10歳代、30歳代)のヒトACL遺残組織由来細胞をラット膝関節内に注射(5×10^5 cells / ラット)し、それぞれGroup 10s、Group 30sとした。また対照群として同様の手術を行い、phosphate-buffered saline (PBS)のみ膝関節内に注射したラット群をGroup PBSとした。

ACL再建術後2・4・8週で組織学的評価(Hematoxylin and Eosin染色及びMovat-pentachrome染色)、術後2週で免疫組織化学的評価(human-cell derived vasculogenesis / osteogenesis及びintrinsic angiogenesis / osteogenesisの検討)、術後2・4・8週で画像評価(micro-CTによる骨孔面積測定)、術後8週で生体力学的評価(大腿骨-移植腱-脛骨の引張試験)をそれぞれ各群n=5で行い、各群間の差異を検討した。

【結果】

組織学的評価では、Movat-pentachrome染色で青色に染色される内軟骨様骨化箇所がGroup 10sでは術後4週で見られたのに対し、他の2群では術後8週まで見られなかった。また術後8週ではGroup 10sでは骨-腱間の癒合所見が見られたが他の2群では内軟骨様骨化箇所が見られるのみであった。

免疫組織化学的評価では、骨孔と腱の境界部にGroup 10sにおいてラットの血管に一致してヒト由来血管内皮細胞が有意に多くみられ、活発なhuman-cell derived vasculogenesisを示していると考えられた。同様にGroup 10sにおいてはヒト由来骨芽細胞が移植腱の骨孔との境界部に沿って有意に多くみられ、活発なhuman-cell derived osteogenesisを示していると考えられた。さらにラット由来血管内皮細胞も骨孔と腱の境界部にGroup 10sにおいて有意に多く認められ、活発なintrinsic angiogenesisを示していると考えられた。ラット由来骨芽細胞も同様にGroup 10sで有意に多く認められ、活発なintrinsic osteogenesisを示していると考えられた。いずれの免疫組織化学的評価項目においてもGroup 30sとGroup PBSの間には有意差を認めなかった。

画像評価では、micro-CTを用いて関節面より3mm遠位の脛骨骨孔断面面積を計測して術直後との面積比を算出したところ、術後4・8週時点においてGroup 10sで他の2群に比べ有意な骨孔面積の縮小が見られた。Group 30sとGroup PBSの間には有意差を認めなかった。

生体力学的評価では、引張試験でGroup 10sにおいて他の2群に比べ有意に

高い破断強度を認めた。破断はGroup 30s・Group PBSにおいてはほぼ脛骨骨孔と移植腱の間で起こったが、同部位での破断はGroup 10sにおいては5例中2例のみであり残りの3例では移植腱実質で破断した。Group 30sとGroup PBSの間には破断強度に有意差を認めなかった。

【考察】

組織学的評価においてGroup 10sで他の2群に比べ早期の内軟骨骨化様所見および骨-腱癒合所見を認めたことより、10歳代のACL遺残組織由来細胞は30歳代のACL遺残組織由来細胞に比べより骨増殖を促進すると考えられる。

免疫組織学的評価においてGroup 10sで他の2群に比べ有意な血管新生・骨新生傾向を認めた。これまでに骨新生と血管分化は骨-腱間癒合に重要であることが示されており、本研究では直接的効果(human-cell derived vasculogenesis / osteogenesis)及び間接的効果(intrinsic angiogenesis / osteogenesis: paracrine効果)によりGroup 10sで骨-腱間の癒合が促進されたと考えられる。

Micro-CTを用いた画像評価においてはGroup 10sで他の2群に比べ有意に脛骨骨孔が縮小していた。骨-腱接合部の治癒程度や接着強度は移植腱周囲の骨量に影響されるとされており、10歳代のACL遺残組織由来細胞が高い骨-腱間癒合効果を持つことが画像評価でも認められたと考えられる。

生体力学的評価においては引張試験でGroup 10sで有意に高い破断強度を示した。骨-腱接合部のコラーゲン線維の増生や組織学的な治癒と引張試験における破断強度は関連するとされており、10歳代のACL遺残組織由来細胞は生体力学的にも高い骨-腱間癒合促進効果を示したと考えられる。

いずれの評価項目においても10歳代のACL遺残組織由来細胞は30歳代に比べ高い骨-腱間癒合促進効果を示したが、過去の研究よりヒトACL遺残組織由来CD34陽性細胞が骨-腱間癒合を促進すること、及びCD34陽性率、増殖能・多分化能は加齢と共に低下することが示されていることより、本研究では若年者由来細胞の高いCD34陽性率、増殖能・多分化能が、骨-腱間癒合を促進したと考えられる。臨床的には、若年者ほど可能な限り術中にACL遺残組織を温存することが勧められる。

【結論】

免疫不全ラットを用いたACL再建モデルの治癒過程において、若年者のACL遺残組織由来細胞は比較的高齢者由来の細胞に比べて骨-移植腱間の癒合をより促進した。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2566 号	氏 名	中野 直樹
論文題目 Title of Dissertation	Age-Dependent Healing Potential of Anterior Cruciate Ligament Remnant-Derived Cells 膝前十字靭帯再建術後治癒能力の年齢による差異に関する検討		
審査委員 Examiner	主 査 瓜 村 善 博 Chief Examiner 副 査 錦 織 千 佳 子 Vice-examiner 副 査 石 田 達 郎 Vice-examiner		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

自家Hamstrings腱を用いた膝前十字靭帯 (以下ACL) 再建術においては、強固な骨孔・移植腱間の癒合が機能的回復には不可欠である。術後には若年者ほど早期の機能的回復が得られる傾向にあることが日常臨床経験されるが、この真偽や詳細については未だ不明である。過去の研究より、ACL遺残組織由来細胞はACL再建術の際に骨・腱間の癒合を促進し、これにはACL遺残組織内のCD34陽性細胞が貢献している可能性があることが示されている。研究者らは過去にヒトACL遺残組織由来細胞の増殖能・多分化能 (骨新生・血管新生) およびCD34陽性細胞の割合が加齢と共に低下することを*in vitro*にて示した。本研究ではACL損傷患者の遺残靭帯由来細胞の患者年齢による治癒促進能力の違いを動物モデルを用いて検討した。

対象と方法

初回ACL損傷に対して鏡視下ACL再建術を施行された10歳代および30歳代の患者を対象とした。鏡視下ACL再建術中にACL損傷部より組織を採取し、その後細胞を分離抽出した。動物モデルとして免疫不全ラット計60匹の片側ACLを人為的に切断し、同側の自家長趾屈筋腱を移植腱としてACL再建術を施行した。その後、10歳代、30歳代のヒトACL遺残組織由来細胞をそれぞれラット膝関節内に注射し、それぞれGroup 10s、Group 30sとした。また対照群として術後にphosphate-buffered saline (PBS) のみ膝関節内に注射したGroup PBSを作成した。組織学的評価、免疫組織化学的評価、画像評価、および生体力学的評価を行い、各群間の差異を検討した。

結果

組織学的評価では、Movat-pentachrome染色で青色に染色される内軟骨様骨化箇所や、その後の骨・腱間の癒合所見が他の2群にくらべ早期に認められた。免疫組織化学的評価では、骨孔と腱の境界部にGroup 10sにおいてラットの血管に一致してヒト由来血管内皮細胞・骨芽細胞が有意に多くみられ、活発なhuman-cell derived vasculogenesis、osteogenesisを示していると考えられた。ラット由来血管内皮細胞・骨芽細胞も骨孔と腱の境界部にGroup 10sにおいて有意に多く認められ、活発なintrinsic angiogenesis、osteogenesisを示していると考えられた。画像評価では、関節面より3 mm遠位の脛骨骨孔断面積を計測して術直後との面積比を算出したところ、術後4、8週時点においてGroup 10sで他の2群に比べ有意な骨孔面積の縮小が見られた。生体力学的評価では、引張試験でGroup 10sにおいて他の2群に比べ有意に高い破断強度を認めた。破断部位はGroup 30s、Group PBSにおいては骨孔・移植腱間、Group 10sでは腱実質で主に見られた。

考察と結論

組織学的評価に関しては、10歳代のACL遺残組織由来細胞が30歳代に比べより骨増殖を促進したと考えられる。免疫組織学的評価に関しては、過去に骨新生と血管分化は骨・腱間癒合に重要であるとされ、本研究では直接的効果 (human-cell derived) および間接的効果 (intrinsic) によりGroup 10sで骨・腱間の癒合が促進されたと考えられる。画像評価に

関しては、過去に骨・腱接合部の治癒程度や接着強度は移植腱周囲の骨量に影響されるとされ、10歳代の ACL 遺残組織由来細胞が高い骨・腱間癒合効果を持つことが画像評価でも認められたと考えられる。生体力学的評価に関しては、過去に骨・腱接合部のコラーゲン線維の増生や組織学的な治癒と引張試験における破断強度は関連するとされ、10歳代の ACL 遺残組織由来細胞は生体力学的にも高い骨・腱間癒合促進効果を示したと考えられる。

これまでヒト ACL 遺残組織由来 CD34 陽性細胞が骨・腱間癒合を促進すること、および CD34 陽性率、増殖能・多分化能は加齢と共に低下することが示されていることより、本研究では若年者由来細胞の高い CD34 陽性率、増殖能・多分化能が骨・腱間癒合を促進したと考えられる。臨床的には、若年者ほど可能な限り術中に ACL 遺残組織を温存することが勧められる。本研究は膝前十字靭帯損傷患者の遺残靭帯由来細胞の患者年齢による治癒促進能力の違いを、動物モデルを用いて検討したものであるが、若年者由来の細胞ほど治癒促進能力が高いという点を初めて解明した点におい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。