

学位論文

Doctor's Thesis

論文題名: 関節軟骨全層欠損に対する fibroblast growth factor (FGF)-2 短期間投与の
軟骨修復への影響に関する研究

(The effect of the short exposure to fibroblast growth factor-2 for the
regenerative repair of full-thickness articular cartilage defects)

著者名: 中馬東彦 Haruhiko Chuma

指導教官名: 整形外科学担当前教授 高木克公

紹介教授名: 循環器病態学担当教授 小川久雄

審査委員名: 細胞病理学担当教授 竹屋元裕

分子病理学担当教授 山本哲郎

病態情報解析学担当教授 岡部紘明

機能病理学担当教授 伊藤隆明

2004 年度

Table of Contents (目次)

1)要旨	4
2)発表論文	7
3)謝辞	8
4)略語一覧	9
5)研究の背景と目的	
5)-1 臨床的背景	10
5)-2 関節軟骨の構造と機能	12
5)-3 増殖分化シグナルによる関節軟骨の再生誘導	14
5)-4 本研究の目的	22
6)実験方法	
6)-1 実験動物	23
6)-2 FGF-2 の投与期間が関節軟骨全層欠損の修復反応に及ぼす影響に関する 検討	23
6)-2-1 家兎関節軟骨全層欠損モデルの作成	23
6)-2-2 修復組織の組織学的評価	25

6)-3	FGF-2 の投与期間が関節軟骨全層欠損部修復組織内の細胞密度と細胞増殖に及ぼす影響に関する検討	26
6)-3-1	家兎関節軟骨全層欠損モデルの作成	26
6)-3-2	修復組織内の細胞密度と細胞増殖能の評価	26
6)-4	関節軟骨全層欠損部における FGF-2 滞留時間に関する検討	29
6)-5	骨髄由来未分化間葉系細胞の遊走能に及ぼす FGF-2 の影響に関する検討	30
6)-5-1	細胞培養	30
6)-5-2	細胞遊走能の評価	31
6)-6	統計処理	31
7)	実験結果	
7)-1	FGF-2 の投与期間が関節軟骨全層欠損の修復反応に及ぼす影響	33
7)-2	FGF-2 の投与期間が関節軟骨全層欠損部修復組織内の細胞密度と細胞増殖に及ぼす影響	37
7)-3	¹²⁵ I-FGF-2 の関節軟骨全層欠損部からの消失	40
7)-4	骨髄由来未分化間葉系細胞の遊走能に及ぼす FGF-2 の影響	40
8)	考察	47
9)	結語	51
10)	参考文献	52

1) 要旨

[目的] 家兎大腿骨膝蓋窩に作成した 5mm 径の関節軟骨全層欠損では、関節腔内に fibroblast growth factor (FGF)-2 を 2 週間持続的に投与すると軟骨再生が誘導される。本研究の目的は、より短期間の FGF-2 投与が関節軟骨全層欠損の修復過程に及ぼす影響を検討することである。

[方法] 自己修復不可能な 5mm 径の円筒状の関節軟骨全層欠損を家兎大腿骨膝蓋窩に作成した。欠損作成後 1 日、3 日あるいは 2 週間、osmotic pump を用いて膝関節腔内に FGF-2(150pg/h)を持続的に投与し、欠損部の修復過程および修復組織内の間葉系細胞の増殖に及ぼす FGF-2 の作用を検討した。また欠損内に注入した FGF-2 の動態をラジオアイソトープを用いて評価し、さらに *in vitro* で骨髄由来の間葉系細胞の遊走能に及ぼす FGF-2 の影響を検討した。

[結果] FGF-2 の 1 日、あるいは 3 日投与は、欠損作成後 8 週までに FGF-2 の 2 週間投与と同程度に良好な軟骨で被覆された骨端組織の再生を誘導した。欠損内に注入した FGF-2 は急速に局所から消失し、その半減期は 30 分以内であることがラジオアイソトープを用いた検討で示された。骨髄由来間葉系細胞の培養系における検討より、FGF-2 は骨髄から欠損部への間葉系細胞の遊走を促進することが示唆された。

[結語] 家兎の 5mm 径関節軟骨全層欠損に軟骨再生を誘導するためには、FGF-2 を 1 日持続的に投与するだけで十分である。FGF-2 は軟骨誘導の重要な制御段階である間葉系細胞の遊走と動員を促進することが示唆された。

Summary

Objectives: Administration of fibroblast growth factor (FGF)-2 for 2 weeks induces a successful cartilaginous repair response in 5-mm full-thickness articular cartilage defects in rabbits. The purpose of this study was to investigate the effects of a short time exposure to FGF-2 on the repair of the defects.

Methods: Five-mm-diameter cylindrical defects, which do not repair spontaneously, were created in the femoral trochlea of the rabbit knees. The defects were administered sterile saline or FGF-2 (150 pg/h) via an osmotic pump for the initial 1 day, 3 days, or 2 weeks, and we assessed the FGF-2 action on the proliferation and migration of mesenchymal cells in the reparative tissue. Using a total of 126 rabbits, we performed three sets of experiments. We also studied the effect of FGF-2 on migration of marrow-derived mesenchymal cells *in vitro*.

Results: FGF-2 treatment for 1 day or 3 days induced the sequential chondrogenic repair responses that led to successful cartilaginous resurfacing of defects within 8 weeks, as well as the 2-week-treatment did. We confirmed by a radioisotope study that FGF-2 injected was rapidly eliminated from the defects (a residual ratio of 50% within 30 min). The effect of FGF-2 on cultured marrow-derived cells suggested that FGF-2 facilitated the mobilization and migration of replicating mesenchymal cells from bone marrow.

Conclusions: Only 1 day exposure to FGF-2 is sufficient for induction of the chondrogenic repair response in 5-mm-diameter full-thickness defects of articular cartilage in rabbits. FGF-2 stimulated the recruitment of mesenchymal cells into the defects, which was a limiting step for the induction of cartilage.

2) 発表論文

One day exposure to FGF-2 was sufficient for the regenerative repair of full-thickness defects of articular cartilage in rabbits

H. Chuma, H. Mizuta, S. Kudo, K. Takagi, and Y. Hiraki

Osteoarthritis and Cartilage 12: 834-842, 2004

3) 謝辞

本研究の機会を提供され、ご指導いただいた熊本大学大学院医学薬学研究部運動骨格病態学分野 高木克公前教授に深く謝意を表します。

研究実施および論文作成に際して直接御指導、御助言をいただいた熊本大学大学院医学薬学研究部運動骨格病態学分野 水田博志助教授、ならびに京都大学再生医科学研究所 生体組織工学部門生体設計分子設計学分野 開祐司教授に深く感謝致します。また、実験に御協力いただいた熊本大学医学部附属病院整形外科 工藤智志先生に感謝致します。

4) 略語一覽

ABC: avidin-biotin-peroxidase complex

BSA: bovine serum albumin

DAB: diaminobenzidine

EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid

FBS: fetal bovine serum

FGF: fibroblast growth factor

PBS: phosphate buffer saline

PCNA: proliferating cell nuclear antigen

RI: radioisotope

TBS: Tris-buffered saline

5) 研究の背景と目的

5)-1 臨床的背景

関節軟骨は骨端を被覆する厚さ数 mm の薄い組織であるが、荷重緩衝体および潤滑機構として優れた力学的特性を有し、可動関節に要求される荷重支持機能と運動機能において中心的な役割を果たしている。関節軟骨は軟骨細胞と細胞外基質から構成され、軟骨細胞は旺盛な代謝により細胞外基質を産生し、維持している。しかしながら、関節軟骨は血管やリンパ管を欠き、軟骨細胞が豊富な細胞外基質に取り囲まれていることも相まって、ひとたび損傷を受けるときわめて修復能力に乏しい組織である。外傷や疾病によりひとたび関節軟骨が損傷されると、本来の硝子軟骨で自然修復することは期待しがたい。

このため、従来より関節軟骨の修復を促進する種々の試みが行われてきた。drilling、abrasion、microfracture などの marrow stimulation technique は最も古くから行われてきた方法であり、軟骨欠損部の硬化した軟骨下骨を切除あるいは孔を穿ち、骨髄より未分化な間葉系細胞を誘導することにより軟骨修復をうながすことを目的としている。しかしながら、本法では臨床的に短期間の症状の改善は認められるものの、修復組織は経時的に線維性組織となり、硝子軟骨による修復は得られない。一方、骨膜・軟骨膜移植は脛骨より採取した骨膜あるいは肋軟骨より採取した軟骨膜で軟骨欠損部を被覆する方法で、骨膜や軟骨膜に存在する未分化な間葉系細胞の軟骨形成能を応用した方法である^(1,2)。しかし本法では、骨膜や軟骨膜が軟骨形成能を有する年齢が若年者に限られて

いること、また再生された軟骨内に骨化が生じることなどが問題点として指摘されている。これに対して、自家骨軟骨移植は主に膝関節の非荷重部から骨軟骨片を採取し軟骨欠損部に移植する方法である。本法では本来の力学的特性を持ち、かつ生きた軟骨細胞を含む硝子軟骨で欠損部を修復することができるが、非荷重部からの採取量に限界があることが最大の欠点である。この欠点に対し、最近では膝関節の非荷重部から複数の小さな骨軟骨片を採取し、これを軟骨欠損部にモザイク状に移植する mosaicplasty が開発され普及しつつある^(3,4)。本法を用いることで比較的大きな軟骨欠損部の修復が可能となったが、関節面の適合性、移植軟骨とその間隙に生じた線維軟骨との結合性、移植部位の耐久性、採取部位の長期的な経過など未解決の課題が多く残されている。さらに近年では培養自家軟骨細胞移植が関心を集め、すでに一部では臨床応用も開始されている⁽⁵⁾。本法はまず膝関節の非荷重部の自家軟骨片を採取し、軟骨細胞を単離後、培養液中で約 3 週間増殖させ、ついで軟骨欠損部に骨膜を縫合し、骨膜下に培養軟骨細胞浮遊液を注入する方法である。しかし、本法では軟骨の再生は見られるものの、軟骨下骨の形成は良好ではなく、また再生軟骨と周囲の軟骨組織や骨との結合性も明らかではなく、はたして長期的に硝子軟骨として保持されるか否かについては不明である。このように、いずれの方法においてもなお多くの問題点が残されており、損傷された関節軟骨を硝子軟骨で確実に修復できる方法は現在なお確立されていない。

関節軟骨の損傷は、靭帯損傷、半月損傷、骨軟骨骨折、脱臼などの関節外傷、骨壊死、離断性骨軟骨炎などの関節疾患、さらには関節の退行性変化など、様々な病態に伴って生じ得る病態である。近年のスポーツ人口の増加に伴い、若年者の関節外傷に伴う

関節軟骨損傷は確実に増加している。関節軟骨の損傷は円滑な関節機能を破綻させ、スポーツ活動に支障を及ぼすだけでなく、荷重部に生じた広範囲の軟骨損傷では時間の経過と共に関節破壊が進行し、最終的には二次性の変形性関節症へと移行する⁽⁷⁾。また急激な高齢化社会が形成されつつある現在、関節の退行性変化としての一次性変形性関節症の患者も急速に増加しており、本邦では膝関節だけでも約 1,000 万人の変形性関節症の患者数が推定されている。変形性関節症が進行し正常な関節機能が喪失した関節では人工関節への置換しか治療法がなく、現在年間約 7 万人に人工関節置換術が行われているが、今後さらに急増することが予想されている。関節軟骨を再生誘導する治療の開発は整形外科医にとって長年の夢であるとともに、変形性関節症の発症、進行を抑制し、人工関節置換術を必要とする症例を確実に減少させることより、医療経済的にも緊急かつ重要な課題である。

5)-2 関節軟骨の構造と機能

関節軟骨は組織学的には硝子軟骨であり、軟骨細胞と細胞外基質から構成される。その大部分は細胞外基質からなり、軟骨細胞はきわめて少なく細胞外基質内の小窩に存在する。成熟した関節軟骨は軟骨細胞の形態、配列、基質の性状から tangential zone、transitional zone、radial zone、calcified zone の 4 層に分けられる。最表層の tangential zone では円盤状の軟骨細胞が関節表面に平行に並び、基質はムコ多糖染色でほとんど染まらない。transitional zone では球形の大型化した軟骨細胞が不規則に配列し、基質はムコ多糖染色で染まる。radial zone は関節軟骨の主要な部分で、球形の軟骨細胞が柱

状に配列し、基質はムコ多糖染色で濃染する。最も深層の calcified zone では軟骨細胞はまばらで、基質は石灰化し軟骨下骨と接している。

細胞外基質の主成分は水分で、湿重量の 70~80% を占め、この豊富な水分量が関節軟骨に優れた力学的特性をもたらす上で重要な役割を担っている。水分以外の構成物質としてはコラーゲンが約 50%、プロテオグリカンが 30~35% を占めている。関節軟骨の主要コラーゲンは II 型コラーゲンであり、その他に VI、IX、X、XI 型コラーゲンが少量含まれている。コラーゲン線維の配列は各層により異なり、tangenital zone ではコラーゲン線維が関節表面に平行に並び、transitional zone では線維の走行は不規則となり、radial zone、calcified zone では線維は垂直に配列する。このコラーゲン線維の配列の違いは、関節軟骨の各層における力学的要請を反映している。プロテオグリカンはコアプロテインにコンドロイチン硫酸、ケタラン硫酸が結合して一つのユニットを形成したもので、このユニットが、ヒアルロン酸を背骨構造として多数結合し、巨大な集合体であるアグリカンを形成している。プロテオグリカンは陰性に荷電しており、ナトリウムイオンや水と親和性を持っている。軟骨基質では複雑なコラーゲンネットワークの中にプロテオグリカンが含まれ、水分子がその間を荷重により自由に移動できる構造になっている。この構造により軟骨の弾力性、圧縮性が生まれ、荷重に対する緩衝体の役割を果たしている。

関節軟骨には血管、リンパ管はなく、その栄養は滑液の拡散に依存している。幼若な関節軟骨では軟骨細胞の有糸分裂像がみられ、骨端の成長に寄与しているが、関節軟骨の組織形成が完了した時点では、軟骨細胞は細胞分裂を完全に停止する。しかしなが

ら成熟軟骨細胞は無あるいは低酸素下に旺盛な代謝を営み、細胞外基質の活発なリモデリングを行っている。この代謝は全身的・局所的液性因子と関節運動を介した力学的因子により調整されていると考えられている。

5)-3 増殖分化シグナルによる関節軟骨の再生誘導

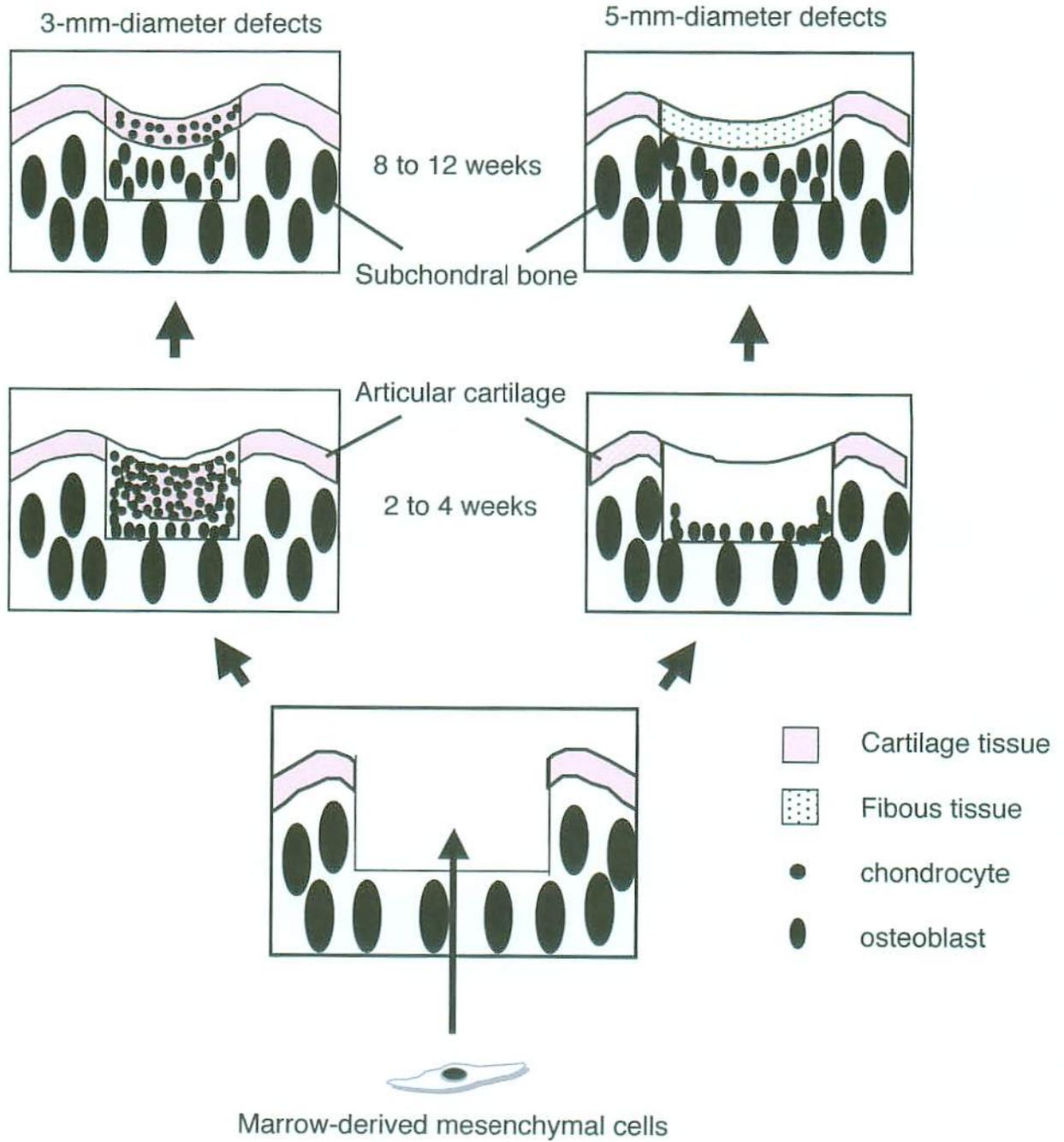
血管に富む骨は旺盛な再生能力を保持しているが、無血管組織である軟骨の再生能力はきわめて乏しく、軟骨下骨に達しない関節軟骨損傷では基本的に修復反応はみられず、損傷部に軟骨が再生されることはない^(7,8)。一方、関節表面から軟骨下骨に達する全層欠損では、欠損サイズがその修復過程を決定する大きな要因になっている⁽⁹⁻¹¹⁾。すなわち、大きな欠損では軟骨の再生はみられず、線維性組織で修復され経時的に変形性変化が進行するのに対し、小さな欠損では限られた条件下ではあるが軟骨が自然に再生する場合がある。この修復機序の違いは、家兎を用いた関節軟骨全層欠損モデルにおいても同様に再現することができる⁽¹⁰⁾。4ヶ月齢の家兎大腿骨膝蓋窩に深さ4mmの円筒状全層欠損を作成すると、直径3mmの欠損では自然に軟骨再生が誘導されるのに対し、直径5mmの欠損では軟骨下骨の再生が起こるのみで、関節表面が軟骨で被覆されることはない。いずれの場合も、欠損部内は血腫が生じた後、1~2週で骨髄から遊走した紡錘形の未分化な細胞で充填される。その後3mm径の欠損では2~4週で未分化な細胞が軟骨細胞へと分化し、旺盛な軟骨形成が観察される。欠損深部では軟骨細胞の肥大化が見られ、軟骨組織の成熟化とともにいったん再生誘導された軟骨組織は欠損深部より徐々に骨組織に置換されていく。骨への置換は軟骨組織がもとの関節軟骨の厚みを回

復するまで続いて停止し、欠損作成後 8~12 週で本来の関節の組織構築が再生される。これに対し、5mm 径の欠損では欠損部内の修復組織に軟骨分化は誘導されず軟骨形成は生じないが、欠損深部からの軟骨下骨形成は 3mm 径欠損と同様に進行するので、関節表面は線維性組織に覆われることになる(Fig.1)。このように、関節軟骨全層欠損の修復では欠損部を充填する未分化な細胞の増殖と分化が重要な鍵を握っている⁽¹²⁾。骨髄に造血幹細胞が存在することはよく知られているが、骨やその他の結合組織の形成に参画する線維芽細胞のみならず骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への多分化能を保持した間葉系幹細胞も存在すると考えられてきた。最近、Pittenger らによって、このような間葉系幹細胞が実在することが実験的にも明らかになった⁽¹³⁾。3mm 径の関節軟骨全層欠損で軟骨が再生されるという事実より、これらの細胞は骨髄内に潜在する間葉系幹細胞であると考えられる。

近年、胎生期肢芽の骨形成過程や軟骨前駆細胞株の培養系における解析により、軟骨分化の過程を巧妙に制御する増殖分化シグナルの実体が急速に解明されつつある。自律的な軟骨分化の進行に多様な増殖分化シグナルのネットワークが介在することが示されている⁽¹⁴⁻¹⁷⁾。このような知見に基づいて、増殖分化制御シグナルを利用して骨髄内に潜在する間葉系幹細胞を活性化し、軟骨の再生誘導をはかろうとする試みがなされ始めている^(18,19)。

肢芽間充織細胞の分離培養系における軟骨分化の誘導には高い播種細胞密度が必要である⁽²⁰⁾。また、骨髄や骨膜より採取し培養した間葉系細胞を自然修復しない家兎関節軟骨全層欠損に移植すると、欠損部内に軟骨分化が誘導され、軟骨下骨の形成とカップ

Fig. 1

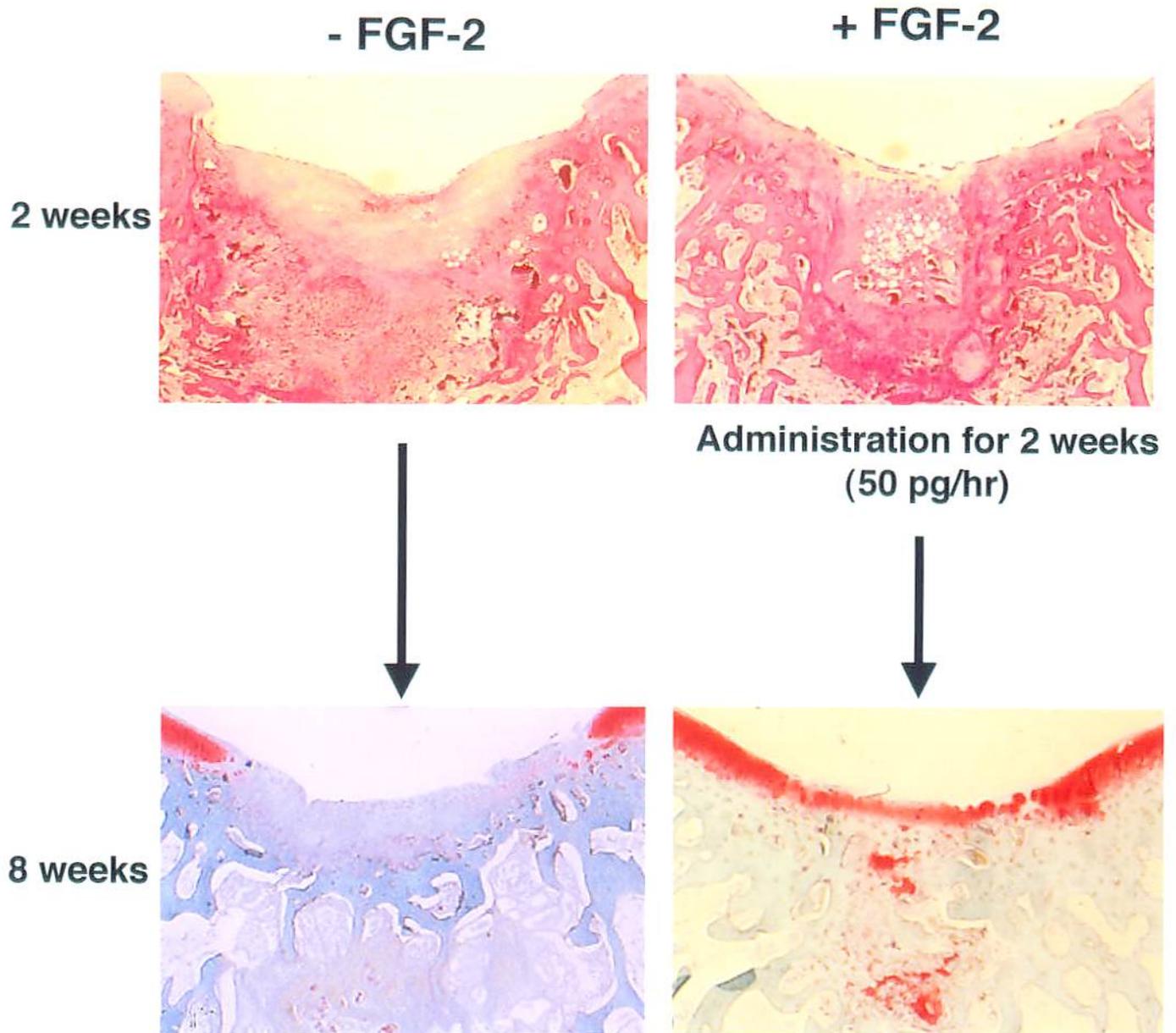


Reparative mode of full-thickness articular cartilage defects

リングした形で本来の組織構築が再生されることが示されている⁽²¹⁾。このような知見を踏まえると、前述した 5mm 径の家兎関節軟骨全層欠損モデルで軟骨修復が起こらない要因は欠損部内の組織幹細胞密度にある可能性が示唆される。そうであれば、幹細胞移植による方法以外に、欠損部に遊走した幹細胞の増殖を促進するシグナルを注入し修復組織中の幹細胞密度を上昇させることで、*in situ*で軟骨再生が誘導できると考えられる。

Fibroblastic Growth Factor (以下 FGF と略す) は、肢芽間充織細胞の高い増殖能の維持に重要な役割を担っている⁽²²⁻²⁵⁾。さらに、軟骨幹細胞の性格をきわめてよく保持し、かつ軟骨分化のすべての段階を再現できる ATDC5 細胞培養系の解析により、未分化な ATDC5 細胞には FGF-1 や FGF-2 を含む複数の FGF サブタイプが発現していて、幹細胞の旺盛な自己複製に大きく寄与していることが示されている⁽²⁶⁻²⁸⁾。そこで我々は、欠損部に遊走する幹細胞密度を上昇させることを狙って、家兎大腿骨膝蓋窩に本来軟骨再生がみられない 5mm 径欠損を作製し、FGF-2 の投与を試みた⁽¹⁰⁾。すなわち、大腿後外側皮下に留置した osmotic pump を使用して、関節腔内に FGF-2 (50pg/h) を 2 週間持続的に注入した。その結果、欠損部は未分化な間葉系細胞で充填された後、FGF-2 投与が終了する 2 週間後には欠損部辺縁を中心に軟骨細胞が出現し旺盛な軟骨形成が誘導された。その後、欠損深部の軟骨細胞は肥大化して骨への置換が開始され、8 週間後には本来の骨軟骨境界部まで再構築された軟骨下骨の表面に正常軟骨と同様な柱状構造を持つ軟骨層が再生された。組織化した細胞外基質で取り囲まれた軟骨細胞には FGF シグナルは伝達されないため、欠損周囲の軟骨細胞の FGF-2 に対する増殖応答は全く認められなかった(Fig. 2)。

Fig. 2

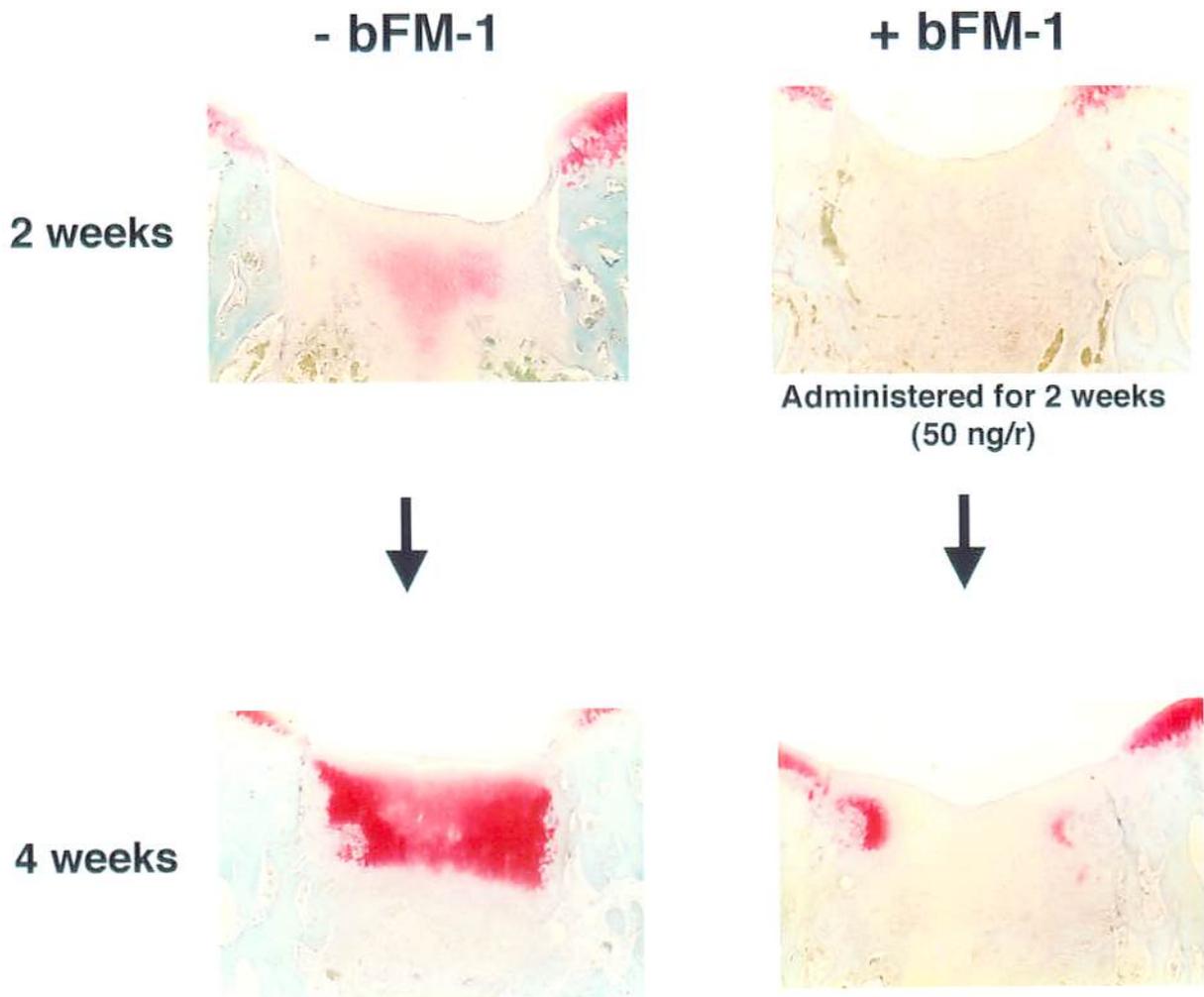


Regeneration of full-thickness articular cartilage (5 mm diameter) treated with or without FGF-2

逆に、本来関節軟骨が自然修復する 3mm 径の欠損を家兎大腿骨膝蓋窩に作成し、関節腔内に抗 FGF-2 中和モノクローナル抗体 (50ng/h) を 2 週間注入すると、欠損部内の修復組織中に軟骨細胞の出現はみられなかった。すなわち、軟骨下骨の修復は起こるものの軟骨の再生はみられず、3mm 径の欠損があたかも軟骨修復が起こらない 5mm 径欠損と同様の修復機序を辿った(Fig.3)。このことは、生理的な関節軟骨の修復においても FGF-2 が重要な役割を果たしていることを示している。欠損内部の FGF シグナルは周囲の骨組織と遊走してきた幹細胞自身から供給される。抗 FGF-2 中和モノクローナル抗体 (bFM-1)投与により軟骨再生を阻害された修復組織では、対照群と比べて組織幹細胞の FGF-2mRNA 発現が著明に増加し、これに対応して FGF-2 蛋白の蓄積が認められた。この結果は、修復組織中の幹細胞自身に作用している FGF-2 のオートシグナリングの働きが中和抗体により阻害されたために生じたリバウンド現象と考えられた。

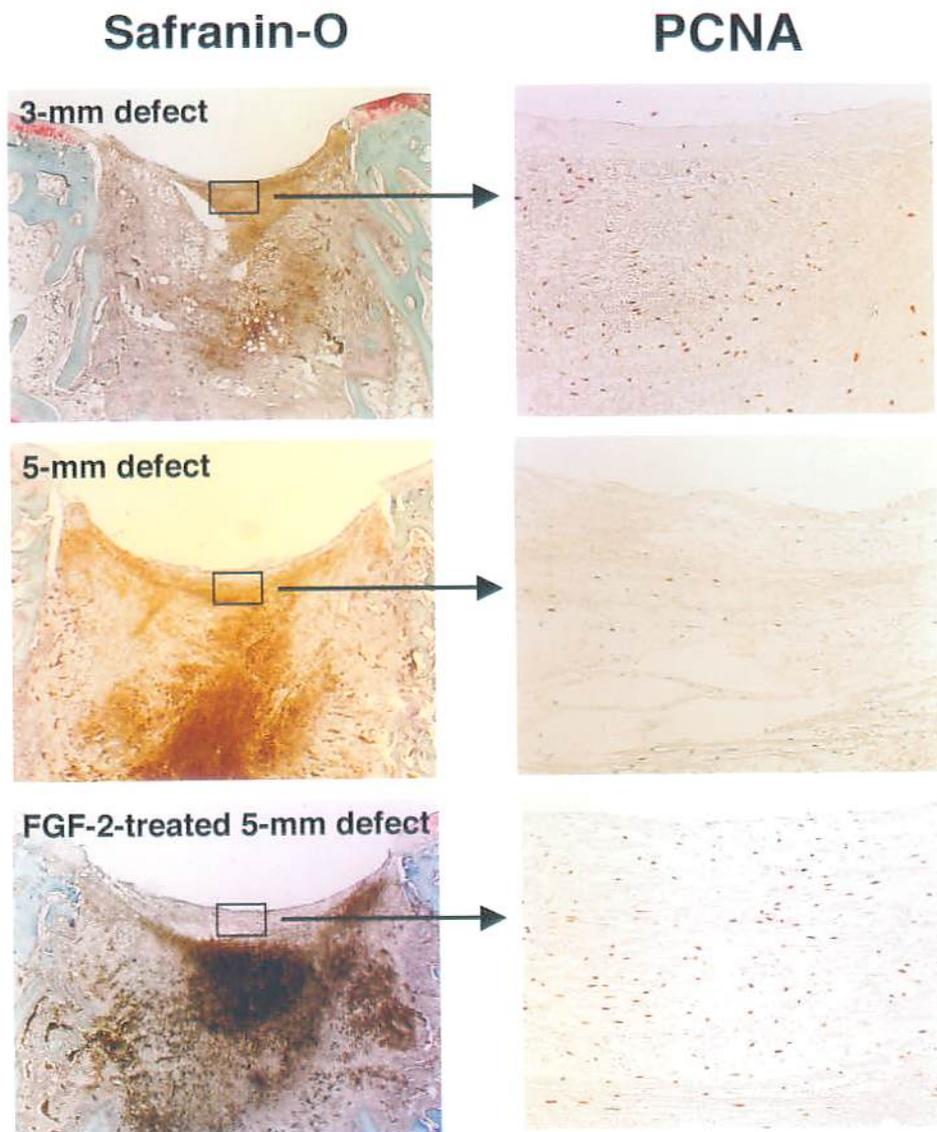
関節軟骨全層欠損の修復において、FGF シグナルが軟骨幹細胞の増殖維持シグナルとして機能していることは、欠損部修復組織内の組織幹細胞における PCNA 陽性細胞の測定によっても裏付けられた⁽²⁹⁾。すなわち、軟骨再生が自然に誘導される 3mm 径欠損では、欠損作成後 1 週の時点で約 60%の細胞が PCNA 陽性細胞であるのに対し、軟骨修復がみられない 5mm 径欠損ではわずかに 15%の PCNA 陽性細胞を認めるにすぎない。一方、FGF-2 を投与した 5mm 径欠損では 3mm 径欠損と同程度に PCNA 陽性細胞が増加していた(Fig.4)。以上の結果より、関節軟骨全層欠損の修復過程において、FGF シグナルは欠損部を充填する未分化な幹細胞の増殖を促進することにより、軟骨分化の誘導に必要な幹細胞密度を供給していることが示唆された。また、関節軟骨全層欠損の

Fig. 3



Inhibitory effect of anti FGF-2 monoclonal antibody (bFM-1) on spontaneous repair of the 3 mm diameter full-thickness defects.

Fig. 4



Immunohistochemistry of PCNA in the reparative tissue at 1 week after creation of the defects

修復機序が欠損サイズに依存する現象は、FGF-2 供給に起因しているものと推察された。

5)-4 本研究の目的

我々は、関節腔内に osmotic pump で FGF-2 を 2 週間持続的に注入することで関節軟骨全層欠損に軟骨再生が誘導されることを先行研究で明らかにした。一方、FGF-2 はより短期間の投与においても軟骨分化を促進する可能性が幾つかの研究で示唆されている。Shida らは、幼若ラットの膝関節腔内に FGF-2 を単回注入することで、大腿骨顆部辺縁の軟骨前駆細胞の細胞数が増加することを示している⁽³⁰⁾。Kawaguchi らは、ラット長管骨骨折治癒モデルを用いて骨折部への FGF-2 単回投与の影響を検討している。その結果、投与された FGF-2 は 3 日以内にその 90%が局所から消失するにもかかわらず、投与後 1 週の骨折部仮骨内には著明な軟骨形成の増大が見られることを示した⁽³¹⁾。これらの事実は、FGF-2 が軟骨形成過程できわめて早期に作用していることを示し、したがって、先行研究で持続投与を行った 2 週間よりもっと短期間の FGF-2 投与によっても関節軟骨全層欠損に軟骨再生が誘導できる可能性を示唆している。そこで本研究では、FGF-2 の 1 日、あるいは 3 日投与が 5mm 径の家兎関節軟骨全層欠損の修復過程に及ぼす影響について検討した。また欠損部に注入された FGF-2 の動態をラジオアイソトープを用いて評価し、さらに骨髄由来の間葉系細胞の遊走能に及ぼす FGF-2 の作用を *in vitro* で検討した。

6) 実験方法

6)-1 実験動物

体重 3.0-3.4kg、15-16 週齢の雄の日本白色家兎を用いた。全ての家兎は熊本大学動物資源開発センター (CARD) にてケージ内で個別に飼育した。実験動物の取り扱いと実験手順は CARD のガイドラインに沿って行った。

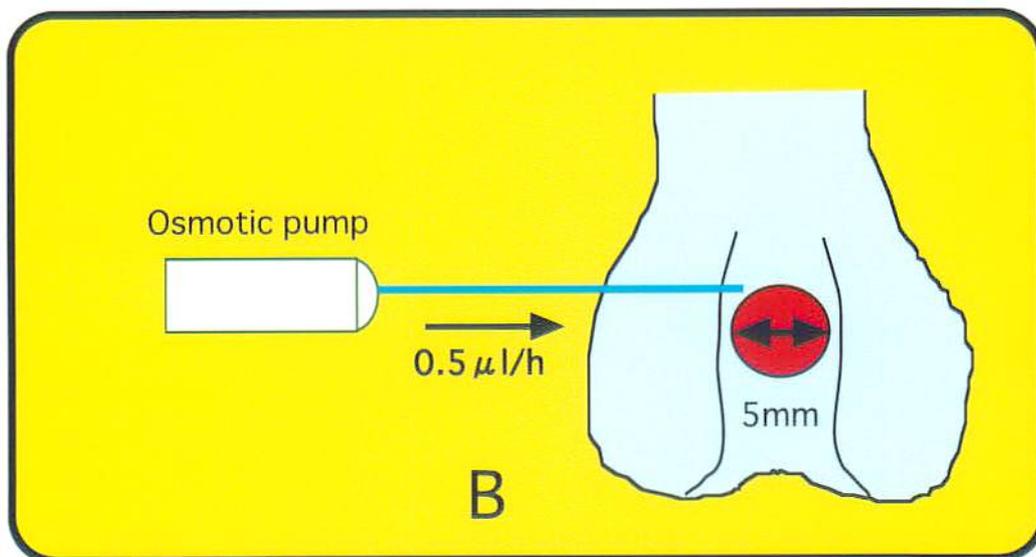
6)-2 FGF-2 の投与期間が関節軟骨全層欠損の修復反応に及ぼす影響に関する検討

6)-2-1 家兎関節軟骨全層欠損モデルの作成

42 羽の家兎にペントバルビタールによる静脈麻酔(30mg/kg)を行い、消毒後、傍膝蓋進入で膝関節を展開し、大腿骨膝蓋窩を露出した。膝蓋窩の中心にハンドドリルを用いて直径 5mm、深さ 4mm の関節軟骨全層欠損を作成した。

欠損作成後、osmotic pump と接続した無菌チューブ(内径 0.75mm、外形 1.45mm)の先端を 5mm 関節腔内に挿入し(Fig.5A)、osmotic pump 本体は大腿後外側の皮下に留置した。使用した osmotic pump は 0.5 μ l/h で 2 週間の薬物投与が可能であり(Fig.5B)、薬物投与の期間中チューブの先端が関節腔内に留置されていることは先行実験で確認されている^(10,32)。21 羽の家兎には 200 μ l の PBS で満たされた osmotic pump を設置し、他の 21 羽には FGF-2 (300ng/ml)で満たされた osmotic pump を設置した。

Fig.5



A: Photograph showing an osmotic pump connected with silastic medical grade tubing. The pump was placed subcutaneously in the posterolateral region of the thigh.

B: Schematic drawing of the administration of FGF-2 with an osmotic pump into 5 mm diameter full-thickness articular cartilage defects.

関節包と皮膚はそれぞれナイロン糸で縫合し、閉創した。術後は患肢の固定は行わず、ケージ内で自由に行動させた。

FGF-2 を投与された 21 羽の家兎を FGF-2 の投与期間によって 1 日、3 日、2 週投与群の 3 群（各 n=7）に分けた。PBS を投与された対照群の 21 羽も同様に 1 日、3 日、2 週投与群の 3 群（各 n=7）に分けた。実験のプロトコールに従い、各群の FGF あるいは PBS 投与期間最終日に再度ペントバルビタールによる静脈麻酔を行い、消毒後、大腿後外側に留置した osmotic pump 本体の直上に小切開を加え、関節包を展開することなく osmotic pump 本体とチューブを除去した。その後、再びケージ内で自由に飼育した。

6)-2-2 修復組織の組織学的評価

修復組織の組織化学的解析のために、全ての家兎は欠損作成後 8 週で致死量のペントバルビタールの静脈投与により屠殺された。自然修復する 3mm 径の欠損や FGF-2 を 2 週間投与した 5mm 径の欠損では、欠損作成後 8 週までに骨端の構築が再生されることが先行研究で確認されているため⁽¹⁰⁾、修復組織を評価するタイムポイントとして欠損作成後 8 週の時点が選択された。屠殺直後に欠損部を含む大腿骨遠位端を摘出し、室温で 1 時間の 4%パラホルムアルデヒド固定を行った。さらに 10% EDTA で 3 週間脱灰を行った後、パラフィン包埋した。欠損部修復組織の横断切片は 5 μ m 厚で作成し、H.E. 染色およびサフラニン-O 染色を行った。

修復組織の半定量的評価は、実験群の割り当ての情報を知らない 2 人の検者によっ

て行われた。評価には Pineda らの histological grading scale を一部改変したスコア (Table 1)⁽³³⁾を用いた。使用したスコアでは、良好な修復が高スコアとなるようオリジナルのスコアを逆にし、0(worst)から 14(best)で評価した。

本実験は、126羽の家兎を用いて3回繰り返され、同様な結果が得られた。

6)-3 FGF-2 の投与期間が関節軟骨全層欠損部修復組織内の細胞密度と細胞増殖能に及ぼす影響に関する検討

6)-3-1 家兎関節軟骨全層欠損モデルの作成

36羽の家兎に対し上述の方法で関節軟骨全層欠損を作成した。家兎 18羽に対し、同様に osmotic pump を用い FGF-2 を投与し、その投与期間により 1日、3日、1週間投与の3群(各 n=6)に分けた。残る 18羽は、対照群として PBS を 1日、3日、1週間投与した(各 n=6)。留置した osmotic pump は上述と同様に FGF-2 あるいは PBS の各投与期間最終日に抜去した。

6)-3-2 修復組織内の細胞密度と細胞増殖能の評価

全ての家兎は、組織化学的、免疫組織化学的評価のために欠損作成後 1 週の時点で致死量のペントバルビタールの静脈投与により屠殺された。屠殺直後に欠損部を含む大腿骨遠位端を摘出し、室温で 1 時間の 4%パラホルムアルデヒド固定を行った。さらに 10% EDTA で 3 週間脱灰を行った後、パラフィン包埋した。欠損部修復組織の横断切片は 5

Table 1
Scoring system for the histological appearance of
full-thickness defects of articular cartilage*

Characteristics	Score
Filling of defects (%)	
125	3
100	4
75	3
50	2
25	1
0	0
Reconstitution of osteochondral junction	
Yes	2
Almost	1
Not close	0
Matrix staining	
Normal	4
Reduced staining	3
Significant staining	2
Faint staining	1
No staining	0
Cell morphology	
Normal	4
Mostly hyaline and fibrocartilage	3
Mostly fibrocartilage	2
Some fibrocartilage, but mostly non-chondrocytic cells	1
Non-chondrocytic cell only	0
Perfect score	14

*Modified from Pineda *et al.* (1992).

μm 厚で作成し、H.E.染色を行った。続いて、欠損部へ遊走した間葉系細胞の増殖能を評価するために、隣接切片を用いて抗 PCNA 抗体を用いた免疫染色を行った。切片を脱パラフィンし、メタノールに溶解した 0.5% hydrogen peroxide で内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックし、0.1% BSA を混入した TBS で洗浄した。非特異的染色を減じるために normal horse serum でインキュベートした。室温で 1 時間抗 PCNA 抗体と反応させ、ABC キットと DAB を用いて抗体を固定、染色した。カウンターステインにはメチルグリーン染色を行った。positive control としては日本白色家兎の成長軟骨板を使用し、negative control としては抗 PCNA 抗体のかわりに normal horse serum を使用した。

修復組織の細胞密度の測定には切片を H.E.染色した後、Gally らの方法を参考に行った⁽³⁴⁾。欠損部を 1mm x 1mm の 20 領域に分割し、すでに骨化が見られている最深層の 5 領域を除いた 15 領域で測定を行った。光学顕微鏡を用いて、200 倍視野で、血管内皮細胞と炎症細胞を除いたすべての有核細胞をカウントし、15 領域の平均値を算出した。1 つのパラフィンブロックより 3 切片を使用し、3 切片の平均値をその検体の細胞密度とした。6 羽の平均値より各群の細胞密度を求めた。

修復組織内の PCNA 陽性細胞率は、Aizawa らの方法⁽³⁵⁾により、欠損部修復組織内の血管内皮細胞と炎症細胞を除いた総有核細胞数に対する PCNA 陽性細胞の比率を算出した。細胞密度の測定と同様に、1mm x 1mm の 20 領域中、最深層の 5 領域を除いた 15 領域について、400 倍視野で、各領域で 5 視野、すなわち 1 切片につき計 75 視野で計測した。1 検体につき 3 切片で計測したため、1 検体あたり 225 視野で PCNA 陽

性細胞数と PCNA 陰性細胞数を算出し、両細胞数の和に対する陽性細胞の比率を算出し、PCNA 陽性細胞率とした。各群 6 羽で PCNA 陽性細胞率を算出し、その平均値を各群の PCNA 陽性細胞率とした。

組織切片の評価は、実験群の割り当ての情報を知らない 2 人の検者によって行われた。本実験は、72 羽の家兎を用いて 2 回繰り返され、同様な結果が得られた。

6)-4 関節軟骨全層欠損部における FGF-2 滞留時間に関する検討

関節軟骨全層欠損部に投与された FGF-2 の滞留時間を RI を用いて検討した^(19,36,37)。使用した ¹²⁵I-labeled FGF-2 は NEN Life Science 社 (Boston, MA, USA) から購入し、その specific activity は 88.4 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ であった。12 羽の家兎を用い、上述した方法と同様な方法で、5mm 径の関節軟骨全層欠損を両膝関節に作成した。関節包と皮膚は別々に 4-0 ナイロン糸を用いて縫合し閉創した。翌日、3 羽の家兎に再度静脈麻酔を行い、右膝関節を展開後、0.343 μCi の RI 活性を持つと計算される 5ng の ¹²⁵I-labeled FGF-2 を 5 μl の PBS に混和して、欠損部をみたす血腫内にマイクロシリンジで注入した。注入後 30 分、60 分、90 分後に 1 羽ずつ家兎を屠殺し、即時に欠損内の血腫を小綿球で拭って回収した。屠殺直後に、左膝関節の欠損部を満たしている血腫にも同量の ¹²⁵I-labeled FGF-2 を混和した 5 μl の PBS を注入し、同様な方法で即座に欠損内の血腫を小綿球で拭って回収した。血腫を回収した綿球は、ただちに γ カウンタを用いてその RI 活性を測定した。全ての RI 測定は血腫を回収後 2 分以内に完了した。¹²⁵I-labeled FGF-

2 を欠損部の血腫内に注入後ただちに血腫を拭って回収した綿球と、同量の ^{125}I -labeled FGF-2 を直接注入した綿球の RI 活性を比較した予備実験では、血腫を綿球で拭って回収した場合の RI 活性の回収率は $91.3 \pm 4.8\%$ であった。各個体における欠損内 RI の残存率は、左膝関節の血腫を回収した綿球の RI 活性に対する右膝関節の血腫を回収した綿球の RI 活性の比率で算出した。欠損作成の翌日に、同様な測定を 4 回繰り返し、各群 4 羽の RI 残存率の平均をそれぞれのタイムポイントにおける RI 残存率とした。

6)-5 骨髓由来未分化間葉系細胞の遊走能に及ぼす FGF-2 の影響に

関する検討

6)-5-1 細胞培養

骨髓内の未分化間葉系細胞の採取とその培養には、Ashton ら、Wakitani らの方法を一部改変した方法を用いた^(21,38)。1 羽の家兎を致死量のペントバルビタールの静脈投与で屠殺し、両側の大腿骨と脛骨を無菌的に摘出した。それぞれの骨の両端を切除し、髓腔内の骨髓を serum free の Ham's F-12 培地に押し出した。これを 18G、21G、23G の注射針に順に通して、single cell suspension を作成した。さらに PBS で 2 回洗浄し、5 分間の遠心分離後、上清を捨て、10% FBS および抗生剤 (penicillin G 100 U/ml, streptomycin $100 \mu\text{g/ml}$) を混和した Ham's F-12 培地を入れて細胞浮遊液を作成した。 5.0×10^6 cells/ml の希釈細胞浮遊液を 90mm シャーレに加え、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ の環境下で培養した。培養開始 5 日後、付着していない浮遊細胞を洗浄除去し、その後は

1 日毎に培地を交換した。細胞が confluent に達した時点(Fig.6)で、trypsinization により細胞を採取し、遠心後、0.1% BSA 入り Ham's F-12 培地を入れ、以下の実験に使用した。

6)-5-2 細胞遊走能の評価

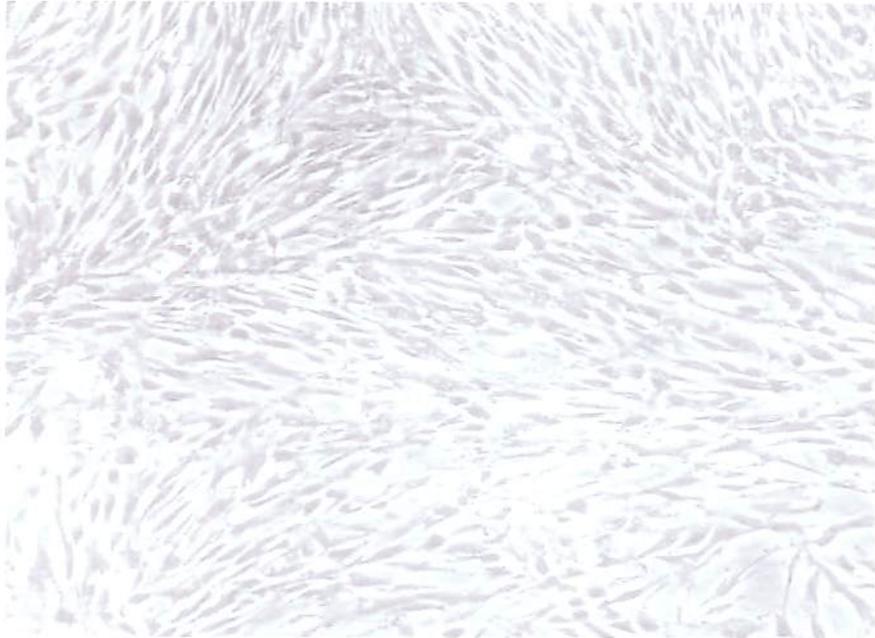
細胞遊走の評価には、8 μ m 径の pore size をもつ polycarbonate filter を備えた chemotaxis chamber を用い、checkerboard 形式で chamber 内の FGF-2 濃度を設定した。bottom chamber には 0ng/ml から 50ng/ml の FGF-2 を加えた 0.1%BSA を含む serum-free の Ham's F-12 培地を入れた。次いで upper chamber をプレート上に設置し、0ng/ml から 10ng/ml の FGF-2 を加えた 0.1%BSA を含む serum-free の Ham's F-12 培地中で培養した 1×10^5 cells/ml の細胞を chamber に加えた。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ の環境下で 5 時間インキュベートした後、filter 上面に付着し遊走しなかった細胞を綿球で除去し、filter を 100%メタノールで 5 分間固定した後、ギムザ染色を行い、スライドグラス上にマウントした。遊走細胞数の計測は、光学顕微鏡を用い、400 倍視野で、filter 1 枚につき任意の 16 視野を選択して行った。

本実験は、7 羽の家兎を用い 7 回繰り返し、結果はその平均値で示した。

6)-6 統計処理

組織学的スコア、PCNA 陽性細胞率、遊走能の結果における統計学的解析には Kruskal-Wallis test 及び Mann-Whitney U test を用いた。P value <0.05 を有意差ありとした。

Fig. 6



Photomicrograph showing a living culture of the bone-marrow-derived mesenchymal cells, harvested by trypsinization, and then used for subsequent chemotactic analysis.

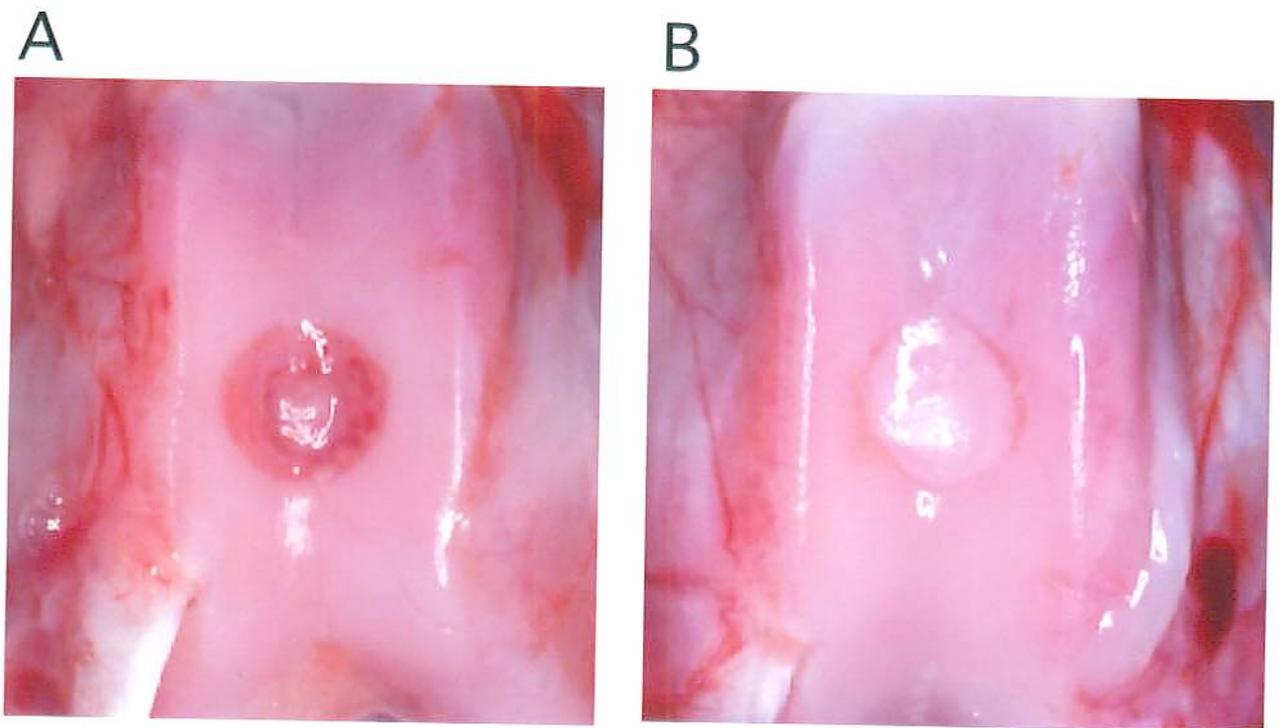
7) 実験結果

7)-1 FGF-2 の投与期間が関節軟骨全層欠損の修復反応に及ぼす影響

5mm 径の関節軟骨全層欠損を作成後 8 週における修復組織の肉眼的所見を Fig.7 に示す。PBS を投与した群では 1 日、3 日、2 週投与群とも色調は白色で周辺正常軟骨に比べ光沢が少なく、凹凸不整が見られた。一方、FGF-2 投与群では 1 日、3 日、2 週投与群とも修復組織の表面の光沢は正常軟骨に近く平滑であった。光学顕微鏡による修復組織の組織学的所見を Fig.8 に示す。PBS を投与した対照群では、軟骨下骨はほぼ元の高さまで修復されていたが、修復組織の表層は線維性組織で覆われていた。欠損表面を覆っている細胞はほとんどが軟骨細胞様の細胞ではなく、サフラニン-O による基質の染色性は見られなかった。これに対して、FGF-2 を投与した群では、1 日投与、3 日投与、2 週間投与のいずれでも、サフラニン-O に良染する基質をもった軟骨組織が関節表面を覆い、軟骨下骨は本来の関節軟骨と軟骨下骨の境界の高さまで再生していた。関節表面を被覆した軟骨組織では、球形の軟骨細胞は正常の関節軟骨と同様に柱状配列を呈していた。

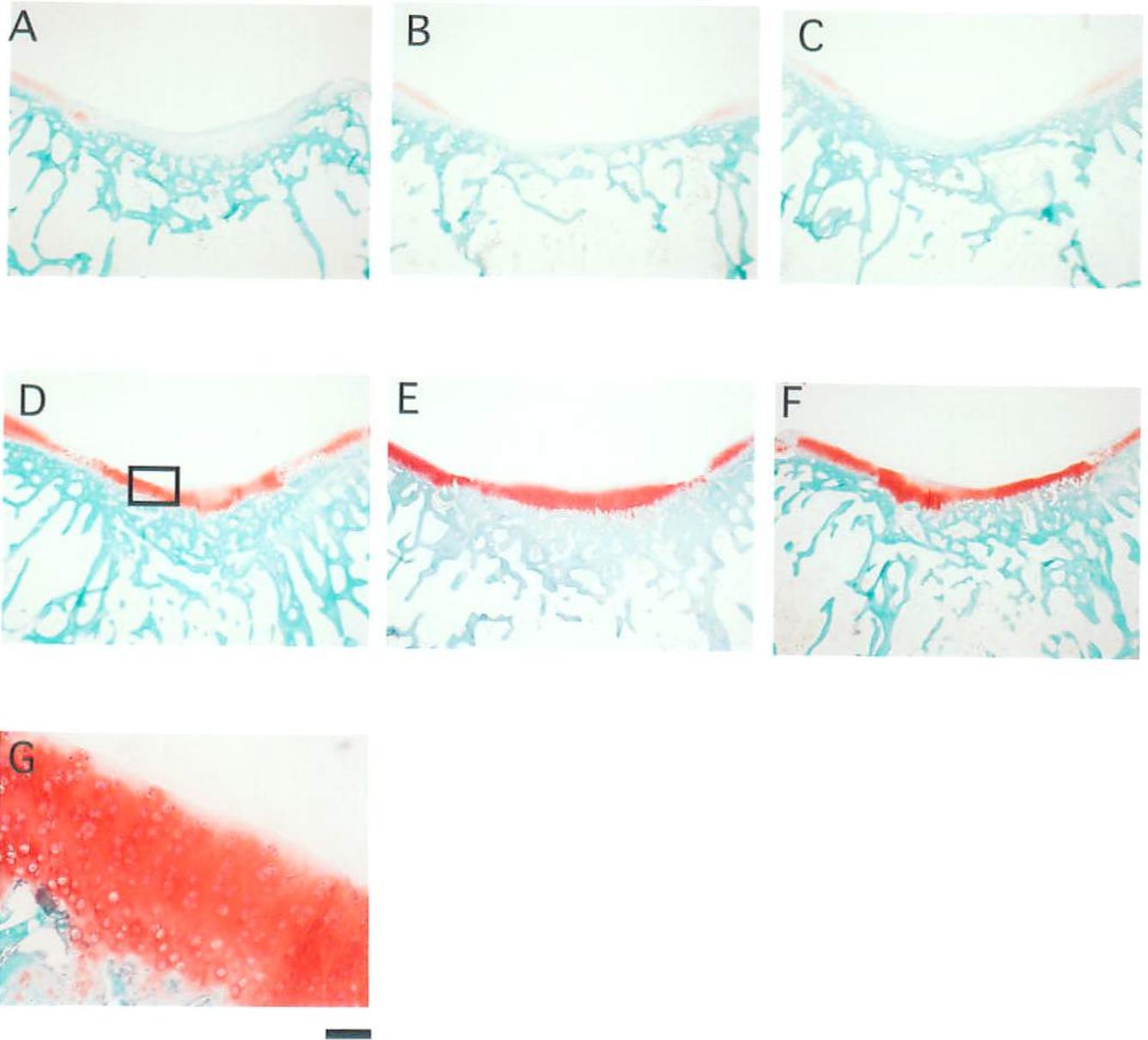
各群における修復組織の半定量的評価の結果を Fig.9 に示す。FGF-2 投与群では、1 日投与、3 日投与、2 週間投与のいずれにおいても、対照群より有意に良好な修復を示すスコアであった。FGF-2 投与群間においては、1 日投与、3 日投与は 2 週間投与と同等の修復スコアであった。この結果は、5mm 径の関節軟骨全層欠損において軟骨再生を誘導し本来の組織構築を回復させるには、FGF-2 を 1 日投与するだけで十分である

Fig. 7



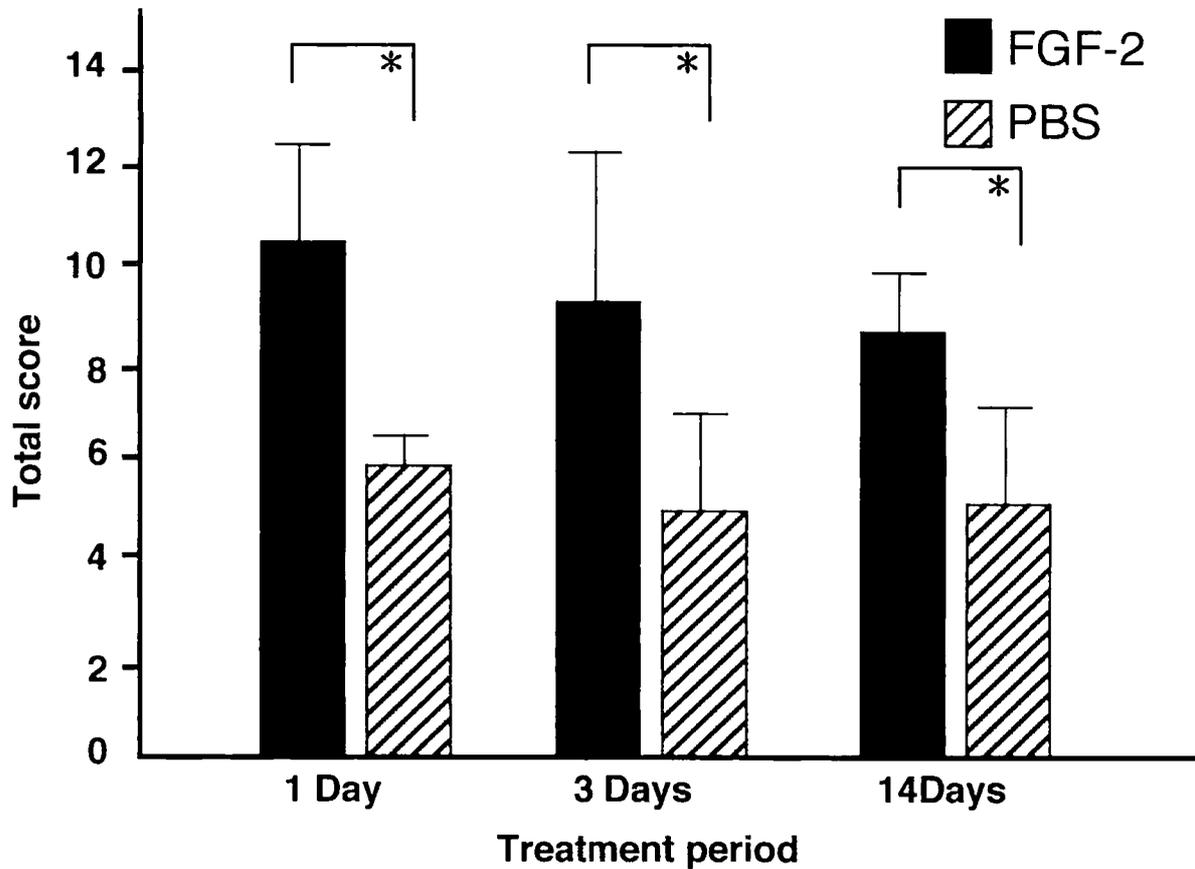
Gross appearance of the 5 mm diameter full-thickness defects treated with (A) PBS alone or (B) treated with 150pg/h of FGF-2 for 1 day at 8 weeks after creation of the defects.

Fig. 8



Regeneration of 5-mm full-thickness defects treated with PBS alone for 1 day (A), 3 days (B) or 2 weeks (C), or with FGF-2 (150 pg/h) for 1 day (D), 3 days (E), or 2 weeks (F). Panel G is higher-power photomicrograph of the framed area in panel D. All sections were stained with Safranin-O. Bar, 1 mm for A, B, C, D, E, and F; 100 μ m for G

Fig. 9



Histological score for the regeneration of full-thickness defect at 8 weeks after creation of the defects according to the histological grading scale (Table 1). The defects were treated with PBS alone or FGF-2 (150 pg/h) for 1,3 days or 2 weeks. Values are means \pm SD (n=7). Asterisks indicate results that were significantly different between the two groups (Mann-Whitney's U-test; $P < 0.05$).

ことを示している。

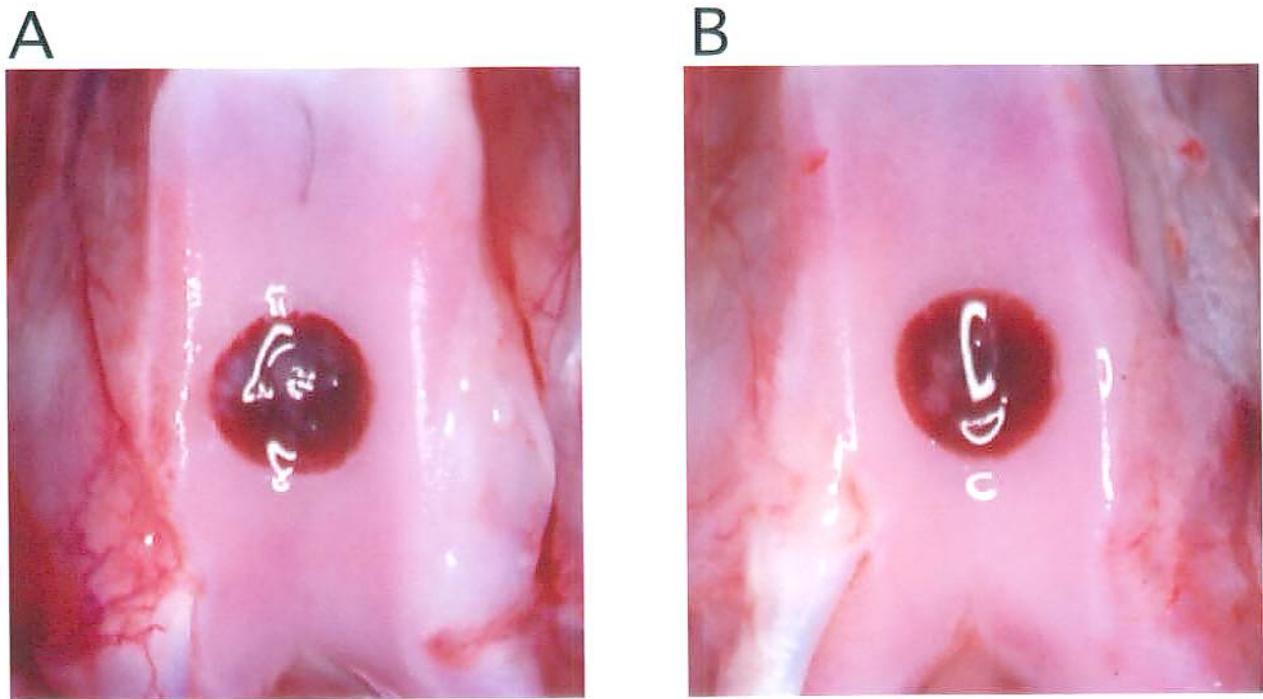
7)-2 FGF-2 の投与期間が関節軟骨全層欠損部修復組織内の細胞密度と細胞増殖能に及ぼす影響

欠損作成後 1 週における欠損部の肉眼的所見は、PBS、あるいは FGF-2 を投与されたいずれの群においても投与日数に関係なくまだ大部分が血腫様の外見を呈しており、表面中央の一部に線維性組織が形成され始めていた(Fig.10)。欠損作成後 1 週における修復組織内の間葉系細胞の増殖能力を評価するために、抗 PCNA 抗体を用いた免疫染色を行った。まず修復組織の H.E.染色を行った後、その前後の切片を PCNA 抗体で免疫染色した。

欠損作成後 1 週における FGF-2 投与群の修復組織は、FGF-2 の投与期間にかかわらず、PBS のみを投与された対照群の欠損部修復組織と有意な違いを認めなかった。欠損の中心は血腫で満たされ、その辺縁で未分化な紡錘形の間葉系細胞が増殖していた。欠損の深部と辺縁の軟骨下骨と隣接した部位では、骨芽細胞への分化がみられた。

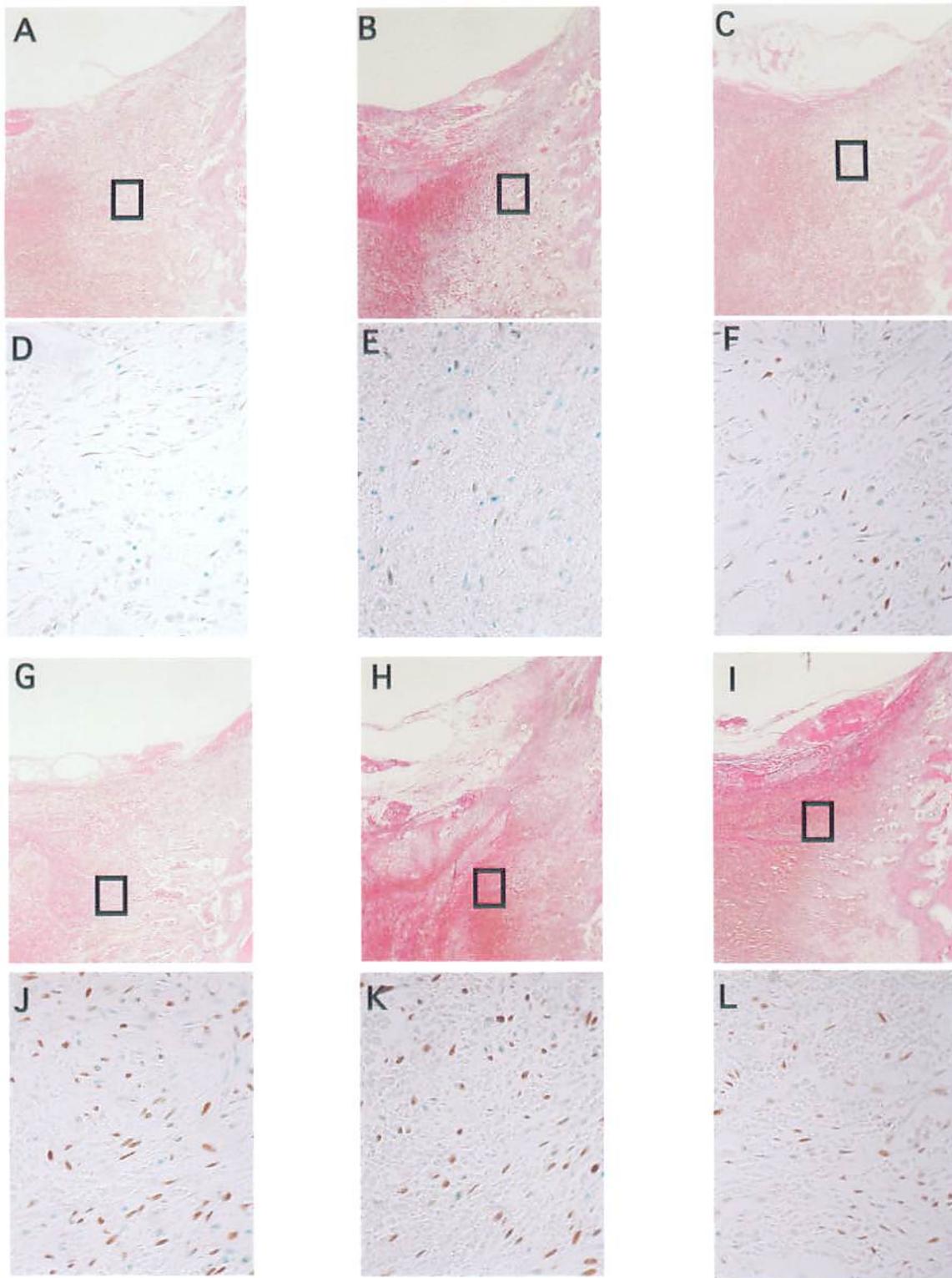
抗 PCNA 抗体に対する染色性は、対照群においては、欠損の周辺部をのぞいて修復組織内にほとんど確認されなかった。これに対して、FGF-2 投与群においては、1 日投与、3 日投与、1 週間投与のいずれにおいても、欠損内のほとんどの未分化細胞が抗 PCNA 抗体に染色されていた。FGF-2 投与群の免疫反応性に関しては、投与期間で有意な相違は認められなかった(Fig.11)。

Fig. 10



Gross appearance of the 5 mm diameter full-thickness defects treated with (A) PBS alone or (B) treated with 150pg/h of FGF-2 for 1 day at 1 week after creation of the defects.

Fig. 11



Transverse sections of the reparative 5-mm diameter defects treated with PBS alone for 1 day (A and D), 3 days, (B and E) or 1 week (C and F), and treated with FGF-2 (150 pg/h) for 1 day (G and J), 3 days, (H and K) or 1 week (I and L). All animals were killed at 1 week after creation of defects. Hematoxylin and eosin staining (A, B, C, G, H, and I) and PCNA immunostaining (D, E, J, K and L) were carried out. Panels D, E, F, J, K and L represent the PCNA-positive cells in the areas denoted by the framed areas in panels A, B, C, G, H and I, respectively, at a higher magnification. The sections were counterstained with methyl green. Bar, 1 mm for A, B, C, G, H and I; 125 μ m for D, E, F, J, K, and L.

各群における欠損部修復組織内の細胞密度及び PCNA 陽性細胞率を Table2 に示す。欠損作成後 1 週において、対照群における PCNA 陽性細胞率は約 20%であるのに対し、FGF-2 投与群ではいずれの投与期間においても PCNA 陽性細胞率が 50%以上で、対照群におけるそれよりも有意に高率であった。1 週における細胞密度も FGF-2 投与群が対照群よりも有意に高かった。FGF-2 を投与した群では、投与期間により細胞密度に有意な差はみられなかった。

7)-3 ¹²⁵I- FGF-2 の関節軟骨全層欠損部からの消失

測定した各タイムポイントにおいて欠損部内に残留した RI 活性を Fig.12 に示す。欠損部内に残留した RI 活性は、時間依存性に急速に減少し、投与後 30 分で約 40%、90 分後には約 20%しか残存していなかった。この結果より、欠損部血腫内に注入された FGF-2 の半減期は 30 分以内と推定された。

7)-4 骨髄由来未分化間葉系細胞の遊走能に及ぼす FGF-2 の影響

家兎骨髄由来の未分化間葉系細胞の FGF-2 に対する遊走反応を Fig.13 に示す。Bottom chamber に FGF-2 が含まれない時の遊走細胞数は 8.7 ± 6.7 cells であるのに対し、FGF-2 濃度が 0.1 ng/ml では 41.6 ± 17.6 、1 ng/ml では 55.7 ± 25.6 、5ng/ml で 68 ± 23.8 、10ng/ml で 83.6 ± 18.4 、50ng/ml で 57.8 ± 32.0 と、細胞遊走は FGF-2 濃度が 0.1ng/ml から 10ng/ml までの間で濃度依存性に促進された。最大活性は

Table 2

Cell density and occurrence of the PCNA-positive undifferentiated cells in the reparative tissue at 1 week after creation of defects

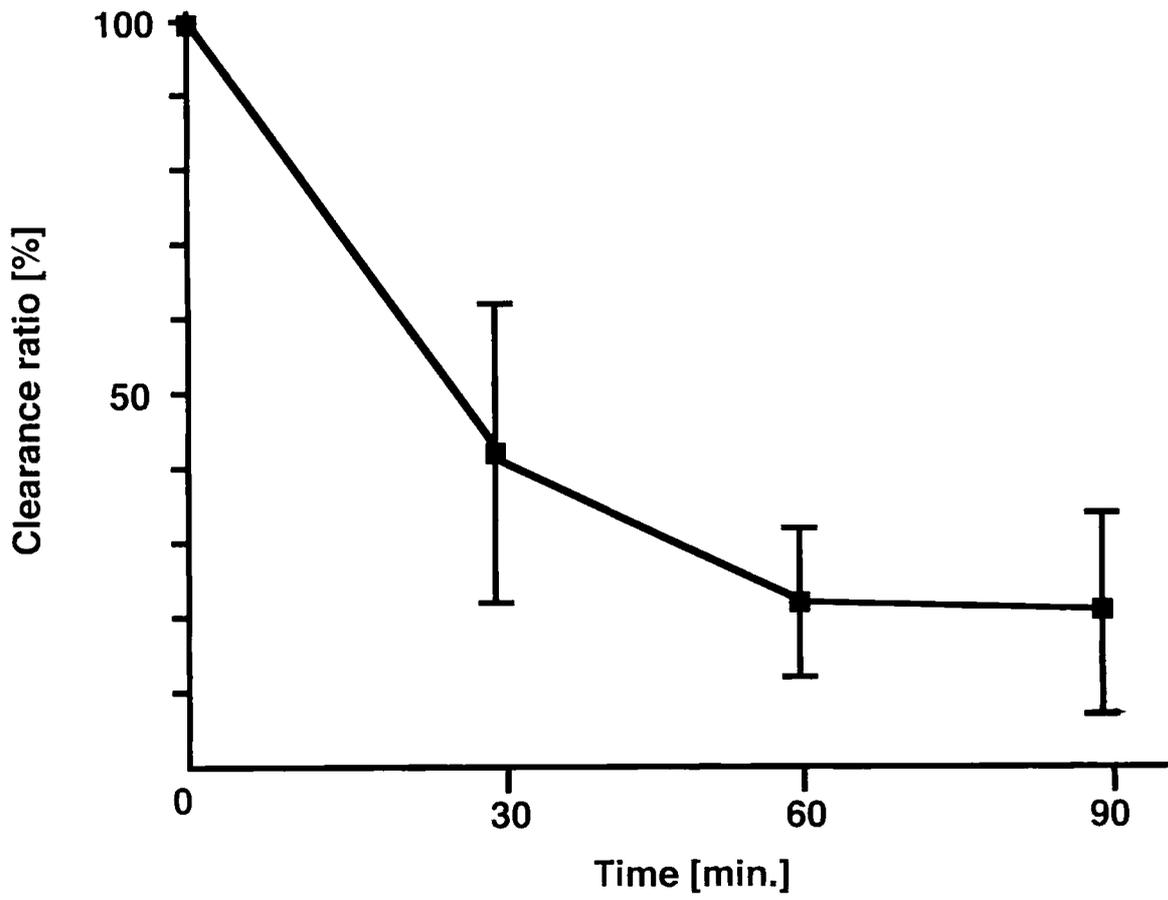
Treatment period	Cell density (cells $\times 10^{-3}/\mu\text{m}^2$)		PCNA-positive cells (% of total)	
	FGF-2	PBS alone	FGF-2	PBS alone
1 Day	1.22 \pm 0.31	0.74 \pm 0.19	51.9 \pm 14.4	28.9 \pm 8.7
3 Days	1.12 \pm 0.16	0.69 \pm 0.20	54.1 \pm 7.0	27.3 \pm 5.6
7 Days	1.21 \pm 0.16	0.78 \pm 0.24	53.9 \pm 6.1	32.9 \pm 4.3

Values are the means \pm SD for six animals.

All nuclei were counted in a total of 90 fields using three sections for each animal at a magnification of $\times 200$, as described in Materials and Methods.

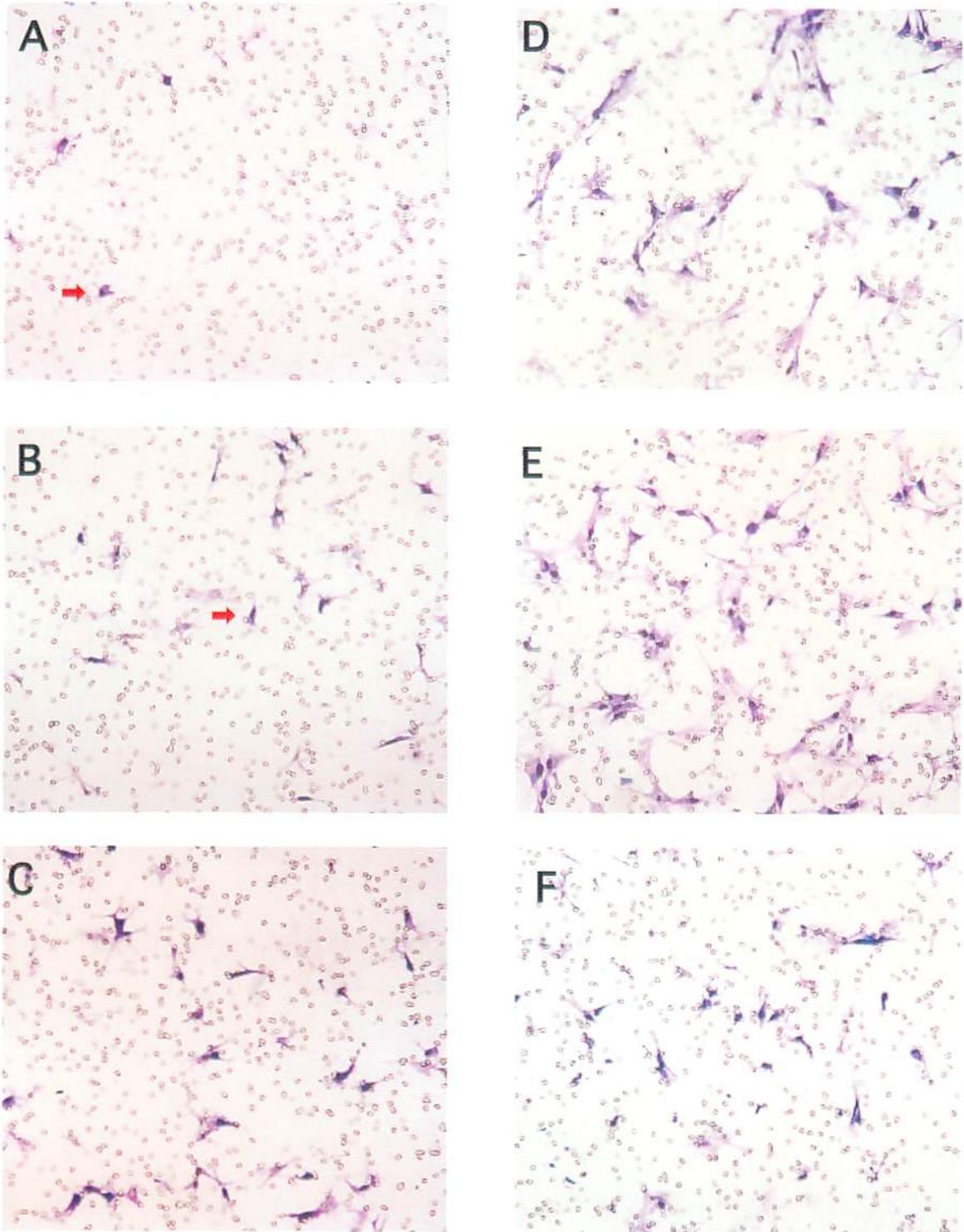
PCNA-positive and negative undifferentiated cells also were counted in a total of 225 fields using three sections for each animal at a magnification of $\times 400$.

Fig. 12



Time course of the ^{125}I -labeled FGF-2 clearance ratio.
Values are the mean \pm SD (n=4).

Fig.13

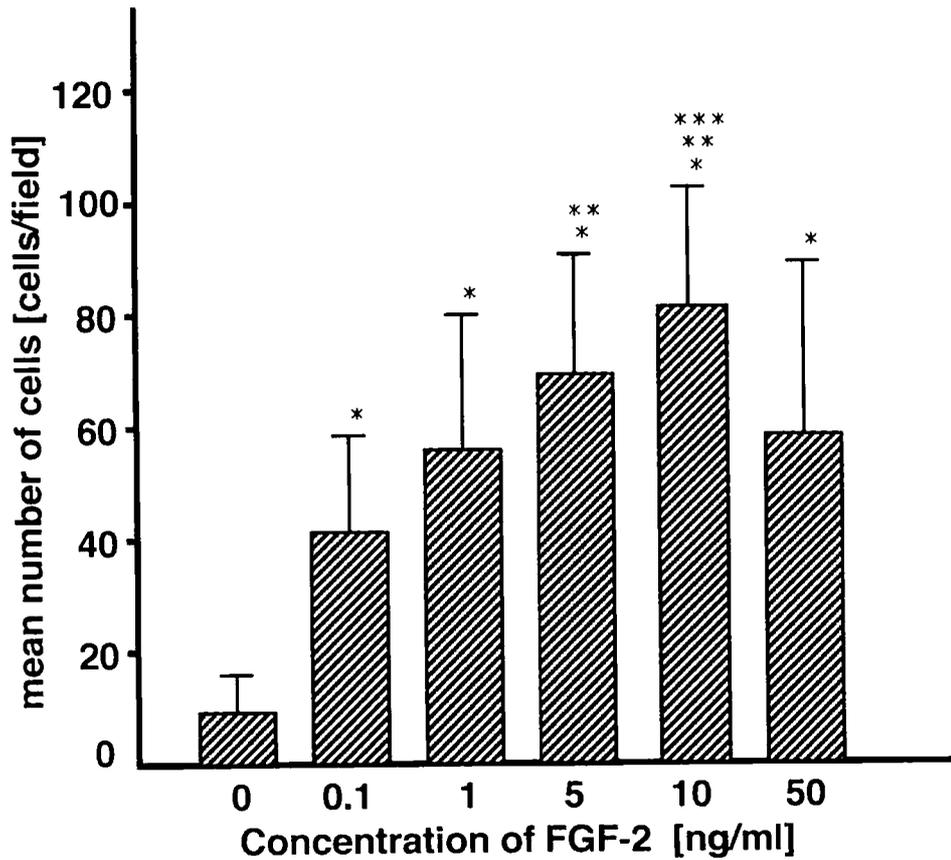


Representative photomicrographs demonstrating the migration of marrow-derived mesenchymal stem cells (arrowhead) in response to FGF-2. Cells suspended in Ham's F-12 medium without FGF-2 were placed in the upper well of the chemotaxis chamber after loading the lower well with Ham's F-12 medium alone (A), 0.1ng/ml , 1ng/ml , 5ng/ml , 10ng/ml , and 50ng/ml of FGF-2. Scale bar 100 μ m

10ng/ml でみられ、その遊走細胞数は培地に FGF-2 を含まない対照群と比較して約 9.6 倍であった。50ng/ml では遊走活性は低下したが、対照群と比較すると有意に上昇していた(Fig.14)。

さらに、FGF-2 の正の濃度勾配で観察される chemotactic migration と random migration である chemokinetic migration を区別するために、checkerboard analysis を行った。その結果、Table 3 に示すように、FGF-2 の chemotactic action は明らかであったが、chemokinetic migration はほとんど認められなかった。

Fig. 14



Chemotactic response of marrow-derived mesenchymal cells to FGF-2. Marrow-derived mesenchymal cells placed in the upper well of the chamber after loading the lower well with FGF-2 at 0.1 to 50 ng/ml and FGF-free medium (0 ng/ml) as a negative control. Values are the mean \pm SD for 7 experiments.

*Significantly different from 0 ng/ml. **significantly different from 0.1 ng/ml, and ***significantly different from 1 ng/ml (Mann-Whitney's U-test; $P < 0.05$).

Table 3

Chemokinetic response using various concentrations of FGF-2 in the upper and lower well of the chemotaxis chamber

FGF-2 (ng/ml)	Number of cells migrated into lower wells	
Upper well	0 ng/ml	10 ng/ml
Lower well	0 ng/ml	10 ng/ml
0 ng/ml	8.7 ± 6.7 [*]	11.5 ± 4.7 [*]
10 ng/ml	83.6 ± 18.4	18.1 ± 11.7 [*]

Cells that migrated into lower wells through the nucleopore filters were counted in 6 light microscope fields (x100) per filter.

Values are means ± standard deviations for seven experiments.

Astarisks indicate results that were significantly different from [upper 0 / lower 10] group (Mann-Whitney U-test; P<0.05).

8) 考察

我々は、家兎大腿骨膝蓋窩に作成した自然修復不可能な 5mm 径の関節軟骨全層欠損において、欠損作成後 2 週間 FGF-2 を膝関節腔内に持続的に注入すると良好な関節軟骨と軟骨下骨の再生が誘導されることを先行研究で示した⁽¹⁰⁾。この結果を踏まえ、本研究ではさらに、欠損作成後 1 日あるいは 3 日というより短期間の FGF-2 投与が 5mm 径欠損の修復反応に及ぼす影響について検討した。その結果、FGF-2 の短期間投与でも 2 週間投与と同等の再生修復反応が得られることが示された。すなわち、5mm 径の関節軟骨全層欠損において軟骨再生を誘導するには、FGF-2 を関節腔内に 1 日持続投与するだけで十分であることが明らかとなった。

関節の滑膜組織にも未分化な間葉系細胞が存在することが示唆されているが^(9,39,40)、関節軟骨全層欠損の修復においては、欠損部深層の骨髄から欠損部へ遊走する未分化な間葉系細胞が修復部を充填する主要な細胞であると考えられている⁽¹²⁾。関節軟骨全層欠損の経時的な修復過程については先にも述べたが、欠損部にはまず血腫が充満し、2~3 日経過すると未分化な細胞が血腫の辺縁に出現する。その後、未分化な細胞は欠損の中央に向け遊走し、1 週間までには欠損はほぼ未分化な細胞で満たされる⁽²⁹⁾。我々は先行研究で、欠損部を充填した細胞の中にマクロファージや血管内皮細胞、骨芽細胞の存在を確認するために、CD68、CD31、アルカリフォスファターゼに対する免疫組織学検討を行った。その結果、欠損内修復組織中の細胞にこれらに対する免疫応答性は認められなかった⁽²⁹⁾。これらの知見より修復初期の組織は主に骨髄より遊走してきた未分化な

間葉系細胞で構成されていることが示唆される。

旺盛な自己複製能の促進維持による軟骨前駆細胞の細胞密度の増加は、軟骨形成が開始される上で必須の要件であると考えられている^(20,41-43)。先にも述べたように、我々は先行研究で、関節軟骨全層欠損の修復過程における軟骨形成能は、欠損内修復組織を充填した未分化な細胞の PCNA 陽性細胞率によく相関することを示した⁽²⁹⁾。すなわち、軟骨が自然に再生する 3mm 径の欠損においては欠損作成後 1 週の時点で欠損内修復組織の PCNA 陽性細胞率は約 60%にも達するが、軟骨が再生しない 5mm 径の欠損では PCNA 陽性細胞率は約 15%と有意に低かった。一方、5mm 径の欠損に FGF-2 を持続的に投与した場合は、欠損作成後 1 週における PCNA 陽性細胞率は 3mm 径の欠損のそれと同程度のレベルに上昇していた。さらに今回の研究では、FGF-2 をわずか 1 日投与した 5mm 径の欠損においても、欠損内修復組織の PCNA 陽性細胞率は FGF-2 を 1 週間持続投与した時と同等に上昇することが明らかとなった。PCNA は DNA 合成に必須な 36kDa の塩基性核蛋白である⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾。この核蛋白は、細胞周期の G1 phase 後期から S phase にかけて合成される^(45,47)。すなわち、増殖しているすべての細胞が抗 PCNA 抗体に染色されるわけではなく、従って、PCNA 陽性である細胞数は実際増殖している細胞数より少ないと考えられる。細胞周期におけるそれぞれの phase の時間は細胞のタイプによって異なるが⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾、本研究で FGF-2 を 1 日投与した場合の 5mm 径欠損内修復組織中の PCNA 陽性細胞率が 50%以上の高い率を示すことは、欠損内修復組織中のほとんどすべての細胞が増殖期にあることを示唆するものと考えられる。

in vivo で投与された FGFs は投与局所から急速に消失することがいくつかの研究で

示されている^(31,36)。成熟ラットの膝関節腔内に注入された FGF-2 は、注入後わずか数時間しか関節腔内にはとどまらない⁽³⁰⁾。この点に関して、本研究でも同様な結果が得られた。すなわち、関節軟骨全層欠損に充満した血腫内に注入した FGF-2 は、投与後 30 分以内にその半分以上が欠損内から消失することが示された。PCNA の半減期は、細胞のタイプによって 8~60 時間であると報告されている⁽⁵¹⁾。従って、投与された FGF-2 がその局所から急速に消失することを考えると、膝関節腔内に一日だけ投与された FGF-2 が PCNA 陽性細胞率で示されるような極めて旺盛な細胞増殖の促進に直接作用しているとは考えにくい。

関節軟骨全層欠損の修復過程において、骨髄に由来する未分化間葉系細胞の欠損内への遊走と動員は最も早期に観察される細胞反応であり、軟骨性修復を誘導する上で極めて重要な制御段階と考えられる。FGF-2 は、細胞増殖の促進作用に加え、ケラチノサイト、血管内皮細胞、神経堤細胞、胎生期肢芽間充織細胞など、種々の細胞に対して細胞遊走を促進する作用が報告されている⁽⁵²⁻⁵⁵⁾。しかしながら、骨髄に由来する未分化間葉系細胞に対する FGF-2 の細胞遊走に対する影響については明らかではない。そこで我々は、本研究で、家兎骨髄に由来する未分化間葉系細胞に対する FGF-2 の細胞遊走促進作用について検討した。骨髄の未分化間葉系細胞の分離と培養は、Wakitani ら、Ashton らの方法を改変して行った^(21,38)。なお、Ashton らは同様な方法で分離、培養した細胞が骨軟骨へ分化する能力を持つことをヌードマウスで diffusion chamber assay を用いて確認している。本実験の結果では、FGF-2 は骨髄由来の未分化間葉系細胞の遊走能を 10ng/ml の FGF-2 濃度をピークとして濃度依存性に促進させることが *in vitro* で示さ

れた。この *in vitro* での結果を踏まえると、関節軟骨全層欠損の修復過程における FGF-2 の主要な働きは、骨髄に由来する未分化間葉系細胞の欠損内への遊走と動員にあることが示唆される。

本研究で我々は、関節軟骨全層欠損に対する FGF-2 の 1 日投与が 3 日投与や 2 週間投与と同程度に欠損部に良好な軟骨再生を誘導することを示した。FGF-2 の 1 日投与は、本来の関節軟骨との境界の高さまで回復した軟骨下骨とその表面を被覆する関節軟骨で構成された骨端本来の組織構築を再生するのに十分であった。FGF-2 の投与により再生誘導された関節軟骨は、正常の硝子軟骨と同様に、II 型コラーゲンやグリコサミノグリカンに富んだ細胞外基質から構成されていることはすでに先行研究で明らかになっている⁽²⁹⁾。しかしながら、FGF-2 の投与期間が再生軟骨の力学的特性に影響を与えるかどうかについては今後の検討が必要である。

9) 結語

1. 家兎大腿骨膝蓋窩に作成した 5mm 径の関節軟骨全層欠損に軟骨再生を誘導するには、関節腔内に FGF-2 を 1 日持続的に投与するだけで十分であった。
2. 関節腔内に FGF-2 を 1 日持続的に投与すると、欠損作成後 1 週の時点で欠損内修復組織の未分化な細胞の増殖能は著明に上昇した。
3. 欠損部血腫内に注入された FGF-2 の半減期は 30 分以内と推定された。
4. FGF-2 は *in vitro* において骨髄より採取・培養した未分化間葉系細胞の遊走を促進した。
5. 以上の結果より、関節軟骨全層欠損の修復過程における FGF-2 の主要な働きは、骨髄に由来する未分化間葉系細胞の欠損内への遊走と動員にあることが示唆された。

10) 参考文献

1. O'Doriscol SW. The repair of major osteochondral defects in joint surfaces by neochondrogenesis with autogenous osteoperiosteal grafts stimulated by continuous passive motion. Clin Orthop 1986; 208: 131-40
2. 蔡詩岳、藤井克之 自家骨膜移植による関節軟骨の修復 関節外科. 1995; 14: 68-76
3. Matsusue Y, Yamamuro T, Hama H. Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. Arthroscopy 1993; 9: 318-21
4. Hangody L. Kish G. Karpati Z. Szerb I. Eberhardt R. Treatment of osteochondritis dissecans of the talus: use of the mosaicplasty technique--a preliminary report. Foot Ankle Int 1997; 18: 628-34
5. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med. 1994 ;331: 889-95
6. Mankin HJ. Current concept review. The response of articular cartilage to mechanical injury. J Bone Joint Surg Am 1982; 64: 460-6
7. Kim HK, Moran ME, Salter RB. The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits. J Bone Joint Surg Am 1991; 73: 1301-15.

8. Hunziker EB, Rosenberg LC. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am* 1996; 78: 721-33.
9. Convery FR, Akeson WH, Keown GH. The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses. *Clin Orthop* 1972; 82: 253-62
10. Otsuka Y, Mizuta H, Takagi K, Iyama K, Yoshitake Y, Nishikawa K, Suzuki F, Hiraki Y. Requirement of fibroblast growth factor signaling for regeneration of epiphyseal morphology in rabbit full-thickness defects of articular cartilage. *Dev Growth Differ* 1997; 39: 143-56
11. Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, Simon TM. Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model; a preliminary study. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83: 53-6
12. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1993; 75: 532-53.
13. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143-7.

14. Shukunami C, Ohta Y, Sakuda M, Hiraki Y. Sequential progression of the differentiation program by bone morphogenetic protein-2 in chondrogenic cell line ATDC5. *Exp Cell Res* 1998; 241: 1-11.
15. Shimizu A, Tada K, Shukunami C, Hiraki Y, Kurokawa T, Magane N, et al. A Novel Alternatively Spliced Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Isoform Lacking the Acid Box Domain Is Expressed during Chondrogenic Differentiation of ATDC5 Cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 11031-40.
16. Kulyk WM, Rodgers B, Greer K, Kosher RA. Promotion of embryonic chick limb cartilage differentiation by transforming growth factor- β . *Dev Biol* 1989; 135: 424-30.
17. Haas AR, Tuan RS. Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: II. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 requires modulation of N-cadherin expression and function. *Differentiation* 1999; 64: 77-89.
18. Sellers RS, Peluso D, Morris EA. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1997; 79: 1452-63.

19. Sellers RS, Zhang R, Glasson SS, Kim HD, Peluso D, D'Augusta DA, et al. Repair of articular cartilage defects one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Bone Joint Surg Am* 2000; 82: 151-60.
20. Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM. Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop* 1997; 254-69.
21. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young R, Mansour JM, Caplan AI, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1994; 76: 579-92.
22. Niswander L, Tickle C, Vogel A, Booth I, Martin GR. FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs out growth and patterning of the limb. *Cell* 1993; 75: 579-87.
23. Niswander L. Interplay between the molecular signals that control vertebrate limb development. *Int J Dev Biol* 2002; 46: 877-81.
24. Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, Achondroplasia. *Cell* 1994; 78: 335-42
25. Cohn MJ, Izpisua-Belmonte JC, Abud H, Heath JK, Tickle C. Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell* 1995; 80: 739-46

26. 開祐司、宿南知佐 *In vitro* 軟骨分化モデルの構築と解析. *Tiss Cult Res Commun* 1997; 16: 111-21
27. 開祐司 軟骨再生の分子機構と治療への展開. *最新医学* 1999; 103: 2843-9
28. 開祐司、宿南知佐、水田博志 軟骨幹細胞の増殖分化と関節軟骨の再生. *リウマチ科* 1999; 22: 10-7
29. Mizuta H, Kudo S, Nakamura E, Otsuka Y, Takagi K, Hiraki Y. Active proliferation of mesenchymal cells prior to the chondrogenic repair response in rabbit full-thickness defects of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12: 586-96.
30. Shida J, Jingushi S, Izumi T, Iwaki A, Sugioka Y. Basic fibroblast growth factor stimulates articular cartilage enlargement in young rats in vivo. *J Orthop Res* 1996; 14: 265-72.
31. Kawaguchi H, Kurokawa T, Hanada K, Hiyama Y, Tamura M, Ogata E, et al. Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology* 1994; 135: 774-81.
32. Kudo S, Mizuta H, Otsuka Y, Takagi K, Hiraki Y. Inhibition of chondrogenesis by parathyroid hormone in vivo during repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 253-60.

33. Pineda S, Pollack A, Stevenson S, Goldberg V, Caplan A. A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair. *Acta Anat Basel* 1992; 143: 335-40.
34. Gallay SH, Miura Y, Commisso CN, Fitzsimmons JS, O'Driscoll SW. Relationship of donor site to chondrogenic potential of periosteum in vitro. *J Orthop Res* 1994; 12: 515-25.
35. Aizawa T, Kokubun S, Tanaka Y. Apoptosis and proliferation of growth plate chondrocytes in rabbits. *J Bone Joint Surg Br* 1997; 79: 483-6.
36. Jingushi S, Heydemann SK, Kana SK, Macey LR, Bolander ME. Acidic fibroblast growth factor (aFGF) injection stimulates cartilage enlargement and inhibits cartilage gene expression in rat fracture healing. *J Orthopaedic Res* 1990; 8: 364-71.
37. Kawai K, Suzuki S, Tabata Y, Ikada Y, Nishimura Y. Accelerated tissue regeneration through incorporation of basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres into artificial dermis. *Biomaterials* 2000; 21: 489-99.
38. Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop* 1980; 294-307.

39. Hunziker EB, Driesang IM, Morris EA. Chondrogenesis in cartilage repair is induced by members of the transforming growth factor-beta superfamily. *Clin Orthop* 2001; S171-81.
40. Hunziker EB. Growth-factor-induced healing of partial-thickness defects in adult articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9: 22-32.
41. Osdoby P, Caplan AI. Osteogenesis in cultures of limb mesenchymal cells. *Dev Biol* 1979; 73: 84-102.
42. Osdoby P, Caplan AI. A scanning electron microscopic investigation of in vitro osteogenesis. *Calcif Tissue Int* 1980; 30: 43-50.
43. George M, Chepenik KP, Schneiderman MH. Proliferation of cells undergoing chondrogenesis in vitro. *Differentiation* 1983; 24: 245-9.
44. Tan CK, Castillo C, So AG, Downey KM. An auxiliary protein for DNA polymerase-delta from fetal calf thymus. *J Biol Chem* 1986; 261: 12310-6.
45. Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 1987; 326: 515-7.
46. Prelich G, Tan CK, Kostura M, Mathews MB, So AG, Downey KM, et al. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein. *Nature* 1987; 326: 517-20.
47. Bravo R, Celis JE. A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *J Cell Biol* 1980; 84: 795-802.

48. Steel GG. Growth kinetics of tumors. Oxford: Clarendon Press, 1977.
49. Wright NA, Cell proliferation in health and disease. In: Recent advances in histopathology. Anthony, PP, MacSween, RM, Eds. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1984: 17-33.
50. Wright NA, Alison M. The biology of epithelial cell populations. Oxford: Clarendon Press, 1984.
51. Gannon JV, Nebreda A, Goodger NM, Morgan PR, Hunt T. A measure of the mitotic index: studies of the abundance and half-life of p34cdc2 in cultured cells and normal and neoplastic tissues. *Genes Cells* 1998; 3: 17-27.
52. Andresen JL, Ehlers N. Chemotaxis of human keratocytes is increased by platelet-derived growth factor-BB, epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha, acidic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-I, and transforming growth factor-beta. *Curr Eye Res* 1998; 17: 79-87.
53. Kanda S, Lerner EC, Tsuda S, Shono T, Kanetake H, Smithgall TE. The nonreceptor protein-tyrosine kinase c-Fes is involved in fibroblast growth factor-2-induced chemotaxis of murine brain capillary endothelial cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 10105-11.
54. Kubota Y, Ito K. Chemotactic migration of mesencephalic neural crest cells in the mouse. *Dev Dyn* 2000; 217: 170-9.

55. Webb SE, Lee KK, Tang MK, Ede DA. Fibroblast growth factors 2 and 4 stimulate migration of mouse embryonic limb myogenic cells. *Dev Dyn* 1997; 209: 206-16.