前十字靭帯自己治癒に貢献する細胞の探索と検証

森下佑里（PT，MSc）[1)]，村田健児（PT，PhD）[2)]，
国分貴徳（PT，PhD）[2)]，金村尚彦（PT，PhD）[2)]

[1)] 埼玉県立大学大学院保健医療福祉学研究科博士後期課程
[2)] 埼玉県立大学保健医療福祉学部理学療法学科

キーワード：前十字靭帯，関節制動，自己治癒

はじめに

前十字靭帯（Anterior Cruciate Ligament：以下，ACL）損傷の発生率は年々増加傾向にあるものの，治療法は1980 年代より外科的再建術が主流である。その背景には，ACL の治癒能力の低さが挙げられる。同じ膝関節の靭帯でありながら治療に保存療法が選択される内側側副靱帯と治癒能力を比較した研究では，scaffold の欠如[1)] 等を根拠に ACL の治癒能力の低さを示唆している。

そのため，長年 ACL の保存療法については懐疑的であるとされてきたが，近年，装具を用いた保存的な介入により ACL が自己治癒することが報告されている[2)]。また，我々も動物を用いた研究により靭帯が治癒することを報告した[3)]。これらの報告によると，ACL 損傷後急性期からの運動学的介入が分子生物学的応答に影響し，自己治癒に重要であるとしている。

ACL の自己治癒が示されているにもかかわらず，臨床において保存療法が普及していない理由には，靭帯の自己治癒機構が解明されていないことが一要因であると考えられる。そこで本研究は，ACL の自己治癒に貢献する細胞を明らかにすることを目的とした。

対象および方法

1. 倫理的配慮

本研究は，埼玉県立大学動物実験倫理委員会の承認（受付番号 29-6 号）を得て実施した。

2. 対象

Wistar 系雄性ラット 11 週齢 24 匹を対象とした。対照（以下，Sham）群，ACL 切断（ACL Transection：以下，ACLT）群，関節包外関節制動（Controlled Abnormal Movement：以下，CAM）群に分け，さらに各群介入後 1 週，2 週のグループに各 4 匹ずつ割りあてた。

3. 外科的介入

三種混合麻酔薬（0.375 mg/kg 塩酸メデトミジン，2 mg/kg ミタゾラム，2.5 mg/kg 酒石酸ブトルファノール）を腹腔内に注入し，深麻酔をかけた。Sham 群は関節包の切開，骨孔の作成を行った。ACLT 群は ACL 損傷後異常な関節運動を残し，CAM 群は ACL 損傷後異常な関節運動を制動した。閉創後，メデトミジン拮抗薬（0.75 mg/kg 塩酸アチパメゾール）を皮下に注射した。

4. 組織学的解析

1）組織採取

実験終了後，右後肢の膝関節を採取し，4%PFA にて 48 時間浸漬固定した。脱灰処理は 10%EDTA を用いて約 70 日間行い凍結包埋した。包埋した組織は，クリオスタット CM3050S（Leica，Germany）にて 12 μm に薄切した。

2）免疫組織化学染色

内因性ペルオキシターゼ活性の抑制と非特異的反応のブロッキング後，一次抗体には抗 CD45 抗体（希釈濃度 1:250，OriGene，USA），抗 CD73 抗体（希釈濃度 1:1500，Bioss，USA），抗 CD90 抗体（希釈濃度 1:500，Boster，USA）を用いた。二次抗体に Goat anti-rabbit IgG 抗体もしくは Horse anti-mouse IgG 抗体，VECTAIN Elite ABC Standard Kit（Vector Laboratories，USA）を用いて ABC 法を行った。DAB とヘマトキシリンで対比染色し，光学顕微鏡にて観察した。

結　　果

1. CD45

全群・全時点において滑膜線維層に陽性所見が観察された。Sham 群の靭帯実質部や ACLT 群および CAM 群の遺残靭帯，断端周囲の細胞，断端間細胞，治癒領域では陰性であった（図 1 a）。

2. CD73

1 週時点の ACLT 群と CAM 群では遺残靭帯，断端周囲の細胞集団，断端間細胞が陽性所見を示した。2 週時点では，ACLT 群の断端間細胞と CAM 群の断端および治癒領域で染色性が低下したが，ACLT 群の遺残靭帯と断端周囲の細胞は依然として陽性所見を示した（図 1 b）。

3. CD90

ACLT 群と CAM 群の遺残靭帯や断端周囲の細胞集団，断端間細胞に陽性所見を示した。2 週時点での染色性は両群ともに低下した（図 1 c）。

考　　察

本研究は，ACL 自己治癒機構の解明に向け，組織学的解析を用いて ACL の自己治癒に貢献する細胞の探索を行った。Morito らは，滑膜由来の間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cell：以下，MSC）が ACL 損傷後に増殖し，さらに損傷部位に付着することを示した[4)]。さらに，Kanaya らは，ACL 部分損傷後に骨髄由来の MSC を注射することで ACL が治癒する傾向を示した

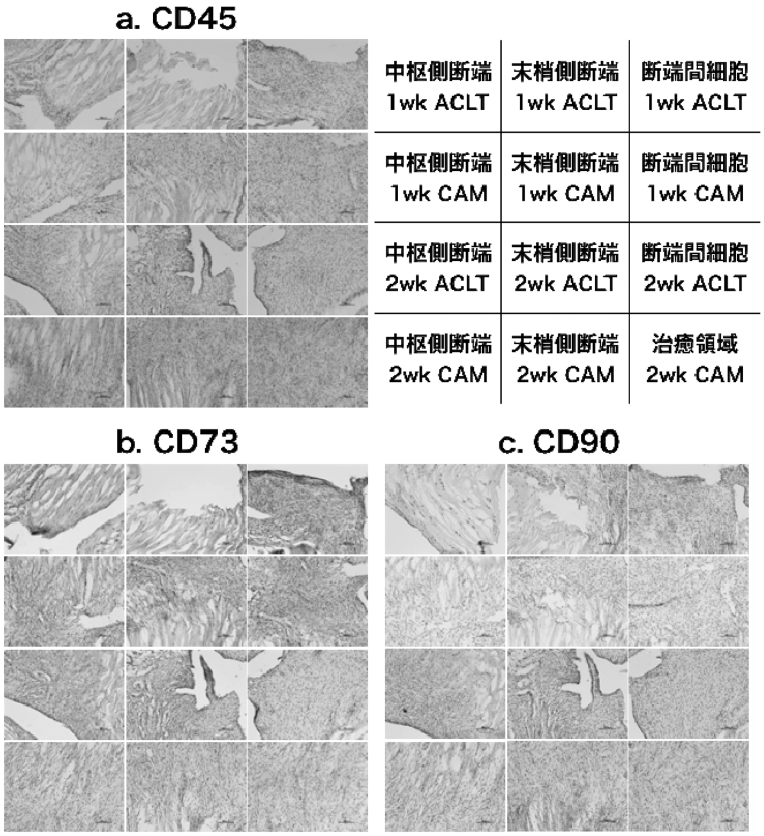

図 1 ACLT 群および CAM 群における CD45，CD73，CD90 の IHC 染色像（a）CD45 は遺残靭帯，断端周囲の細胞，断端間細胞，治癒領域では陰性であった．（b）CD73 は 1 週時点の遺残靭帯，断端周囲の細胞集団，断端間細胞において陽性所見を示した．2 週時点では，CAM 群の染色性は低下したが，ACLT 群は依然として陽性所見を示した．（c）CD90 は ACLT 群の遺残靭帯や断端周囲の細胞集団，断端間細胞に陽性所見を示した．CAM 群においても類似していた．Scar bar = 100 μm.

ことを報告した[5]。そこで，本研究では ACL の自己治癒に貢献しうる細胞として MSC に着目した。MSC は多分化能を有し，ヒトにおいては細胞表面マーカー CD73，CD90，CD105 が陽性，CD34 や CD45 が陰性であれば MSC であると同定される[6]。

本研究において，ACLT 群および CAM 群の遺残靭帯と断端周囲の細胞，断端間細胞は CD73，CD90 に陽性であり，CD45 に陰性であった。したがって，ACL 損傷後に増殖した断端周囲の細胞や断端間細胞は MSC を含み，増殖した細胞は関節制動により局在性が変化することが示唆された。また，CD73，CD90 の染色性は 1 週時点よりも 2 週時点で低下し，ACLT 群は CAM 群よりも染色性が維持されていた。これは幼若な間葉細胞の成熟が関係していると考えられる。CAM 群においてはすでに MSC が線維芽細胞へと成熟し ACL が治癒したため染色性は低下したが，ACLT 群は靭帯が治癒していないため 2 週時点でも断端周囲に幼若な間葉細胞が存在していると推察される。

本研究の限界としては，サンプル数が少なく定量化が行えていないことが挙げられる。今後サンプル数を増やし，解析を進めることで ACL 自己治癒に貢献する細胞を明言することができると考える。

結　　論

本研究は，ACL の自己治癒に貢献する細胞について組織学的手法を用いて検討した。その結果，ACL 治癒過程における CD45，CD73，CD90 の局在を示し，ACLT 群や CAM 群で観察された断端周囲の細胞や断端間細胞には MSC が含まれることが明らかとなった。

文　　献

1）Murray M, Martin S, *et al.*: Histological changes in the human anterior cruciate ligament after rupture. J Bone Joint Surg Am. 2000; 82(10): 1387–1397.
2）Ihara H, Miwa M, *et al.*: Acute Torn Meniscus Combined with Acute Cruciate Ligament Injury –Second Look Arthroscopy After 3-month Conservative Treatment–. Clin Orthop Relat Res. 1994; 307: 146–154.
3）Kokubun T, Kanemura N, *et al.*: Effect of Changing the Joint Kinematics of Knees With a Ruptured Anterior Cruciate Ligament on the Molecular Biological Responses and Spontaneous Healing in a Rat Model. Am J Sports Med. 2016; 44(11): 2900–2910.

4) Morito T, Muneta T, *et al*.: Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. Rheumatology. 2008; 47: 1137–1143.
5) Kanaya A, Deie M, *et al*.: Intra-articular injection of mesenchymal stromal cells in partially torn anterior cruciate ligaments in a rat model. Arthroscopy. 2007; 23(6): 610–617.
6) Mafi P, Hindocha S, *et al*.: Adult Mesenchymal Stem Cells and Cell Surface Characterization – A Systematic Review of the Literature. Open Orthop J. 2011; 5: 253–260.