

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462348

研究課題名(和文) 肩腱板修復における骨髄由来細胞の分化の解明

研究課題名(英文) Drilling effect of the regeneration of fibrocartilage at the tendon to bone insertion after rotator cuff repair

研究代表者

森原 徹 (Toru, Morihara)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90336735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腱板修復における腱骨接合部での骨髄由来細胞の動態について検討した。その結果、腱板修復の際に線維軟骨を温存し母床に骨穿孔を行った群では、腱骨接合部でより多くの間葉系細胞と軟骨組織を認めた。これらの結果から、腱板修復において、線維軟骨の温存と母床への骨穿孔は修復を促進させる可能性があると考えた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to analyze the kinetics of bone marrow-derived cells involved in the healing process of rotator cuff repair at the tendon to bone insertion. Mesenchymal cells infiltrated and fibrocartilage layer regeneration was observed in group, drilling into the footprint and preserving the fibrous cartilage tissues besides rotator cuff repair. Drilling into the footprint and preserving the fibrocartilage tissue can improve tissue repair at the repaired tendon to bone insertion following rotator cuff repair.

研究分野：整形外科

キーワード：腱板修復 骨髄由来細胞

1. 研究開始当初の背景

肩腱板断裂は代表的な肩関節疾患の一つであり、疼痛や可動域制限により日常生活動作に支障をきたすことが多い。保存療法で症状が改善しない場合には手術療法である腱板修復術が行われるが再断裂による成績不良例が散見される。再断裂はしばしば腱骨接合部で生じるため、成績不良例を減らすには、腱骨接合部の良好な再生が重要であり、その再生メカニズムを解明する必要がある。

腱板修復過程では肩峰下滑液包由来細胞と骨髄由来細胞が重要な役割を果たしていると考えられ、母床を海綿骨化させることは骨髄から間葉系細胞や成長因子の放出を促し、腱骨接合部の修復を促進する可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は腱板修復の際に骨髄由来細胞を誘導する処置を行い、腱骨接合部における組織学的修復および骨髄由来細胞の動態について検討することである。

3. 研究の方法

(1) 対象

京都府立医科大学の動物舎で飼育された12週齢 Sprague-Dawley (SD) ラット (SHIMIZU Laboratory Supplies Co., Ltd., Kyoto, Japan) 51匹および Green Fluorescent Protein (GFP) ラット (Japan SLC, Hamamatsu, Japan) 10匹を用いた。本研究は京都府立医科大学の動物実験倫理委員会の審査と承認を得て行った。

(2) GFP 骨髄キメララットの作成

深麻酔下で SD ラットに 10 Gy のガンマ線を照射して骨髄抑制をかける。続いて、GFP ラットの長管骨から回収した骨髄由来細胞を経静脈的に SD ラットに移植する。移植後4週にラットの末梢血細胞および骨髄細胞の GFP 細胞陽性率を FACS calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) で測定する。GFP 骨髄ラットは骨髄内と末梢循環のみに GFP 陽性細胞を有する。

(3) 手術方法

SD ラットおよび GFP 骨髄キメララットをそれぞれ3群に分け腱板修復モデルを作製した。A 群ではラットに全身麻酔を行い、清潔下で両肩の手術を行った。棘上筋腱を大結節附着部から尖刃で鋭利に切除した。尖刃で母床の軟部組織を可及的に除去した。両側の棘上筋腱は母床とは連続しない大結節の遠位部の骨皮質に前後方向に作製した骨孔にナイロン糸で解剖学的な附着部に再縫着した。B 群では、棘上筋を修復する前に大結節の棘上筋腱の母床に海綿骨に達する骨孔を作製し骨髄からの出血を確認した。C 群では、棘上筋を修復する前に軟骨を搔爬し、骨髄からの出血を確認した。筋膜および皮膚をナイロン糸

で縫合し閉創した。ラットは術後、外固定を行わず、ケージ中での自由な運動を許可し、12時間周期の明暗室で飼育した。

(4) 組織サンプルの作製と観察

SD ラットでは術後 2, 4, 8 週で、GFP 骨髄キメララットでは術後 4 週で安楽死させ、両肩関節周囲組織を三角筋、腱板組織、上腕骨近位、肩甲骨を含んだ状態で採取した。採取した組織を 4%ホルムアルデヒドで固定したのちに、ethylene diamine tetraacetic acid (pH 7.5) 溶液で脱灰した。

次に、20%スクロースで溶媒を置換し、さらに、標本組織は OTC コンパウンド (Sakura Seiki, Tokyo, Japan) で被覆しドライアイスで急速冷凍した。続いて棘上筋腱長軸と並行な冠状断のスライスで連続切片を作製し、各切片をスライドガラスに固定した。

①組織学的修復

SD ラットの標本切片にヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い、光学顕微鏡で腱骨接合部の細胞形態および組織構築を観察した。近接切片に対してサフラニン O 染色を行い、軟骨細胞の評価を光学顕微鏡で行った。

②骨髄由来細胞の動態

GFP 骨髄キメララットの標本切片では共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 510 META; Zeiss, Jene, Germany) で腱骨接合部における GFP 陽性細胞の動態を観察した。

4. 研究成果

①組織学的修復

術後 2, 4, 8 週において、すべての群で再断裂例はみられなかった。

術後 2 週では、すべての群で接合部の細胞数は増加しており、主として紡錘形で扁平な核を有する繊維芽細胞様細胞を認めた (Figure. 1)。B 群と C 群では核の多形性を有する間葉系細胞陽性細胞を認めた。A 群と B 群では線維軟骨層が残存していた。C 群では線維軟骨を認めず、腱断端と骨組織が直接、接していた。

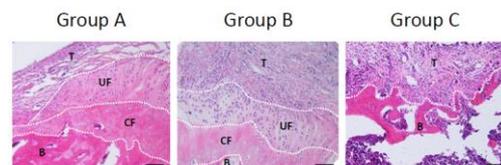


Figure.1 HE 染色 (術後 2 週)

術後 4 週ではすべての群で接合部の細胞数は多く、主として線維芽細胞様であった (Figure. 2)。A 群と B 群では残存した線維軟骨層を認めたが、C 群では認めなかった。サフラニン O 染色では A 群で線維軟骨層に弱い

メタクロマジーを認めた (Figure. 3). B 群では A 群と比べ強いメタクロマジーを認め、軟骨基質産生能が高かった. C 群ではメタクロマジーを認めなかった.

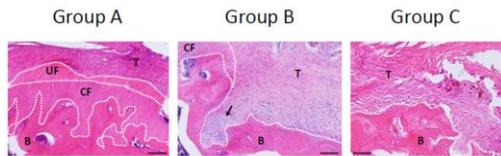


Figure. 2 HE 染色 (術後 4 週)

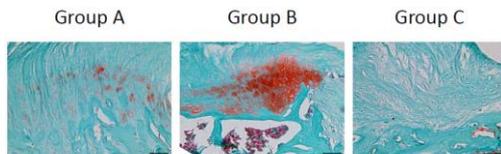


Figure. 3 サフラニン 0 染色 (術後 4 週)

術後 8 週では、すべての群で接合部の細胞数は減少していた (Figure. 4). A 群と B 群では修復腱と線維軟骨層との連続性は良好であり、4 層構造が回復していた. C 群では腱骨接合部に密に膠原線維を認めたが、線維軟骨層を認めなかった.

サフラニン 0 染色では線維軟骨層に A 群で弱く、B 群で強いメタクロマジーを認めた (Figure. 5). C 群ではメタクロマジーを認めなかった.

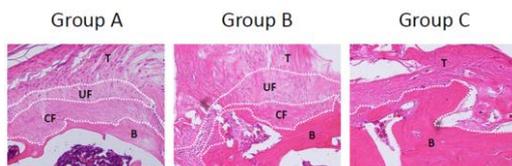


Figure. 4 HE 染色 (術後 8 週)

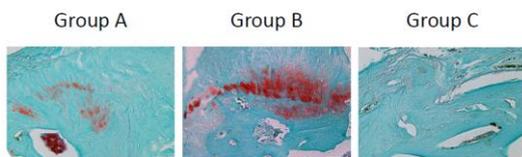


Figure. 5 サフラニン 0 染色 (術後 8 週)

②骨髄由来細胞の動態

B 群と C 群では腱骨接合部において GFP 陽性細胞を認めたが A 群ではほとんど認めなかった. B 群では隣接切片をサフラニン 0 染色でメタクロマジーを認めた場所と一致して GFP 陽性細胞を認めた (Figure. 6).

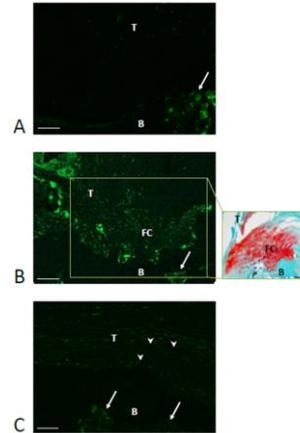


Figure. 6 共焦点レーザー顕微鏡所見

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)

① 仲川春彦, 森原 徹, 加太佑吉, 祐成 毅, 木田圭重, 立入久和, 藤原浩芳, 久保俊一. 腱骨接合部への軟骨細胞分化誘導～腱板修復部母床へのドリリング～. 肩関節, 査読有, 2015 年, 39 巻, 365-369

〔学会発表〕 (計 2 件)

① 仲川春彦, 森原 徹, 立入久和, 祐成 毅, 加太佑吉, 木田圭重, 岩田圭生, 藤原浩芳, 河田光博, 久保俊一. 腱板修復部母床に対するドリリングの骨接合部に与える影響 組織学的検討. 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会, 千葉, 幕張メッセ国際会議場, 2013 年 10 月 17-18 日

② 仲川春彦, 森原 徹, 祐成 毅, 加太佑吉, 立入久和, 木田圭重, 藤原浩芳, 松田賢一, 河田光博, 久保俊一. 腱骨接合部への軟骨細胞誘導 ～腱板修復部母床へのドリリング～. 第 41 回日本肩関節学会, 佐賀, 佐賀市文化会館・佐賀県総合体育館, 2014 年 10 月 24-25 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森原 徹 (MORIHARA TORU)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号: 90336735

(2)研究分担者
なし ()
研究者番号 :

(3)連携研究者
なし ()
研究者番号 :