

氏名(本籍)	みやき 味八木	しげる 茂(神奈川県)
学位の種類	博士(医学)	
学位記番号	博甲第3436号	
学位授与年月日	平成16年3月25日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
審査研究科	医学研究科	
学位論文題目	The characteristic of ruptured and normal anterior cruciate ligament-derived cells. (ヒトの断裂した正常前十字靭帯由来細胞の性質)	
主査	筑波大学教授	医学博士 野口雅之
副査	筑波大学助教授	医学博士 斎田幸久
副査	筑波大学助教授	博士(学術) 高橋秀人
副査	筑波大学講師	博士(医学) 花井修次

論文の内容の要旨

(目的)

膝前十字靭帯は、膝の安定に重要であるにも関わらず、特にスポーツなどにおいて頻繁に損傷する組織である。しかしその自己修復能は非常に乏しいので自己腱、靭帯を犠牲とした再建術が行われているが、保存療法により治癒するとの報告もあり断裂部の修復に関わる細胞の存在が示唆されている。

前十字靭帯損傷における修復において骨髄由来の未分化細胞や滑膜細胞などの関与が推定されているが、癒痕を形成した損傷靭帯組織にどのような性質を持った細胞が存在しているのかは不明である。そこで本研究は、断裂した前十字靭帯にどのような性質を持った細胞集団が存在するのかを明らかにすることを目的とした。

(対象と方法)

細胞の準備: 前十字靭帯損傷患者(18-23才)5人より事前に承諾を得て靭帯再建時に鏡視下で断裂した前十字靭帯断端部組織を採取した。対照として人工膝関節置換術時に採取した正常靭帯を用いた。採取した組織は、phosphatebuffer saline (PBS) で洗浄し細かく刻み、細胞培養プレートに静置後、遊走してきた細胞を培養し実験に用いた。

フローサイトメトリーを用いた細胞表面マーカーの解析: 断裂した前十字靭帯由来細胞について13種類の細胞表面マーカー(CD34, CD73, CD105など)の発現についてフローサイトメトリーを用いて解析した。

各種細胞への分化誘導及びその評価: 骨への分化を調べるために、ascorbate, β -glycerophosphate, dexamethasoneを含むDMEM/10% FBSで培養し、alkaline phosphatase染色やArizarin red S染色を行った。また、軟骨への分化は、TGF- β 3等を含む無血清DMEMで高密度ベレット培養した。またSafranin O染色を行ってプロテオグリカンの形成を観察した。軟骨細胞の分化マーカーである2型、10型コラーゲン、アグリカン、Sox9の遺伝子発現を調べた。さらに脂肪細胞への分化は、コンフルエントな状態でdexamethasone, isobutylmethylxanthine, insulinを含むDMEM high glucose/10% FBSで培養しOil Red O

染色を行った。脂肪細胞特異的な分化マーカーである LPL, aP2, PPAR γ の遺伝子発現を調べた。

(結果)

断裂した前十字靭帯由来細胞および正常の前十字靭帯由来細胞は共に、線維芽細胞様で紡錘形の形態であった。

フローサイトメトリーを用いた細胞表面マーカーの解析では、断裂したおよび正常の前十字靭帯由来細胞は共に、CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 を強発現し、CD55, CD106 は弱発現であった。また、造血系、血球系細胞等の細胞表面マーカーである CD31, CD34, CD45, CD140a は陰性であった。

断裂した前十字靭帯由来細胞では、骨誘導培地では結節を形成し、alkaline phosphatase と Arizarin red S 染色共に強陽性であった。軟骨へ誘導した組織染色では、軟骨細胞特有の形態形成を観察し、Safranin O 染色も陽性であった。脂肪誘導培地では、脂肪滴をもつ細胞が多数観察でき Oil Red O 染色でも陽性であった。また各々の分化マーカーである遺伝子の発現も確認することができた。一方、正常前十字靭帯由来細胞では、ほぼ全て陰性または弱陽性であった。

(考察)

本研究は、断裂したおよび正常前十字靭帯由来細胞群が、多分化能を持つ間葉系幹細胞で報告されている細胞表面マーカーの発現パターンと類似し、断裂した靭帯由来細胞でのみ高効率に骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への多分化能をもつことを発見した。断裂した前十字靭帯由来細胞群は、損傷による刺激によって誘導された骨髄由来間葉系幹細胞であるのか、滑膜由来であるのか、正常前十字靭帯組織中に存在している細胞であるのかの起源を特定することはできない。しかし、靭帯損傷部に多分化能を持つ細胞が存在することを発見したことで、Scaffold (足場)、成長因子、物理的刺激等の適切な環境を整え靭帯再生を誘導できれば、再建靭帯の修復促進や損傷靭帯の一次修復が可能になると考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究によってヒト前十字靭帯由来の細胞群には、骨髄由来間葉系幹細胞のように骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞へ分化することができる多分化能を有する細胞が存在することが明らかになった。著者が述べるように将来的にこの細胞を使ってヒト靭帯の再生や損傷の修復が促進できれば整形外科領域の大きな進歩につながる意味ある研究と考える。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。