

論文審査の要旨および担当者

学位申請者	大野 秀樹（大野犬猫病院）
学位論文題目	イヌの前十字靭帯断裂における Androgen の 関与に関する研究
担当者	主査 北里大学教授 岡野 昇三 副査 北里大学教授 渡辺 大作 副査 北里大学准教授 吉岡 一機 副査 日本獣医生命科学大学教授 原 康

論文審査の要旨

膝関節は動物の身体運動に極めて重要な関節であり、前・後膝十字靭帯、外・内側側副靭帯、半月大腿靭帯など複数の靭帯で補強され複雑な構造を有している。近年、イヌ・ネコの高齢化に伴い関節疾患が急増しているが、特に前十字靭帯 (Anterior cruciate ligament; 以下 ACL) 断裂は膝関節疾患の中でも発生が多く、跛行を主訴とするイヌ患者の約 20% に発生している。従って、ACL 断裂は小動物臨床上、最も重要な整形外科疾患である。

ACL 断裂の発生要因として遺伝学的要因、免疫学的要因、大腿骨顆間窩狭窄など形態学的要因、運動力学的要因や、内分泌因子・肥満などのリスクファクターの関連が考えられている。ヒトでは男性のみならず女性の ACL からも Androgen Receptor (以下 AR) が発現していることから、Androgen が ACL の成長と発達に重要な役割を果たし、また、ACL 断裂に深く関与しているとの報告が多数ある。イヌにおいても、性や年齢に

よって ACL 断裂の発生頻度が異なり、雄より雌の発症率が高く、また未避妊雌および未去勢雄よりも避妊雌および去勢雄の方が発症率が高いという疫学的な相違が指摘されている。しかしながら、その詳細は十分に解明されていない。

そこで著者は、イヌ ACL 断裂における性ホルモン、特に Androgen の関与について解明すべく、組織学的見地から本研究を行った。第 1 章では基礎的な研究として正常なイヌの ACL における AR の発現について観察し、第 2 章では 5 α -dihydrotestosterone (DHT) が培養イヌ ACL 線維芽細胞に及ぼす影響について、そして第 3 章では断裂したイヌ ACL における AR および procollagen type 1 の発現状況について観察した。

第 1 章 正常なイヌ前十字靭帯の組織構造と Androgen Receptor の発現について

ACL が Androgen 応答組織であるか否か、雌雄間並びに若齢・高齢間における AR の発現程度について、1~2 歳の若齢ビーグル犬 21 匹(雌 12、雄 9 匹)および 7~11 歳の高齢雑種犬 5 匹(雄 3、雌 2 匹)の計 26 匹から得られた ACL 組織を形態学および免疫組織化学的に観察し、また、血清総 Testosterone 濃度の測定を行った。

血清総 Testosterone 濃度は雌よりも雄が有意な高値を示し($p < 0.01$)、高齢雄よりも若齢雄で高かった。ACL は密な線維性結合組織であり、粗大な膠原線維の束から構成されていた。若齢雄の ACL 組織内には多くの小血管が分布していたが、若齢雌ではそれは少なかった。高齢個体では雌雄共に ACL 内の血管分布はさらに減少していた。雌雄全ての ACL において、組織を構成する線維細胞、線維芽細胞、滑膜細胞、血管内皮細胞のそれぞれの核が抗 AR 抗体に陽性を示していた。若齢雄の AR 発現が

最も強く、高齢雄ではその発現は減弱していた。一方、雌での発現は年齢による発現の程度差は認められなかったが、雄よりも明らかに弱かった。

以上の結果より、イヌ ACL は Androgen の標的組織であると解され、また、AR 発現と血管分布の程度差が ACL 断裂の疫学的背景(頻度、性差)に相関していることから、Androgen が ACL 組織内の血流量の調整や靭帯の強度に影響を及ぼしている可能性が示唆された(Ohno et al., Okajimas Folia Anat. Jpn. 90:31-39. [2013])。

第 2 章 イヌ前十字靭帯培養線維芽細胞における Androgen の影響について

イヌ ACL における Androgen の関与が明らかにされたことから、さらに DHT が ACL 線維芽細胞に及ぼす影響について、2 匹の正常ビーグル犬(雄、5 ヶ月齢)の ACL から得られた線維芽細胞を 1~10-3 μ M 各濃度の DHT を添加した基礎培地ないし非添加の基礎培地で培養し、AR 発現、細胞増殖活性およびコラーゲン合成について比較観察した。

DHT 添加群の培養線維芽細胞は、添加 48 時間で核は大型化し、大きく明瞭な核小体を形成していた。抗 AR 抗体陽性細胞の数は DHT 添加群でいずれの培養時点でも非添加群よりも多かった。増殖細胞核抗原(PCNA)の陽性率は、24 時間後の DHT 添加群全てが非添加群よりも優位に高値を示し($p < 0.05$)、48、96 時間後でも高い傾向を示していた。抗 procollagen type 1 陽性細胞の数は、24 時間後の DHT 1 μ M 添加群において対照群よりも発現の程度が強く、添加後 48 時間では用量依存的にその程度を増していた。さらに細胞増殖測定(MTS 法)から、全ての時点において DHT 添加群は非添加群よりも高い増殖能を示す傾向にあり

($p < 0.05$)、特に 48 時間後では添加用量依存的に反応が増大する傾向を示していた。

以上、DHT が ACL 線維芽細胞に作用して AR 発現と細胞増殖活性を亢進することが明らかにされ、DHT がコラーゲン合成に関与していること、すなわち、性ホルモンがイヌ生体 ACL の強度保持に関与し ACL 断裂発生頻度の性差に影響を及ぼしていることが示唆された(Ohno et al., Okajimas Folia Anat. Jpn. 89:35-38[2012])。また、DHT 添加による ACL 線維芽細胞の DNA 合成と細胞分裂は DHT 添加後 24 時間から 48 時間の間に行われることが明らかにされた。

第 3 章 断裂したイヌの前十字靭帯における Androgen Receptor の発現について

第 1 章および 2 章において、イヌ ACL が Androgen の標的組織であり、Androgen の動態が ACL 断裂に深く関与することが示唆されたことから、さらに、断裂したイヌ ACL における AR の発現状況について非断裂例と比較観察した。ACL 断裂 16 例(雄 6、雌 10 匹)と健康なビーグル犬 9 例(雄 5、雌 4 匹)について血清総 Testosterone 濃度を測定し、採取した ACL 組織について病理組織学的観察と AR、Procollagen type 1 の分布状況、PCNA を用いた細胞増殖活性を観察した。

雌の血清総 Testosterone 濃度は正常例、断裂例ともに雄よりも低く、測定可能下限値を下回る低値を示していた。雄断裂例の血清総 Testosterone 濃度は正常例雄に比べて低い傾向を示していた。断裂例の ACL には増殖初期、増殖期および再生期へと推移する各ステージの組織変化が観察された。AR の発現は Collagen 線維束や間質の結合組織に存在する線維芽細胞、滑膜細胞や間質の血管内皮細胞の核に認められた。

AR の発現程度は血清総 Testosterone 濃度と正の相関を示し、正常例、断裂例ともに雄よりも雌で発現が弱かった。また、断裂例では AR 発現はさらに弱く、特に去勢雄・避妊雌の断裂例では著しく弱い傾向にあった。Procollagen type 1 の発現も同様で、正常例、断裂例ともに雄よりも雌で発現が弱く、正常例と比較すると断裂例でより弱い傾向が認められた。PCNA 陽性細胞も、正常例、断裂例ともに雄より雌で少なく、正常例よりも断裂例で少ない傾向を示していた。

これら結果から、血清総 Testosterone 濃度が低く、かつ、靭帯において AR 発現の低い個体は ACL 線維芽細胞の増殖活性が低く Procollagen 合成が低下し、ACL の構造的強度が低下していることが示され、疫学的にみた ACL 断裂の年齢差、雌雄差との関連性が明らかにされた (Ohno et al., Philipp. J. Vet. Med. 51:131-136 [2014])。

以上、イヌの正常および断裂 ACL における AR の発現に関する一連の観察より、ACL は Androgen 標的組織であり、Androgen が ACL 構成細胞に作用して細胞増殖を活性化しコラーゲン産生を促進させることで ACL の構造的な強度保持に関与していること、AR の発現強度は雄よりも雌で弱く、年齢的には雌雄共に高齢で低下しており、これらが ACL 断裂の有病率に大きく影響を及ぼしていることが裏付けられた。

本研究は前十字靭帯断裂の臨床と基礎を結ぶ比較医学的データを提示したもので、その成果は今後の伴侶動物医療、特に高齢動物における運動器疾患の獣医療に貢献する価値あるものと確信する。著者は、膝関節疾患に興味を抱いて以来、獣医診療に従事しながら本研究を遂行した。そのたゆまぬ熱意と探究心、ならびに得られた成果より、著者は博士(獣医学)の学位を受けるに相応しい判断し、審査委員一同は合格と判定した。