

令和元年6月17日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04519

研究課題名(和文) 生体分泌組織リガメントゲルを基材とする靭帯再生技術及び人工靭帯の開発

研究課題名(英文) Development of a ligament regeneration technique and a artificial ligament using a secretion ligament gel as a base material

研究代表者

葛巻 徹 (Kuzumaki, Toru)

東海大学・工学部・教授

研究者番号：50396909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、断裂した腱・靭帯から分泌されるコラーゲン前駆体組織を基材として、コラーゲン線維組織が一方向に配向した組織を再生するための最適条件について検討した。腱由来の分泌組織は3日間の生体内温存で成熟し、適切な張力を印加することで正常なウサギの腱のコラーゲン線維束と同等の組織を得ることに成功した。一方、靭帯由来の分泌組織は成長が遅く10日間以上の生体内温存が必要であった。腱由来および靭帯由来の分泌組織は、それぞれ腱鞘および滑膜が分泌組織の機械的性質に影響を与える。腱鞘と滑膜を除去した分泌組織は張力印加によって伸長し、いずれの場合もコラーゲン線維束の形成が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腱・靭帯断端から形成される分泌組織を基材として、張力印加により靭帯様組織を再生する基本技術を確立した。生体由来の人工靭帯を工業的に生産できる手法が確立されると、損傷靭帯への新たな移植治療法の構築が期待できる。ゲル組織の成熟期間とコラーゲン線維化組織の形成に要する機械的張力を正確に見積もることができれば、現行の腱・靭帯損傷治療に対して、より正確で、効果的な固定療法とリハビリを行うためのエビデンスを与えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the optimum conditions for regeneration of a collagen fiber structure using a collagen precursor as a base material secreted from ruptured tendon or ligament. We found that the collagen precursor derived from tendon was matured in 3 days in vivo, and then, the oriented collagen fiber structure with the same structure of the normal tendon of rabbit was formed by applying the appropriate tension. Meanwhile, the collagen precursor derived from ligament was slow-growing, and the preservation in vivo more than ten days was necessary. A stratum synoviale of ligament affected the mechanical property of the collagen precursor derived from ligament. The formation of a collagen fiber structure was confirmed by applying the tension for the collagen precursor that a tendon sheath or a stratum synoviale was eliminated.

研究分野：ナノ材料計測科学

キーワード：生体分泌組織 腱・靭帯損傷 再生医療技術

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

靱帯は骨と骨とをつなぐ組織で近傍に血管が乏しく、特に膝関節の前十字靱帯や肘関節の側副靱帯は再生しにくい。多くの競技レベルのスポーツ選手やプロアスリートらが膝や肘の靱帯損傷で移植による再建を第一選択とするのはそのためである。移植による靱帯の再建では、健全な腱組織から一部を切除し、靱帯として自家移植する方法が一般的であるが、健全な組織への侵襲が著しく、採取部位のパフォーマンスの低下や再々建時には前回とは違う部位から腱組織を採取しなければならないという欠点がある。また、市販の人工靱帯は耐久性や生体親和性等に問題があり普及しているとは言い難い。このような状況にあって、現行の靱帯損傷時の固定療法や、靱帯断裂時の移植による靱帯再建術に対して、再生医療技術を利用した画期的な新技術が渴望されている。高齢化社会を迎え、中高年者の積極的なスポーツへの参加は体力の向上、生活習慣病からの脱離、健康増進など有効な点が多く公的にも推奨されている。しかし、その一方で急激な心身への負担が腱や靱帯の損傷・断裂など予期せぬ事態を招き、これによる傷害の慢性化が新たな問題として浮上してきている。中高年者がけがの心配なく元気で活力のある日常生活を送るための新規医療技術の開発は、結果として経済活動の活発化と医療費の削減につながるため喫緊の課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、マウスのアキレス腱の再生過程の研究で得た知見を基に、人工靱帯形成に資するコラーゲン前駆体組織を「リガメントゲル」と呼称し、これを基材として靱帯の再生及び生体由来の人工靱帯を形成できれば現行の治療法にとって代わる新規再生医療技術を開発できると考えた。本研究は中型動物であるウサギを対象として実験を行い、腱由来と靱帯由来の生体分泌組織「リガメントゲル」の形成と靱帯様組織形成におけるそれぞれのリガメントゲルの特徴付け、及び、靱帯様組織形成のための基礎技術の確立を目的とした。

3. 研究の方法

<腱由来のリガメントゲル形成>

ウサギのアキレス腱をメスで切断し、フッ素系樹脂フィルム(Aflex, 旭硝子)10×13 mmの上に片方の切断端を医療用針付き 10-0 ナイロン縫合糸で結紮固定した。生体内で 3, 5, 10, 15 日間温存し、試料を取り出した。

<靱帯由来のリガメントゲル形成>

ウサギの内側側副靱帯をメスで切断し、フッ素系樹脂フィルム(Aflex, 旭硝子)10×13 mmの上に片方の切断端を医療用針付き 10-0 ナイロン縫合糸で結紮固定した。

【リガメントゲルからの靱帯様組織の形成】

ウサギの腱・靱帯組織由来のリガメントゲル試料に対する張力印加実験は従来型の引張試験機と本研究で独自開発した張力印加装置で行った。

張力印加試験および微小引張試験

張力印加による試料の組織変化を確認するため、独自開発した張力印加装置を用いて、ウサギの腱または靱帯由来のリガメントゲル試料に対して実験を行った。また、市販の微小引張試験機(MX-500N-FA, IMADA)を用いて力学挙動の評価を行った。

原子間力顕微鏡(AFM)による表面観察

AFM(SPM-9700, SHIMADZU)を用いて各種試料に対して張力印加前後の表面観察を行った。

試料をガラス基板に乗せ、試料が平坦になるように設置し、ダイナミックモードで観察した。プローブはシリコン製カンチレバー（NCHV-10V, Bruker）を使用した。

赤外分光法の全反射測定法 (ATR: FT/IR-4200、日本分光(株))による構造解析

張力印加前後の各種リガメントゲル試料と正常なウサギのアキレス腱と靭帯に対して ATR(PR 0450-S, FT-IR-4200typeA、日本分光(株))を用いて構造解析を行った。プリズムはダイヤモンドを使用した。

4. 研究成果

＜腱由来のリガメントゲル＞

ウサギの腱由来リガメントゲルのサイズは生体内温存日数によって異なるが、概ね約 1.5~5mm×約 1~3mm であった。

ウサギの生体内に 10 日間温存したリガメントゲル試料に対して張力印加実験を行った。張力印加前後の試料の外観写真を図 1 に示した。ウサギの腱由来のリガメントゲル試料はマウスの同条件のものと同様にひも状に伸長した。引張速度約 0.3 mm/h でゲル試料は元のサイズから最大約 200%伸長した。張力印加前後のリガメントゲル試料の AFM 像を図 2 に示した。張力印加前の試料表面には配向性のない細かいコラーゲン線維が見られ、張力印加後ではコラーゲン線維が太く成長し配向した組織は見られなかった。この組織変化はマウスで得られた結果とは異なるものであった。

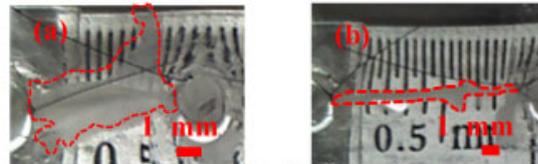


図 1 張力印加前後の腱由来リガメントゲル試料(10 日間温存)

(a) 張力印加前、 (b) 張力印加後

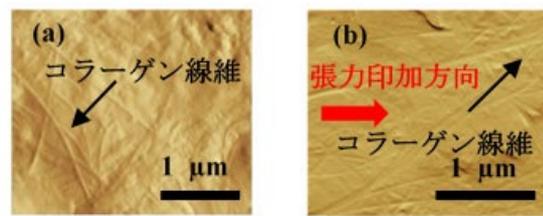


図 2 張力印加前後の腱由来リガメントゲル試料(10 日間温存)の AFM 像

(a) 張力印加前、 (b) 張力印加後

この結果から、ウサギの腱由来リガメントゲルとマウスのテンドンゲルは同じコラーゲン前駆体組織ではあるものの、張力に対する組織変化が異なることが示唆された。そこで、生体内温存期間の異なるリガメントゲル試料を作製し、張力に対する組織的变化を検証することとした。

ウサギの各種リガメントゲル試料に対して張力印加実験を行った。3、5、15 日間温存試料はマウスの 10 日間温存テンドンゲル試料と同様に細くひも状に伸長することが確認された。AFM 像から、生体内での成熟期間の最も短い 3 日間温存したりガメントゲル試料において正常なウサギの腱と同程度の直径を持つコラーゲン線維の配向が確認された。マウスの場合、3、5 日間温存コラーゲン前駆体試料は未成熟でほとんど伸長せず、コラーゲン線維組織の形成も認められなかったことから、ウサギのリガメントゲルはマウスの場合と比べて生体内での温存期間が短い場合でも成熟し、張力印加により配向したコラーゲン線維組織が再生することが示唆された。しかしながら、温存期間が 5 日間以降の試料では太く成長したコラーゲン線維の配向した組織は観察できなかった。

各種リガメントゲル試料に対する構造解析を行った。ウサギの 10 日間温存リガメントゲルは張力印加前後で顕著なスペクトルの差異は見られなかったが、3、5、15 日間温存リガメントゲル試料は張力印加後にコラーゲン分子間の架橋に伴うアルドール縮合反応を示す

OH 基のピークが強く現れていることが確認できた。分子構造解析の結果からもウサギのリガメントゲルは3日間の時点で張力印加によりコラーゲン線維の架橋が進行することが確認された。表面組織観察と分子構造解析の結果から、ウサギのリガメントゲル試料はマウスの場合とは異なり生体内での温存期間が3日間の時点で張力印加によりコラーゲン線維組織が再生されることが確認された。

生体内温存期間が5日間以降のコラーゲン線維再生組織を確認するため各温存日数における腱由来リガメントゲル試料の微小引張試験後の組織をAFMで観察した。観察された範囲では、破断荷重とコラーゲン線維の直径との間に比例関係が認められた。この結果は、マウスで得られた結果を支持するものであるが、やはり10、15日間の試料ではコラーゲン線維組織は観察されなかった。これはフィルムモデル法によるリガメントゲル作製時に腱鞘組織の一部がフィルム内に侵入したことが原因である可能性が高い。

張力印加前の各温存期間におけるリガメントゲル試料を観察した。各試料ともアキレス腱付近(近位端)とリガメントゲルの末端付近(遠位端)でゲルの濃淡の差が見られた。マウスの場合、コラーゲン前駆体試料は比較的均質な組織を呈しており、近位端と遠位端でのゲル組織の差異は見られなかった。この近位端と遠位端でのゲル組織の濃淡の差は、フィルムモデル法による試料作製時に腱鞘組織が侵入してしまったことに由来すると考えられる。そこで、10日間温存リガメントゲル試料に対して長手方向(近位端と遠位端方向)に対して張力印加を試みた。この張力印加方法で微小引張試験を行った際に得られたリガメントゲル試料の荷重-伸び曲線では荷重の値の上昇が見られた。これはマウスのテンドンゲル試料と同様の力学挙動であり、コラーゲン線維の架橋に伴う強度の上昇だと考えられる。張力印加後、リガメントゲル試料の遠位端付近で直径約 194 ± 26.9 nmのコラーゲン線維が張力印加方向に配向していることが確認された。以上の結果から、腱由来のリガメントゲル試料では、腱鞘組織の混入があるものの、張力印加時にはリガメントゲルのコラーゲン線維が架橋し、張力印加方向に配向したコラーゲン線維組織が形成されていると考えられる。各温存日数で作製した腱由来のリガメントゲルの荷重-変位曲線から、腱由来のリガメントゲルは3日間の温存でコラーゲン線維組織の再生が認められたが、荷重-変位曲線の立ち上がり傾きを比較すると10、15日間の方が高くなっていることがわかる。3日間以上の生体内温存で張力印加によるコラーゲン線維組織の再生は認められたものの、生体内温存日数によってリガメントゲルの物理的性質に違いが生じている可能性が高い。マウスの場合と同様、10日間温存した試料が靭帯様再生組織を得るためには適切であると考えられる。また、本実験の範囲内において、正常なウサギのコラーゲン線維束の平均直径と同程度のコラーゲン線維組織を再生させるためには約0.05N以上の張力印加が必要であることが示された。

<靭帯由来のリガメントゲル>

生体内で10日間温存することで腱由来の場合と同様、リガメントゲルが形成されることが確認された。張力印加前の試料で配向性のない線維状の組織が見られた。この試料に対して張力印加を行った。

ウサギの10日間温存靭帯由来のリガメントゲル試料は弾性が強く、張力を加えると一旦伸長するものの、張力除荷後に元の形状を復元する傾向が見られた。靭帯由来のリガメントゲル試料は表面で観察された線維状の組織によって伸びが制限されている可能性があると考えた。ウサギの正常な靭帯組織の表面は線維状組織である滑膜に覆われていたことから、AFMで観察された線維状組織は滑膜であると考えられる。そこで、靭帯断裂モデルを

形成する前に、靭帯表面の滑膜をピンセットでこそぎ落とし滑膜を除去した後、フィルムモデル法で10日間温存リガメントゲル試料を作製した。滑膜除去後の10日間温存リガメントゲル試料に張力を印加した。この試料は腱由来リガメントゲルと同様にひも状に伸長し、張力除荷後もその形状を保持していた。張力印加前には線維状組織は確認されず、張力印加後は張力印加方向にコラーゲン線維が配向して形成されたことが確認された。これらの結果から、滑膜を除去することで腱由来リガメントゲルと同様の性質を備えたゲル組織が形成されることが実験的に確認された。靭帯由来の各種リガメントゲル試料及び正常なウサギの靭帯のATRスペクトルから滑膜除去前と正常なウサギの靭帯で 1500cm^{-1} 付近に見られるピークが滑膜除去した試料では消失しており、これらのピークが滑膜に由来するコラーゲン線維組織であると考えられる。また、滑膜除去した試料の張力印加後のATRスペクトルにはOH基のピークが確認できた。このスペクトルの変化は応力印加によりコラーゲン線維の架橋が起きたことに対応している。

以下に本実験で得られた成果をまとめた。

(1) 中型動物であるウサギの腱および靭帯からコラーゲン前駆体であるリガメントゲルの生成が確認された。

(2) 腱由来のリガメントゲル形成では、フィルム内に腱鞘組織が侵入するが、張力印加によりコラーゲン線維が架橋し、張力印加方向に配向した組織が得られる。腱鞘組織の侵入はウサギの腱が太いため、腱と2枚のフィルムとの間に隙間ができやすいことが原因となっていると考えられる。

(3) 靭帯由来のリガメントゲル形成では、ゲル試料表面に滑膜が形成される。この場合、リガメントゲル組織は弾性が高く、除荷後のゲル組織はほぼ元の形状を回復する。このため、リガメントゲル形成時においては滑膜組織の除去は不可欠である。

(4) 滑膜を除去して形成したリガメントゲルは腱由来のリガメントゲルと同様、配向したコラーゲン線維組織が形成されるが、靭帯由来のリガメントゲルは比較的生成量が少ない傾向にあった。また、靭帯由来のリガメントゲルは3日間の生体内温存では形成されなかった。

(5) 腱由来のリガメントゲルを基材とする靭帯様組織の形成においては、3日間の生体内温存で成熟し、張力印加によってコラーゲン線維組織が形成された。しかし、各生体内温存日数における腱由来のリガメントゲルの荷重-変位曲線の結果および靭帯由来のリガメントゲルの形成状態を考慮すると、10日間生体内で温存した腱由来のリガメントゲル試料が靭帯様組織形成の基材として適切であると考えられる。

(6) 本実験条件ではリガメントゲルに印加する張力に比例してコラーゲン線維の架橋が進行し、線維太さが増加する傾向が認められた。実験に用いたリガメントゲルの正確な断面積の見積もりが困難であるため応力値の算出はできなかったが、ウサギの正常なコラーゲン線維と同等の平均直径を得るためには、 0.05N 程度の張力印加が必要である。成熟したリガメントゲル試料への張力印加によるコラーゲン線維組織の形成は再現性が高く、引張速度が約 0.3 mm/h で元のサイズから最大約200%伸長させることができた。

(7) 本実験では腱・靭帯由来のリガメントゲル試料から形成した靭帯様組織はサイズが小さく移植実験には不適であった。しかしながら、本実験の実施によりゲル組織の大型化を達成するための方法論および移植適用可能な人工靭帯形成に向けた新たな方策を着想することができた(知的財産権に関連するため詳細は記述しない)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Y. Ohashi, J. Nakase, K. Shimozaki, K. Torigoe, H. Tsuchiya, Evaluation of dynamic change in regenerated tendons in a mouse model, Journal of Experimental Orthopaedics, 5, 2018, P. P. 37-44
2. 鳥越甲順、葛巻徹、中瀬順介、土屋弘行、Tendon gel (腱の再生)、臨床整形外科、59(6)、2017、P. P. 542-545
3. T. Kuzumaki, K. Yamazaki, K. Suzuki, K. Torigoe, Appropriate Tensile Mode and Timing of Applying Tension to Promote Tendon Gel Regeneration、Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 12(3), 2017, P. P. 465-475

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 山口竜也、大野真沙、下崎研吾、中瀬順介、鳥越甲順、葛巻徹、ラビットの腱分泌組織 tendongel の成熟期間と再生腱様組織の機械的性質の相関性、第 18 回日本再生医療学会、2019
2. K. Shimozaki, J. Nakase, Y. Takata, K. Asai, H. Tsuchiya, Tendon specific regeneration: observed intrinsic tendon healing using the film model method, 18th European Society of Sports Traumatology, Knee Surgery & Arthroscopy (ESSKA), 2018
3. K. Shimozaki, J. Nakase, T. Oshima, Y. Takata, K. Asai, H. Tsuchiya, Investigation of intrinsic tendon healing using the film model method. Asia-Pacific Knee, Arthroscopy and Sports Medicine Society (APKASS), 2018
5. 山口竜也、下崎研吾、中瀬順介、鳥越甲順、ラビットから採取したテンドンゲルの張力印加による再生組織、2018
4. 大野真沙、山口竜也、下崎研吾、中瀬順介、鳥越甲順、葛巻徹、生体分泌組織に対する引張印加によるコラーゲン線維組織の再生、2018 Society of Advanced Science, 2018
6. 下崎研吾、中瀬順介、高田泰史、浅井一希、鳥越甲順、葛巻徹、山口竜也、土屋弘行、ウサギアキレス腱を用いた腱固有再生過程の観察、第 33 回日本整形外科基礎学術集会、2018
7. T. Yamaguchi, Y. Onozuka, K. Shimozaki, J. Nakase, K. Oshima, K. Torigoe, T. Kuzumaki, Formation of ligament analogs by applying tension to ligament secretions、MNTC2017 Tokai Univ.、2017
8. 鈴木慶一、山口竜也、鳥越甲順、大島健史、中瀬順介、葛巻徹、靭帯分泌組織を用いた人工靭帯形成のための基礎研究、第 16 回日本再生医療学会総会、2017

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：鳥越甲順

ローマ字氏名：Torigoe Kojun

所属研究機関名：福井医療大学

部局名：保健医療学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：50126603

研究分担者氏名：中瀬順介

ローマ字氏名：Nakase Junsuke

所属研究機関名：金沢大学

部局名：附属病院

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：50584843

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。