

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	機能再建・再生科学領域 脊椎脊髄病態修復学分野 氏名 Chin Shunfu (陳 俊輔)
<p>(論文題目)</p> <p>Immunohistochemical localization of mesenchymal stem cells in ossified human spinal ligaments          脊柱靭帯骨化症における間葉系幹細胞の局在の免疫組織化学的検討</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>目的 脊柱靭帯は脊柱の過度な動きを制限し、その安定化に寄与しているが、後縦靭帯骨化症や黄色靭帯骨化症などの脊柱靭帯骨化を生じると脊髄が圧迫され、筋力低下や歩行障害、しびれ、痛みなどの脊髄障害が生じてくる。脊柱靭帯骨化の機序は十分に解明されていないが、その過程に近年注目されている間葉系幹細胞(MSCs)の関与が考えられ、我々は”脊柱靭帯にはMSCsが存在し、それらが脊柱靭帯骨化の病態に関わる”という仮説を立て研究してきた。それを証明する最初の段階として、我々は <i>in vitro</i> でヒト脊柱靭帯から多分化能を持ち、そしてMSCs表面マーカーの発現を呈する細胞の単離を試み、MSCsがヒト脊柱靭帯内に存在していることを証明した。本研究の目的は、次の段階として、ヒト脊柱靭帯におけるMSCsの局在、および脊柱靭帯骨化症におけるその局在の変化について免疫組織化学的に検討することとした。</p> <p>対象と方法 弘前大学大学院医学研究科倫理委員会の承認後に脊椎後方手術を受けた患者から胸椎黄色靭帯組織を採取した。骨化靭帯組織は、黄色靭帯骨化症(OLF)の患者から6標本、対照群として、胸髄腫瘍、脊髄空洞症、及び胸椎破裂骨折の患者から非骨化靭帯組織6標本を得た。採取された靭帯組織は速やかにホルマリン固定を行い、骨化部分を含んでいる靭帯組織についてはKC-X液を用いて脱灰処理を行った。靭帯組織を矢状切断してパラフィン切片を作製した後、Hematoxylin-Eosin染色を行い、靭帯組織の組織学的評価を行った。次に、二重蛍光染色法を用いて免疫組織学的検討を行った。一次抗体は、MSCs表面マーカー(CD73、CD90およびCD105)、血管内皮細胞表面マーカー(CD31)、血管周皮細胞表面マーカー(<math>\alpha</math>-SMA)と軟骨細胞マーカー(S100)を使用した。CD73/CD90、CD73/CD105、CD90/CD105、CD73/CD31、CD90/CD31、CD105/CD31、CD73/<math>\alpha</math>-SMA、CD90/<math>\alpha</math>-SMA、CD105/<math>\alpha</math>-SMA、CD73/S100、CD90/S100およびCD105/S100の組み合わせで染色した後、靭帯組織において血管領域(特に内皮細胞層と周皮細胞領域)、および靭帯実質部、そして骨化靭帯組織の骨化前線領域でのMSCs表面マーカーの発現を蛍光顕微鏡を用いて検討した。</p> <p>結果 対照群と比べ、血管領域では、OLFの線維断片化した靭帯実質部に多数の新生血管を認め、血管周囲にMSCsの強い集積を認めた。更に、血管周囲では、血管内皮細胞表面マーカーCD31陽性の細胞ではMSCs表面マーカーの発現を認めなかった。一方、血管周皮細胞領域では血管周皮細胞表面マーカー<math>\alpha</math>-SMA陽性の細胞はMSCs表面マーカーの共局在性を認めた。靭帯実質部では、骨化靭帯組織の靭帯実質部におけるMSCsの数が対照群と比べ、著明な増加を示した。骨化前線周囲で、軟骨細胞が多数出現し、細胞にMSC表面マーカーの発現を呈することが観察された。</p> <p>結論 今回我々の研究は、ヒト脊柱靭帯組織において、MSCsは血管周皮細胞領域、靭帯実質部、および骨化前線に局在することを確認した。そして、OLFの靭帯実質部における間葉系幹細胞の出現は非骨化のものより高かった。OLFの骨化前線周囲領域で、MSCsマーカーを発現する軟骨芽細胞様細胞が観察されたことから、靭帯骨化にMSCs</p>	

が関与する可能性があると考え、今後、MSCs の遊走と靭帯異所性骨化過程におけるその役割を解明する予定である。