

15-251

(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

Growth kinetics, infiltration into the patellar tendon, and integrin expression of extrinsic fibroblasts infiltrating the devitalized patellar tendon are different from those of intrinsic fibroblasts in the normal patellar tendon.

(不活化膝蓋腱に浸潤した外来性線維芽細胞と膝蓋腱内在性線維芽細胞の増殖能、浸潤能およびインテグリン発現について)

氏名 池間康成 (池間)

論 文 要 旨

膝前十字靱帯損傷に対する靱帯再建術において、自家移植腱は術後早期に阻血性壊死に陥り、その後外来性線維芽細胞が壊死後膝蓋腱に浸潤し移植腱の再構築を担うことは広く知られている。一方、力学的には移植腱は再構築過程に一時的に腱マトリックスの力学的特性の劣化を認め、本劣化後の腱マトリックスの回復には年単位の長期間を要するとされている。しかしながら、壊死後膝蓋腱に浸潤する外来性線維芽細胞の生物学的特性を明らかにした報告はなく、これらを明らかにすることは今後の移植腱の再構築過程を人為的に制御する上で重要な課題であると考えられる。本研究の目的は壊死後膝蓋腱に浸潤した外来性線維芽細胞と正常膝蓋腱の内在性線維芽細胞を単離し、これら培養細胞の生物学的特性の相違を *in vitro* で比較検討することである。

実験動物には雌成熟日本白色家兎を用いた。外来性線維芽細胞の単離のため、*in situ*

freeze-thaw 処置により膝蓋腱内在性線維芽細胞を死滅させ、処置後6週間後に膝蓋腱を採取し、組織培養にて外来性線維芽細胞を単離培養した。反対側の無処置膝蓋腱を同様に組織培養し膝蓋腱の内在性線維芽細胞を単離培養した。これら2種類の線維芽細胞に対し増殖能、浸潤能、integrin 発現量を比較した。増殖能に関しては24時間毎に7日間、MTS法により細胞数を検討した。浸潤能の評価には、培養細胞含有のcollagen gel中に凍結解凍処理した膝蓋腱マトリックスを浸漬させ、浸漬後1、3、6週での膝蓋腱マトリックス中の浸潤細胞数を共焦点レーザー顕微鏡にて計測した。また、細胞表面のintegrin $\alpha 5 \beta 1$ の発現量をflow cytometryを用いて測定した。

その結果、外来性線維芽細胞の増殖能は膝蓋腱内在性線維芽細胞と比較し有意に低いことが明らかとなった。また、外来性線維芽細胞の膝蓋腱マトリックス中への浸潤細胞数は膝蓋腱内在性線維芽細胞と比較し各時期と

も有意に低値であった。細胞表面の integrin α 5 β 1 発現量は外来性線維芽細胞が内在性線維芽細胞に比べ有意に低下していたことが明らかになった。

膜貫通型糖タンパク質 integrin は Arginine- Glycine- Aspartic acid (RGD) 配列を介して細胞外マトリックスに結合し、細胞の増殖および遊走を促進させることが報告されている。したがって、本研究で明らかにした外来性線維芽細胞の腱マトリックス中への低い浸潤能はその低い増殖能に加え、 integrin α 5 β 1 の細胞表面発現が低いことに起因することが考えられた。したがって、外来性線維芽細胞の細胞表面の integrin α 5 β 1 を人為的に過剰発現させることにより、靭帯再建術における自家移植腱の再構築を加速化させる可能性があり、今後、外来性線維芽細胞の生物学的特性のさらなる解明が期待される。

(別紙様式第 7 号)

論文審査結果の要旨

| | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|-------------------|-------|
| 報告番号 | 課程博 * 第 号 論文博 | 氏名 | 池間 康成 |
| 論文審査委員 | 審査日 | 平成 17 年 11 月 21 日 | |
| | 主査教授 | 須加原 一博 (印) | |
| | 副査教授 | 安澄 文樹 (印) | |
| | 副査教授 | 中 董 唯 (印) | |
| (論文題目) | | | |
| Growth kinetics, infiltration into the patellar tendon, and integrin expression of extrinsic fibroblasts infiltrating the devitalized patellar tendon are different from those of intrinsic fibroblasts in the normal patellar tendon. | | | |
| (不活化膝蓋腱に浸潤した外来性線維芽細胞と膝蓋腱内在性線維芽細胞の増殖能、浸潤能およびインテグリン発現について) | | | |
| (論文審査結果の要旨) | | | |
| 上記の論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義、学術的水準につき慎重かつ校正に検討し、以下のような審査結果を得た。 | | | |
| 1. 研究の背景と目的 | | | |
| 膝前十字靭帯損傷に対する靭帯再建術において、自家移植腱は術後早期に阻血性壊死に陥り、その後外来性に線維芽細胞が壊死後膝蓋腱に浸潤し、移植腱の再構築を担うことは広く知られている。一方、再構築過程において、移植腱マトリックスの力学的特性は一時的に劣化し、その回復には年単位の長期間を要するとされている。しかしながら、移植腱へ外来性に浸潤する線維芽細胞の生物学的特性を明らかにした報告はなく、これらを解明することは今後の移植腱の再構築過程を検討する上で重要な課題であると考えられる。本研究の目的は、壊死後膝蓋腱へ外来性に浸潤した線維芽細胞と正常膝蓋腱の内在性線維芽細胞を単離し、これら培養細胞の生物学的特性の相違を in vitro で比較検討することである。 | | | |

- 備考 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。
 2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。
 3 *印は記入しないこと。

論 文 審 査 結 果 の 要 旨

2. 研究内容

実験動物には雌成熟日本白色家兎を用いた。外来性浸潤線維芽細胞の単離のため、in situ 凍結解凍処理により膝蓋腱内在細胞を死滅させ、処置後 6 週間後に膝蓋腱を採取し、組織培養にて外来性浸潤線維芽細胞を単離培養した。反対側の無処置膝蓋腱を同様に組織培養し膝蓋腱の正常線維芽細胞を単離培養した。これら 2 種類の線維芽細胞に対し増殖能、浸潤能、インテグリン発現量を比較した。増殖能に関しては 24 時間毎に 7 日間、MTS 法により細胞数を計測した。浸潤能の評価には、培養細胞含有のコラーゲンゲル中に凍結解凍処理した腱マトリックスを浸漬させ、浸漬後 1、3、6 週での浸潤細胞数を共焦点レーザー顕微鏡にて計測した。また、 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンの発現量を flow cytometry を用いて測定した。

その結果、外来性浸潤線維芽細胞の増殖能は正常線維芽細胞と比較し有意に低いことが明らかとなった。また、外来性浸潤線維芽細胞の膝蓋腱マトリックス中への浸潤細胞数は正常線維芽細胞と比較し各時期とも有意に低値であった。 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン発現量は外来性浸潤線維芽細胞が正常線維芽細胞に比べ有意に低値であることが明らかになった。

膜貫通型糖タンパク質インテグリンは、Arginine·Glycine·Aspartic acid (RGD) 配列を介して細胞外マトリックスに結合し、その後の増殖および遊走を促進させることが報告されている。したがって、本研究で明らかにした外来性線維芽細胞の腱マトリックス中への低い浸潤能はその低い増殖能に加え、 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンの発現が低いことに起因することが考えられた。

3. 研究成果の意義と学術的水準

本研究は、膝蓋腱に浸潤した線維芽細胞の生物学的特性を組織培養により初めて明らかにした。その線維芽細胞の生物学的特性を制御することにより、移植腱の再構築を加速させることができれば、術後早期復帰の可能性も高い。従って、本研究はこれからの靭帯再建術における重要な基礎的研究であり、その学術的意義は高いと考えられる。

以上により、本論文は学位授与に十分に値すると判断した。

- 備 考
- 1 用紙の規格は、A 4 とし縦にして左横書きとすること。
 - 2 要旨は 800 字～1200 字以内にまとめること。
 - 3 *印は記入しないこと。