

氏 名	星 山 芳 亮
(ふ り が な)	(ほ し や ま よ し あ き)
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 27 年 1 月 28 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	Chondrocyte Clusters Adjacent to Sites of Cartilage Degeneration have Characteristics of Progenitor Cells (変性した軟骨周囲に残存するクラスター化した軟 骨細胞は前駆細胞様の特性を持つ)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 佐 浦 隆 一 教授 植 野 高 章 教授 廣 瀬 善 信

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目 的》

変形性関節症 (osteoarthritis、OA) は、関節疾患の中で最も頻度が高く、関節軟骨の破壊と消失が主たる病態である。OA における軟骨変性とリモデリングは異常な細胞活動の結果であり、その代表例として OA における軟骨細胞集簇塊 (クラスター) を形成することはよく知られている。

膝 OA の大きな原因の一つとして下肢のアライメント異常による荷重不均衡がある。これまで荷重負荷の増加により Fibroblast growth factor 2 (FGF2) の発現が上昇し、軟骨細胞のクラスター化を誘導することが報告されている。しかし、生体膝における軟骨細胞クラスターの発現と膝関節変形との関係を詳細に検討した報告はない。

そこで本研究の目的は、内反型膝 OA 患者の大腿骨顆部内外側での軟骨細胞の性質を比較し、変形性膝関節症の病態形成における軟骨細胞の役割を明らかにすることである。

《対象と方法》

対象は内反型膝OAの診断にて全人工膝関節置換術（Total knee arthroplasty、TKA）を行った45人45膝（女性34人、男性11人）である。TKA時に切除された大腿骨の内側顆（medial femoral condyle、MFC）、内側後顆（medial posterior condyle、MPC）、外側顆（lateral femoral condyle、LFC）、外側後顆（lateral posterior condyle、LPC）より関節軟骨組織を採取した。各部位での軟骨変性の程度はSafranin-O/Fast green染色を用いたMankin scoreを指標として判定し、同時に軟骨細胞密度や細胞形態も詳細に観察した。また、MPC、LPCの軟骨細胞の生存率、軟骨細胞の特性を間葉系前駆細胞マーカーであるSTRO-1、細胞増殖関連因子のFGF2、Ki-67 に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、その発現の程度を検討した。軟骨細胞の増殖能力を検討するために、MPC、LPCより採取した軟骨細胞の平面培養による軟骨結節形成能の評価とMPCの軟骨組織培養を行った。

《結 果》

Mankin scoreで示される軟骨の変性程度は、MFC (13.3 ± 1.7)、MPC (7.8 ± 2.9) と内側コンパートメントで強い変性を示したが、外側コンパートメントの変性の程度はLFC (4.1 ± 2.7)、LPC (3.8 ± 2.2) と軽度であった ($P < 0.001$)。軟骨細胞密度は、MPC (247.3 ± 130.9) では、LFC (154.5 ± 38.0)、LPC (145 ± 35.6) に比較して高かったが、MFC (9.0 ± 30.0) には細胞がほとんど存在していなかった ($P < 0.001$)。また、軟骨細胞の形態は、MPCではクラスター細胞が多く、LFCおよびLPCでは単細胞が多かった。軟骨細胞の生存率は、MPC ($88.6 \pm 6.5\%$) がLPC ($67.7 \pm 12.7\%$) より高かった ($P = 0.02$)。免疫組織学的検討では、MPC (STRO-1: $58.7 \pm 5.9\%$; FGF2: $69.7 \pm 14.1\%$; Ki-67: $46.9 \pm 19.4\%$) はLPC (STRO-1: $7.0 \pm 11.9\%$; FGF2: $13.6 \pm 16.5\%$; Ki-67: $8.2 \pm 9.4\%$) より全ての免疫染色で陽性率が高かった ($P < 0.001$)。平面培養の結果はMPCより採取した軟骨細胞はLPCより採取した軟骨細胞よりも増殖能力が高く、また、軟骨結節形成 (MPC: 71.6 ± 73.5 ; LPC: 39.8 ± 46.7) も著明であった ($P = 0.03$)。さらに、MPCを用いた軟骨組織培養の検討

では、軟骨亀裂の消失と軟骨表層の新たな層の形成、Mankin scoreの改善を認めた (P<0.001)。

《考 察》

本研究では、同一関節内でも部位によって軟骨細胞の生物学的特性が異なることが明らかとなった。内反型膝 OA では内側コンパートメントの変性が強く、最も荷重負荷を受ける MFC では軟骨細胞はほとんど存在しなかったが、MFC 後方の MPC では Mankin score で示される関節軟骨の変性が強く認められた。また、MPC では、荷重負荷が軽度な外側コンパートメント (LFC、LPC) に比べて、クラスター形成が多く細胞密度が高かった。MPC では細胞生存率も高く、免疫組織学的検討の結果からも高い増殖能力を持つことが示された。実際に、MPC 由来軟骨細胞を用いた平面培養では高い軟骨結節形成能が観察され、組織培養でも軟骨亀裂の消失と軟骨表層の新たな層の形成がみられた。

これらの差異は内反変形による内側、外側コンパートメントの荷重分布の不均衡によるものと推察されるが、荷重部近傍でのクラスター化した軟骨細胞は高い増殖能を有し、内軟骨性骨化機序による骨棘形成や荷重に伴うリモデリング、あるいは関節軟骨の修復機転などに関与している可能性がある。

《結 論》

変性関節軟骨周辺の軟骨細胞は高い増殖能をもつ前駆細胞としての特徴を有し、荷重に関連した関節のリモデリングに重要な役割を演じていることが明らかであり、関節軟骨の修復メカニズムを利用した OA 治療の有用な細胞源になる可能性が示された。

論文審査結果の要旨

変形性関節症（以下 OA）では軟骨組織に軟骨細胞集簇塊（クラスター）が観察されるが、膝 OA におけるクラスターの役割についての詳細な報告はない。

申請者は内反型膝 OA の診断にて全人工膝関節置換術（Total knee arthroplasty、TKA）を行った 45 人 45 膝の大腿骨顆部 4 箇所より軟骨組織を採取し、Safranin-O/Fast green 染色にて各部位での軟骨変性の程度とクラスターの局在を調査した。また、内側後顆、外側後顆の軟骨細胞の細胞生存率、種々の成長因子や細胞シグナル蛋白の免疫組織学的検索、さらに内側後顆、外側後顆由来軟骨細胞の軟骨結節形成能や組織培養手法を用いた内側後顆の自己修復能を検討した。

本研究の結果から申請者は、内反型膝 OA では内側顆では変性が最も強いが、その周囲に残存する軟骨組織にはクラスターを形成する軟骨細胞が多く存在し、生存率と増殖能力は外側顆の軟骨細胞に比べて高く、前駆細胞の特性を持つことを示した。また、平面培養手法を用いて、内側後顆のクラスター形成軟骨細胞の高い増殖能力、軟骨結節形成能力を示し、組織培養の手法を用いた組織修復能力の検討から、クラスター化した軟骨細胞は高い増殖能力と軟骨結節形成能力をもち、荷重に関連した関節のリモデリングに重要な役割を演じていることを明らかにした。

今回の知見は、膝 OA の関節軟骨に存在するクラスターの局在とその役割の一端を明らかにして OA の病態解明に寄与すると同時に、これらの細胞が関節軟骨の修復メカニズムを利用した OA 治療の有用な細胞源になる可能性を示した。

以上により、本論文は本学大学院学則第11条第1項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)

Journal of Orthopaedic Research 33(4): 548-55, 2015