

学位論文題名

The effect of cytokines on the migration of fibroblasts
derived from different regions of the canine shoulder capsule

(犬の肩関節包線維芽細胞の遊走能に対する各種サイトカインの作用)

学位論文内容の要旨

整形外科領域において、靭帯/腱などの軟部組織損傷は日常診療においてよく遭遇する疾患である。軟部組織損傷の治癒機転には、線維芽細胞が重要な役割をはたしている。その治癒過程は、初期に線維芽細胞が損傷部位に遊走し、新生膠原線維を産生し、膠原線維が成熟していくことにより新生腱/靭帯が構築されることによる。この過程を修飾する因子として、断端同士の初期固定力、靭帯にかかる負荷などの力学的因子、あるいは Cytokine などによる生物学的刺激因子などが考えられている。

肩関節は、人体の中で一番大きな可動域をもつ関節である。解剖学的形態からみると、大きな球状の上腕骨頭と浅い肩甲骨関節窩から成り立ち、非常に不安定な関節である。関節の安定性は、主に肩関節周囲の軟部組織(関節包、靭帯および筋肉)により得られている。しかし、肩関節の関節包あるいは靭帯の生物学的特性についての研究報告はない。今回の研究は、犬の肩関節包から採取した線維芽細胞の遊走能が、各種の Cytokine によっていかに刺激されるかを検討することにより、肩関節包の線維芽細胞の生物学的特性を検討することである。

犬の関節包: 3 箇所(上方内側関節上腕靭帯、下方内側関節上腕靭帯および後方関節包)から切片を採取し、線維芽細胞を培養した。関節包を被う滑膜細胞は、可及的に取り除き、第 2 世代培養の細胞を使用した。

6 種類の Cytokine: PDGF(platelet-derived growth factor)-AB、HGF(Hepatocyte growth factor)、IGF-1(insulin growth factor-1)、BMP(bone morphogenic protein)-2、TGF(transforming growth factor)- β 、および IL(interleukin)-1 に対する各線維芽細胞の遊走能の反応を Boyden chamber を用いて測定した。Boyden chamber は、上下 2 つのプラスチック・ケースからなり、各々に 48 個の小さな穴があいている。細胞の遊走能を検討するために擬似的 in vivo 状態を再現することを目的としている。下のケースの穴に Cytokine を含む溶液を入れ、膠原線維(Type I)で被った polycarbonate 膜を上下のケースの間にはさみ、上のケースの穴に線維芽細胞の懸濁液を入れて 4 時間培養した。この膠原線維でおおわれた膜を通過して膜の反対側の表面に生着した線維芽細胞の数を顕微鏡にて測定することにより、線維芽細胞の遊走能を評価した。Cytokine を含まない対照群と各 Cytokine 群との比率(遊走能比=Cytokine を含む

群の細胞数/Cytokine を含まない群の細胞数×100%)を計算し、遊走能を比較検討した。

PDGF-AB および HGF は、3 箇所から採取した線維芽細胞の遊走能を濃度依存性に増加させた。PDGF-AB では、1ng/ml では 171%から 316%増加させ、10ng/ml では 531%から 743%増大させた。HGF では、1ng/ml では 133%から 188%の増加を、10ng/ml では 264%から 309%の増大を示した。IGF-1 は、いずれの濃度においても、それぞれの線維芽細胞の遊走を 160%から 250%増大させた。BMP-2、TGF- β および IL-1 は、いずれの線維芽細胞の遊走能も刺激しなかった。

肩関節包の各部位から採取した線維芽細胞の Cytokine に対する反応をみると、後方関節包の線維芽細胞は、上方および下方内側関節上腕靭帯から採取した細胞に比較して、低濃度の Cytokine に対する遊走能の増加率が有意に低かった。

肩関節の関節包あるいは靭帯の生物学的特性を検討した研究は今回が初めてである。靭帯損傷の治癒過程において、初期に線維芽細胞が損傷部位に遊走してくることを促進させることは、治癒過程を短縮させ得る可能性がある。各種の Cytokine あるいは成長因子が、損傷した軟部組織の炎症期における細胞浸潤などを司どっている。今回の研究から、いくつかの Cytokine(PDGF-AB、HGF、IGF-1)は、犬肩関節包の線維芽細胞の遊走能を増大させていた。今回と同様の手技にて測定した犬膝関節の靭帯より採取した線維芽細胞の Cytokine に対する遊走能の変化をみた研究と比較すると、線維芽細胞の Cytokine に対する反応には関節特異性があることが示唆された。PDGF-AB は、肩関節包および膝関節の線維芽細胞の遊走能をともに増大させたが、膝関節の細胞に比較して肩関節の細胞は約 3 倍の遊走能の増大を示した。IGF-1 は、肩関節の線維芽細胞の遊走能を増大させたが、膝関節の細胞には効果がなかった。対称的に、IL-1 は、肩関節の細胞には変化がなかったが、膝関節の細胞の遊走能を増大させた。

関節以外の線維芽細胞の遊走能をみた報告によると、IL-1 α 、basic fibroblast growth factor、あるいは PDGF は、人の皮膚の線維芽細胞を増大させた。また、PDGF、IL-1 α 、TGF- β 、あるいは IGF-1 は、歯根膜線維芽細胞の遊走能および増殖能を増大させていた。これらの報告と比較すると、組織特異性も考慮に入れる必要がある。今回の研究において、肩関節包の線維芽細胞が BMP-2、IL-1 および TGF- β に対して反応しなかったのは、細胞自体の受容体の欠如、Cytokine の至適濃度、あるいは種適合性の欠如などの可能性も考えられる。

人間の肩関節は、その安定性を主に周囲の軟部組織により得ている。臨床的に代表的な疾患として、五十肩などの可動域制限を呈する軟部組織の拘縮に起因する疾患と、肩関節前方脱臼などの不安定性を呈する軟部組織の修復機転不全に起因する疾患の相反する病態がある。いずれの疾患においても関節包などの軟部組織が大きな役割をはたしている。外傷あるいは何らかの炎症により、関節液のある種の Cytokine 濃度が上昇することにより、関節包の線維芽細胞が反応し、これらの疾患を惹起することが考えられる。今後さらに肩関節における軟部組織の生物学的特性をより明らかにすることにより、Cytokine などによる線維芽細胞の生体反応を利用した治療方法を確立することが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 浪 明 男
副 査 教 授 安 田 和 則
副 査 教 授 清 水 宏

学位論文題名

The effect of cytokines on the migration of fibroblasts derived from different regions of the canine shoulder capsule

(犬の肩関節包線維芽細胞の遊走能に対する各種サイトカインの作用)

犬の肩関節包から採取した線維芽細胞の遊走能が、各種の Cytokine によっていかに刺激されるかを検討することにより、肩関節包の線維芽細胞の生物学的特性を検討した研究である。犬の関節包: 3 箇所(上方内側関節上腕靭帯、下方内側関節上腕靭帯および後方関節包)から採取した線維芽細胞を用いて、6 種類の Cytokine: PDGF(platelet-derived growth factor)-AB、HGF(Hepatocyte growth factor)、IGF-1(insulin growth factor-1)、BMP(bone morphogenic protein)-2、TGF(transforming growth factor)- β 、および IL(interleukin)-1 に対する各線維芽細胞の遊走能の変化を Boyden chamber を用いて測定した。膠原線維でおおわれた膜を通過して反対側の膜の表面に生着した線維芽細胞の数を顕微鏡にて測定することにより、線維芽細胞の遊走能を評価した。Cytokine を含まない対照群と各 Cytokine 群との比率(遊走能比=Cytokine を含む群の細胞数/Cytokine を含まない群の細胞数 \times 100%)を計算し、遊走能を比較検討した。

PDGF-AB および HGF は、3 箇所から採取した線維芽細胞の遊走能を濃度依存性が増加させた。PDGF-AB では、1ng/ml では 171%から 316%増加させ、10ng/ml では 531%から 743%増大させた。HGF では、1ng/ml では 133%から 188%の増加を、10ng/ml では 264%から 309%の増大を示した。IGF-1 は、いずれの濃度においても、それぞれの線維芽細胞の遊走を 160%から 250%増大させた。BMP-2、TGF- β および IL-1 は、いずれの線維芽細胞の遊走能も刺激しなかった。肩関節包の各部位から採取した線維芽細胞の Cytokine に対する反応をみると、後方関節包の線維芽細胞は、上方および下方内側関節上腕靭帯から採取した細胞に比較して、低濃度の Cytokine に対する遊走能の増加率が有意に低かった。

今回と同様の手技にて測定した犬膝関節の靭帯より採取した線維芽細胞の Cytokine に対する遊走能の変化をみた研究と比較すると、線維芽細胞の Cytokine に対する反応には関節特異性があることが示唆された。PDGF-AB は、肩関節包および膝関節の線維芽細胞の遊走能をともに増大させたが、膝関節の細胞に比較して肩関節の細胞は約 3 倍の遊走能の

増大を示した。IGF-1 は、肩関節の線維芽細胞の遊走能を増大させたが、膝関節の細胞には効果がなかった。対称的に、IL-1 は、肩関節の細胞には変化がなかったが、膝関節の細胞の遊走能を増大させた。

靭帯損傷の治癒過程において、初期に線維芽細胞が損傷部位に遊走してくることを促進させることは、治癒過程を短縮させ得る可能性がある。

口頭発表にあたり、副査の清水宏教授より、サイトカインが線維芽細胞の遊走能を刺激する作用機序、サイトカインの濃度設定および第 2 世代の細胞を使用した理由についての質問が、副査の安田和則教授より、Boyden chamber の原理、刺激された遊走してきた細胞の形態が対照群の細胞に比し変化しているか、採取した場所による細胞の遊走能の変化は機能的部位の変化あるいは肉眼的変化と対応するか。との質問があり、主査の三浪明男教授より、遊走能の変化は受容体によるものだけなのかどうか、肩関節疾患における細胞と正常肩の細胞自体に遊走能に対する変化があるのか、およびサイトカインの臨床応用についての質問があり、これに対して申請者は自己の研究結果と文献的知識に基づいておおむね妥当な回答を行なった。

この論文は、肩関節の関節包の各種サイトカインに対する生物学的特性を研究した最初の研究であり、今後の肩関節疾患へのサイトカインの応用などに期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。