

氏名	長谷川 彰彦
(ふりがな)	(はせがわ あきひこ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成26年1月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Cellular and extracellular matrix changes in anterior cruciate ligaments during human knee aging and osteoarthritis (ヒト膝関節の加齢および関節症性変化に伴う前十字靭帯細胞と細胞外マトリックスの変化に関する研究)
論文審査委員	(主) 教授 佐 浦 隆 一 教授 植 野 高 章 教授 上 田 晃 一

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《研究の目的》

近年われわれは、変形性関節症（以下OA）に罹患した膝のほとんどにおいて、前十字靭帯（以下ACL）に変性を生じていることを報告したが、ACLの細胞および細胞外マトリックスが加齢およびOA進行の過程でどのように変化するかは明らかにされていない。本研究の目的は、加齢およびOAの進行に伴うACLの細胞および細胞外マトリックスの変化を明らかにする事である。

《方 法》

ヒト新鮮屍体80体、150膝（年齢23歳～94歳）を対象とした。関節軟骨およびACLを肉眼的および組織学的に評価した。ACLの組織学的検討には長軸切片および短軸切片のHematoxylin&Eosin染色（以下H&E染色）標本を作成し、定量的スコアリングを用いて評価した。加齢およびOA変化に伴うACLの細胞および細胞外マトリックスの変化を明らかにするために、対象を正常群（45歳未満、ACL、軟骨ともに正常、n=10）、加齢群（60歳以上、ACL、軟骨ともに軽度変性あり、n=37）、変性群（60歳以上、ACL、軟骨ともに中等度～重度変性あり、n=27）に分類し、H&E染色標本で細胞密度、細胞構成を調査した。また、各群の代表的サンプル（正常群n=6、加齢群n=12、変性群n=10）の長軸切片を用いて細胞外マトリックスの構成要素（I型、II型、III型、X型コラーゲンおよびアグリカン）および、その分解酵素（MMP-1、MMP-3、MMP-13）、分化マーカー（Sox-9、Runx-2、Scleraxis）、細胞増殖マーカー（Ki-67）、間葉系前駆細胞マーカー（STRO-1）、筋線維芽細胞マーカー（ α -SMA）の発現について免疫組織化学染色を用いて調査した。さらに、MMP-1、MMP-3、MMP-13の発現を定量するため、各群より採取、培養したACLの細胞を用いてWestern blottingを行った。

《結 果》

ACLの細胞数は加齢に伴い減少したが、変性ACLの細胞数は血管周囲に線維芽細胞様の細胞集合体が、無血管野に軟骨細胞様の細胞集合体が形成されることにより増加した。MMP-1、MMP-3、MMP-13の発現は加齢により減少したが、変性ACLでは主に軟骨細胞様の細胞集合体において発現が増加した。I型コラーゲンは正常および変性ACLの靭帯実質部全体に発現していたが、変性ACLの軟骨細胞様の細胞集合体の周囲では発現が減少していた。II型、X型コラーゲンおよびアグリカンは軟骨細胞様の細胞集合体の周囲でのみ発現が認められ、同部位にはIII型コラーゲンも発現していた。軟骨細胞分化マーカーであるSox-9、肥大軟骨細胞のマーカーであるRunx-2、および腱、靭帯特異的マーカーであるScleraxisは変性ACLの軟骨細胞様の細胞集合体において発現が増加していた。筋線維芽細

胞のマーカーである α -SMAや、間葉系前駆細胞のマーカーであるSTRO-1は加齢に伴い減少した。一方、変性ACLにおいて形成された細胞集合体は α -SMA、STRO-1ともに陽性であった。

《考 察》

ACLの細胞は加齢により減少し、細胞の増殖能および活性が低下していた。また、変性ACLにおいては靭帯細胞の構成に著明な変化を認めた。血管周囲にみられる線維芽細胞様の細胞集合体は高い増殖能をもっていたが、これらは間葉系前駆細胞および筋線維芽細胞を含む細胞が血流により動員され、増殖したものと考えられた。このことから変性ACLは再生能を有することが示唆された。一方で、無血管野にみられた軟骨様の細胞集合体では細胞外マトリックスの分解酵素であるMMP-1、MMP-3、MMP-13の発現が増加しており、その周囲では靭帯実質の主な構成要素であるI型コラーゲンの発現が低下し、II型、III型、X型コラーゲンおよびアグリカンが発現していた。これらのことから変性ACLにおいて異常に分化した軟骨様の細胞集合体はI型コラーゲンの産生低下や異常な細胞外マトリックスの産生に関与し、ACLの生体力学的破綻につながる可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

前十字靭帯(以下ACL)は膝関節の安定性に寄与しており、ACLの断裂は変形性関節症(以下OA)の進行に関与することが知られている。近年、申請者らはOA膝のほとんどにおいて、ACLに変性を生じていることを報告したが、加齢およびOA進行の過程でACLの細胞および細胞外マトリックスがどのように変化するかについて詳細に調べた研究はない。

そこで、申請者はヒト新鮮屍体80体、150膝(年齢23歳～94歳)を対象として、正常群(45歳未満、ACL、軟骨ともに正常)、加齢群(60歳以上、ACL、軟骨ともに軽度変性)、変性群(60歳以上、ACL、軟骨ともに中等度～重度変性)に分類して、加齢およびOA変化に伴うACLの細胞および細胞外マトリックスの変化をHematoxylin&Eosin染色および免疫組織化学染色を用いて検討し、また、培養したACLの細胞を用いてWestern blottingを行った。

本研究の結果から、ACLの細胞数は加齢に伴い減少するが、変性ACLの細胞数は、血管周囲に線維芽細胞様の細胞集合体が形成され、無血管野に軟骨細胞様の細胞集合体が形成されることにより増加することが明らかにされた。そして申請者は、変性ACLの血管周囲にみられる線維芽細胞様の細胞集合体を間葉系前駆細胞および筋線維芽細胞を含む細胞の動員および増殖の結果と考察し、このことからACLが再生能を有する可能性を示している。また、無血管野に形成された軟骨細胞様の細胞集合体では細胞外マトリックス分解酵素(MMP-1、MMP-3、MMP-13)の発現が増加する一方、その周囲では靭帯実質の主な構成要素であるI型コラーゲンの発現が低下し、II型、III型、X型コラーゲンおよびアグリカンが発現していることも明らかにしており、変性ACLにみられる異常に分化した軟骨様の細胞集合体が異常な細胞外マトリックスの産生に関与し、ACLの生体力学的破綻につながる可能性も提示した。

今回の知見は、加齢およびOA進行に伴うACL変性の詳細を明らかにし、OA膝におけるACL断裂の病態解明に寄与するものである。

以上により、本論文は本学大学院学則第11条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Arthritis research & therapy 15(1): R29, 2013 Feb doi: 10.1186/ar4165

<http://arthritis-research.com/content/15/1/R29> <オンライン掲載> in press