

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11038

研究課題名（和文）FIB/SEMトモグラフィーを用いた、力学的負荷下の腱骨付着部超微形態定量解析

研究課題名（英文）Comparison of Structural Properties Between Postnatal and Adult Tendon Insertion with FIB/SEM Tomography in Rat

研究代表者

金澤 知之進（Kanazawa, Tomonoshin）

久留米大学・医学部・客員教授

研究者番号：50529518

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、(1)エストロゲン徐負荷状態での腱骨付着部組織構築を検討することと、(2)次世代走査型電子顕微鏡であるFIB/SEMトモグラフィーを用いて、出生直後と成熟後それぞれの腱骨付着部細胞/コラーゲン線維の三次元超微形態とその分布様式を定量的に解析し、腱骨付着部障害の治療に資する基盤的な知見を得ることを目的とした。

結果、(1)エストロゲン徐負荷状態であると考えられる卵巣摘出ラット腱骨付着部の構造は、骨密度、力学的、組織学的評価それぞれにおいて、正常と比べて脆弱なものであった。(2)出生直後と成熟後それぞれの腱骨付着部細胞/コラーゲン線維の三次元超微形態とその分布様式の違いを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正常な腱組織が骨に付着している部位（腱骨付着部）は、物理的剛性の全く異なる骨組織と腱組織を連結しており、運動において強大な力学的負荷がかかる部位である。このような特殊な環境から、整形外科領域において腱骨付着部は炎症性疼痛を引き起こし、その治療に難渋することが知られている。本研究では、エストロゲン徐負荷状態での組織構築を検討することと、次世代走査型電子顕微鏡であるFIB/SEMトモグラフィーを用いて、出生直後と成熟後それぞれの腱骨付着部細胞/コラーゲン線維の三次元超微形態とその分布様式を定量的に解析した。これらの結果腱骨付着部障害の治療に資する基盤的な知見になるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study, (1) We evaluated the effect of the estrogen-deficient state on tendon-to-bone healing after rotator cuff repair in an ovariectomized rat model. (2) The morphological differences between postnatal and adult tendon insertion in terms of the ultrastructural cellular properties were clarified. In this study, we showed that (1) The estrogen-deficient state by ovariectomy, compared with control rats, led to decreased biomechanical properties and poor development of chondroid tissue that influenced the repair of the tendon insertion after surgery. (2) The present study successfully used FIB/SEM tomography to clarify the differences in morphology and cellular structural properties between postnatal and adult tendon insertions.

These findings can aid in determining how to regenerate a normal tendon insertion in the repaired tendon-bone interface after rotator cuff repair.

研究分野：整形外科

キーワード：腱骨付着部 3次元構造解析 硬組織 FIB/SEMトモグラフィー

## 1. 研究開始当初の背景

### [整形外科領域における腱骨付着部障害とは]

整形外科領域において、腱骨付着部はその構造の特性上、運動時に強大な力学的ストレスがかかる為、炎症性疼痛が遷延し、治療に難渋することが広く知られている。このような組織構造は、腱が骨につく身体の各所に存在しており、つまるところ過度な力学的負荷がかかる状況下におかれれば、身体のあらゆる部位に、難治性の炎症性疼痛を生じ得るものである。その結果、スポーツ選手のスポーツ活動はもちろんのこと、正常人においても ADL を著しく低下させてしまう。しかしながら、腱骨付着部障害がどのような構造/メカニズムによって発症するのか、また、過度なストレスが加わった場合、超微形態レベルにおいて、どのような組織形態変化が起こっているのかは依然として不明であり、それが腱骨付着部症治療を難渋させている要因の1つとなっている。

### [正常腱骨付着部の組織構築]

正常腱骨付着部は、力学的ストレスを十分に分散出来るように、腱線維が幅広く広がりつつ骨表面に付着している。組織学的構造においては、腱から骨にかけて、線維軟骨を介した4層構造(腱-非石灰化軟骨-石灰化軟骨-骨)をとっているとき、腱側から徐々に剛性の高い組織へ移行しながら骨に付着している。このような形態

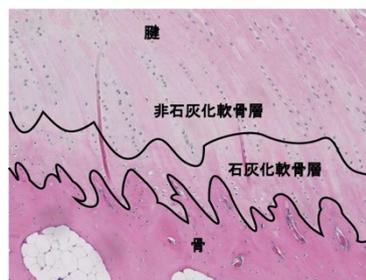


図1: 正常腱骨付着部 (光学顕微鏡)

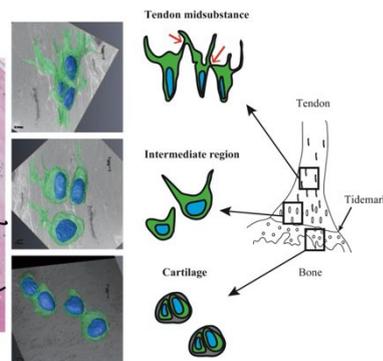


図2: 正常腱骨付着部 (電子顕微鏡)

的的な特徴から、巧妙に応力の集中を防いでいるものと考えられる (図1)。また、申請者らは電子顕微鏡レベルの組織形態において腱骨付着部を解析している。結果、線維軟骨から腱に至るまで、細胞は明瞭な境界を持つことなくその形態をスムーズに移行させており、且つ、付着部に存在する非石灰化線維軟骨細胞の突起は、隣接するコラーゲン線維束に対して、一定の方向性と極性を有していることを示している [Kanazawa et al. Muscles Ligaments Tendons J: 2014] (図2)。

### [正常腱骨付着部の組織構築の発達過程]

申請者らは、出生直後のラットを用いて、腱骨付着部形成過程において発現している蛋白の動態変化と、超微形態レベルにおける腱骨付着部に存在する細胞の形態変化を解析した。これらの結果から、正常腱骨付着部には、SOX9/SCX 蛋白を共発現している細胞群が存在しており、正常腱骨付着部は、出生後に生じる劇的な力学的環境変化にさらされることにより、コラーゲン線維束はもちろんのこと、細胞形態においてもそのスムーズな組織構築を成熟させていく。それと同時に、付着部に存在する細胞は、出生後約1か月の間にその細胞形態をもドラスティックに変化させていることを示した

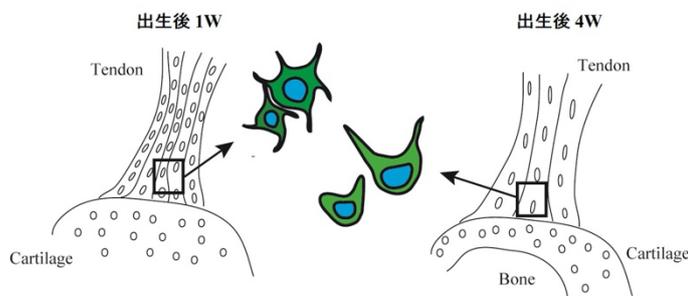


図3: 正常腱骨付着部形成過程

[Kanazawa et al. J Orthop Res: 2015] (図3)。

このように、正常付着部の組織構築やその形成過程は徐々に明らかとなりつつあるが、依然として不明な部分も多く残されている。特に、正常と靭帯付着部に様々なストレスを付加した場合、それぞれ腱骨付着部に存在する細胞の超微形態レベルの解像度による詳細な形態的特徴と、それら細胞の分布状態を同時に把握することは、実際に付着部障害の治療に対する基盤的知見となるものと考えている。これまで我々は、FIB/SEM トモグラフィーを用いることによって、付着部に存在する細胞一個体の三次元形態構造は明らかにしてきたが、腱骨付着部に存在する細胞が、どのような形のもので、どのように分布しているのか解析するまでには至っていない。元来、組織観察法においては光学顕微鏡であれ電子顕微鏡であれ、二次元的な解析手法となるわけであるが、生体内に存在する細胞群は当然の如く三次元空間内に分布しているわけであり、二次元的な観察によってその分布を解析する時、そこに大きな制約が生じてしまう。しかしながら近年、生物形態学分野に導入されはじめている FIB/SEM トモグラフィーは、超微形態レベルの三次元形態情報を残しつつ、広範囲な細胞分布を解析することが可能である。FIB/SEM トモグラフィーはそのシステム上、透過型電子顕微鏡レベルでの解像度を有しつつ、同時に、従来の電子顕微鏡よりも遥かに広範囲の形態観察が出来ることを可能にしている次世代走査型電子顕微鏡である。連続切片画像の取得により、観察領域の超微形態レベルでの三次元形態観察をも可能にしている。更にこの FIB/SEM トモグラフィーでは、再構築した三次元空間内に存在する細胞の

体積や形態重心等、定量的な比較を行うのに必須である形態的数値情報を取得/解析することも可能であり、これらの情報から、取得したブロック内の細胞数や、細胞自体の体積、分布状況等、従来定量化する事が極めて困難であった、三次元空間内での形態定量解析というものを、非常に信頼性/再現性における形で可能にすることが出来る画期的なものである。

## 2. 研究の目的

正常な腱組織が骨に付着している部位（腱骨付着部）は、物理的剛性の全く異なる骨組織と腱組織を連結しており、運動において強大な力学的負荷がかかる部位である。このような特殊な環境から、整形外科領域において腱骨付着部は炎症性疼痛を引き起こし、その治療に難渋することが知られている。正常腱骨付着部組織は、線維軟骨を介した特殊な構造をしているが、様々な環境下において、どのような形態変化をなしているのか不明である。本研究では、エストロゲン徐負荷状態での組織構築を検討することと、次世代走査型電子顕微鏡である FIB/SEM トモグラフィーを用いて、出生直後と成熟後それぞれの腱骨付着部細胞/コラーゲン線維の三次元超微形態とその分布様式を定量的に解析し、腱骨付着部障害の治療に資する基盤的な知見を得ることを目的とする。

本研究では、

- (1) 正常とエストロゲンホルモン除負荷状態である卵巣摘出ラットの腱骨付着部組織構築の違いを検討
- (2) 出生直後と成熟後それぞれの腱骨付着部細胞/コラーゲン線維の三次元超微形態とその分布様式を定量的に解析

以上2つの研究を行った。

## 3. 研究の方法

- (1) 卵巣摘出ラットに対し、腱板縫合モデルを作成し、術後 2, 4, 8, 12 週後に屠殺、腱板縫合部を力学的、組織学的に評価した。(図 4)

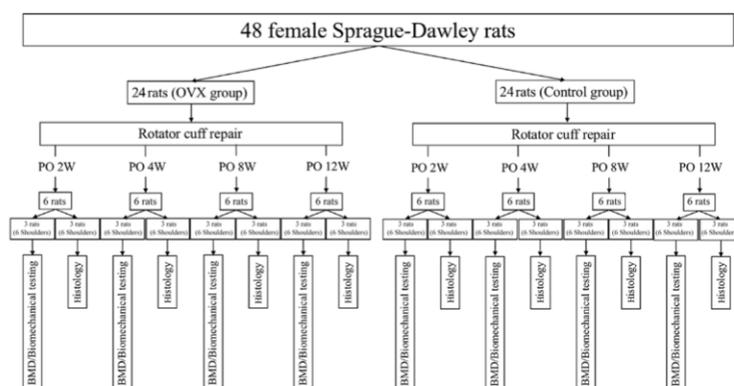


図 4: 卵巣摘出ラット腱板縫合モデルを用いた力学的/組織学的評価

- (2) 出生後 1 週と 12 週のラット検体を用い、FIB/SEM tomography から得られた block 全体の情報をもとに、腱骨付着部領域に存在する細胞群の定量的な形態変化とその分布状況を検証した。(図 5)

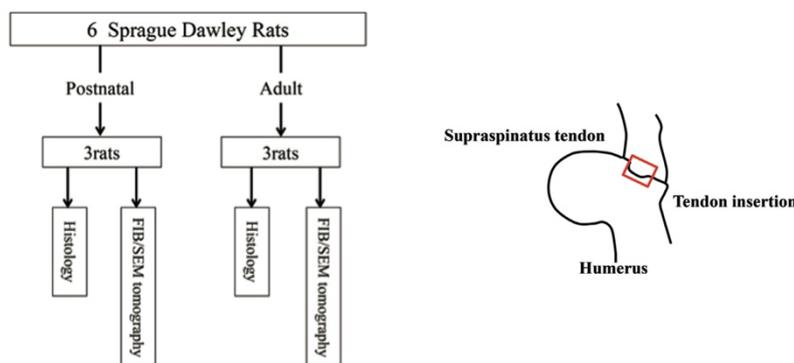


図5: 出生直後と成熟後ラットそれぞれの腱骨付着部細胞/コラーゲン線維の三次元超微形態解析

#### 4. 研究成果

本研究では、(1)エストロゲン徐負荷状態での腱骨付着部組織構築を検討することと、(2)次世代走査型電子顕微鏡である FIB/SEM トモグラフィーを用いて、出生直後と成熟後それぞれの腱骨付着部細胞/コラーゲン線維の三次元超微形態とその分布様式を定量的に解析し、腱骨付着部障害の治療に資する基盤的な知見を得ることを目的とした。

結果、(1)エストロゲン徐負荷状態であると考えられる卵巣摘出ラット腱骨付着部の構造は、骨密度、力学的、組織学的評価それぞれにおいて、正常と比べて脆弱なものであった。(2)出生直後と成熟後それぞれの腱骨付着部細胞/コラーゲン線維の三次元超微形態とその分布様式の違いを明らかにした。

正常な腱組織が骨に付着している部位（腱骨付着部）は、物理的剛性の全く異なる骨組織と腱組織を連結しており、運動において強大な力学的負荷がかかる部位である。このような特殊な環境から、整形外科領域において腱骨付着部は炎症性疼痛を引き起こし、その治療に難渋することが知られている。本研究では、エストロゲン徐負荷状態での組織構築を検討することと、次世代走査型電子顕微鏡である FIB/SEM トモグラフィーを用いて、出生直後と成熟後それぞれの腱骨付着部細胞/コラーゲン線維の三次元超微形態とその分布様式を定量的に解析した。これらの結果腱骨付着部障害の治療に資する基盤的な知見になるものとする。

以上の結果を2つの論文にまとめ、論文発表した。

(1) Tanaka K, Kanazawa T, Gotoh M, Tanesue R, Nakamura H, Ohzono H, et al. Effects of Estrogen-Deficient State on Rotator Cuff Healing. Am J Sports Med. 2019;363546518815869.

(2) Yamada T, Kanazawa T, Ohta K, Nakamura KI. Comparison of Structural Properties Between Postnatal and Adult Tendon Insertion with FIB/SEM Tomography in Rat. The Kurume medical journal. 2021;66(4):217-24.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hirashima S, Ohta K, Kanazawa T, Togo A, Kakuma T, Kusakawa J, Nakamura KI	4. 巻 9
2. 論文標題 Three-dimensional ultrastructural and histomorphological analysis of the periodontal ligament with occlusal hypofunction via focused ion beam/scanning electron microscope tomography.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 9520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-45963-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hirashima S, Kanazawa T, Ohta K, Nakamura KI	4. 巻 95
2. 論文標題 Three-dimensional ultrastructural imaging and quantitative analysis of the periodontal ligament.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anatomical science international	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12565-019-00502-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shingo Hirashima, Keisuke Ohta, Tomonoshin Kanazawa, Akinobu Togo, Risa Tsuneyoshi, Jingo Kusakawa, Kei-Ichiro Nakamura	4. 巻 69
2. 論文標題 Cellular network across cementum and periodontal ligament elucidated by FIB/SEM tomography.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 53-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jmicro/dfz117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 TAKU YAMADA, TOMONOSHIN KANAZAWA, KEISUKE OHTA, KEI-ICHIRO NAKAMURA	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of the cellular structural properties at the normal tendon insertion with FIB/SEM tomography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kurume Medical Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka K,	4. 巻 Feb;47(2)
2. 論文標題 Effects of Estrogen-Deficient State on Rotator Cuff Healing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The American journal of sports medicine	6. 最初と最後の頁 389-397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0363546518815869	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Koji Tanaka
2. 発表標題 Analysis of Tendon-To-Bone Healing After Rotator Cuff Repair In Ovariectomized Rat Model
3. 学会等名 27 SECEC-ESSSE Congress
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中 康嗣
2. 発表標題 Influence of Decreased Bone Mineral Density on Rotator Cuff Healing
3. 学会等名 第44回日本肩関節学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Koji Tanaka
2. 発表標題 Relationship between tendon-to-bone healing and bone mineral density in an ovariectomized rat model
3. 学会等名 ACASEA 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Koji Tanaka
2. 発表標題 Influence of decreased bone mineral density on rotator cuff healing
3. 学会等名 ORS 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koji Tanaka
2. 発表標題 Relationship between Tendon-to-Bone Healing and Bone Mineral Density in Ovariectomized Rat
3. 学会等名 AAOS 2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	田中 康嗣  (Tanaka Koji)	久留米大学・医学部・助教  (37104)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------