

平成 21 年 4 月 28 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890190

研究課題名（和文） 骨と靭帯結合部（エンテシス）の再生技術確立と臨床応用

研究課題名（英文） Generation of tendon-to-bone interface "entheses" with use of recombinant BMP-2 and application to the ACL Reconstruction

研究代表者

鈴木 亨暢（Suzuki Akinobu）

大阪市立大学・医学部大学院医学研究科・後期研究医

研究者番号：00445016

研究成果の概要：

この研究では新しい生理的再生を目指して、サイトカインのBMPを用いた骨靭帯結合部の再生とそれを用いた新しい靭帯再建術の開発を目的とした。

家兎アキレス腱にBMP入りポリマー埋植実験を行ったが、安定した骨化が得られなかった。直接BMP注入法に変更することによって安定した骨化が得られた。組織学的には4週では内軟骨性骨化に類似した骨形成が見られ腱・非石灰化軟骨・石灰化軟骨・骨の4層構造が確認された。この再構築されたenthesesを用いて臨床応用を可能とするための前十字靭帯再建モデルを作成した。半腱様筋腱に対してアキレス腱と同様にナイロン結紮後rhBMP-2を2箇所15、30ugずつ注入したところ、6週の15ugで良好な骨形成があり、移植材料として最適な大きさであった。これを用いた前十字靭帯再建モデルを試行している。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	390,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：整形外科学

キーワード：骨腱移行部、BMP、再生医療

1. 研究開始当初の背景

正常な tendon bone junction には entheses と呼ばれる構造が存在し、力学的負荷を円滑に伝達する役割を担っている。すなわち tendon の collagen fibers が Sharpy 線維として軟骨から骨の中へと連続する。その組織構造として、4層構造が

特徴的である。すなわち、Zone 1：tendon 終末、Zone 2：非石灰化 fibrocartilage 層、Zone 3：石灰化 fibrocartilage、Zone 4：皮質骨という連続である。この4層構造により局所的ストレスの集中を防ぎ、円滑な load transmission に重要な役割を果た

している。その発生過程は腱付着部における内軟骨性骨化によって完成するといわれている。しかし現在行われている腱や靭帯の骨との境界部での断裂修復および再建法ではこの組織構造の再生修復ではなく fibrous scar tissue によるものであり、正常な4層構造を有する tendon と bone の insertion site を再構築することができず、生理的な力学的強度回復が得られない。このことから膝十字靭帯再建手術後の骨孔拡大、再建靭帯の骨への固定力不足などの問題となっている。

2. 研究の目的

正常な entheses の特徴的な4層構造の再生によって生理的力学的特性を有する entheses 構造を再生回復させる技術を開発し、将来の腱、靭帯と骨との移行部修復に臨床利用を進展させるのが本研究の目的である。Entheses の4層構造の再生には腱、靭帯とコラーゲン繊維を腱、靭帯と共有し連続する線維軟骨および骨の形成が必須である。その目的に骨形成因子 (BMP、未分化間葉系細胞から軟骨細胞への分化促進作用がある) を用いる。我々は予備的実験で腱実質部に腱組織とコラーゲン線維を共有する線維軟骨、骨の作成を試み成功している。この技術によって Bone-cartilage-tendon-構造を腱内に誘導し、その誘導骨を entheses 再生が必要な部位の骨と癒合させることで entheses の再生を目指す。

3. 研究の方法

(1) rhBMPによるアキレス腱内での異所性骨化モデルの作成と最適化
ウサギ (日本白色家兎3.2~4.0kg) のアキレス腱に対してポリマー3mgに rhBMP (10ug) を混合したコンポジットを埋植する。1週

ごとにレントゲン撮影を行い、移植後1,2,3,4週ごとに屠殺し、アキレス腱を採取してレントゲン撮影と組織学的評価を行う。軟X線装置 (ソフロン)、骨密度測定器 (アロカ) を用いてBMPによる異所性骨形成を1,2,3,4週で撮影、測定し骨形成を評価する。H-E, toluidine blue, von kossa 染色を行い、骨形成態の把握と異所性骨化と靭帯線維との関係性を評価する。

次にアキレス腱に直接 rhBMP を注入するモデルを作成し同上の評価を行った。

(2) 再生 entheses モデルの作成及び臨床応用に向けての機能評価

あらかじめ腱内に rhBMP を埋入した4週間後、ウサギ脛骨近位に骨孔を作成、切断した骨化部断端を埋入し、ワイヤーで固定する。コントロールとして腱のみを骨孔を通し同様の固定を行う。この骨孔作成モデルを4週間後に屠殺、レントゲン、CT、組織学的評価、力学試験を行った。

(3) 骨靭帯結合部の自家移植材の作成技術の確立

臨床に直結した動物実験モデルとして、前十字靭帯再建術で有用とされている膝蓋腱 (bone-tendon-bone ; BTB) を模写した再生BTBの作成を行う。白色家兎のアキレス腱に対して rhBMP-2 を2箇所注入した。注入するBMPの量を0,15,30,60 μ g、注入後経時的に3,4,6週でレントゲン撮影を行った。レントゲンで良好な骨形成が見られた時期に屠殺し組織切片を作成した。白色家兎の半腱様筋に同様な操作を行い、アキレス腱と同じく骨形成がなされるかを検討した。

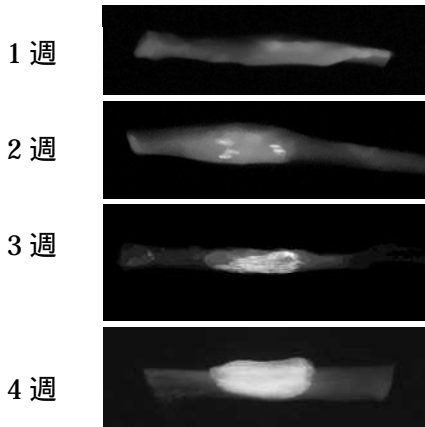
4. 研究成果

(1) BMPを用いて正常4層構造を有する tendon bone junctionの再構築

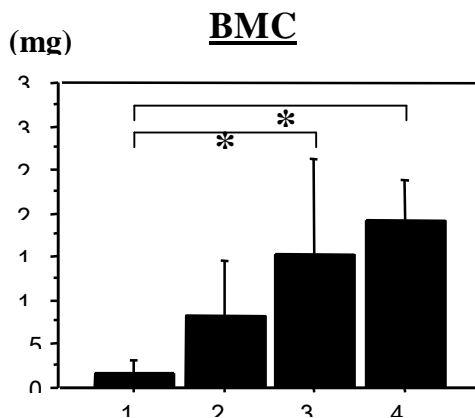
家兔アキレス腱にBMP入りポリマー埋植実験を行ったが、安定した骨化が得られなかった。技術的に手技が不安定であると考え、より簡素化したBMP注入法に変更



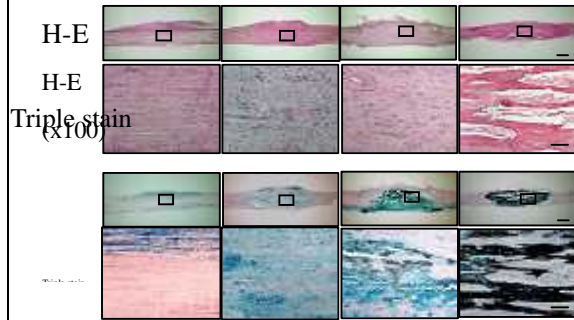
することによって安定した骨化が得られた。2週後の軟X線では腱内に点状



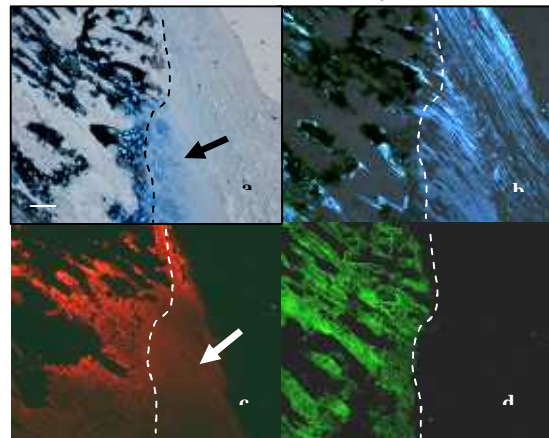
の骨化巣が出現し、4週にかけて徐々に範囲が拡大した。骨密度計測では2週から経時的に骨密度の増加が見られた。



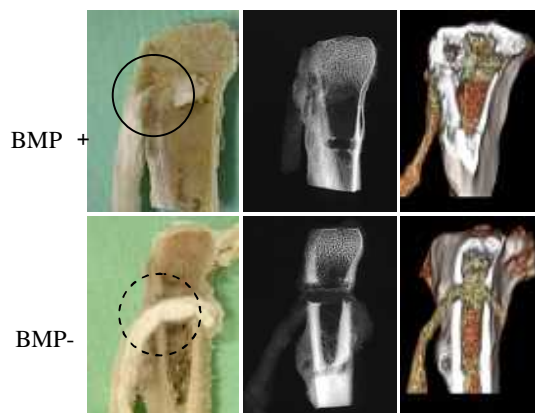
組織学的には1週目で細胞数増加が認められ、2週で腱線維内に卵形細胞が出現し、toluidine blue染色で異染性を示した。3週目で卵形細胞周囲の一部にvon Kossa染色陽性領域が広く分布し、4週では内軟骨性骨化に類似した骨形成が見られた。



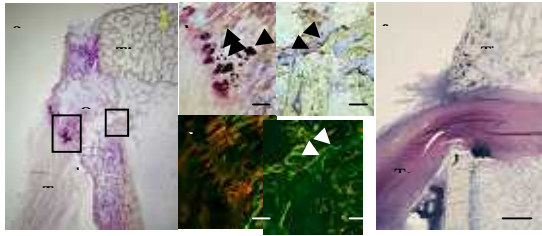
偏光顕微鏡にて腱と骨に線維の連続性が見られ、腱・非石灰化軟骨・石灰化軟骨・骨の4層構造が確認された。



(2)再構築enthesiの機能的評価と臨床に直結した動物実験モデルでの有用性
家兔脛骨近位部に骨孔を作成し、再構築されたenthesiを移植した。コントロール群では腱のみを骨孔に通した。4週後のCTで、コントロール群では骨孔内に骨新生がなかったのに対し、enthesi移植群では骨孔が移植骨で充填されていた。

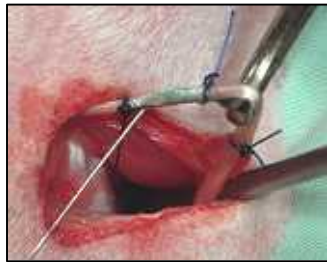


組織学的評価では、enthesi移植群で移植骨と母床骨の骨癒合が認められ、enthesiの4層構造は維持されていた。



また力学試験ではコントロール群に対し entheses 移植群で引っ張り強度が有意に高値を示し、力学的特性回復が見られた。

(3) 骨靭帯結合部の自家移植材の作成技術の確立



予定された部分に骨化させるためのナイロン糸 4 針結紮をしなければ 2 箇所 2 箇所の骨が 1 塊になることがたびたび観察された。よって骨化予定部分にナイロン糸で結紮し、その間に BMP を注入、20 分静置した後ナイロン糸を解いて閉創した。BMP 注入後 3 週から骨化が見られ 6 週で十分な骨化が確認



できた。30ug 群において最適な骨形成が確認された。一箇所につき 30ug 注入し待機期間を 6 週として、前十字靭帯再建術を計画した。しかしながら、実際の手術中においてアキレス腱に作成した Bone-Tendon-Bone 自家移植材料はウサギ膝前

十字靭帯よりも相当太く、問題であった。臨床現場ではアキレス腱より半腱様筋を用いる靭帯再建術が一般的であるために、半腱様筋腱に対してアキレス腱と同様にナイロン結紮後 rhBMP-2 を 2 箇所 15、30ug ずつ注入したところ、6 週の 15ug で良好な骨形成があり、移植材料として最適な大きさであった。

よって以後の実験に半腱様筋腱に rhBMP を注入、再生 Bone-Tendon-Bone を作成し、これを用いた前十字靭帯再建術を試行している。



半腱様筋腱でも腱内骨形成が見られる

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 4 件)

Takahara Y, Suzuki A, Maeda M, Kawashima H, Nakatani T, Kiyama H. Expression of pancreatitis associated proteins in urothelium and urinary afferent neurons following cyclophosphamide induced cystitis. Journal of Urology. 2008,179(4) 1603-9. 査読有

中村博亮, 辻尾唯雄, 寺井秀富, 星野雅俊, 松村昭, 加藤相勲, 鈴木亨暢, 高山和士, 高岡邦夫. 骨粗鬆症性脊椎骨折の病態骨粗鬆症性椎体骨折後偽関節発生に關与する予後不良因子について 多施設前向きコホート研究. 臨床整形外科 2008, 43 (4) 309-314 査読有

Hashimoto Y, Yoshida G, Toyoda H, Takaoka K. Generation of tendon-to-bone interface "entheses" with use of recombinant BMP-2 in a rabbit model. J Orthop Res. 2007 ;25:1415-24

査読有

辻尾唯雄, 寺井秀富, 松村昭, 星野雅俊, 鈴木亨暢, 並川崇, 高山和士, 中村博亮, 高岡邦夫【骨粗鬆症性脊椎骨折の発症リスクファクターと予後因子】 早期 MRI からみた骨粗鬆症性脊椎椎体骨折の予後不良因子. 骨・関節・靭帯 2007, 20 巻 1 号 Page45-53 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

Yusuke Hashimoto; Hiroshi Naka; Kenji Fukunaga; Kunio Takaoka. Generation of Bone-Tendon-Bone graft using rhBMP and application to the ACL Reconstruction. the 55th Orthopaedic research society, 2009.2.22. Las Vegas, USA

橋本祐介, 仲哲史, 福永健治, 高岡邦夫 rhBMP を用いた人工 Bone-Tendon-Bone の作成とそれを使用した ACL 再建術 第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会 2008.10.23 京都

橋本祐介, 吉田玄, 豊田宏光, 高岡邦夫 BMP を用いた骨靭帯移行部の再生. 25 回日本骨代謝学会学術集会 2007.7.19 大阪

橋本祐介, 仲哲史, 福永健治, 高岡邦夫 BMP を用いた骨と靭帯結合部(エンテシス)の

再生とその臨床応用の可能性 第26回日本運動器移植再生医学研究会 2007.10.27 浜松

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 亨暢 (Suzuki Akinobu)

大阪市立大学・大学院医学研究科・後期研究医

研究者番号：00445016

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究協力者

橋本 祐介 (Hashimoto Yusuke)

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70243243

(4) 研究協力者

仲 哲史 (Naka Hiroshi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・大学院生