



The Influence of Ruptured Scar Pattern on the Healing Potential of Anterior Cruciate Ligament Remnant Cells

Kirizuki, Shinsuke

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2018-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7141号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007141>

※ 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

The Influence of Ruptured Scar Pattern on the Healing Potential of Anterior Cruciate Ligament Remnant Cells

前十字靱帯損傷後の遺残組織の形態の差異が

治癒特性に与える影響

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)

桐月 伸輔

【目的】

膝前十字靱帯（以下 ACL）は損傷されると一般的に自然治癒が見込めず、活動性の高い患者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。しかし近年、ACL 組織には治癒能が備わっているという報告がなされるようになってきた。我々は急性期の ACL 損傷部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てきた。またラット・イヌ ACL 再建モデルにおいて、ヒト ACL 損傷部組織中の細胞群または損傷部組織を移植することで骨孔の縮小、骨・腱間の癒合促進を認めることを報告した。さらに ACL 損傷患者において ACL 損傷部組織を移植腱に縫合した 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 評価で骨孔拡大の抑制が確認され、骨・腱間結合治癒の促進効果が確認されたが術後の臨床成績の有意な改善は認められなかった。また ACL 損傷部組織の治癒能は患者ごとの背景(年齢、受傷から手術までの期間)によって異なることも当研究室から報告しており、臨床応用していくためには治癒能に影響を及ぼす因子の更なる検討が必要であると考え。急性期の ACL 損傷膝において関節内のどこにも再接着していない ACL 損傷部組織の形態には多量の血腫が集積していることがしばしば観察される。そこで関節内のどこにも再接着していない形態の ACL 損傷部組織には豊富な CD34 陽性細胞が含まれており、高い治癒能を有しているのではないかと仮定した。本研究の目的は、術中におけるヒト ACL 損傷部組織の形態とその治癒能との関連を調査することである。

【方法】

対象となったのは年齢が 35 歳未満、受傷からの期間が 3 カ月以内に初回関節鏡視下 ACL 再建術を施行した患者の 39 膝から回収した ACL 損傷部組織である。関節鏡視下で ACL 損傷部組織の形態を Crain らが提唱した分類(Crain I:後十字靱帯に再接着、Crain II:大腿骨顆間の天井部に再接着、Crain III:大腿骨の本来の解剖学的付着部位よりも前方部に再接着、Crain IV:盲端となっている)で評価した。研究の初期段階で Crain IV に分類された ACL 損傷部組織が後述する評価項目の細胞増殖能が高いことが分かったため Crain I～III に分類された ACL 損傷部組織を Reattachment group(28 検体)、Crain IV に分類された ACL 損傷部組織を Non-reattachment group(11 検体)と分類した。2 群間に受傷から期間、性別、年齢について有意差はなかった。採取した ACL 損傷部組織は細胞分離し、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、Alizarin red 染色、ALP 活性、リアルタイム PCR による Osteocalcin、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 Ulex europaeus lectin (UEA1) の染色、Tube Length 形成、リアルタイム PCR による VE-cadherin、CD31 の mRNA 発現量で評価した。軟骨分化は Pellet 培養し Toluidin blue

染色で評価し、脂肪分化は Oil red 染色にて評価した。

【結果】

Hematoxylin and Eosin 染色での評価では Reattachment group と比較して Non-reattachment group では組織内に血管と考えられる管腔構造がより多く見られた。

フローサイトメトリーでの血球、血管系、間葉系の表面マーカー陽性率の評価を行ったところ CD34 陽性率において Non-reattachment group は Reattachment group より有意に高値を示していた ($p<0.05$)。

細胞増殖能を比較したところ Passage2～4 にかけて Non-reattachment group は Reattachment group より有意に高い増殖能を示していた ($p<0.05$)。

骨分化能では、ALP 染色、Alizarin red 染色で Non-reattachment group は Reattachment group より強く染色される傾向がみられ、ALP 活性、リアルタイム PCR での Osteocalcin、Runx2 の mRNA 発現率においても Non-reattachment group は Reattachment group より有意に高い骨分化能を示していた ($p<0.05$)。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や Tube length 形成、リアルタイム PCR での VE-cadherin、CD31 の mRNA 発現率において Non-reattachment group は Reattachment group より有意に高い血管内皮分化能を示していた ($p<0.05$)。

軟骨分化能では Toluidin blue 染色、脂肪分化能では Oil red 染色で、Non-reattachment group は Reattachment group より強く染色される傾向がみられた。

【考察】

ACL 損傷部組織には、高い細胞増殖能、多分化能を有する細胞群を備えており、患者ごとの因子として年齢や受傷からの期間がその治癒能に影響を与えることを今まで報告してきた。本研究では ACL 損傷部組織の形態の違いも重要な因子であることを示しており、Non-reattachment group に分類される ACL 損傷部組織に含まれる細胞は他の形態の組織の細胞と比較して CD34 陽性細胞の割合が高く、高い細胞増殖能、多分化能を有していることから高い治癒能を有していることを示唆する結果となった。Song らはウサギの ACL 再建モデルにおいて力学的な刺激を加えると未分化な細胞が分化していくことを報告している。本研究では Reattachment group に分類される ACL 損傷部組織は関節内に再接着の後、力学的な刺激が加わった結果、幹細胞が分化し治癒能が失われてしまったことや Non-reattachment group に分類される ACL 損傷部組織には血管構造が多数みられたことなどから血管内皮前駆細胞である CD34 陽性細胞が多く出現し、影響を与えた可能性が考えられる。

【結語】

本研究では Non-reattachment group に分類される ACL 損傷部組織には高い CD34 陽性細胞率細胞増殖能、分化能を有しており、特に骨芽細胞分化能、血管内皮細胞分化能が高いことが示された。そのため ACL 損傷部組織の温存や移植腱に組織を移植するような ACL 再建術を行う場合には ACL 損傷部組織の形態も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 2764号	氏 名	桐月伸輔
論 文 題 目 Title of Dissertation	The Influence of Ruptured Scar Pattern on the Healing Potential of Anterior Cruciate Ligament Remnant Cells 前十字靱帯損傷後の遺残組織の形態の差異が 治癒特性に与える影響		
審 査 委 員 Examiner	主 査 佐々木 正 Chief Examiner 副 査 勝 = 郁夫 Vice-examiner 副 査 味本 徹夫 Vice-examiner		

神戸大学大学院医学(系)研究科(博士課程)

(要旨は1,000字～2,000字程度)

研究者らは現在までに、前十字靱帯(ACL)損傷部組織は高い増殖能、多能性幹細胞を備えた CD34 陽性細胞を多く含むことを in vitro で証明し、その細胞群、損傷部組織が骨・靱間結合の早期治癒に貢献することを前臨床試験・臨床試験を通じて報告している。しかし、個々の患者特性によりその治癒能が異なることが予想され、年齢や受傷からの期間により細胞が有する増殖能、多分化能が異なることが分かってきている。しかし関節内における ACL 損傷部組織の形態の差異がどのような影響を与えるかは明らかになっていない。本研究の目的は ACL 損傷部組織の形態が生物学的活性に与える影響について検討することである。

【方法】

対象は年齢が35歳未満、受傷からの期間が3カ月以内に初回関節鏡視下 ACL 再建術を施行した患者の39膝から回収した ACL 損傷部組織である。関節鏡視下で ACL 損傷部組織の形態を確認し関節内に再接着している群(Reattachment group: 28 検体)、どこにも再接着していない群(Non-reattachment group: 11 検体)の2群に分類した。ACL 損傷部組織の断端部を採取、細胞を分離してフローサイトメトリーでの細胞表面マーカー発現率、細胞増殖能、骨・血管内皮・軟骨・脂肪への分化能を評価し、2群間で比較、検討した。

【結果】

フローサイトメトリーでの血球、血管系、間葉系の表面マーカー陽性率の評価を行ったところ CD34 陽性率において Non-reattachment group は Reattachment group より有意に高値を示していた ($p<0.05$)。

細胞増殖能を比較したところ Passage2～4 にかけて Non-reattachment group は Reattachment group より有意に高い増殖能を示していた ($p<0.05$)。

骨分化能では、ALP 染色、Alizarin red 染色で Non-reattachment group は Reattachment group より強く染色される傾向がみられ、ALP 活性、リアルタイム PCR での Osteocalcin、Runx2 の mRNA 発現率においても Non-reattachment group は Reattachment group より有意に高い骨分化能を示していた ($p<0.05$)。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細胞数や Tube length 形成、リアルタイム PCR での VE-cadherin、CD31 の mRNA 発現率において Non-reattachment group は Reattachment group より有意に高い血管内皮分化能を示していた ($p<0.05$)。

軟骨分化能では Toluidin blue 染色、脂肪分化能では Oil red 染色で、Non-reattachment group は Reattachment group より強く染色される傾向がみられた。

【考察】

Non-reattachment group に分類される ACL 損傷部組織に含まれる細胞は他の形態の組織の細胞と比較して高い治癒能を有していることを示唆する結果となった。本研究では Reattachment group に分類される ACL 損傷部組織は関節内に再接着の後、力学的な刺激が加わった結果、幹細胞が分化し生物学的活性が失われてしまったことなどが影響を与えたと考えられる。

【結論】

本研究では Non-reattachment group に分類される ACL 損傷部組織には高い CD34 陽性細胞率細胞増殖能、分化能を有しており、特に骨細胞分化能、血管内皮細胞分化能が高いことが示された。そのため ACL 損傷部組織の温存や移植腱に組織を移植するような ACL 再建術を行う場合には ACL 損傷部組織の形態も考慮するべきである。

本研究は従来明らかにされていなかった ACL 損傷部組織の形態と生物学的活性との関連について初めて報告したものであり、ACL 損傷膝に対する損傷部組織を用いた新たな治療アプローチの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。