

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09475

研究課題名(和文) 疎性結合組織移植と再生医療技術の融合による新しい腱治療の開発

研究課題名(英文) New treatment for tendon healing with combination of areolar tissue and regenerative medicine technology

研究代表者

佐々木 薫 (Sasaki, Kaoru)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：10536220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの背部から疎性結合組織を採取し一塊にして腱欠損部に移植した。それにより腱の治癒は得られ移植の有用性を示したが、必ずしも想定通りと行かず移植方法を再考した。まず移植環境における機械的刺激の影響を検討するため、腱張力除去モデルを作成し、腱修復部には腱張力が必要であることを証明し、学会、論文発表を行った。次に移植方法を最適化するため、頭蓋骨欠損モデル、背部シリコン移植モデルなどを用いてその生着メカニズムを検討した。線維芽細胞増殖因子により移植疎性結合組織が厚くなることが確認され創治癒促進作用があることが示された。現在論文投稿準備中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腱治癒における張力の影響を可視化することができた。またそれに用いた新しい腱張力除去モデルは他の実験にも用いることのできるものであった。本研究成果によって解明されていないことの多い疎性結合組織移植において線維芽細胞増殖因子が創治癒促進に働くことが示され、実臨床において不安定な疎性結合組織移植を安心して、そして確実に行える一つの論拠になるものとして学術的、社会的に意義のあるものとする。

研究成果の概要(英文)：Loose connective areolar tissue was harvested from the back of the rat and transplanted into the tendon defect. As a result, tendon was healed and the usefulness of transplantation was shown, but it did not always go as expected and we reconsidered the transplantation method.

First, in order to examine the effect of mechanical stimulation in the transplantation environment, we created a tendon tension free model, proved that tendon tension is necessary for the tendon repair site, and presented at academic conferences and papers. Next, in order to optimize the transplantation method, the engraftment mechanism was examined using a skull defect model, a back silicon transplantation model, and the like. It was confirmed that the transplanted loose connective tissue was thickened by fibroblast growth factor, and it was shown that it has a wound healing promoting effect. Currently preparing to submit a treatise.

研究分野：形成外科

キーワード：疎性結合組織移植 腱治癒 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

術後に良好な機能予後を獲得するためには、十分な指の関節可動域を獲得することが重要である。重度上肢外傷では、損傷が筋・腱・その周囲組織まで及び、修復部の強度と滑走を両立することは困難で、修復部再断裂、癒着、関節拘縮により機能予後は不良となる。

腱の治癒形態は腱内血流による治癒 (intrinsic healing) と腱外血流による治癒 (extrinsic healing) の2種類がある。前者は屈筋腱など腱鞘構造を持つ腱における治癒である。後者は伸筋腱など腱周囲疎性結合組織 (パラテノン) に囲まれた腱における治癒である。しかし重度上肢外傷では、腱鞘や腱内血流を供給する腱ひもが損傷することが多く extrinsic healing がその治癒の主体となる。

予備実験として、我々は腱の extrinsic healing の研究を行ってきた。アルカリ・水・浸軟処理を行ったラットアキレス腱を、走査型電子顕微鏡で観察し、修復腱の3次元の線維性構造の経時的な再構築過程を可視化し、その過程においてパラテノンはそれ自体が修復腱の足場であり、滑走組織としての役割を持つことが示された。腱周囲組織が損傷、欠損すると、腱治癒不良による再断裂や滑走不足による癒着がおこり機能予後が不良となる。したがって機能予後を改善させるためには損傷、欠損した腱周囲疎性結合組織を移植という形で補うことが望ましい。また大きな組織を移植する方法は血管柄付遊離組織移植であるが、それは微小血管吻合という高度な技術を要する点で問題がある。

脂肪由来幹細胞・多血小板血漿は創傷治癒促進作用を持ち、いずれも採取が容易であるという点で臨床応用しやすい材料であり、今後の臨床応用に向けて期待の大きい分野である。これまで我々は脂肪由来幹細胞を用いた腱治癒の研究を行ってきた。しかしそれらを必要な部位に効率的に供給する方法に課題が残る。

## 2. 研究の目的

重度上肢外傷に対する現在の標準的治療には限界がある。腱周囲組織の損傷・欠損を伴い、腱再断裂、癒着、拘縮により手の機能予後は不良となることが多い。しかし手外傷の患者の多くは働き盛りの労働者であり、彼らが良好な手の機能を獲得し社会活動を行うことは、患者本人のみならず社会にとっても重要である。本研究は重度上肢外傷の機能予後を改善することを最終目的とした。

## 3. 研究の方法

ラットにおいて疎性結合組織移植に対する多血小板血漿や脂肪由来幹細胞移植の有用性を確認し、移植疎性結合組織の生着率、生着する組織量を明らかにするために、以下の研究を計画した。

### 腱損傷モデルの作成

300 g ラット、麻酔はソムノベンチルの腹腔内投与で行うこととした。下腿内側をメスにて皮膚切開し、アキレス腱を鋭的に切離し、深達性損傷により腱周囲組織が欠損した状態を想定し、腱欠損部周囲のパラテノンを除去し、腱縫合は行わず、皮膚のみ6 - 0 ナイロンで縫合しこれを基本のモデルとした。

### 3群比較

疎性結合組織移植のみ (コントロール)

疎性結合組織移植+脂肪由来幹細胞移植

疎性結合組織移植+多血小板血漿

上記3つの群の比較を計画した。

#### 4. 研究成果

まず研究計画に準じて腱損傷モデルを作成し、腱損傷部に疎性結合組織を一塊にして挿入するコントロール群を作成した。ラットの背部から疎性結合組織を採取し(図1)腱欠損部に挿入した。腱の治癒傾向は得られたが(図2)、スペーサー的に挿入された疎性結合組織が腱断端の治癒を抑制している側面もあるのではないかと考え、移植方法を再考した。

移植方法に関して、まず移植環境として移植部、腱修復部にかかる機械的刺激の影響を検討するため、腱張力除去モデルを作成(図3)した。そして走査型電子顕微鏡で治癒した腱修復部の観察を行い、腱修復部には腱張力が必要であることを証明した。これらについて学会発表、論文発表を行った(Junya Oshima, Kaoru Sasaki et al. Visualization of microstructural change affected by mechanical stimulation in tendon healing with a novel tensionless model, Microscopy 186-191, 2021)。

次に薄い膜状の疎性結合組織をどのように移植するのが良いのか検討するため、頭蓋骨欠損モデル、背部シリコン移植モデル(図4)を作成し、その生着メカニズムを検討した(論文投稿中でありアクセプトされておりませんので、詳細は記述できません)。

さらにもともと脂肪幹細胞、多血小板血漿を用いる予定であったが、諸事情により用いることができず、basic fibroblast growth factor(bFGF)を代用し効果を見た。bFGF群は非bFGF群に比べて移植疎性結合組織が厚くなることが確認された。(論文作成中でありアクセプトされておりませんので、詳細は記述できません)。

本研究は本来の計画通りとはいかず、試行錯誤ではあったが、その中で、新しい知見を得、学会、論文発表という結果を出すことができた。

図1 背部から採取した疎性結合組織

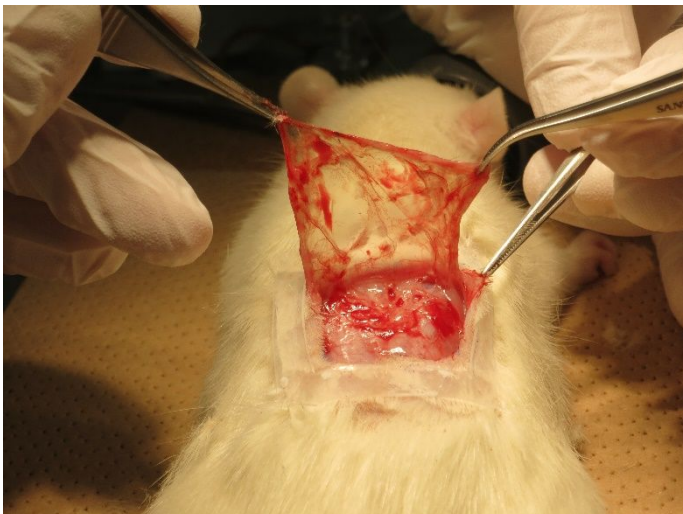


図2 疎性結合組織移植後14日の腱修復部

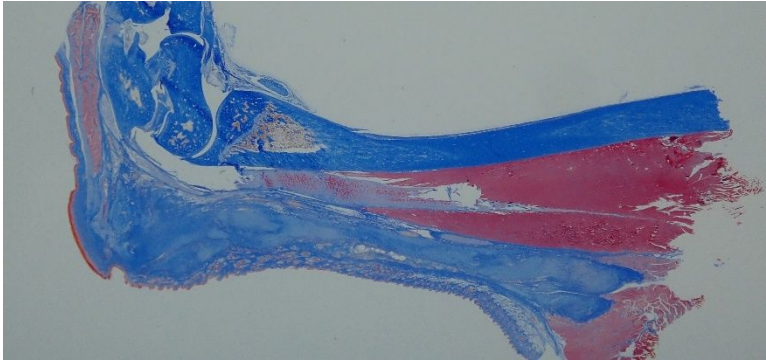


図3 腱張力除去モデル

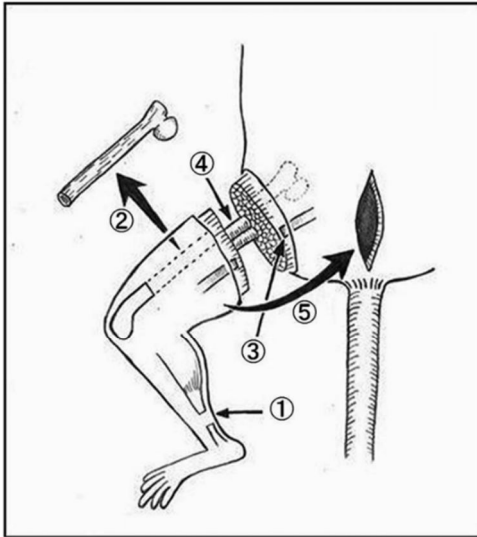


Fig. 1. The preparation of a new tensionless tendon laceration model: Achilles tendon is cut with a surgical knife. Two-third of the femur is removed on the proximal side. The ischiatic nerve is cut and separated. All muscles in the thigh are cut and separated. The affected leg is transplanted to the dorsal side through a subcutaneous tunnel.



図4 背部シリコン移植モデル



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Oshima Junya, Sasaki Kaoru, Yamamoto Naoto, Kiyosawa Tomoharu, Sekido Mitsuru	4. 巻 70
2. 論文標題 Visualization of microstructural change affected by mechanical stimulation in tendon healing with a novel tensionless model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 186 ~ 191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jmicro/dfaa043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大島純弥、佐々木薫、渋谷陽一郎、今井裕季子、佐々木正浩、相原有希子、関堂充
2. 発表標題 ラットアキレス腱張力除去モデルを用いた機械的刺激が腱修復に与える影響の可視化
3. 学会等名 29回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	関堂 充  (Sekido Mitsuru)  (40372255)	筑波大学・医学医療系・教授    (12102)	
研究分担者	渋谷 陽一郎  (Shibuya Yoichiro)  (50783883)	筑波大学・医学医療系・講師    (12102)	
研究分担者	相原 有希子  (Aihara Yukiko)  (70707801)	筑波大学・医学医療系・講師    (12102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	佐々木 正浩  (Sasaki Masahiro)  (80804723)	筑波大学・附属病院・病院講師    (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関