

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10394

研究課題名(和文)閉経モデルマウスを用いた狭窄性腱鞘炎の病態解析

研究課題名(英文)Pathogenic analysis of stenosis tenosynovitis using ovariectomized mice.

研究代表者

内山 茂晴(Uchiyama, Shigeharu)

信州大学・医学部・特任教授

研究者番号：10242679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：狭窄性腱鞘炎は閉経後や周産期の女性に多くみられる疾患であるが、その発症機序は未だ不明である。我々は閉経モデルマウス(以下OVT)を用いて、狭窄性腱鞘炎の病態解明を試みた。リアルタイムPCRによる解析では、OVT群の滑膜内腱ではエストロゲン受容体 $\alpha$ の発現増加を認めた。また、RNAシーケンスの結果、OVT群で2倍以上の発現増加を認める30種類の遺伝子が検出され、その中にSAA1,SAA3などの急性炎症マーカーである遺伝子群が含まれていた。本研究結果より、エストロゲンが滑膜内腱の恒常性維持に重要な役割を担っており、エストロゲン欠乏による恒常性の破綻が狭窄性腱鞘炎発症に関与していると推測された。

研究成果の概要(英文)：Stenosing tenosynovitis is often diagnosed in postmenopausal women or perinatal women. However, little is known about the pathogenic mechanism of tenosynovitis. We attempted to clarify the relationship between estrogen and pathogenesis of tenosynovitis using ovariectomized (OVT) mice. Real-time PCR analysis of OVT mice demonstrated an increased expression of estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) in the intrasynovial tendon. RNA-sequence analysis detected 30 genes that showed more than twice the expression of ER $\alpha$  compared to the OVT group, and included SAA1 and SAA3 genes as acute inflammatory markers. Our results suggest that estrogen plays an important role in maintaining the homeostasis of intrasynovial tendons, and a failure of the homeostasis caused by the lack of estrogen may lead to the development of tenosynovitis.

研究分野：整形外科

キーワード：狭窄性腱鞘炎 エストロゲン エストロゲン受容体

## 1. 研究開始当初の背景

手指の弾発指やドケルバン病に代表される狭窄性腱鞘炎は、整形外科領域では日常診療で頻繁にみられる疾患である。1年間の発症例は10万人に対し28人で、生涯有病率は2.6%とされ、国内だけでも年間4万例が発症することになる。好発年齢は40-60歳であり、閉経から更年期を迎えた女性に多く発症するが、しばしば好発年齢を外れた周産期女性にも発症する。その他糖尿病、手指作業者、老化などが狭窄性腱鞘炎の発症要因と考えられているが、前述の好発年齢や性差などの特徴から、女性ホルモンの狭窄性腱鞘炎発症への関与が長年にわたり示唆されてきた。しかし、実際の発症機序や関連性については未だ不明のままである。

女性ホルモンであるエストロゲンは、分子量300程度の小さな脂溶性ステロイドで、標的細胞の受容体と結合し標的遺伝子の発現調整を行っている。エストロゲンと結合する代表的な受容体としてエストロゲン受容体(以下ER)が報告され、2つのERの体内分布は異なっている。ERは主に生殖機能に関連する臓器、ERは肺、腎臓、骨、血管上皮など生殖器官以外に発現するとされてきたが、近年ER、ER両方が全身の様々な器官に発現していることが明らかとなった。これらERの局在に関する数々の発見以降、ERを発現する器官や組織に対してエストロゲンの欠乏や不均衡が及ぼす影響についての知見が集積されつつある。ERおよびエストロゲンは子宮や乳腺などの女性特有の器官の疾患のみならず、動脈硬化、アルツハイマー、肺高血圧などの疾患の発症との関連が報告されているが、狭窄性腱鞘炎の発症とERおよびエストロゲンとの関連性についての報告はない。

今日、狭窄性腱鞘炎に対しては、発症を予防するための有効な手段はなく、通常発症後に腱鞘内ステロイド注射や腱鞘切開術による治療が行われている。いずれも治療に対する反応性やアウトカムは比較的良好ではあるが、両側例や複数指の罹患例も多く、しばしば治療に難渋する。人口の高齢化にともない、狭窄性腱鞘炎の患者数は今後増加すると考えられる。その一方で、高齢者の健康な手指機能の維持は健康寿命を伸ばすために非常に重要な要素となることが予想されることから、より詳細な病態解析に基づいた疾患の予防法や新しい治療法の開発が望まれる。

## 2. 研究の目的

我々はこれまでにルプリシンの欠損により、腱・腱鞘間の摩擦の増加や腱組織内の軟骨化生といった、実際の腱鞘炎で見られる所

見と極めて類似した現象が起こり、さらに加齢に伴い遺伝子発現レベルにおいて腱組織から軟骨組織へのシフトが起きているという興味深い結果を得ている(図1,2,3)。

本研究は上記の背景およびこれまでの研究成果をさらに発展させ、老化と共に腱鞘炎発症の大きな要因と考えられている女性ホルモンに焦点をあて、閉経モデルマウスを対象とした分子生物学的手法により、その病態を以下のような研究手順で解明することを目的とする。

- (1) 閉経モデルマウスの滑膜内腱と腱鞘滑膜における遺伝子発現パターンを網羅的に解析しその特徴を明らかにする。
- (2) 閉経モデルマウスの滑膜内腱と腱鞘を組織学的に解析しその特徴を明らかにする。
- (3) 閉経モデルマウスにおける腱由来幹細胞の性質について解析を行い、狭窄性腱鞘炎との関連性を明らかにする。

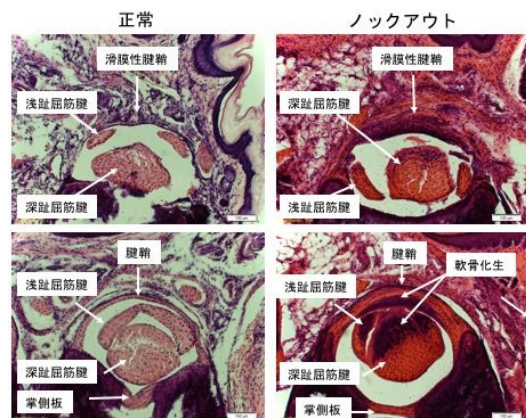


図1 ルプリシン・ノックアウトマウスでは滑膜の増殖、腱鞘の肥厚、腱と腱鞘内に軟骨化生を認める。

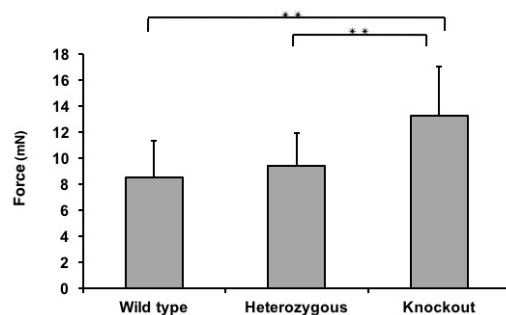


図2 ルプリシン・ノックアウトマウスでは腱と腱鞘間の摩擦が増加する

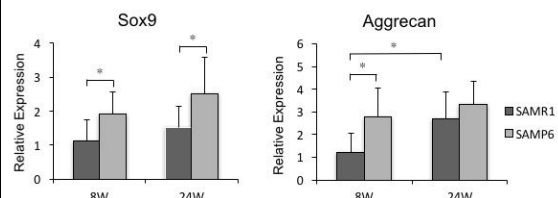


図3 老化モデルマウスでは軟骨細胞のマーカーであるSox9とアグリカンの発現が増加する。

### 3. 研究の方法

実験には C57/BL6 マウスを使用した。C57/BL6 マウスは肥満、二型糖尿病、動脈硬化に対する感受性が高く、骨密度も低くなりやすいといった特徴を持つ。これら疾患の発症因子の一つに閉経に伴うエストロゲン欠乏があげられる。以上の理由より女性ホルモンを扱う研究において C57/BL6 は多く用いられる種であり、本研究もそれらに準じた。先行実験として Wild type の滑膜内腱における ER の発現を確認する目的で、メス後肢より滑膜内腱である深趾屈筋腱を採取し、リアルタイム PCR により ER の 2 つのアイソフォームである ER $\alpha$ 、ER $\beta$  の発現を確認した。

続いて 8 週齢 C57/BL6 メスマウスを使用し、卵巣摘出による閉経処置を行なった。麻酔は腹腔内麻酔（ソムノペンチル、Saline 希釈、50mg/kg）と吸入麻酔（イソフルラン、濃度約 2mg/kg）を使用し苦痛を最小限とした。卵巣摘出後の経過観察および飼育期間は閉経後骨粗鬆および閉経後脂肪肝、動脈硬化研究におけるモデルマウスの経過観察期間を参考とした。C57/BL6 メスマウスを閉経モデル群（OVT 群）対象（CT 群）の 2 群（N=6）に分類し、卵巣摘出後 4-16 週時に後肢第 2-4 趾より深趾屈筋腱を採取し ER $\alpha$ 、ER $\beta$  の発現量をリアルタイム PCR により解析するとともに、後肢の横断面標本を作成し、免疫染色にて滑膜内腱およびその周辺組織の ER $\alpha$ 、ER $\beta$  の発現を観察した。さらに、RNA シークエンスを用いて OVT 群と CT 群の深趾屈筋腱における遺伝子発現を網羅的に解析した。OVT 後経過観察期間は 8 週とした。得られたデータを基に、腱鞘炎発症の原因となる遺伝子または遺伝子群を解析した。

### 4. 研究成果

#### 1) マウス滑膜内腱の腱細胞における ER の発現

リアルタイム PCR による解析では、メスマウス後肢の滑膜内腱において ER $\alpha$ 、ER $\beta$  の発現が確認された。免疫染色では、8 週齢メスマウス滑膜内腱の腱細胞および腱鞘内の細胞において ER $\alpha$ 、ER $\beta$  の発現を確認した（図 4）。

マウス滑膜外腱の腱細胞における ER の発現は、ヒトおよびウサギで既に報告されていたが、マウス滑膜内腱の腱細胞における発現は本研究において初めて確認された。

#### 2) 閉経モデルマウス滑膜内腱における ER 発現量の変化

閉経モデルマウスの滑膜内腱を用いた解析では、OVT 群は CT 群に比して ER $\alpha$  の発現が高かった。また、ER $\beta$  は両群での発現量に有意差を認めなかった（図 5）。また、OVT 群

では加齢に伴い ER $\alpha$  の発現が増加していた。また CT 群においても 4 週から 8 週にかけて ER $\alpha$  の発現が増加した。一方、ER $\beta$  は CT 群で 8 週と 16 週での発現が増加したが、その他は有意な差を認めなかった。（図 6）

#### 3) 閉経モデルマウス滑膜内腱における遺伝子発現の変化

RNA シークエンスによる解析では、OVT 群において 2 倍以上の発現増加を認める 30 種類の遺伝子が検出され、その中に炎症性サイトカインの作用により合成される急性相反応物質であり、アミロイド原性蛋白をコードする SAA1 および SAA3 を含む遺伝子群が含まれていた。

閉経モデルマウスの滑膜内腱では、ER $\alpha$  の発現が増加し、急性炎症のバイオマーカーである SAA を含む遺伝子群の発現増加を認めたことから、エストロゲンが滑膜内腱の恒常性や機能維持に重要な役割を担っており、閉経などに伴うエストロゲンの欠乏により恒常性に破綻をきたした結果、狭窄性腱鞘炎が発症する可能性が示唆された。

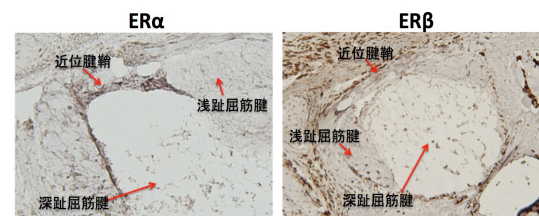


図4 8週齢のC57/BL6メスマウスの滑膜内腱において、ER $\alpha$ ・ER $\beta$ が発現している

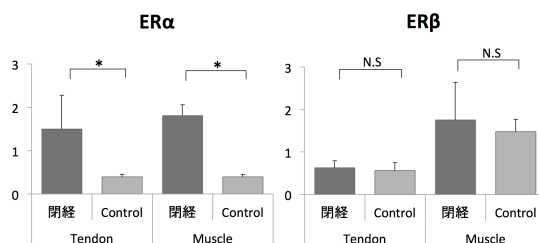


図5 閉経モデルマウスでは滑膜内腱でのER $\alpha$ の発現が増加する

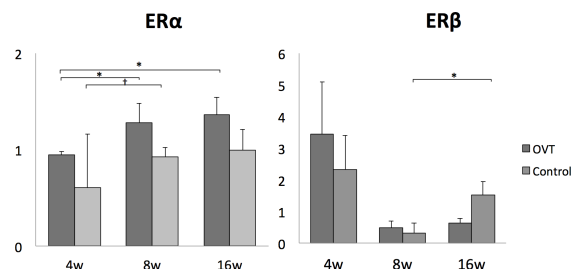


図6 OVT群では加齢とともにER $\alpha$ の発現が増加する

### 5. 主な発表論文等

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

内山 茂晴 (UCHIYAMA, Shigeharu)

信州大学・医学部・特任教授  
研究者番号：10242679

(2)研究分担者

林 正徳 (HAYASHI, Masanori)  
信州大学・学術研究院医学系・助教  
研究者番号：20624703

加藤 博之 (KATO, Hiroyuki)  
信州大学・学術研究院医学系・教授  
研究者番号：40204490

二村 圭祐 (NIMURA, Keisuke)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：00462713