

論文内容要旨

論文題目

Increased production of osteolytic mediators and resorbing capacity of carbonated calcium phosphate in titanium laden macrophages derived from bone marrow.

(チタン貪食骨髄由来マクロファージは骨吸収性物質の産生増加と炭素化燐酸カルシウム吸収能を示す。)

責任講座:整形外科学講座

氏名: 玉木 康信

[内容要旨]

【目的】人工股関節全置換術後に生じる非感染性の弛み, 人工股関節周囲の骨溶解(オステオライシス)が臨床的大きな問題である. 一方, マクロファージは異物貪食能を有し人工股関節周囲オステオライシスや人工関節の弛みにおける生体反応に大きく関与する. 本研究では, 人工関節素材摩耗粉に対する骨髄マクロファージの機能の評価を目的に, 骨髄マクロファージの初代培養系の確立を目指した. また, 骨髄マクロファージの純チタン顆粒貪食後の骨吸収性サイトカイン, 細胞外基質蛋白分解酵素とその内因性阻害因子のメッセンジャーRNA(mRNA)の発現変化, さらに炭素化燐酸カルシウム層の吸収能を評価した.

【方法】8週齢 Wistar ラット大腿骨からフィルター濾過法を用いて骨髄細胞浮遊液を作成し, マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF, 10ng/ml)の存在下で72時間培養した. 壁吸着性細胞をトリプシン・EDTA法で分離後, 4×10^5 cells/mlの細胞密度で再び培養し, 酵素細胞化学的に酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP)の発現を, 免疫細胞化学的にCD68とcathepsin Kを, さらに墨汁貪食能を評価した. さらに純チタン顆粒(0.15%)添加により, 定量的real-time polymerase chain reaction(PCR)法によるinterleukin(IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor(TNF)- α , M-CSF, cathepsin K, matrix metalloproteinase(MMP)-2, -3, -9, -12, -13, -14, tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP)-1, -2, の各mRNAの発現を経時的に検討した. また, 炭素化燐酸カルシウム層上に 1×10^6 cells/mlの細胞密度で壁吸着細胞を播種して吸収能の評価を行った.

【結果】骨髄マクロファージはTRAP陰性であったが, cathepsin K陽性であった. 培養72時間までCD68陽性率, 墨汁貪食率はともに99%以上を示した. チタン顆粒添加後12時間まで99%以上の骨髄マクロファージが顆粒貪食能を示すとともに, 顆粒添加によりIL-1 β , IL-6, TNF- α , M-CSF, cathepsin K, MMP-9, -12, -13, -14の発現が増強していた. 一方, TIMP-1, -2は発現が抑制された. 炭素化燐酸カルシウム層の吸収面積は培養3週で有意に増加した.

【考察】分離, 培養された骨髄由来壁吸着性細胞は破骨細胞に特異的なTRAP染色に陰性で, 旺盛な異物貪食能を有し, 単球/マクロファージマーカーCD68に陽性であった. 本研究の培養系は骨髄由来マクロファージを高い純度で分離, 培養可能で, チタン顆粒添加の実験系に用いることが可能であった.

従来, 破骨細胞に特異的なcathepsin KのmRNA, 蛋白質が骨髄マクロファージに確認された. この所見は, 人工関節周囲の脆弱化した骨組織に接してCD68⁺かつcathepsin K⁺マクロファージが多数存在するという*in vivo*における過去の観察を支持していた.

本培養系のマクロファージには, 破骨細胞の分化・成熟・骨吸収機能促進に関与するサイトカインや人工関節周囲の結合組織の脆弱化に関与する細胞外基質分解酵素の発現が確認された. また, チタン顆粒貪食により, IL-1 β , IL-6, TNF- α , M-CSF, cathepsin K, MMP-9, -12, -13, -14の発現が亢進していた. 骨髄マクロファージは, チタン顆粒を添加しても明らかな多核化, TRAP陽性化を示すことなく, 炭素化燐酸カルシウム層吸収能を示した.

以上の所見は人工股関節周囲組織の骨吸収において, 骨髄マクロファージが, 骨吸収性サイトカインや細胞外基質蛋白分解酵素の産生, MMP-TIMPの不均衡に関与し, さらに破骨細胞の活性化と周囲組織の脆弱化を引き起こす可能性を示している. また, 破骨細胞とともに人工関節周囲骨吸収に直接関与することを示唆するものと思われた.

平成 18 年 1 月 30 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名：玉木 康信

報告書題目： Increased production of osteolytic mediators and resorbing capacity of carbonated calcium-phosphate in titanium laden macrophages derived from bone marrow

審査委員： 主審査委員 山川 光徳



副審査委員 河田 純男



副審査委員 後藤 薫



審査終了日：平成 18 年 1 月 18 日

【論文審査結果要旨】

人工股関節全置換術は世界で年間 100 万件も実施され、整形外科領域における主要な手術法となっている。しかし、人工股関節全置換術後の骨溶解で起こる弛みが臨床上大きな問題である。摩耗して弛みを生じた人工関節周囲組織には、遊離した摩耗粉を盛んに貪食したマクロファージが集簇する。一般に、生体骨の吸収は破骨細胞の機能亢進で起こるが、本研究は摩耗粉を貪食した骨髄由来マクロファージも骨吸収に関与しうることを明らかにした。尚、既に、本研究は中間審査を受け、審査員のアドバイスのもとで新たな追加実験がなされ、その結果も盛り込まれている。

本研究における主要な知見を列記すると以下ようになる。

- ①ラット大腿骨の骨髄細胞から、フィルター濾過法を用いてマクロファージを有効に分離する方法を開発した。
- ②骨髄マクロファージは、破骨細胞と異なり酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ陰性であったが、骨溶解に重要な cathepsin K を産生していた。
- ③骨髄マクロファージにチタン顆粒を添加すると interleukin (IL)-1 β 、IL-6、tumor necrosis factor- α 、macrophage colony-stimulating factor、cathepsin K、matrix metalloproteinase-9、-12、-13、-14 の発現が増強し、tissue inhibitor of metalloproteinase-1、-2 の発現が抑制された。
- ④炭素化リン酸カルシウム層上でチタン顆粒を負荷した骨髄マクロファージを培養すると、カルシウム層の吸収面積が培養 3 週で有意に増加した。

本研究は、骨髄マクロファージが骨吸収性サイトカインを産生し、細胞外基質分解酵素とその抑制性酵素の不均衡を誘発することで、骨吸収に直接あるいは破骨細胞を介して間接的に骨吸収を行うことを明らかにした。

本研究には重要な新知見が含まれており、これらの結論を導き出す過程についても熟慮され、結果に対する十分な考察もなされていた。本研究で得られた成果は、人工股関節全置換術後に起こる骨溶解の病態形成に有用な情報を与えると思われた。本審査委員会では、全員一致して、博士（医学）論文にふさわしいものと判断し、合格とした。

(1,200 字以内)