

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 6月11日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591660

研究課題名（和文）肩腱板再建と再生に関する実験的研究

研究課題名（英文）Experimental study of rotator cuff repair and regeneration

研究代表者

井手 淳二 (IDE JUNJI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：10253725

研究成果の概要（和文）： 修復困難あるいは不能な肩腱板断裂の治療法は未解決の問題点であり、新たな治療法を開発する必要がある。ヒト真皮細胞外基質 Acellular Dermal Matrix（以下ADM）は、細胞外基質のみで構成される生体架橋組織であり、細胞成分が特殊技術により削除されているため異物反応がなく周囲からの細胞浸潤が容易な構造である。先行研究により、ADMパッチグラフトにより腱板骨結合部が再構築されることを実証したが、健常組織と比較すると組織学的、生体力学的に劣っていた。そこで、この腱板再建動物モデルに、線維芽細胞増殖因子（FGF-2）を局所投与することで腱板骨結合部のリモデリングと再生が促進されると仮説を立て実験を行った。実験結果から、FGF-2の局所投与は、ADMパッチグラフトによる腱板再構築を組織学的、分子生物学的および生体力学的に促進することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Little is known about biologic methods to improve tendon-to-bone repair or regeneration. Because growth factors are expressed during various phases of bone and tendon repair, there has been considerable interest in their recombinant proteins as therapeutic agents to enhance such repairs. We hypothesized that FGF-2 may improve the strength and quality of the regenerated tendon in rats undergoing rotator cuff reconstruction with an acellular dermal matrix (ADM) graft. The purpose of this study was to determine whether the local application of FGF-2 accelerates regeneration and remodeling of rotator cuff tendon defects grafted with ADM. In conclusion, the histological remodeling of ADM grafts placed in rat rotator cuff defects was accelerated by the local administration of FGF-2 due to increasing number of proliferating cells and gene expression of coll1, col3 and Biglycan in the graft and ADM grafts can be preconditioned with the application of FGF-2 to improve their biomechanical properties.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	300,000	90,000	390,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：四肢機能再建学

1. 研究開始当初の背景

腱板断裂は、中高齢者にみられる有痛性肩疾患の代表的なものの1つである。その臨床症状は、運動時痛と安静時痛、とくに夜間痛であり、運動制限・挙上困難などの機能障害である。MRI・超音波検査などの非侵襲的画像検査の進歩により肩腱板断裂の診断精度は著しく向上し、以前は不正確な診断のもとにいたずらに保存療法が継続されていたこの疾患の治療に大きな変化をもたらした。今後、本邦における高齢化と患者ニーズの高度化が進めば、手術療法によって腱板修復を希望する患者の数は増大するものと考えられる。外科治療技術、特に関節鏡視下手術の進歩は低侵襲化と腱板修復術の治療成績の確実性の向上をもたらし、今や腱板断裂の手術療法は、肩関節外科における重要な治療領域である。

肩腱板は肩甲骨に起始し上腕骨に停止しており、その完全（全層）断裂形態は上腕骨から腱板が剥離断裂するものである。腱板が上腕骨から剥離した損傷形態であるため、通常自然治癒することはない、修復手術が必要となる。腱板修復術では、腱板を上腕骨に縫合し腱骨間の癒合治癒を目的とする。肩腱板断裂修復術の問題点は、大きな断裂例や筋萎縮が強い例や65歳以上の高齢者に術後再断裂が多く成績不良因子となっていることである。これまで試みられてきた治療法は、筋腱移行術、自家腱移植術、同種腱移植、人工靭帯による再建などである。しかし、筋腱移行術は侵襲が大きい、自家腱移植術は健常自家組織が犠牲となる、同種腱移植はdisease transmissionの可能性があり、人工靭帯は異物反応があるなどの問題点があるため新たな治療法を開発する必要がある。

2. 研究の目的

ヒト真皮細胞外基質Acellular Dermal Matrix（以下ADM）（GraftJacket, Wright medical technology, USA）は、細胞外基質のみで構成される同種架橋組織である。細胞成分が特殊技術により削除されており、異物反応がなく、周囲からの細胞浸潤が容易な構造となっているのが特徴である。動物実験により、このGraftJacketをパッチグラフトとした腱板骨結合部再建法の有効性を検証した。結果として、その有効性は認められたが、健常組織と比較すると組織学的、生体力学的に劣っていた（Ide, J Shoulder Elbow Surg 2009）。そこで、この腱板再建動物モデルに、FGF-2を局所投与することで腱板骨結合部の再生とリモデリングが促進されると仮説を立てた。

細胞増殖因子のひとつであるFGF-2は、肉芽組織形成、線維芽細胞の増殖、細胞外基質の生成、血管再生を促進することが知られており、皮膚潰瘍治療薬として市販されている。また、FGF-2局所投与により骨折治癒が促進されたとの基礎研究があり、臨床治験が行われている。さらに、当科の先行研究ではFGF-2局所投与により軟骨再生が促進された。本研究の目的は、GraftJacketをパッチグラフトとした腱板再建動物モデル（Ide, J Shoulder Elbow Surg 2009）を用いて、FGF-2の局所投与による再生腱骨結合部の組織学的、分子生物学的、生体力学的評価を行うことにより、この仮説を実証することである。

3. 研究の方法

20週齢の雄Sprague-Dawleyラット（以下SDラット）を使用し、腱板欠損群、グラフト群、グラフトFGF治療群、正常コントロールの4群を作成し比較検討した。SDラット腱板に矢状断方向3mm、前額断方向5mmの腱骨結合部を含めた欠損をつくり腱板欠損群とした。この腱板欠損モデルの欠損部に3×5×0.6mmの

GraftJacketをグラフトした腱板再建モデルを作成した。FGF-2 (100 μ g/kg) を投与したグラフトFGF群とし、フィブリン糊のみ投与したものをGraft群とした。

手術

手術は両肩に行い、棘上筋大結節付着部の線維軟骨および皮質骨をリユールとデンタルバーを用いて切除した。上腕骨に1mm径の骨トンネルを作成し、5-0 エチボンドを通してマットレス縫合し、腱とグラフトは5-0 エチボンドでマットレス縫合した。この骨トンネルにフィブリン糊をdelivery systemとしてFGF-2 (100 μ g/kg) を投与した。

評価法

(1) 組織学的、分子生物学的評価

術後2週、6週、12週で実験動物を安楽死させ、グラフト骨結合部を採取し評価した。HE染色、サフラニンO染色、偏光顕微鏡所見による組織学的評価と腱板骨結合部組織成熟度スコア(modified Watkins score, 表1)による定量評価、PCNA免疫染色による増殖細胞数の定量評価、real time RT-PCR法による1型コラーゲン、3型コラーゲン、Biglycan のmRNA遺伝子発現の定量評価を行った。統計処理にはMann-Whitney U testを用い危険率5%未満を有意差ありとした。

(2) 生体力学的評価

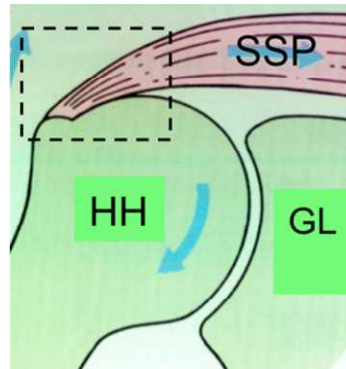
術後12週でグラフト再建部を含む棘上筋と上腕骨を一塊として採取した。腱骨結合部はデバイスを用い幅3mm、厚さ2mmに成形した。張力測定器 (STA-1225 ; Orientec, Tokyo) を用い10mm/minで最大破断強度と剛性を計測した。また、破断部位を記録した。張力測定器の腱把持部にはサンドペーパーをつけ、腱と上腕骨を上下方向に牽引した。統計学的処理はKruskal-Wallis検定を行い、有意差があった場合にはScheffe検定を用いた。危険率5%未満を有意とした。

4. 研究成果

(1) 組織学的、分子生物学的評価

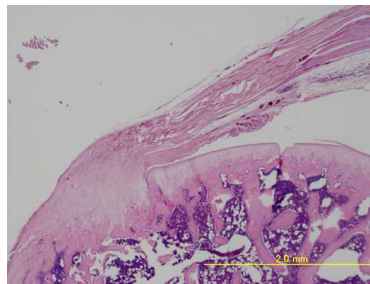
正常棘上筋腱骨結合部

HE、サフラニンO染色、偏光顕微鏡所見。腱・非石灰化線維軟骨・灰化線維軟骨・骨の順に滑らかに移行し、enthesisを形成していた。

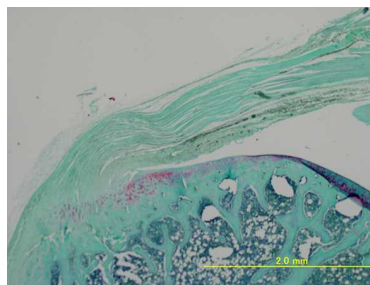


SSP: 棘上筋 HH: 上腕骨頭 GL: 関節窩

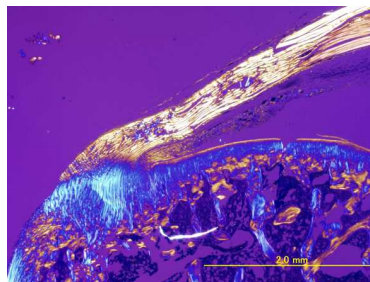
(以下点線部の組織像)



HE染色



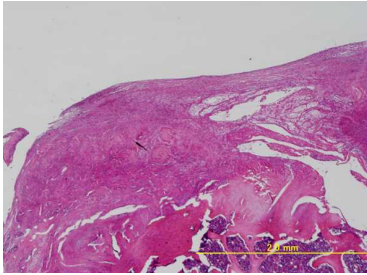
サフラニンO染色



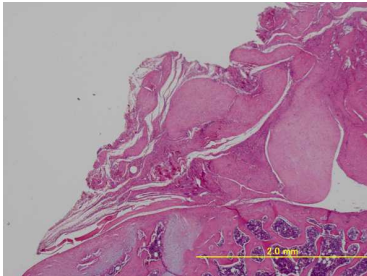
偏光顕微鏡所見

腱板欠損群の修復経過

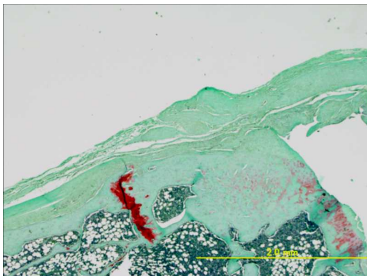
術後2週時は腱骨間には疎な結合組織が介在しfibrin clotsを認め、6週時は腱と骨は肉芽組織で連続しているのみであった。術後12週で新生コラーゲン線維を認めたが、軟骨組織形成は認めなかった。



術後2週 (HE)



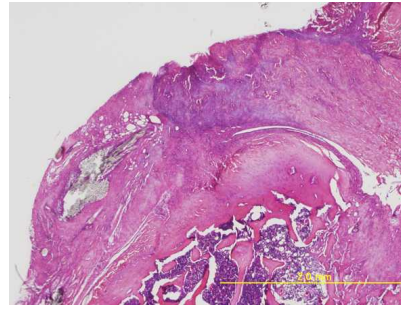
術後6週 (HE)



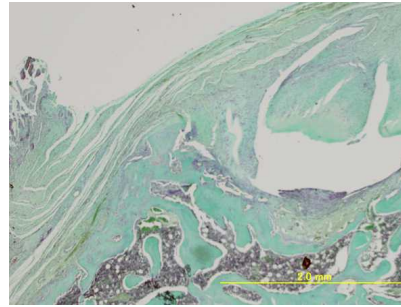
術後12週 (サフラニンO)

グラフト群の修復経過

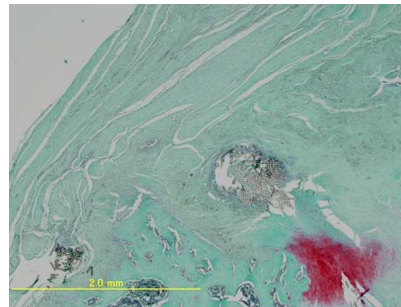
術後2週時、グラフトには線維芽細胞と炎症細胞浸潤を認めた。6週で規則的に配列した新生膠原線維を認め、bone ingrowthが進行していた。炎症細胞は減少していた。12週でサフラニンO染色にて赤く染まる軟骨組織を認めた。



術後2週 (HE)



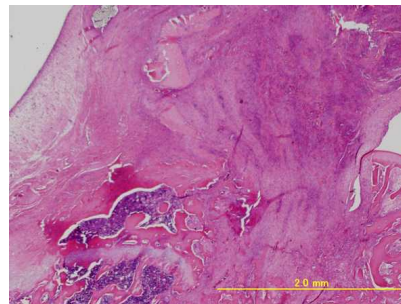
術後6週 (サフラニンO)



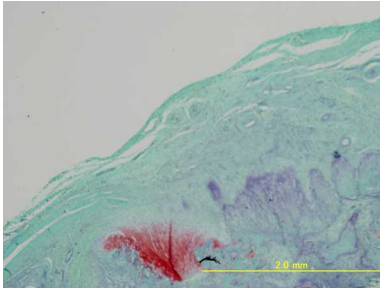
術後12週 (サフラニンO)

グラフトFGF群の修復経過

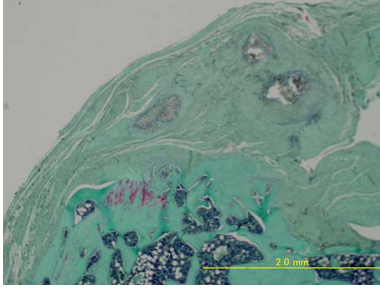
術後2週はグラフト群と同様の所見であった。6週時、サフラニンO染色にて赤く染まる軟骨組織を認め、術後12週ではコラーゲン線維の増殖と軟骨組織の増加はグラフトFGF群がより顕著であった。



術後2週 (HE)



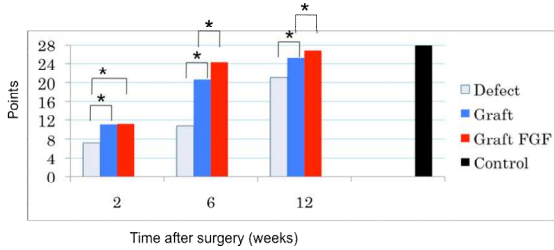
術後6週(サフラニンO)



術後12週(サフラニンO)

腱板骨結合部組織成熟度スコア

2週・6週・12週で腱板欠損群よりグラフト群、グラフトFGF群が有意に高く、6週・12週でグラフトFGF群がGraft群より有意に高かった。



* p<0.05

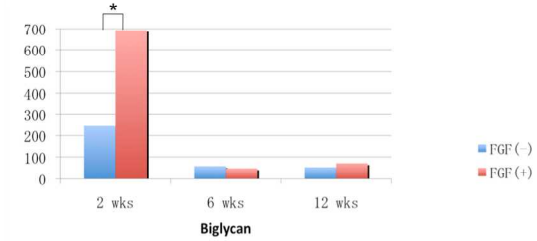
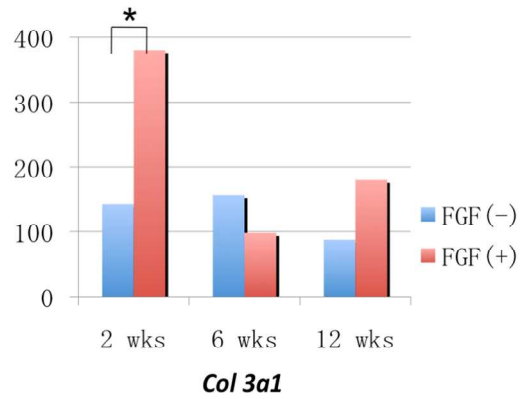
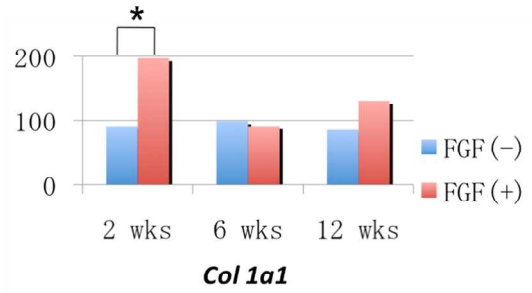
PCNA陽性増殖細胞数

グラフト群とグラフトFGF群の2週時のPCNA陽性増殖細胞数は、それぞれ平均406±25個と平均599±30個であり、グラフトFGF群が有意に大きかった(p=0.002)。

Real time RT-PCR法によるmRNA遺伝子発現

1型コラーゲン、3型コラーゲンのmRNAの発現はともに術後2週時のみ、グラフトFGF群が有意に高かった。軟骨組織形成の指標とし

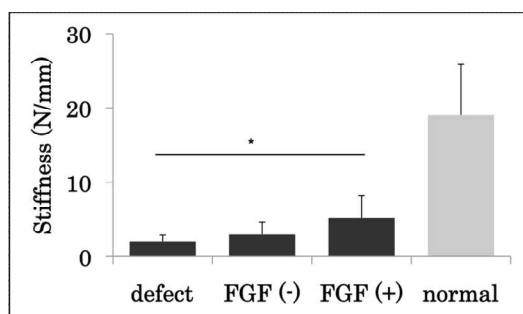
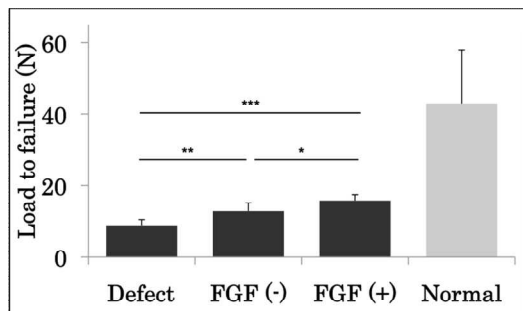
てのBiglycanも術後2週時のみ、グラフトFGF群が有意に高かった。



(2) 生体力学的評価

正常群の最大破綻強度は42.9±15.1(N)、剛性は19.0±6.9(N/mm)であった。破断部位は腱骨結合部6例、大結節部2例であった。腱板欠損群、グラフト群、グラフトFGF治療群の最大破綻強度は、9.0±1.6(N)、13.0±2.3(N)、15.9±1.6(N)であり、各群間に有意差を認めた。各群の剛性は、2.1±0.9(N/mm)、3.0±1.7(N/mm)、5.3±3.0(N/mm)であり、グラフトFGF治療群が有意に大きかった。手術を行った

3群の破断部位は全て再構築した腱骨結合部であった。グラフトFGF治療群の最大破綻強度は正常群の37%であり、剛性は28%であった。



本研究の国内外における位置づけ

肩腱板骨結合部の再生に生体材料と細胞増殖因子を併用した基礎研究は国内外で報告はなく、独創的研究である。FGF-2は、ヒト真皮細胞外基質(Graftjacket)で架橋した再生腱骨移行部の強度を高め、質を改善した。本方法により健常自家組織を犠牲とせず、同部再生の促進が可能となるため、新しい有効な治療法として期待できる。また、本研究により腱骨結合部再生過程・機序に関する有用な情報を得ることができた。

今後の展望

本研究によりヒト真皮細胞外基質によるグラフトと成長因子FGF-2を併用した腱板再建法の有用性を実証できたが、その強度は正常の40%にすぎないことも明らかとなった。今後、同一動物モデルを用いてFGF-2以外の細胞増殖因子あるいは間葉系幹細胞が腱板骨結合部の再生に及ぼす影響について検討し、さらに有益な腱板再建法の開発に貢献したい。

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1件)

徳永琢也、井手淳二、上園圭司、水田博志. FGF-2 が細胞外基質グラフトによる腱板骨結合部の再構築に及ぼす影響. 肩関節 36:523-526, 2012. 査読有

〔学会発表〕(計3件)

1) 第39回日本肩関節学会 平成24年10月6日(京王プラザホテル、東京)

Acellular matrix bioscaffoldとFGF-2による再構築腱板骨結合部の生体力学的評価

上園圭司、井手淳二、徳永琢也、坂本英俊、水田博志

2) 第38回日本肩関節学会 平成23年10月7日(福岡国際会議場、福岡市)

FGF-2が細胞外基質グラフトによる腱板再構築に及ぼす影響

徳永琢也、井手淳二、上園圭司、仙波圭、水田博志

3) Ide J, Kikukawa K, Mizuta H. Regeneration of rotator cuff tendon-to-bone junction by acellular matrix bioscaffold combined with locally applied FGF-2. The 11th International Congress of Shoulder and Elbow Surgery. The Edinburgh International Conference Centre, Edinburgh, UK. 6th Sep, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井手 淳二 (IDE JUNJI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号: 10253725

(2) 研究分担者

水田 博志 (MIZUTA HIROSHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号: 60174025

(3) 連携研究者

坂本 英俊 (SAKAMOTO HIDETOSHI)

熊本大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号: 10153917