

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591655

研究課題名（和文） 生体吸収性スキャフォールドによる細胞培養移植を要しない肩腱板再生

研究課題名（英文） Regeneration of rotator cuff using bioabsorbable scaffold without cultured cells

研究代表者

国分 毅（KOKUBU TAKESHI）

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：40403266

研究成果の概要（和文）：生体吸収性高分子であるポリ乳酸グリコール酸（PLG）を用いたスキャフォールドを兔の腱板損傷モデルに移植して評価した。組織学的には、移植後 4 週より線維芽細胞を確認でき、8 週で PLG はほぼ吸収され骨との移行部に新たな骨形成も見られた。16 週間になると、正常の腱板に類似した組織像を確認できた。力学的には、再生腱板の最大破断強度は、移植後 8 週で、正常腱とほぼ同等の強度を有していた。今回開発した PLG スキャフォールドは、腱板再生材料として有用である。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to evaluate an application of poly (D-L-lactide-co-glycolide) (PLG) scaffold in a rabbit rotator cuff defect model. Histologically, spindle shaped cells were observed inside of the scaffold at 4 weeks postoperatively. At 8 weeks, the PLG scaffold had dissolved and bone formation was observed at the scaffold-bone interface. At 16 weeks, the scaffold-bone interface matured and expression of type II collagen was observed. Biomechanically, statistical difference of ultimate failure load was not seen between scaffold group and normal tendon after 8 weeks postoperatively. This PLG scaffold could be applied to bridge rotator cuff defect.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：肩腱板広範囲断裂・腱板再生・スキャフォールド・PLG・electrospinning 法

## 1. 研究開始当初の背景

肩腱板断裂患者の保存療法無効例に対しては、観血的に損傷腱板の縫合を行うが、断裂の大きさが大断裂（3-5 cm）や広範囲断裂（5 cm 以上）であれば、腱板の縫合が不可能な場合も存在し、しばしば治療に難渋する。そのような縫合不可能な症例に対して良好な成績を獲得するためには、退行変性し消失した腱板組織の

再建や再生が必要である。再建方法として、自家同種組織移植法として他部位より採取した靭帯や腱を移植する方法もあるが、手術操作が煩雑になることや、健全組織を傷害するなどの問題点がある。移植材料として生体非吸収性の人工靭帯やパッチを用いる方法もあるが、異物反応を生じたり、生体親和性が低いことなどより成績が安定していない。これらの問題を解決す

べく生体親和性が高く組織再生を促すことが可能な生体吸収性である人工材料や異種生体組織由来材料が近年開発されつつあり、良好な実験成績や、国外では臨床成績も報告されている。我々も、poly-L-lactic acid から作製したスキヤフォールドを用いた兔の腱板再生実験を行い良好な成績を報告してきたが、材料の吸収速度や炎症反応などの問題点もあり更なる改良が必要であると思われた。そこでより吸収速度の速い poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLG) を electrospinning 法を用いてナノファイバーより成るスキヤフォールドを作製し、その有効性を検討した。

## 2. 研究の目的

生体吸収性スキヤフォールドを用いた兔の肩腱板再生実験をこれまでに行ってきた。我々の最終的な目標としては、幹細胞などの培養操作を不要とし、一期的手術により腱板断裂部に移植するだけで新しい腱板組織が再生されるようなスキヤフォールドの開発である。再生医療の基本三要素となるのは、細胞、スキヤフォールド、成長因子と言われている。生体内の組織欠損部周囲には、細胞と成長因子は存在しているが、スキヤフォールドとなるものは外因的に供給する必要があり、我々はこのスキヤフォールドが最も重要な因子であると考えている。すなわち、細胞にとっての住み家となるスキヤフォールドが快適なものであれば、スキヤフォールド周囲に存在する細胞はその環境に遊走し、その中で良好な増殖と分化が出来るものと思われる。そこで、スキヤフォールドの微細構造を改善し、遊走してくる細胞を効率よく捉え、増殖分化誘導することができれば、生体内で細胞培養しながら腱板組織再生を促すシステムを構築できるのではないかと考えた。

## 3. 研究の方法

electrospinning 法を用いて作成した厚さ約 1mm の PLG シートを 10 x 5mm に切り出しスキヤフォールドとした。その PLG 繊維の直径は平均 3-14  $\mu\text{m}$  であり、気孔率は平均 85%であった (図 1)。家兔棘下筋腱附着部に作成した腱板欠損部に PLG スキヤフォールドを移植して (図 2) 組織学および力学的評価を経時的に行った。コントロールとして、腱板附着部で腱板を一度切離した後、再縫着したものをを用いた。

組織学的評価として、術後 4、8、16 週において、ヘマトキシリン (HE) 染色、サフラン 0 (SO) 染色と I 型、II 型、III 型コラーゲンに対する免疫染色を行った。力学的評

価は術後 4、8、16 週に、移植した PLG スキヤフォールドを上腕骨腱板複合体として摘出し、スキヤフォールド周囲の肉芽組織と関節包を十分に剥離した後、引っ張り試験を行い最大破断強度と弾性率を測定した。

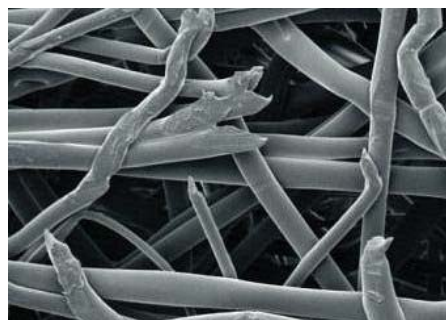


図 1 ナノファイバーより成る PLG 線維

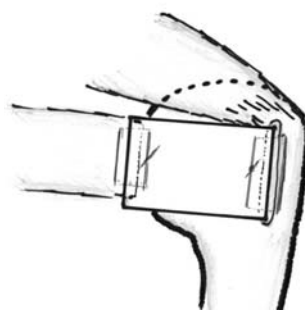


図 2 兔棘下筋腱欠損部に移植された PLG スキヤフォールド

## 4. 研究成果

肉眼的所見として PLG で修復した腱板欠損部は術後 4 週以降、白色を帯びた組織で修復されていた。組織学的には HE 染色では移植後 4 週でスキヤフォールド内には細胞は進入してきているが、PLG 繊維は残存していた (図 3a)。

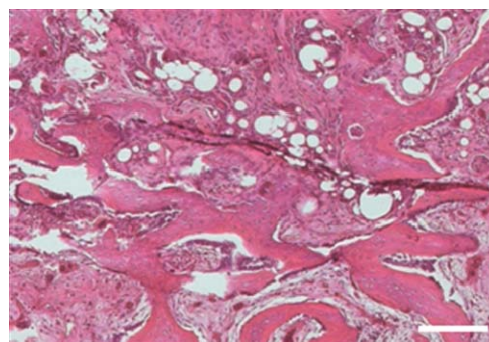


図 3a PLG 移植後 4 週 HE 染色 バー 50  $\mu\text{m}$

移植後 8 週では PLG スキヤフォールドはほぼ吸収されており腱骨移行部には膠原線維が

配列している所見が確認でき（図 3b）、16 週においては正常の enthesis に類似した軟骨細胞の配列が観察できた（図 3c）。

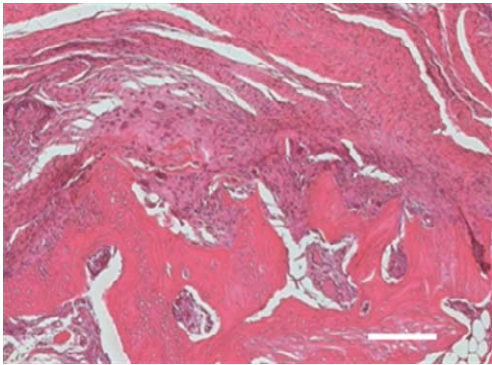


図 3b PLG 移植後 8 週 HE 染色 バー50・m

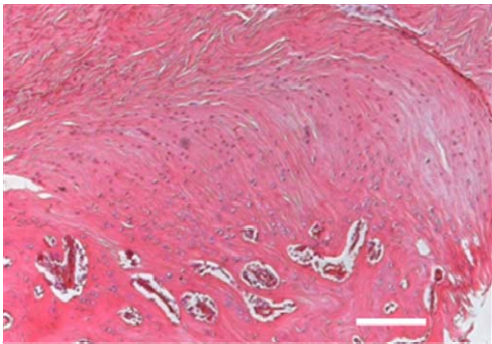


図 3c PLG 移植後 12 週 HE 染色 バー50・m

S0 染色においては軟骨基質中のグルコサミノグルカンがオレンジに染まるが、術後 4 週では腱骨移行部に軟骨基質は認めず（図 4a）、術後 8 週で軟骨基質が確認され（図 4b）、さらに 16 週ではオレンジ色に染色する軟骨層と思われる領域が広がっていた（図 4c）

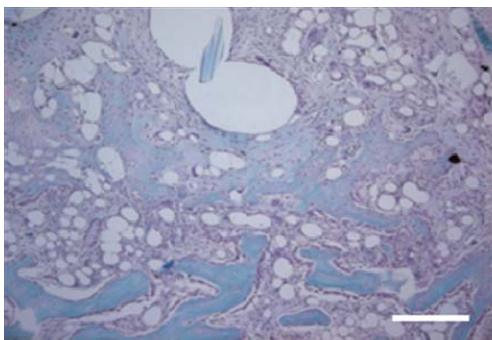


図 4a PLG 移植後 4 週 S0 染色 バー50・m

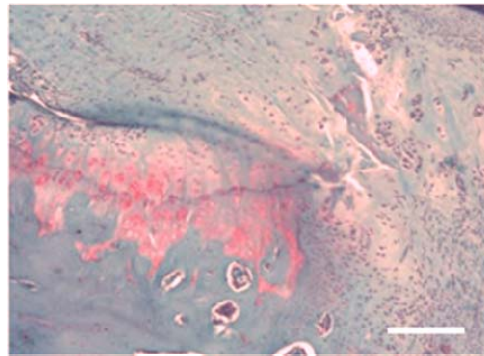


図 4b PLG 移植後 8 週 S0 染色 バー50・m

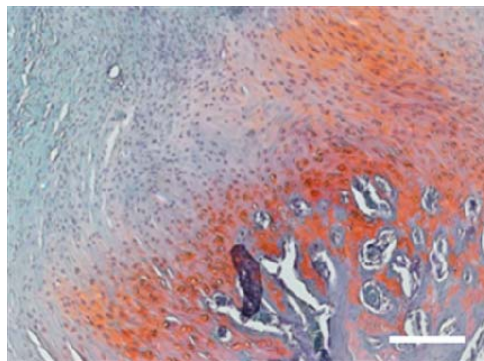


図 4c PLG 移植後 12 週 S0 染色 バー50・m

コラーゲンの免疫染色では骨と再生腱全体に I 型コラーゲンの発現を認め（図 5a）、腱骨移行部には II 型コラーゲンの局在を伴う線維軟骨様の組織再生を認めた（図 5b）。

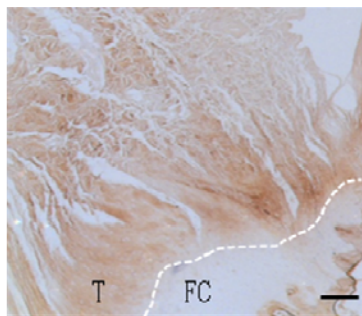


図 5a I 型コラーゲン 16 週  
T:腱 FC:線維性軟骨

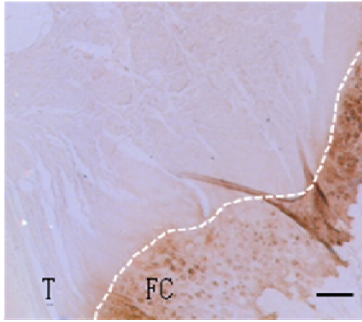


図 5b II 型コラーゲン 16 週

しかしながら、未成熟な組織に発現する III 型コラーゲンも僅かながら存在していた (図 5c)。

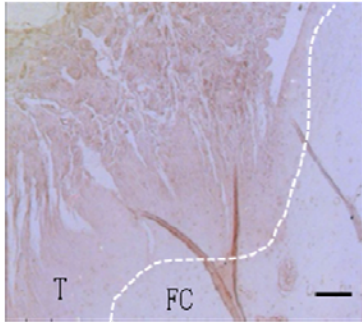


図 5c III 型コラーゲン 16 週

力学的評価では、PLG スキャフォールド移植群での最大破断強度は移植後 4 週で 28.1N、8 週で 71.7N、16 週で 75.3N であった。一方、コントロールとして用いた再縫着群では術後 4 週で 62.7N、8 週で 68.3N、16 週で 69.4N であり、術後 8 週と 16 週では両群間に有意差はなかった。正常家兎棘下筋腱の最大破断強度が約 70N であることより、移植後 8 週で正常組織とほぼ同等の最大破断強度を有していた (図 6a)。

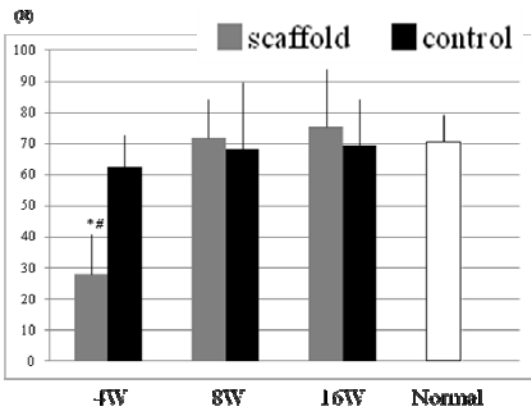


図 6a 最大破断強度

\* P<0.05 compared to normal  
# P<0.05 compared to control

また、再生腱の弾性率は PLG スキャフォールド移植後 4 週で 6.1N/mm、8 週で 12.8N/mm、16 週で 12.8N/mm であり、再縫着群では術後 4 週で 7.3N/mm、8 週で 11.0N/mm、16 週で 10.2N/mm であった。弾性率については増加傾向にあったものの各時点で PLG スキャフォールド移植群と再縫着群に有意差を認めなかった。正常棘下筋腱の弾性率は約 16N/mm であり、PLG スキャフォールド移植後 16 週においても正常組織には及ばないものであった (図 6b)。

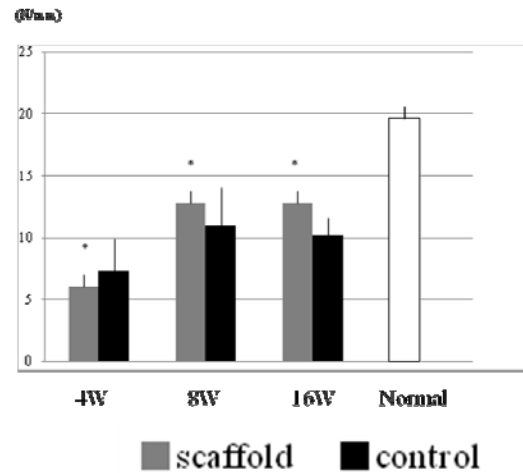


図 6b 弾性率

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- Inui A, Kokubu T, Mifune Y, Sakata R, Nishimoto H, Nishida K, Akisue T, Kuroda R, Satake M, Kaneko H, Fujioka H.  
Regeneration of Rotator Cuff Tear Using Electrospun Poly(d, l-Lactide-Co-Glycolide) Scaffolds in a Rabbit Model. *Arthroscopy*. 2012; 28(12): 1790-1799, 査読有
- 乾淳幸、国分毅、美船泰、他  
ポリ乳酸・グリコール酸 (PLG) スキャフォールドを使用した家兎肩腱板再生の試み  
*肩関節*, 2012; 36(3): 913-916, 査読有
- 国分毅、乾淳幸、美船泰、黒坂昌弘  
人工吸収性材料による肩腱板の再生 家兎棘下筋腱による検討  
*関節外科*, 2012; 31(7): 742-748, 査読無
- Inui A, Kokubu T, Fujioka H, Nagura I, Sakata R, Nishimoto H, Kotera M,

Nishino T, Kurosaka M.

Application of layered poly (L-lactic acid) cell free scaffold in a rabbit rotator cuff defect model.

Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol. 2011; 3: 29, 査読有

- Inui A, Kokubu T, Makino T, Nagura I, Toyokawa N, Sakata R, Kotera M, Nishino T, Fujioka H, Kurosaka M. Potency of double-layered Poly L-lactic Acid scaffold in tissue engineering of tendon tissue. Int Orthop. 2010; 34(8): 1327-32, 査読有

[学会発表] (計4件)

- 国分毅、名倉一成、美船泰、黒坂昌弘  
ポリ乳酸グリコール酸(PLG)スキャフォールドを用いたウサギ肩腱板再生  
第26回日本整形外科学会基礎学術集会  
2011.10.21 前橋
- 国分毅、名倉一成、美船泰  
ポリ乳酸グリコール酸(PLG)シートを使用したウサギ肩腱板再生  
第38回日本肩関節学会 2011.10.7 福岡
- Inui A, Kokubu T, Makino T, Nagura I, Kurosaka M et al.  
Regeneration of rotator cuff tear using electrospun poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLG) scaffolds in a rabbit model.  
57<sup>th</sup> Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. Jan.13-16, 2011 Long Beach, USA
- Kokubu T, Makino T, Inui A, Nagura I, Kurosaka M et al.  
Potency of double layered PLLA scaffold in tissue engineering of tendon tissue.  
7<sup>th</sup> Combined Meeting of the Orthopedic Research Societies. Oct.16-20, 2010 Kyoto, Japan

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

国分 毅 (KOKUBU TAKESHI)  
神戸大学・医学研究科・助教  
研究者番号：40403266

### (2) 研究分担者

名倉 一成 (NAGURA ISSEI)  
神戸大学・医学研究科・医学研究員  
研究者番号：00437485

黒坂 昌弘 (KUROSAKA MASAHIRO)  
神戸大学・医学研究科・教授  
研究者番号：70170115

美船 泰 (MIFUNE YUTAKA)  
神戸大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：80608464