

# 論文内容の要旨

論文提出者氏名 小見山洋人

## 論文題目

The fate and role of bone graft-derived cells after autologous tendon and bone transplantation into the bone tunnel.

## 論文内容の要旨

前十字靭帯 (anterior cruciate ligament: ACL) 再建術では、移植腱としてハムストリングが広く用いられ、良好な臨床成績が報告されている。ACL 再建術を成功させるためには、移植腱のリモデリングが大切な要素であるが、リモデリングには長期間を要する。手術からスポーツ復帰までの期間を短縮させるためには、移植腱のリモデリングを促進させることが重要である。その方法を開発するためには、移植後の組織における細胞の動態解析が必要である。Green fluorescent protein (GFP) 遺伝子改変ラットを用いた腱の骨孔内への移植モデルでは、骨孔周囲の骨組織由来の細胞が移植腱に移行し、早期の移植腱のリモデリングに関与している。一方、ACL 再建術では、骨孔と移植腱の適合性をよくするため、自家骨を移植腱と骨孔の間に移植することがある。移植骨は生体力学的に、移植腱の初期固定性を向上させる働きがあるが、移植骨の生物学的な役割は不明である。本研究の目的は、骨孔内に腱と骨移植を併用したモデルを作製し、移植腱のリモデリング早期における、移植骨由来細胞の動態と機能を解明することである。

動物として 12 週齢の雌 GFP ラットと Sprague-Dawley (SD) 野生型ラットを用いた。SD ラットの右大腿骨顆部に骨孔を作製して、別の SD ラットのアキレス腱と GFP ラットの大腿骨から採取した移植骨を骨孔に挿入した。対照として、右大腿骨顆部の骨孔内にアキレス腱のみを移植した。移植直後、1, 2, 4 週後に Hematoxylin-eosin および propidium iodide 染色、HSP47 およびマクロファージの免疫染色による組織学的検討を行った。共焦点レーザー顕微鏡を用いて GFP 陽性細胞の動態を追跡した。免疫染色により、I 型および III 型コラーゲンの定量評価を行った。移植 2, 4 週後に、張力試験機で最大破断強度を測定した。

移植 1 週後で、移植腱の細胞は移植直後と比べ著しく減少した。移植 4 週後で、骨孔と移植腱の癒合は良好であった。移植腱内の細胞は増加し、血管新生もみられた。移植 1 週後で、移植腱内に GFP 陽性細胞はなかった。移植 2 週後で、移植腱内に少数の GFP 陽性細胞がみられた。移植 4 週後では、移植腱内の GFP 陽性細胞は増加し、その形態は線維芽細胞様であった。移植 2 週後で、移植腱内には多数の propidium iodide 陽性細胞が観察され、一部が GFP 陽性細胞と一致していた。移植 4 週後で、移植骨に少数の HSP47 陽性細胞を認めたが、マクロファ

ージ陽性細胞はみられなかった。移植腱内には多くの HSP47 陽性細胞とマクロファージ陽性細胞を認め、それぞれの一部は GFP 陽性細胞と一致していた。移植 2 週後で、I 型コラーゲンの染色面積の割合は、対照群  $61.0 \pm 12.7\%$ 、骨移植群  $23.7 \pm 8.0\%$ 、III 型コラーゲンは、対照群  $27.9 \pm 5.7\%$ 、骨移植群  $15.7 \pm 4.4\%$  であった。移植 2 週後における破断強度は、対照群平均  $6.3N$ 、移植群平均  $7.5N$ 、4 週後で、対照群平均  $13.0N$ 、移植群平均  $16.1N$  であった。

ACL 再建後の移植腱のリモデリング過程では、移植腱内の細胞動態と血管新生が重要である。本研究では腱と骨移植を併用したモデルであるが、移植直後に移植腱内の細胞はいったん減少し、その後細胞数の増加や血管新生とともに移植腱がリモデリングされることが明らかとなった。一方、ACL 再建時における移植骨の併用は生体力学的に優れ、骨と腱の癒合を促進する可能性がある。移植 4 週後では 2 週後より破断強度が増強し、移植 2、4 週後の骨移植群の破断強度は、対照群に比べて高かった。骨移植を併用することは初期固定力に有用であるだけでなく、生物学的にも有用あると考えた。移植骨には、分化能を有する未分化間葉系細胞が含まれている。本研究では、移植腱内に浸潤した細胞の一部は GFP 陽性移植骨由来細胞と一致しており、移植骨由来細胞が移植腱に移動して生着することを確認した。HSP47 陽性細胞やマクロファージ陽性細胞は、移植 4 週後で移植腱内にみられ、GFP 陽性細胞と一部一致していた。この結果は移植骨由来の未分化間葉系細胞が、コラーゲン産生細胞やマクロファージへ分化して、移植後早期の腱のリモデリングに関与していると考えた。腱や靭帯の引っ張り強度や弾性に I 型や III 型コラーゲンなどのコラーゲン線維が必要であり、移植腱のリモデリングの評価に用いられている。移植 2 週後では、骨移植群の I 型および III 型コラーゲンの染色面積の割合が、対照群よりいずれも低下していた。骨移植は移植腱の早期のリモデリングに影響を与えていると考えた。

移植骨由来細胞は、骨孔周囲の骨組織由来の細胞と協調的に働き、移植 4 週後で移植腱へ移行しコラーゲン産生細胞またはマクロファージに分化することで移植腱の早期のリモデリングに関与していることが判明した。骨孔内に骨移植を併用することで移植腱のリモデリングが促進される可能性がある。