



## Influence of Injury-to-Surgery Interval on the Healing Potential of Human Anterior Cruciate Ligament-Derived Cells

Inokuchi, Takao

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2017-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6885号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006885>

※ 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

## Influence of Injury-to-Surgery Interval on the Healing Potential of Human Anterior Cruciate Ligament-Derived Cells

膝前十字靱帯損傷膝遺残組織の治癒能における受傷時期が及ぼす影響

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：黒田良祐教授)

井口 貴雄

### 【背景・目的】

膝前十字靱帯(以下 ACL)の損傷は膝関節における外傷で高頻度に生じるもの一つである。ACL 損傷は自然治癒しないとされ、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。

また、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。しかし、実際は患者ごとの特性により治癒能が異なることが予想される。本研究ではその因子の一つである、受傷から手術までの期間の相違がヒト ACL 遺残組織由来細胞における骨-腱間の癒合能に及ぼす影響について免疫不全ラット 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患者で受傷から手術までの期間が 3 か月未満の Early 群、3 か月以降の Chronic 群、それぞれ 5 名の ACL 損傷部断端より組織を採取・細胞分離した。受傷から手術までの期間は Early 群が平均 1.9 ヶ月、Chronic 群が平均 7.9 ヶ月であった。年齢および男女比において 2 群間で有意差は無かった。それぞれの群で得られた細胞表面マーカーを fluorescence activated cell sorting (FACS) を用いて評価し、それぞれの増殖能も比較した。

また、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75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（Early群、Chronic群）のヒトACL遺残組織由来細胞をラット膝関節内に注射（ $5 \times 10^5$  cells / ラット）し、それぞれGroup Early、Group Chronic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）、術直後および術後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】

FACSによる細胞表面マーカー評価では、passage0におけるCD34陽性率はEarly群がChronic群と比較し有意に高値を示した。また、増殖能は、Early群がChronic群より有意に高い値を示した。

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 Early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 Early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 Early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 Early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 Early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 Early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。免疫組織化学的評価項目においてGroup Chronic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 Earlyで他の2群に比べ有意な骨孔面積の縮小が見られた。Group Chronic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 Early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 Chronic・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 Earlyにおいては5例中1例のみであり残りの4例では移植腱実質で破断した。Group Chronic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 Early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、ACL断裂後3ヶ月未満のACL遺残組織由来細胞は断裂後3ヶ月以降のACL遺残組織由来細胞に比べより骨-腱癒合を促進すると考えられる。

免疫組織学的評価においてGroup Early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 Early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 Early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、Group Early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 Early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、Group Early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Group EarlyのACL遺残組織由来細胞はGroup Chronic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より、本研究ではACL断裂受傷後早期における組織中には高いCD34陽性率、増殖能・多分化能を有する細胞が存在し、骨-腱間癒合を促進したと考えられる。

### 【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、ACL断裂後3ヶ月未満の遺残組織由来細胞は受傷後3ヶ月以降の遺残組織由来細胞に比べて骨-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 2679 号   | 氏名 | 井口 貴雄 |
| 論文題目<br>Title of<br>Dissertation | <p>Influence of Injury-to-Surgery Interval on the Healing Potential of Human Anterior Cruciate Ligament-Derived Cells</p> <p>膝前十字靭帯損傷膝遺残組織の治癒能における受傷時期が及ぼす影響</p> |    |       |
| 審査委員<br>Examiner                 | <p>主査<br/>眞庭 謙一<br/>Chief Examiner</p> <p>副査<br/>井口 貴雄<br/>Vice-examiner</p> <p>副査<br/>溝洋知司<br/>Vice-examiner</p>  |    |       |

(要旨は1,000字~2,000字程度)

膝前十字靭帯(以下 ACL)の損傷は膝関節における外傷で高頻度に生じるもの一つである。ACL 損傷は自然治癒しないとされ、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。しかし、実際は患者ごとの特性により治癒能が異なることが予想される。本研究ではその因子の一つである、受傷から手術までの期間の相違がヒト ACL 遺残組織由来細胞における骨-腱間の癒合能に及ぼす影響について免疫不全ラット ACL 再建モデルを用いて検討した。

研究方法として、初回 ACL 損傷に対して鏡視下 ACL 再建術を施行された患者で受傷から手術までの期間が 3 か月未満の Early 群、3 か月以降の Chronic 群、それぞれ 5 名の ACL 損傷部断端より組織を採取・細胞分離した。受傷から手術までの期間は Early 群が平均 1.9 ヶ月、Chronic 群が平均 7.9 ヶ月であった。年齢および男女比において 2 群間で有意差は無かった。それぞれの群で得られた細胞表面マーカーを fluorescence activated cell sorting (FACS) を用いて評価し、それぞれの増殖能を比較した。

また、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 75 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 (Early 群、Chronic 群) のヒト ACL 遺残組織由来細胞をラット膝関節内に注射 ( $5 \times 10^5$  cells / ラット) し、それぞれ Group Early、Group Chronic 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)、術直後および術後 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。

結果は、FACS による細胞表面マーカー評価では、passage0 における CD34 陽性率は Early 群が Chronic 群と比較し有意に高値を示した。また、増殖能は、Early 群が Chronic 群より有意に高い値を示した。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 Early 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 Early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 Early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 Early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 Early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 Early 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。免疫組織化学的評価項目において Group Chronic 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 Early で他の2群に比べ有意な骨孔面積の縮小が見られた。Group Chronic 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 Early 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 Chronic・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 Early においては5例中1例のみであり残りの4例では移植腱実質で破断した。Group Chronic と Group PBS の間には破断強度に有意差を認めなかった。

本研究は、膝前十字韌帯 (ACL) 損傷について、受傷から手術までの期間の相違がヒト ACL 遺残組織由来細胞における骨-腱間の癒合能に及ぼす影響について免疫不全ラット ACL 再建モデルを用いて検討した研究であるが、従来ほとんど行われなかった、治癒過程において、ACL 断裂後3ヶ月未満の遺残組織由来細胞は受傷後3ヶ月以降の遺残組織由来細胞に比べて骨-移植腱間の癒合をより促進することについて重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。