

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791573

研究課題名(和文) 骨・靭帯附着部における超微形態・機能解剖学的構造とその破綻後の解明

研究課題名(英文) 3D-ultrastructural analysis of the development at the supraspinatus insertion and the repaired tendon/bone insertion with FIB/SEM tomography

研究代表者

金澤 知之進 (Kanazawa, Tomonoshin)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：50529518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々は、次世代走査型電子顕微鏡(FIB/SEMトモグラフィー)を用いて、正常腱骨附着部と術後腱骨間治癒の違いを超微形態レベルで検討し、術後腱骨間に正常腱骨附着部を再生させる知見を得ることを目的とした。

結果、正常腱骨附着部の構築には、SOX9/SCXを発現し、突起を持った軟骨細胞様細胞群が、重要な役割を担っていることが示唆された。術後腱骨間に正常腱骨附着部の組織構築を再生させていくのであれば、これらを更に検証していく必要がある。同時に、2つの組織の違いを検証していくことは、腱縫合/移植術の治療戦略を考えて行く上で重要な知見に成り得る為、今後更なる附着部形成過程の評価を行っていく必要がある。

研究成果の概要(英文)：To obtain a successful outcome after tendon repair, repaired tendon requires to be anchored biologically to the bone. However, the histological structure at the repaired tendon-bone interface is totally different from that of the normal tendon insertion. This morphological alteration could influence the biological instability after the surgical repair. In this study, we compared the postnatal development at the normal tendon-bone insertion with the repaired supraspinatus tendon-bone insertion in terms of 3D ultrastructure using FIB/SEM tomography, a new scanning electron microscopical method.

Our results identified the difference of the postnatal development of the normal tendon-bone insertion and tendon-bone healing after surgery, additionally, could help better understand the pathophysiology of the tendon-bone insertion. In terms of the clinical perspective, it would contribute to the clue to regenerate the normal insertion at the repaired tendon-bone interface after tendon repair.

研究分野：整形外科

キーワード：腱骨附着部 腱骨間治癒 FIB/SEM tomography 三次元再構築 腱板損傷

1. 研究開始当初の背景

膝関節に存在する前十字靭帯や肩関節における腱板組織は、それぞれ関節の動揺性を制御するのに重要な靭帯/腱であり、これらの損傷は、患者のスポーツ活動や日常生活に支障をきたし、主要な整形外科外傷疾患としてその患者数は年々増加傾向にある。さらにこの損傷に対する治療として問題となるのが、それ自体の自然治癒力が、他の靭帯と比較して非常に低いということであり、現在では、損傷した腱/靭帯を縫合、あるいは自家移植腱を用いて再建するといった手術療法が主な治療法となっている。

手術後に縫合した腱断端/移植腱と骨の間には、当然のことながら、スポーツ活動や日常生活にも耐え得るだけの十分な力学的強度が必要とされる訳であるが、実際には、術後腱骨間の力学的強度は、正常靭帯附着部と比較し非常に低く、その接着面の組織構造は、正常附着部の組織構造とは全く異なり、腱表面の線維性錨着によってその力学的強度を保っているに過ぎない(図1)。実際に我々は、ウサギの靭帯再建モデルを使って、靭帯再建後の骨-移植腱間の治癒過程を免疫組織学的に検証したが、結果、手術後の骨-移植腱間は、正常靭帯附着部とは全く異なる形でしか接着し得ないことを示している。

それに対し、正常腱骨附着部は、力学的ストレスを十分に分散できるように、腱線維が幅広く広がりつつ骨表面に附着し、組織学的には腱側から徐々に剛性の高い組織へと移行することによって、巧妙に応力の集中を防いでいる(図2)。我々は、ラットを用いて、このような組織構築は、出生後約1か月で完成されることを確認しているが、腱が、母床である骨とどのような反応を起こしながら形成されているのか、依然として不明な点が多く残されている。

腱や靭帯は、その性質から考えると、上記に示した特徴的な組織構造が、腱や靭帯の力学的役割にどう貢献しているのか注目される場所である。Kusswetterらは、腱骨間に存在する線維軟骨細胞周囲に、コラーゲン線維が8の字のように走行することにより、線維軟骨細胞自体が靭帯の張力に対する緩衝的役割を担っているのではないかと考察している。しかしながら実際のところ、そのような構築が観察されている訳ではなく、従来の形態観察法では、このような線維軟骨とコラーゲン配列のダイナミックな関係を超微形態レベルの解像度で観察するのは実現不可能であった。

今回用いている FIB/SEM トモグラフィーは、従来の電子顕微鏡と異なり、重金属でブロック染色した試料を樹脂包埋し、その樹脂ブロックの切断面の組成コントラスト情報を画像化することで、透過型電子顕微鏡画像に匹敵する分解能をもって、組織/細胞の超微

形態観察を可能とする技術である。本法は通常の透過型電子顕微鏡観察と異なり、1-2mm四方の広範囲領域を高分解能観察することができる。さらにガリウムイオンビーム(FIB)により 20nm 程度の精密切削が可能である。これは通常の超薄切片よりも薄く、未脱灰硬組織ばかりでなく、金属やダイヤモンドさえ切削することができる。これらを組み合わせること(Slice&view, 図3)により、安定した連続切削画像を得ることができ、また、その再構築により三次元超微形態観察を可能とし、信頼できる形態計測・定量化が実現できる。これは、骨・靭帯附着部に存在する線維軟骨、周囲に存在するコラーゲン配列との超微形態の解剖学的構造観察を実現するものであり、隣接する細胞丸ごとの細胞間にある接触・接着様式を直接観察することができる、これまでにない画期的な方法である。その結果に基づいた解剖学的見地から、正常骨・靭帯附着部の力学的な役割というものを深く検討することを可能にしている。

理想的な腱/靭帯縫合や再建術とは、正常と同様の組織学的な構造を持ち、且つ正常腱/靭帯と遜色のない力学的強度を持った腱骨複合体を再構築することであるとすれば、本研究において正常腱骨附着部が、どのように形成されているのか、線維芽細胞、軟骨細胞と間質のコラーゲン線維に注目して、電子顕微鏡レベルの超微形態をダイナミックに検証することは、腱骨複合体を人為的に再建させるという意味において、基盤的な知見になるものと考えられる。

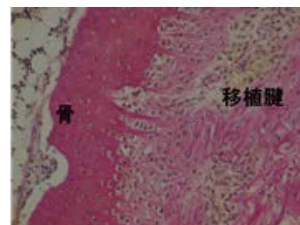


図1:手術後の骨・移植腱間の組織構造

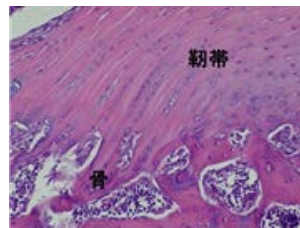


図2:正常骨・靭帯附着部の組織構造

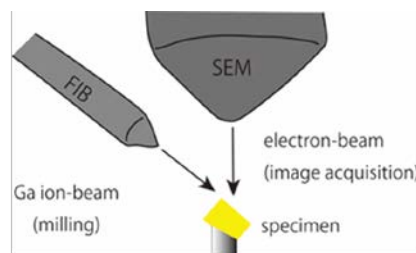


図3:FIB/SEMトモグラフィー撮影の模式図

2. 研究の目的

次世代走査型電子顕微鏡(FIB/SEM トモグラフィ)を用いて、

- 1) 腱骨付着部の正常組織構造
- 2) 腱縫合後の腱骨間治癒過程
- 3) 出生直後からの腱骨付着部形成過程

を、超微形態レベルで比較検討し、正常腱骨付着部形成過程と、腱縫合後の術後腱骨間治癒過程との違いをより明らかにし、今まで得ることの出来なかった術後腱骨間に対して正常腱骨付着部を再生させる知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) 腱骨付着部の正常組織構造

検体として、Sprague-Dawley ラットの棘上筋腱付着部を用いた。検体を脱灰/包埋後、棘上筋腱付着部の骨側に存在する軟骨領域から腱領域にかけて、FIB/SEM トモグラフィによる Slice and view を行った。その後、取り込んだ画像を元に3次元再構築を行い、各領域における細胞形態の違いと周囲の細胞外繊維との関係を比較検討した(図4)。

- 2) 腱縫合後の腱骨間治癒過程

Sprague-Dawley ラットを用いて、棘上筋腱を用いた腱板縫合モデルを作製した。モデル作製後2, 4週後に屠殺し、各週における力学的評価、光学顕微鏡による組織学的な評価とともに、FIB/SEM トモグラフィを用いた超微形態レベルにおける組織評価を行った(図5)。

- 3) 出生直後からの腱骨付着部形成過程

出生直後の Sprague-Dawley ラットを用いて、出生後1週から4週まで1週おきに屠殺し、各週において光学顕微鏡による組織変化、軟骨や腱分化の標識として SOX9, Screlaxis 抗体を用いた免疫染色とともに、FIB/SEM トモグラフィを用いた超微形態レベルにおける組織評価を行った(図6)。

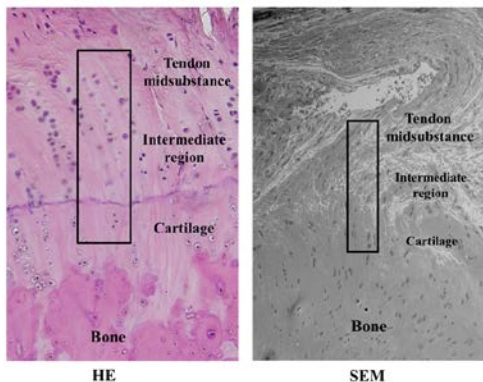


図4: 正常付着部観察領域

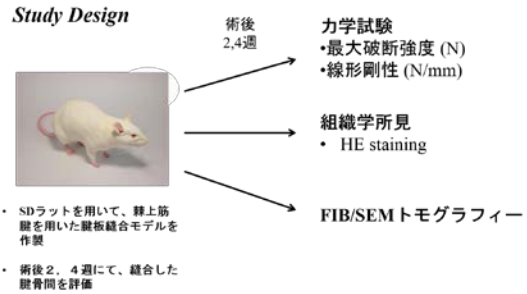


図5: 腱縫合後腱骨間治癒過程の実験概略

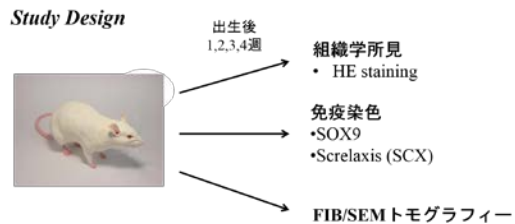


図6: 出生直後からの腱骨付着部形成過程の実験概略

4. 研究成果

- 1) 腱骨付着部の正常組織構造

FIB/SEM トモグラフィを用いて、超微形態レベルにおける、各領域の細胞形態と周囲のコラーゲン線維束間の相互関係を形態学的に検討した結果、従来から言われている4層構造の線維軟骨層領域には、軟骨細胞と線維芽細胞のちょうど中間の形態をした細胞の存在を認め、それは腱実質部領域に認めた細胞と同じく、発達したコラーゲン線維束間に柱状に配列していた(図7)。更に、腱実質部と腱骨付着部領域に存在する細胞突起は、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持っていた。細胞の形態と付着部領域における分布をみると、腱側に存在する細胞の形態分布と軟骨側に存在する細胞の形態分布は一定した境界を持っているのではなく、その分布はなだらかに移行していた(図8)。

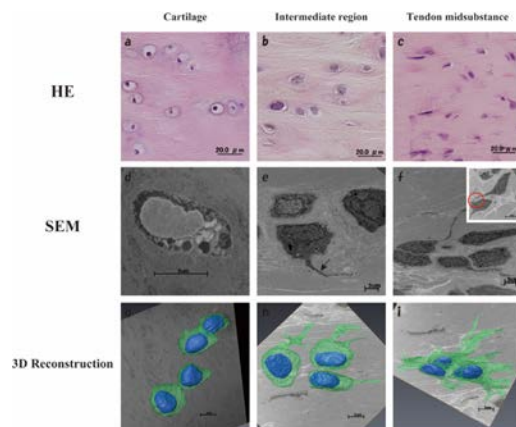


図7: 各領域に存在する細胞の形態比較

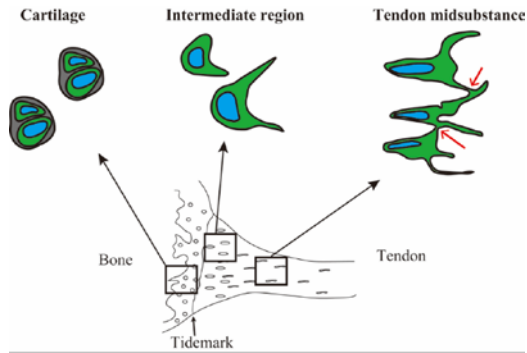


図8: 腱骨付着部に存在する細胞の分布

2) 腱縫合後の腱骨間治癒過程

力学的評価では、最大破断強度、線形剛性ともに、週数を経るに従い有意に増加していたが、術後4週においても依然として、正常付着部の力学的強度に比べ低い値を示していた(図9)。光学顕微鏡による術後腱骨間の組織変化では、2週において、腱骨間には血管線維性組織が介在し、コラーゲンの生成や配列は未熟なものだった。4週になると、細胞の配列やコラーゲンの生成が、より成熟されていたが、正常付着部とは全く違う組織構築であった(図10)。しかしながら、FIB/SEMトモグラフィーでは、光学顕微鏡レベルの解像度では観察することが出来なかった骨と介在組織の境界面に、介在部の線維性組織から骨にかけてまたぐように配列している細胞を認め、この細胞が腱骨間錨着の力学的補填の一因となっている可能性が示唆された(図11)。

過去の報告と同様、超微形態レベルの解像度においても、正常付着部と術後早期における腱骨間は全く異なる組織構築を呈しており、力学的評価と照らし合わせると、この組織構築の相違が力学的強度に反映しているものと思われる。今後、腱骨付着部の力学的強度を増強/加速化していくのであれば、増殖因子等を用いて、介在する細胞と錨着線維の生成を活性化するのは、合理的な方法と思われる。しかしながら、全く異なる組織構築であることから、このような方法を用いる事により、正常付着部と同様の組織構築を再現出来るかどうかは大きく疑問が残るところである。結果として正常付着部と同様の力学的強度を獲得するのは難しく、腱骨間の再生には、全く違ったアプローチが必要かもしれない。

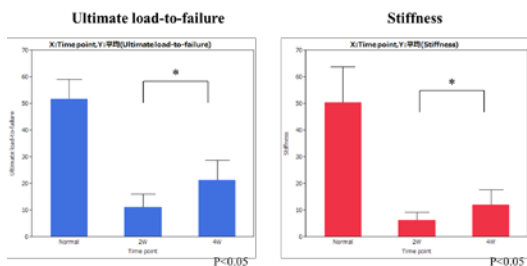


図9: 術後腱骨間の力学的評価

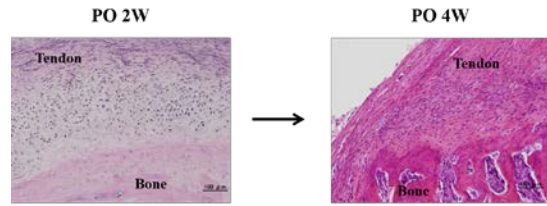


図10: 光学顕微鏡による術後腱骨間組織

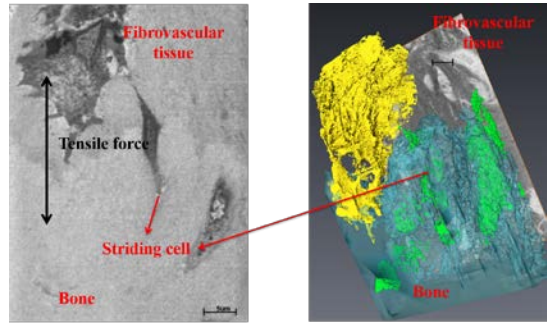


図11: 術後腱骨間のFIB/SEMトモグラフィー画像

3) 出生直後からの腱骨付着部形成過程

光学顕微鏡による出生後の組織変化では、出生後1週において、腱は骨化前段階である骨端核から直接生える様な形で存在し、染色性からも明瞭に区別することが出来た。腱付着部では、未熟なコラーゲン線維束間に柱状に配列した、軟骨様の細胞を認めた。出生後週数経ち、骨端核の骨化と腱側に存在するコラーゲン線維束が成熟するのに伴い、軟骨との境界付近において、コラーゲン線維束間に存在する細胞の核は扁平なものへと変化しているようであったが、細胞突起を含めた細胞自体の形態を観察することは出来なかった(図12)。SOX9とSCXの発現をみた免疫染色においては、出生後付着部に存在する細胞群はSOX9、SCX共にその発現を認めていましたが、週数を経るにしたがいその発現はSCXの方から減弱していた(図13)。FIB/SEMトモグラフィーを用いた超微形態レベルにおける細胞形態では、出生後1週において付着部に存在する細胞は軟骨様の形態をしていたが、骨端核に存在する軟骨細胞群とは異なり、細胞突起を無秩序に伸ばしているのが観察された。しかしながら週数を経ていくに従い、その突起の数は減少していくと同時に、突起の長さは長くなり、一定の方向性を持ってコラーゲン線維束間にその突起を伸ばしている細胞が多く観察された(図14)。

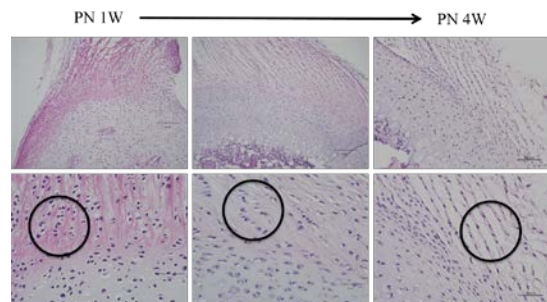


図12: 光学顕微鏡による正常腱骨付着部形成過程

この結果から、正常腱骨付着部の構築には、SOX9/SCXを発現し、且つ、どのような力学的環境にも対応出来る様に無秩序な方向性を持つ細胞突起を有した軟骨細胞様細胞群が付着部領域に存在することが、重要な役割を担っていると考えられる。今後、腱縫合術後の腱骨間に正常腱骨付着部の組織構築を再生させていくのであれば、このような知見を検証していく必要がある。同時に、正常付着部形成と術後腱骨間治癒を1つ1つ丁寧に読み解いていくことは、腱板縫合をはじめとした腱縫合/移植術の治療戦略を考えて行く上で重要な知見に成り得ると考えており、今後も様々なアプローチから更なる付着部形成過程の評価を行っていく必要がある。

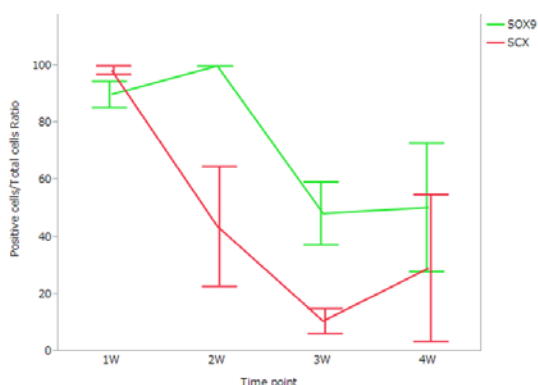


図 1 3 : SOX9/SCXの発現推移

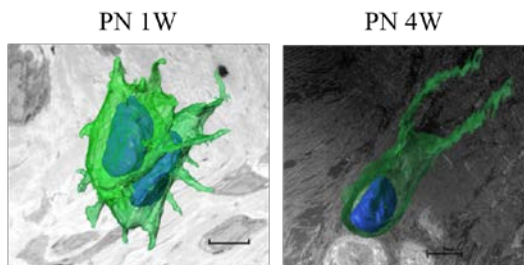


図 1 4 : 発達段階における正常付着部FIB/SEMトモグラフィ画像

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 2 件)

1) Kanazawa T, Gotoh M, Ohta K, Shiba N, Nakamura N.

Novel characteristics of normal supraspinatus insertion in rats: an ultrastructural analysis using three-dimensional reconstruction using focused ion beam/scanning electron microscope tomography.

Muscles, Ligaments and Tendons Journal 4 (2): 182-187, 2014 査読有

2) Kanazawa T, Gotoh M, Nakamura H, Shiba N, Nagata K.

3D-ultrastructural analysis at repaired supraspinatus tendon/bone insertion in rat

Journal of Shoulder and Elbow Surgery 23 (5): 602, 2014 査読無

[学会発表] (計 1 4 件)

1. 金澤知之進、後藤昌史、太田啓介、都合 亜記暢、中村桂一郎

3D-ultrastructural analysis of the development at the supraspinatus insertion with FIB/SEM tomography.

日独整形外科医会 神戸 (2015.5.20)

2. Kanazawa T, Gotoh M, Ohta K, Togoh A, Shiba N, Nakamura K.

3D-ultrastructural analysis of the development at the supraspinatus insertion with FIB/SEM tomography.

2015 Orthopaedic Research Societies Annual Meeting Las Vegas, USA (2015.3.28-31)

3. Kanazawa T, Ohta K, Gotoh M, Togoh A, Shiba N, Nakamura K.

3D-ultrastructural analysis of the development at the supraspinatus tendon insertion with FIB/SEM tomography.

120th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists. Kobe (2015.3.21-23)

4. 金澤知之進、太田啓介、都合 亜記暢、中村桂一郎

出生後ラット棘上筋腱付着部形成過程の三次元超微形態解析

第 4 1 回日本肩関節学会 佐賀 (2014.10.24-25)

5. 金澤知之進、太田啓介、都合 亜記暢、中村桂一郎

出生後における正常腱骨付着部形成過程の超微形態構造解析—肩関節腱板縫合後

の組織変化との比較—

第46回日本臨床分子形態学会学術集会
東京 (2014.10.17-18)

6. 金澤知之進、後藤昌史、太田啓介、都合
亜記暢、中村桂一郎
出生後ラット棘上筋腱付着部形成過程の
三次元超微形態解析
第29回日本整形外科基礎学術集会 鹿
児島 (2014.10.9-10)

7. Kanazawa T, Ohta K, Gotoh M, Togo A,
Shiba N, Nakamura K.
3D-ultrastructural analysis at the repaired
supraspinatus tendon/bone insertion in rat.
2014 Orthopaedic Research Societies Annual
Meeting. New Orleans, USA (2014.3.15-18)

8. 金澤知之進、太田啓介、都合亜記暢、中
村桂一郎
ラット棘上筋腱—骨縫合後の三次元超微
形態構造解析
第69回日本解剖学会九州支部学術集会
鹿児島 (2013.11.2)

9. 金澤知之進、太田啓介、後藤昌史、都合
亜記暢、志波直人、中村桂一郎
次世代走査型電子顕微鏡 (FIB/SEM
tomography)を用いた、ラット棘上筋腱正
常付着部/腱板縫合後腱骨間の三次元超
微形態構造解析
第28回日本整形外科基礎学術集会 幕
張 (2013.10.17-18)

10. Kanazawa T, Ohta K, Gotoh M, Togoh A,
Nakamura K.
3D-ultrastructural analysis at the repaired
supraspinatus tendon/bone insertion in rat.
8th Combined meeting of Orthopaedic
Research Societies Venice, Italy
(2013.10.13-16)

11. 金澤知之進、太田啓介、後藤昌史、都合
亜記暢、志波直人、中村桂一郎
ラット棘上筋腱—骨縫合後の三次元超微
形態構造解析
第40回日本肩関節学会 京都
(2013.9.27-28)

12. Kanazawa T, Gotoh M, Shibata H,
Nakamura H, Higuchi F, Shiba N, Nagata K.
Ultrastructural analysis at the
supraspinatus-tendon insertion in rat
12th International Congress of Shoulder and
Elbow Surgery Nagoya (2013.4.10-12)

13. 金澤知之進、太田啓介、東龍平、都合亜
記暢、中村桂一郎
FIB/SEM トモグラフィーを用いたラット
腱板正常付着部/縫合後腱骨間の超微形

態観察

第118回日本解剖学会・全国学術集会
高松 (2013.3.28-30)

14. 金澤知之進、後藤昌史、柴田英哲、中村
秀祐、白地功、樋口富士男
ラット棘上筋腱骨付着部の超微形態にお
ける機能解剖学的構造解析
第39回日本肩関節学会 東京
(2012.10.5-6)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金澤知之進 (Kanazawa, Tomonoshin)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号: 50529518

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: