

学位授与番号：甲 971 号

氏 名：加藤 壮紀

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 26 年 6 月 25 日

学位論文名：

膝関節周囲靭帯および腱組織固有のコラーゲン成熟過程は細胞レベルで規定されている

—家兎 ACL、MCL、PT を用いた *in vivo*、*in vitro* での検討—

主論文名：

Distinctive collagen maturation process in fibroblasts derived from rabbit anterior cruciate ligament, medial collateral ligament, and patellar tendon *in vitro*.

(膝関節周囲靭帯および腱組織固有のコラーゲン成熟過程は細胞レベルで規定されている-家兎 ACL、MCL、PT を用いた *in vivo*、*in vitro* での検討-)

学位審査委員長：教授 安保雅博

学位審査委員：教授 吉田清嗣 教授 内田満

論文要旨

論文提出者名	加藤壮紀	指導教授名 丸毛啓史
<p data-bbox="140 376 384 414">主論文題名</p> <p data-bbox="129 450 1469 533">◎Distinctive collagen maturation process in fibroblasts derived from rabbit anterior cruciate ligament, medial collateral ligament, and patellar tendon in vitro</p> <p data-bbox="129 568 1469 651">(膝関節周囲靭帯および腱組織固有のコラーゲン成熟過程は細胞レベルで規定されている-家兎 ACL、MCL、PT を用いた in vivo、in vitro での検討-)</p> <p data-bbox="129 687 1062 725">◎Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy 2013; in press</p> <p data-bbox="129 745 1469 1070">◎(目的) 膝周囲を構成する靭帯および腱組織に含まれるコラーゲンには、組織特異的な分子間架橋パターンが誘導され、生体の要求に応じた機能を発現していることが知られている。しかし、こうした組織レベルでのコラーゲン基質の分化・成熟過程の相違が、各組織の細胞レベルで制御されているかについては明らかではない。また、コラーゲン成熟の観点から、靭帯の再生医療における最適な細胞源を決定するために、膝前十字靭帯 (ACL)、膝内側側副靭帯 (MCL)、膝蓋腱 (PT) 由来細胞を培養し、そこに形成されるコラーゲン基質の成熟過程を遺伝子および蛋白レベルで調べ、各組織から分離精製したコラーゲンと比較して検討した。</p> <p data-bbox="129 1090 1469 1509">(方法) 成熟 New Zealand 白色家兎より ACL、MCL、PT を採取し、酵素処理にて細胞を単離した後に培養した。コンフルエント後 4 週まで培養を行い、経時的に細胞基質層を採取し、透過型電子顕微鏡による形態学的観察、遺伝子発現 (リアルタイム RT-PCR) : Collagen1A1 (Col1A1)、Collagen3A1 (Col3A1)、テノモジュリン (tenomodulin)、コラーゲン架橋量を規定する酵素リジロキシダーゼ (LOX) と架橋パターンを規定する酵素比リジンヒドロキシラーゼ 2/リジンヒドロキシラーゼ 1 (PLOD2/PLOD1)、架橋分析: 未熟架橋であるダイヒドロキシリジノノルロイシン (DHLNL)、ヒドロキシリジノノルロイシン (HLNL)、成熟架橋であるピリジノリン (PYD) の分離定量、さらに各組織中のコラーゲン架橋分析を行い、in vitro の結果と比較検討した。</p> <p data-bbox="129 1529 1469 1854">(結果) 培養細胞の基質層に含まれるコラーゲン架橋分析の結果、コラーゲン基質の分化マーカーとなる DHLNL/HLNL 比は、それを制御する PLOD2/PLOD1 の遺伝子発現比に一致するように PT に比べ ACL、MCL で高値であり、それぞれ細胞レベルで腱型あるいは靭帯型コラーゲンが誘導されることが確認された。さらにコラーゲン架橋数は、LOX 遺伝子発現と一致するように ACL、MCL、PT の順に高値を示した。また Col1A1、Col3A1 遺伝子発現は、ACL が MCL、PT に比べ高値であった。また tenomodulin は、いずれの細胞にも発現が見られたが、PT でもっとも強い発現が観察された。</p> <p data-bbox="129 1874 1469 2054">(考察) 今回の検討から、靭帯と腱組織で異なるコラーゲンの成熟過程は細胞レベルで制御されていることが明らかになった。さらに ACL 細胞は増殖能では他と比べて劣っているが、基質合成能、コラーゲン成熟能といった点では優れており、靭帯の再生医療における細胞源としての可能性が示唆された。</p>		

論文審査の結果の要旨

加藤壮紀氏提出の学位申請論文は、主論文1編1冊の英文論文と副論文1編1冊より成る。主論文は、『Distinctive collagen maturation process in fibroblasts derived from rabbit anterior cruciate ligament, medial collateral ligament, and patellar tendon in vitro. (膝関節周囲靭帯および腱組織固有のコラーゲン成熟過程は細胞レベルで規定されている一家兎 ACL、MCL、PT を用いた in vivo、in vitro での検討)』と題する KNEE SURGERY SPORTS TRAUMATOLOGY ARTHROSCOPY (2.676)に掲載された英文論文で、東京慈恵会医科大学整形外科学講座の丸毛啓史教授の研究指導により作成されたものである。以下に、これらの論文に基づく thesis の要旨と論文審査委員会の結果を報告する。

【背景】 膝前十字靭帯 (ACL) は、急激な方向転換を伴うスポーツ活動により、しばしば損傷する膝関節内の構造の一つである。ACL は、他の膝周囲靭帯および腱組織に比べて組織修復能が低いことが知られている。よって、ACL 損傷に対して、縫合などの一次修復のみでは不十分であり、多くの場合は移植腱を用いた ACL 再建術が必要となる。

【目的】 靭帯、腱組織の細胞あるいは組織の特異性を理解することは、組織工学的な ACL 再建の cell source の選択の上で極めて重要である。そこで、白色家兎の ACL、膝内側側副靭帯 (MCL)、PT 由来細胞を培養し、そこに形成されるコラーゲン基質の成熟過程を遺伝子および蛋白レベルで検討し、各組織から分離精製したコラーゲンと比較した。本研究の第一の目的は、細胞レベルでの組織特異的なコラーゲン成熟過程を確かめることであり、経時的なコラーゲン架橋形成と形態学的観察、tenomodulin の遺伝子発現を解析した。第二の目的は、靭帯の再生医療における最適な cell source を決定することであり、最終的なコラーゲン架橋と架橋形成に関与する PLOD、LOX の遺伝子発現、さらに合成されるコラーゲンタイプについて Collagen1A1 (Col1A1)、Collagen3A1 (Col3A1) の遺伝子発現を調べた。

【方法】 成熟 New Zealand 白色家兎より ACL、MCL、PT を採取し、酵素処理にて細胞を単離した後に培養した。コンフルエント後4週まで培養を行い、経時的に細胞基質層を採取し、透過型電子顕微鏡による形態学的観察、遺伝子発現 (リアルタイム RT-PCR) : Collagen1A1 (Col1A1)、Collagen3A1 (Col3A1)、テノモジュリン (tenomodulin)、コラーゲン架橋量を規定する酵素リジルオキシダーゼ (LOX) と架橋パターンを規定する酵素比リジンヒドロキシラーゼ2/リジンヒドロキシラーゼ1 (PLOD2/PLOD1)、架橋分析: 未熟架橋であるダイヒドロキシリジノノルロイシン (DHLNL)、ヒドロキシリジノノルロイシン (HLNL)、成熟架橋であるピリジノリン (PYD) の分離定量、さらに各組織中のコラーゲン架橋分析を行い、in vitro の結果と比較検討した。

【結果】 培養細胞の基質層に含まれるコラーゲン架橋分析の結果、コラーゲン基質の分化マーカーとなる DHLNL/HLNL 比は、それを制御する PLOD2/PLOD1 の遺伝子発現比

に一致するように PT に比べ ACL、MCL で高値であり、それぞれ細胞レベルで腱型あるいは靭帯型コラーゲンが誘導されることが確認された。さらにコラーゲン架橋数は、LOX 遺伝子発現と一致するように ACL、MCL、PT の順に高値を示した。また Col1A1、Col3A1 遺伝子発現は、ACL が MCL、PT に比べ高値であった。また tenomodulin は、いずれの細胞にも発現が見られたが、PT でもっとも強い発現が観察された。

【考察】 今回の検討から、靭帯と腱組織で異なるコラーゲンの成熟過程は細胞レベルで制御されていることが明らかになった。さらに ACL 細胞は増殖能では他と比べて劣っているが、基質合成能、コラーゲン成熟能といった点では優れており、靭帯の再生医療における細胞源としての可能性が示唆された。

以上の論文に対して、去る平成 26 年 6 月 10 日に、吉田清嗣教授、内田満教授のご出席を得て、公開で学位論文審査会を開催した。加藤氏の研究概要の発表に引き続いて口頭試験を行った。席上、1) 靭帯、腱組織の定義、組織の違いについて 2) 足底筋腱などでの代用は不可能か 3) ACL のリモデリングはないのか 4) 腱が靭帯化するメカニズムとは 5) ACL、MCL、PT の細胞の形態の違いは何か 6) コンフルエントにした意義は 7) 再生靭帯と再生皮膚との違いは何か 8) 感覚受容器は残るのか 9) リアルタイム PCR はなぜ 3 週なのか 10) 靭帯に強度を持たせる方法はないのか、11) tenomodulin の意義など多くの質問がなされた。これに対して、加藤氏は適切に回答した。その後、両教授と慎重に審議した結果、加藤壮紀氏の提出論文は、細胞レベルで靭帯と腱組織で異なるコラーゲンの成熟過程は制御されていることを示し、ACL 細胞は、基質合成能、コラーゲン成熟能に優れており、靭帯の再生医療における cell source として、靭帯の再生医療において重要な発展に寄与する可能性を示した点で、有意義な論文であり、学位申請論文として十分価値のあるものと判断した次第である。