

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09626

研究課題名(和文) 移植腱における腱付着部の構造の解析と至適固定法の解明

研究課題名(英文) Effect of difference in fixation methods of tendon graft and the microfracture procedure on tendon-bone junction healing

研究代表者

島村 安則 (Yasunori, Shimamura)

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：20452576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：靭帯再建においては、骨トンネル固定かアンカー固定の固定法が選択される。また骨髄から固定部位への間葉系幹細胞(MSC)を誘導を期待してマイクロフラクチャー(Mf)手技が併用されることがある。本研究では、骨トンネル固定またはアンカー固定のいずれかをMf手技と組み合わせることで、腱-骨接合部へエンテシス様の軟骨線維組織の形成を生じ、移植腱の機械的強度を向上させることができた。以上のことからMf手技は、靭帯再建において有用な手技であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究により移植腱に対するenthesi形成のための骨孔形成の影響や、移植腱の理想的な固定法について大きな発展がもたらされると考えられる。またこの研究により骨孔の形成がenthesiの形成や発達に重要な役割を担うことが明らかになったことで、今後成長因子の補充と手術療法を組み合わせた靭帯再生医療として新たな治療戦略をもたらしうと考えている。

研究成果の概要(英文)：There are generally two methods of fixation for tendon grafts used in ligament reconstruction: bone tunnel (BT) fixation and anchor fixation. The microfracture (Mf) procedure is a technique to induce bleeding from the bone marrow, and the bleeding may contain cells with differentiation potential. However, few studies have compared the effects of the Mf procedure with those of the fixation methods. Histological evaluation of the BT + Mf and A + Mf groups showed healing with fibrocartilage formation at the tendon graft-bone junction. The mRNA expression showed significant increase in type 2 collagen, Scleraxis, and SRY-box9 in the BT + Mf and A + Mf groups. In biomechanical tests, the BT + Mf and A + Mf groups showed significantly increased tensile strength compared with the BT - Mf and A - Mf groups. The Mf procedure resulted in fibrocartilage formation at the tendon-bone junction in the BT and anchor fixation and improved the fixation strength at 4 weeks.

研究分野：Orthopedics

キーワード：エンテシス

### 1. 研究開始当初の背景

近年国内では、疾病の予防や健康維持・増進に重点が置かれるようになり、国民の生活面でも健康志向は上昇傾向にある。スポーツ庁は、小学校から高等学校までを見通しスポーツを通じた学習意欲の向上や、責任感・連帯感の涵養の場として充実を図っている。しかし、スポーツの場においては、様々なアクシデントや外傷によって靭帯の損傷を被ることがある。肘関節内側側副靭帯断裂損傷や膝前十字靭帯断裂損傷などの関節の安定性に破綻を生じさせる損傷は、その後の選手生命にも大きく関わる重大な疾患である。整形外科領域では、これらの疾患に対し移植腱を用いた靭帯再建術が gold standard な治療となっている。

正常な靭帯や腱の骨への付着部には、“enthesis(エンテシス)”と呼ばれる軟骨細胞とコラーゲンから構成された線維軟骨組織体(図1)が介在し、筋肉の収縮や関節の可動による力学的な伝達ストレスを分散させる重要な働きを担っているが、現在の再建術においては、解剖学的位置に作成した骨孔内へ移植腱を挿入し固定するため、本来のエンテシス組織は損なわれ、その再生方法は未だ確立していない。

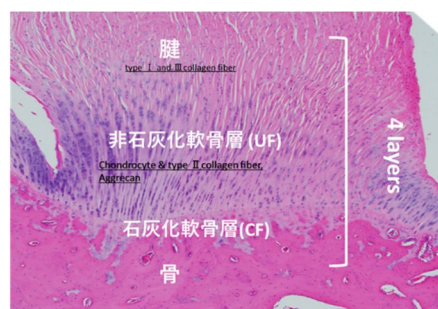


図1. enthesisの4層構造 (ラビットの肘内側側副靭帯)

移植腱は、骨との接着面に固着することになるが、関節の安定性が回復するまでには長期間を要する現状がある。また、エンテシスの再生は得られていないため、長期的にはメカニカルストレスの蓄積による移植腱の再断裂や機能損失を生じる恐れがあるとされている。エンテシス再建法の確立は、リハビリテーション期間を短縮させ、長期的な移植腱の生存を可能とし、アスリートのみならずスポーツ愛好家に対しても早期社会復帰を実現させる重要な課題であると捉えている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、エンテシスの再生に必要な成長因子を未分化間葉系細胞と共に移植腱と骨の接合部へ誘導した場合の力学的負荷、生物学的因子の両側面からエンテシスの再生、発達について明らかにし、至適条件を明らかにすることである。

この研究により移植腱に対するエンテシス形成のための至適力学的負荷と、生物学的因子との関係、及びその相互作用が解明されれば、未だ不明瞭であるエンテシス形成という観点から、移植腱の理想的な固定法や術後リハビリテーション法について大きな発展がもたらされると考えられる。またこの研究により BMP4 や FGF2 などの成長因子が、移植腱においてもエンテシスの再生や発達に重要な役割を担うことが明らかになれば、成長因子の補充と手術療法を組み合わせた靭帯再生医療として新たな治療戦略をもたらすと考えている。

### 3. 研究の方法

靭帯損傷に対する移植腱を用いた靭帯再建術では、近年骨孔内固定法のみならずアンカー固定法による新たな移植腱固定方法が行われるようになってきている。

そのため、本研究では骨孔固定モデルと同時にアンカー固定モデルも作成する。(図2)

ウサギ(NZW, 36匹)の膝窩筋腱を移植腱として採取し、脛骨内側面に移植腱固定モデルを作成した。グループ分けは、固定法の違いによって骨トンネル固定(BT, n=8)群とアンカー固定(A, n=8)群, そして移植腱を骨膜と縫合固定しただけのコントロール(C, n=4)群の3群を作成した。

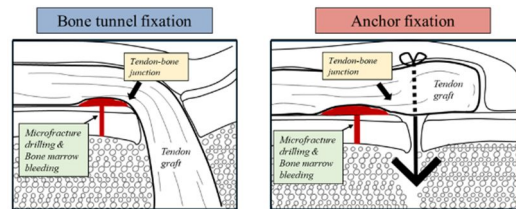


図2. 骨トンネル固定法とアンカー固定法。

またBT群とA群には、それぞれ腱と骨接合部へ間葉系幹細胞を誘導させる microfracture 処置(皮質骨へ小さな骨孔を加えて、骨髓内から未分化間葉系幹細胞を含めた出血を流出させる処置)を加えた群を追加した Mf (BT + Mf; n=8, A + Mf; n=8)群を作成した。

評価方法は、術後4週で脛骨を採取して腱と骨接合部の組織学的評価, mRNA解析(Scx, Col2a1, Sox9, Bmp4), 力学的試験を行った。統計学的分析では  $p < 0.05$  を有意差ありとした。

#### 4. 研究成果

microfracture 処置を加えた Mf 群では、組織学的評価において腱-骨接合部にエンテシス様の線維軟骨組織の形成を認めた。(図3)

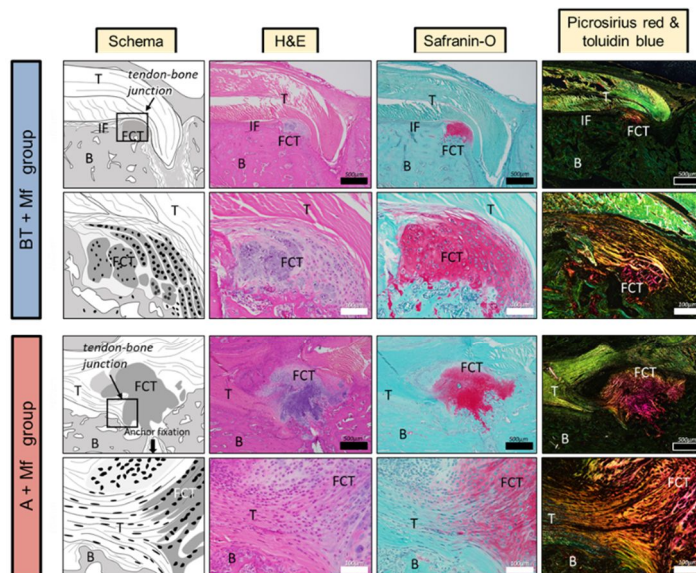


図3. Mf群の組織学的評価結果である。腱-骨接合部に線維軟骨組織の形成を認める。

H-E 染色では、線維軟骨組織内に軟骨細胞の出現を認め、Safranin-O 染色では enthesis 形成に必要な細胞外基質である 2 型コラーゲンが染色された。Picosirius red and Toluidine blue 染色では、軟骨細胞と 2 型コラーゲンの染色および腱のコラーゲンである 1 型と 3 型コラーゲンとの癒合を認めた。mRNA 解析では、非 Mf 群で有意差は細胞分化が示されなかった。一方で、Mf 群では Scx, Sox9, Col2a1 が有意に upregulation を認めたが、Bmp4 の変化は有意でなかった( $p = 0.39$ )。(図4)

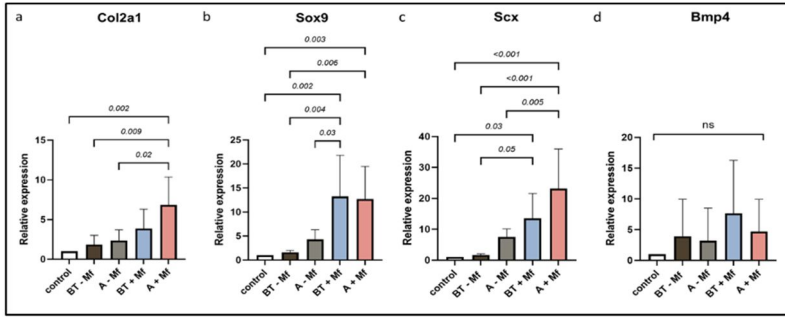


図4. mRNA結果. Mf群では2型コラーゲン、Sox9、Scxの発現上昇を有意に認めた。

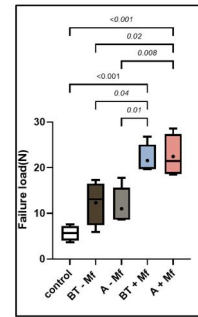


図5. 力学的試験結果. Mf群で有意な破綻抵抗性を認めた。

力学的試験でのMf群は、C群と非Mf群に比べて高い破綻抵抗性を示した(BT vs BT + Mf;  $p = 0.03$ , A vs A + Mf;  $p = 0.008$ )。(図5)

本研究により、骨トンネル固定またはアンカー固定のいずれにおいても、Mf手技と組み合わせることで、腱-骨接合部へエンテシス様の軟骨線維組織を形成させ、移植腱の初期固定力を向上させることができることがはじめて明らかとなった。これらの研究結果は移植腱を用いる手術において手術選択や手技選択の際に有用な情報となる。

なお本研究成果は、「Effect of difference in fixation methods of tendon graft and the microfracture procedure on tendon-bone junction healing」の題名でJournal of Shoulder and Elbow Surgery International 2021に報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nezu Satoshi, Saito Taichi, Yoshida Aki, Narazaki Shinji, Shimamura Yasunori, Furumatsu Takayuki, Ozaki Toshifumi	4. 巻 6
2. 論文標題 Effect of difference in fixation methods of tendon graft and the microfracture procedure on tendon-bone junction healing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JSES International	6. 最初と最後の頁 155 ~ 166
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jseint.2021.10.001	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Satoshi Nezu, Aki Yoshida, Taichi Saito, Yasunori Shimamura, Tomoyuki Noda, Toshifumi Ozaki
2. 発表標題 移植腱固定法の違いと骨髄未分化間葉系細胞の誘導が腱-骨接合部の癒合に与える影響
3. 学会等名 第35回日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2020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
研究分担者	齋藤 太一  (Saito Taichi)  (70644384)	岡山大学・医歯薬学域・助教    (15301)	

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
---------	---------