

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：13701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06845

研究課題名(和文) 腱・腱鞘滑膜細胞特異的遺伝子改変 マウスを利用した腱疾患の治療開発

研究課題名(英文) Development of treatment methods of tendon diseases using genetically modified mice

研究代表者

河村 真吾 (Komura, Shingo)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30456511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：腱特異的遺伝子Scx，腱鞘滑膜特異的遺伝子Tppp3の遺伝子改変マウスScx-CreERT2，Scx-EGFP，Tppp3-CreERT2，Tppp3-EGFPを作製した。Scxマウスにおいて，腱特異的EGFP，X-gal発現を確認した。Tppp3マウスでは，腱鞘滑膜のみでなく，気管支，神経，皮膚等でもEGFP，X-gal発現が観察された。Tppp3-CreERT2/R26Rマウスにおいてタモキシフェン投与後，膝蓋腱断裂モデルを作製した。術後1週時には腱断裂部は線維芽細胞で置換されていたが，これらはX-gal陰性であり，腱鞘滑膜細胞および関節滑膜細胞の腱再生への関与は乏しいことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Scleraxis (Scx) is tendon specific marker, and tubulin polymerization-promoting protein family member 3 (Tppp3) is tendon sheath and synovial joint specific marker. We generated Scx and Tppp3-reporter mouse; Scx-EGFP and Tppp3-EGFP, and tamoxifen-inducible Cre mouse; Scx-CreERT2 and Tppp3-CreERT2. Scx-EGFP and Scx-CreERT2/R26-LacZ mice specifically labeled tendons and ligaments in vivo. While Tppp3-EGFP and Tppp3-CreERT2/R26-LacZ mice labeled not only tendon sheath and synovium in the joints but also other tissue and organs such as bronchial epithelium, nervous system, skin. To investigate whether tendon sheath cells and synovial cells contribute to tendon regeneration, we generated patellar tendon injury model utilizing Tppp3-CreERT2/R26-LacZ mice. 1 week after tendon injury, the gap between ruptured tendons was filled with X-gal negative fibroblastic cells, indicating that tendon sheath cells and synovial cells around patellar tendon could not contribute to tendon regeneration.

研究分野：整形外科

キーワード：腱細胞 腱鞘滑膜細胞 関節滑膜細胞 Scx Tppp3

1. 研究開始当初の背景

腱のマスター転写因子 Scleraxis(Scx), Mohawk(Mkx), 腱鞘滑膜細胞特異的のマーカ遺伝子 tubulin polymerization-promoting protein family member 3 (Tppp3) 等が発見され、腱および腱鞘の発生や再生の研究に利用されている。腱の恒常性は生理的メカニカルストレスにより維持されており、Scx はメカニカルストレス応答性遺伝子の1つであることが知られている。Common disease である腱炎・腱鞘炎では、通常は保存的治療が適応されるが、難治例に対して有効な治療が確立されていないのが現状である。また、腱損傷部を修復する細胞起源についても詳細に理解されていない。

2. 研究の目的

メカニカルストレス応答機構を利用して、腱損傷後の再生を制御するシグナル伝達機構を明らかにし、新規治療薬を開発すること。腱損傷部を修復する細胞の詳細な起源を同定すること。

3. 研究の方法

生体内での Scx 発現を可視化できる遺伝子改変マウス (Scx-EGFP) を作製する。マウス後肢の外固定やアキレス腱損傷等を加えて生理的メカニカルストレスを減弱および消失させる。それらにおいて腱の生理的状態の変化に伴い Scx 発現の変化が見られるか否かを、EGFP 発現を指標として組織学的に評価する。Scx-EGFP マウスを使用し、非生理的メカニカルストレス下でも腱細胞の Scx 発現を維持できる薬剤をスクリーニングする。

腱特異的のタモキシフェン誘導性 Cre 発現マウス (Scx-CreERT2), 腱鞘滑膜特異的のタモキシフェン誘導性 Cre 発現マウス (Tppp3-CreERT2) を作製する。Scx-CreERT2, Tppp3-CreERT2 マウスを Rosa26-LacZ (R26R) マウスと交配し、Scx/R26R, Tppp3/R26R マウスを得る。これらにタモキシフェンを投与した後にアキレス腱損傷を加える。腱細胞または腱鞘滑膜細胞が腱損傷部を修復する細胞であるか解析する。

4. 研究成果

BAC recombination system を用いて Scx-EGFP ターゲティングベクターを作製した。マウス ES 細胞を用いた相同組換え法により、Scx の 3' UTR に ires-EGFP 配列を導入した。サザンハイブリダイゼーションにより、正しい組換え体を選別した。それより Scx-EGFP 遺伝子改変マウスを作製した。蛍光顕微鏡にて、Scx-EGFP マウスにおける腱特異的 EGFP 発現を確認した(図 1)。

Scx-EGFP マウスを交配したところ、ホモマウスが産まれてこず、薬剤選択カセットの存在が発生に悪影響を及ぼすことが示唆された。Dresden University (Anastassiadis K)より

Tg(CAG-dre)1Afst マウスを入手し、これらを交配して薬剤選択カセットを除去した。これによって Scx-EGFP ホモマウスを得た。ホモマウスとヘテロマウスにおいて EGFP 発現量を比較したところ、ホモマウスにおいてより強い EGFP 発現が観察された。この結果から Scx は biallelic 発現であることが示唆された。

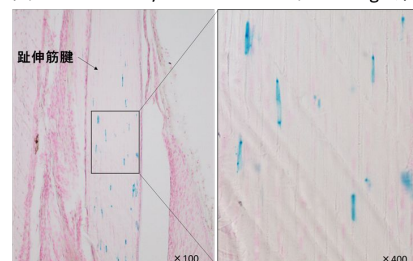
3 - 4 ヶ月齢の Scx-EGFP ホモマウスの後肢をテーピング固定することで腱へのメカニカルストレスを減じた後肢安静固定モデルを、アキレス腱を切断して腱へのメカニカルストレスを消失させた腱断裂モデルを作製した。5 日後にアキレス腱を採取して RNA を抽出し、Scx 発現の変化をリアルタイム PCR 法で調査した。健常アキレス腱(コントロール)と比較して、Scx 発現量は安静固定モデルでは 20%の減少、腱断裂モデルでは 50%の減少を認めた。蛍光顕微鏡下に腱断裂モデルのアキレス腱における EGFP 発現を観察したところ、腱近位断端において著明な EGFP 発現の減弱を認めた。Scx はメカニカルストレス応答性遺伝子であるという過去の研究成果に矛盾しない結果であった。今後 Scx-EGFP アキレス腱断裂マウスにおいて、腱細胞の EGFP 発現を維持しうる薬物をスクリーニングすることで、メカニカルストレスの減弱・消失による腱恒常性破綻を防止する薬物治療開発につなげる。

図1 Scx-EGFPマウスの蛍光顕微鏡像とアキレス腱の免疫染色



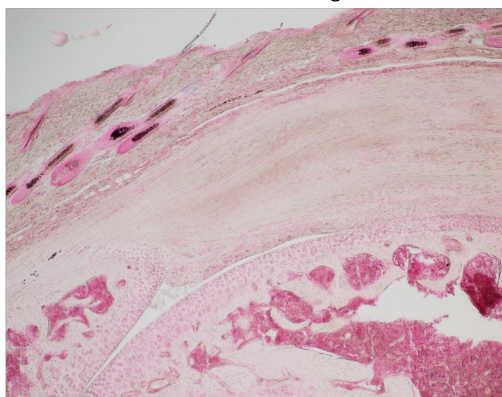
と同様に BAC recombination system を用いて Scx-CreERT2, Tppp3-CreERT2 遺伝子改変マウスを作製した。Scx-CreERT2 マウスにおいては Scx-EGFP マウスと同様に Tg(CAG-dre)1Afst マウスと交配して薬剤選択カセットを除去し、ホモマウスを得た。これらを R26R マウスと交配し、Scx/R26R, Tppp3/R26R マウスを作製した。Scx/R26R マウスにタモキシフェン 2mg 4 回隔日投与を行った後、X-gal 染色を行った結果、四肢の腱や靭帯、尾等において Cre リコンビネーションを確認した(図 2)。

図2 Scx-CreERT2/Rosa26-LacZマウスのX-gal染色



Tpp3/R26R マウスも同様にタモキシフェンを投与し、X-gal 染色を行うことで、腱鞘滑膜および関節滑膜での Cre リコンビネーションを確認した。しかしながら、Tpp3-EGFP、Tpp3-CreERT2/R26R マウスの双方において、腱鞘滑膜のみでなく、気管支、神経、皮膚等でも EGFP、X-gal 発現が観察された。Tpp3/R26R マウスにおいてタモキシフェン投与後、膝蓋腱断裂モデルを作製した。術後 1 週時には膝蓋腱断裂部は線維芽細胞で置換されていたが、これらは X-gal 陰性であった(図 3)。

図3 Tpp3-CreERT²/R26Rマウス
膝蓋腱断裂1週間後のX-gal染色像



腱再生において膝蓋腱周囲の腱鞘滑膜細胞および関節滑膜細胞の関与は乏しいことが示唆された。Scx/R26R においては薬剤選択カセット除去に時間を要したため、現在実験中である。

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)

1. Activin-A enhances mTOR signaling to promote aberrant chondrogenesis in fibrodysplasia ossificans progressiva. Hino K, Horigome K, Nishio M, Komura S, Nagata S, Zhao C, Jin Y, Kawakami K, Yamada Y, Ohta A, Toguchida J, Ikeya M. J Clin Invest. Sep 1; 127(9): 3339-3352. 2017.

2. Recurrent atraumatic acute carpal tunnel syndrome due to hematoma caused by distal radioulnar joint arthritis during anticoagulant treatment with apixaban. Komura S, Hirakawa A, Masuda T, Ito Y, Akiyama H. Arch Orthop Trauma Surg. Aug; 137(8): 1161-1164. 2017.

3. Forearm compartment syndrome concomitant with pseudoaneurysm of the anterior interosseous artery after minor penetrating injury.

Komura S, Hirakawa A, Matsushita Y, Masuda T, Nohara M, Akiyama H. The Journal of Hand Surgery (Asian-Pacific Volume). 2017 (accepted).

4. Wound breakdown reconstructed by reverse lateral arm flap after excision of heterotopic ossification of the elbow following severe burn injury: A case report.

Hirakawa A, Ohno Y, Komura S, Akiyama H. Burns Open. 2017 July; 1(1): 37-40.

[学会発表](計2件)

1. 腱および腱周囲結合組織を標識する遺伝子改変マウスの樹立
河村真吾, 平川明弘, 蟬克憲, Woltjen Knut, 山田泰広, 秋山治彦
2016年10月13-14日
第31回日本整形外科学会基礎学術集会

2. Tpp3 陽性腱鞘滑膜細胞は腱発生に寄与しうる
河村真吾, 平川明弘, 佐竹崇志, 秋山治彦, 山田泰広
2017年10月26-27日
第32回日本整形外科学会基礎学術集会

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

河村 真吾 (Komura Shingo)
岐阜大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 30456511

(4)研究協力者

山田 泰広 (Yasuhiro Yamada)