

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20062

研究課題名(和文) 腱板骨結合部修復過程におけるScx発現前駆細胞の動態解明

研究課題名(英文) Elucidating the involvement of Scleraxis-positive progenitors during rotator cuff tendon-bone healing after acute injury in mice

研究代表者

徳永 琢也 (TOKUNAGA, Takuya)

熊本大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60759520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：腱板修復術後の再断裂は臨床上の課題であり、効果的な修復促進のためには修復機構の理解が重要である。本研究ではScleraxis (Scx) GFPトランスジェニックマウスの損傷モデルを用いて、発生過程で腱付着部の形成に寄与するScxおよびSox9発現細胞の成体の腱板付着部損傷後の修復過程における参画を評価した。本モデルにおいて損傷後4週までに付着部線維軟骨層の再生はみられず、また、修復部において少数のScxおよびScx /Sox9共発現細胞がみられたが、その割合は経時的に低下した。以上より発生期に腱付着部の形成に寄与する前駆細胞が成体の修復過程においても限定的ながら関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Improved understanding of the mechanisms underlying the healing process after rotator cuff (RC) tendon-bone site (enthesis) injury is critical to establish effective repair promotion after surgical RC repair. Recently, it was reported that a specific multipotent Scleraxis (Scx)-positive progenitors with a history of expressing Sox9, which gives rise to tenocytes and chondrocytes, contribute to enthesis development. In this study, we aimed to elucidate the involvement of Scx+ and Scx+/Sox9+ cells in a healing model of supraspinatus tendon enthesis following injury in mature ScxGFP transgenic mice. We showed that small numbers of Scx+ and Scx+/Sox9+ cells transiently emerged at the repair site, but failed to regenerate native fibrocartilaginous enthesis. Our findings suggest that a healing mechanism mediated by enthesis-related progenitors may be potentially equipped in adult mice, although it appears to be limited.

研究分野：整形外科

キーワード：Scleraxis Sox9 腱板 enthesis tendon-bone healing progenitor

### 1. 研究開始当初の背景

腱板断裂は中高年以降に増加し、しばしば肩関節の痛み（夜間痛）や上肢の挙上困難を引き起こす。保存療法の効果が乏しい場合は、断裂した腱板を元の付着部に縫着する腱板修復術が行われるが、術後早期の再断裂はまれではなく、临床上の課題である。再断裂発生の一因として、腱板と骨の移行部の修復能が乏しく、術後に十分な力学強度の回復が困難であることが挙げられる。そのため、腱骨間の修復を刺激し、力学強度の早期回復を目的とした修復促進治療の研究が行われているが、その結果は様々である。より効果的な修復促進治療の確立のためには、修復メカニズムの理解が重要と考えられるが、修復に参画する細胞集団やそれらを制御する因子については未だ不明な点が多い。

本研究分野では、発生過程の解析により腱細胞に特異的なマーカー遺伝子として bHLH 型転写因子の Scleraxis (Scx) や 型膜貫通型糖蛋白質の Tenomodulin (Tnmd) が見出され、これらのマーカーを用いた解析によって SRY-box containing gene 9 (Sox9) と Scx を共発現する前駆細胞集団が腱付着部の形成に寄与すること、また、Scx を発現する腱前駆細胞が成体においても力学強度に優れた腱様組織による修復に寄与する可能性が報告されている。腱板修復過程においても内在性の Scx 発現前駆細胞が重要な役割を担っている可能性に着目し、この前駆細胞を標的とした修復促進治療への応用を期待して本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は Scx の転写制御領域を用いて樹立された ScxGFP トランスジェニックマウスの腱板損傷モデルを作製し、修復過程における Scx 発現細胞の局在およびその共発現因子について免疫組織学的に評価し、その修復過程における役割および制御因子の一端を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験動物および腱板付着部損傷モデル作製

動物は京都大学再生医科学研究所生体分子設計学分野で樹立され、熊本大学動物施設で飼育した ScxGFP トランスジェニックマウスを使用した。研究は熊本大学動物実験委員会の審査と承認を得て行った。

麻酔下に 20 週齢の ScxGFP トランスジェニックマウスの棘上筋腱の上腕骨付着部に直径 1 mm の円筒形電動ドリルを用いて、上腕骨層まで達する深さ 0.2 mm の損傷を作製し閉創した（図 1）。損傷後 3 日、1 週、2 週、4 週で肩関節組織を採取し評価した。また、対側の棘上筋腱付着部を露出し閉創した sham 手術群を同様に評価した。

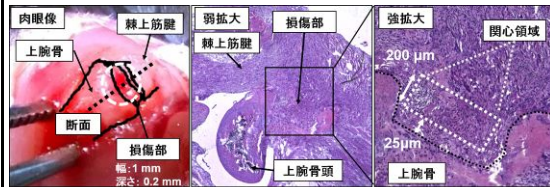


図 1. 損傷モデルおよび関心領域

#### (2) 凍結切片作製および組織学的評価

採取した組織は 20% スクロース含有 4% PFA で固定後に凍結包埋し、粘着フィルム法によりタングステンプレートで 4 μm の凍結組織切片を作製し組織学的評価を行った。HE 染色およびトルイジンブルー染色により組織形態（線維軟骨層の再構築の有無）を評価した。また、二光子レーザー顕微鏡（オリンパス FV1000MPE）を用いてコラーゲン線維に対する第二高調波発生（SHG: Second harmonic generation）を観察し修復組織のコラーゲン線維配列は評価した。また、同一標本上で SHG と GFP を評価し修復組織における Scx 発現細胞とコラーゲン線維配列の関連を評価した。

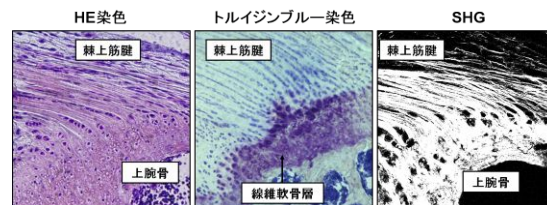


図 2. 組織学的評価

(sham 手術群 棘上筋腱付着部)

#### (3) 免疫組織学的評価

##### 修復組織における Scx/Sox9 共発現細胞の評価

0.25M EDTA で 1 時間脱灰、ブロッキング後に抗 GFP 抗体（ナカライテスク）、抗 Sox9 抗体（Millipore）を一次抗体として 4 日で終夜反応させた後、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 594（Thermo Fisher Scientific）で反応させ蛍光を観察し評価した。

##### 修復組織における Scx 発現細胞の増殖能の評価

抗 GFP 抗体（ナカライテスク）と増殖期細胞マーカーの抗 Ki-67 抗体（Abcam）を一次抗体として 4 日で終夜反応させた後 Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 594 で反応させ蛍光を観察し Scx 発現細胞の増殖能を評価した。

##### 修復組織における間葉系幹細胞の評価

間葉系幹細胞マーカーとして抗 Sca-1 抗体（Abcam）、抗 CD90 抗体（Abcam）、増殖期細胞マーカーの抗 Ki-67 抗体を一次抗体として 4 日で終夜反応させた後、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 594 で反応させ蛍光を観察し修復組織における間葉系幹細胞およびその増殖能を評価した。

## 修復組織の Scx 発現細胞における成長因子シグナルの評価

FGF シグナルの評価のため、抗 pMAPK(Abcam)、抗 pAKT(Abcam)、また、TGF- $\beta$  シグナルの評価のため抗 pSmad3 抗体 (Rockland)、BMP シグナルの評価のため抗 pSmad1/5 抗体 (CST) を一次抗体として 4 週で終夜反応させた後 Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 594 で反応させ蛍光を観察し Scx 発現細胞における成長因子シグナル制御因子を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 腱板附着部損傷モデル修復過程

損傷部では、損傷後 1 週から 2 週にかけて紡錘形細胞と血管が豊富な修復組織が形成され、損傷後 4 週ではコラーゲン線維配列の改善を示す SHG シグナルの増強が認められたが、附着部線維軟骨層の再構築は認められなかった。(図 3)

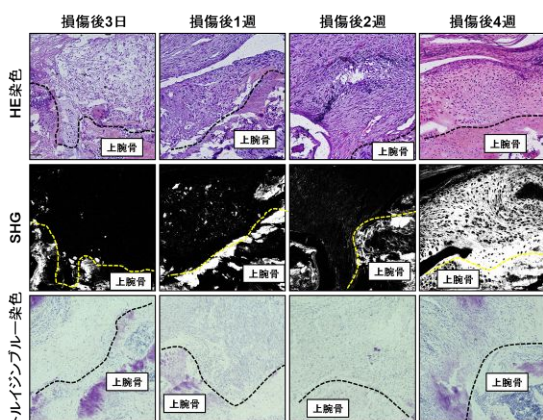


図 3. 腱板附着部損傷モデル修復過程 (損傷群 棘上筋腱附着部)

#### (2) 修復組織における Scx および Scx/Sox9 発現細胞の評価

損傷後 1 週から 4 週の修復部では sham 群より多数の Scx 発現細胞が認められ、腱断端近傍と上腕骨近傍に局在していた。特に、腱断端近傍では SHG シグナルが高い領域に一致していたのに対して、骨近傍では SHG シグナルが低い領域においても Scx 発現細胞が認められた。(図 4)

以上の結果から、Scx 発現細胞は腱実質と骨移行部の双方の修復に参画することが示唆された。また、修復部位によって Scx 発現細胞の周囲のコラーゲン線維の配向性が異なっていることから、Scx 発現細胞集団中に異なる性質を示す複数の sub-population が存在する可能性が示唆された。

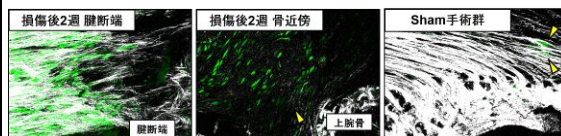


図 4. 修復組織における Scx 発現細胞とコラーゲン線維配列の関連

(コラーゲン線維配列の指標である SHG シグナルは白色で観察される。腱断端において Scx 発現細胞 [緑]は SHG シグナルが高い領域に局在していた。一方、骨近傍では SHG シグナルが低い領域にも局在がみられた。)

Scx/Sox9 共発現細胞は sham 群と損傷後 3 日ではほとんど認められなかったのに対して、損傷後 1 週から 4 週の修復組織内の上腕骨近傍に局在する少数の Scx/Sox9 共発現細胞が認められた。また、修復部に設定した関心領域における全細胞中の Scx および Sox9 発現細胞の割合はいずれも損傷後 1 週をピークとして経時的に低下し、損傷後 4 週ではほとんど認められなかった(図 5)。以上の結果から、Scx 発現細胞および Scx/Sox9 共発現細胞は成体の腱板附着部損傷後の修復過程においても限定的ながら参画している可能性が示唆された。

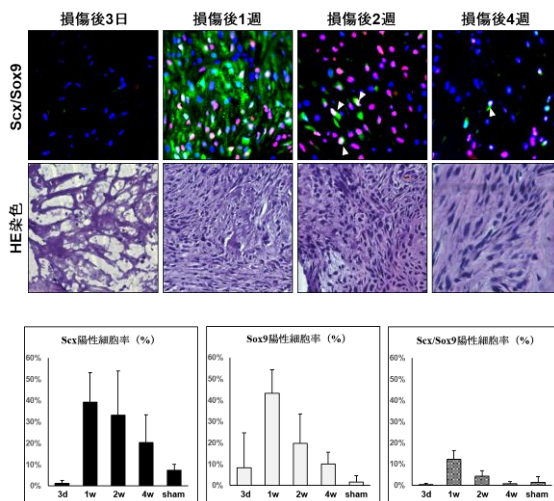


図 5. 修復組織における Scx および Sox9 発現細胞の局在と修復組織関心領域における陽性細胞率の推移

(損傷群 棘上筋腱附着部、Scx 発現細胞 [緑]、Sox9 発現細胞 [赤]、Scx/Sox9 共発現細胞 [黄]、核 [青])

### (3) 修復組織における Scx 発現細胞の増殖能の評価

損傷後 3 日から 4 週の修復部において少数の Scx と Ki-67 を共発現する細胞が認められたが、修復部に設定した関心領域における全細胞中の Scx/Ki-67 共発現細胞の割合は損傷後 1 週をピークとして経時的に低下し、損傷後 4 週ではほとんど認められなかった。また、連続切片を用いた同時期の GFP と Sox9 の二重免疫染色評価では、Scx/Ki-67 共発現細胞と Scx/Sox9 共発現細胞の局在の一致はほとんど認められなかった。以上の結果から、成体の腱板付着部損傷後の修復過程において Scx および Scx/Sox9 共発現細胞の増殖能は限られている可能性が示唆された。

### (4) 修復組織における間葉系幹細胞の評価

sham 群および損傷後 1 週から 4 週の修復部に少数の Sca-1 発現細胞が認められ、sham 群および損傷後 3 日から 4 週の修復部に少数の CD90 発現細胞が認められた。CD90 発現細胞の増殖能を評価するために Ki-67 との共発現を評価したところ、修復部において CD90/Ki-67 共陽性細胞はほとんど認められなかった。さらに、Sox9 発現細胞と CD90 発現細胞の関連性の評価では修復過程を通して CD90/Sox9 共発現細胞はほとんど認められなかった。以上より、本モデルにおいて間葉系幹細胞が修復に参画する可能性が示されたものの、その増殖能は限られていることが示唆された。さらに、CD90 発現細胞は Sox9 および Scx/Sox9 共発現細胞とは同一の population ではない可能性が示唆された。

### (5) 修復組織の Scx 発現細胞における成長因子シグナルの評価

損傷後 1 週から 2 週の修復部の Scx 発現細胞において、ある程度の pMAPK および pSmad3 との共発現が認められたのに対して、pAKT および pSmad1/5 の共発現はほとんど認められなかった。Scx と pMAPK および pSmad3 共発現細胞は経時的に減少し損傷後 4 週ではほとんど認めなかった。以上より、本モデルの修復過程の Scx 発現細胞において MAPK および Smad3 を介した FGF シグナルおよび TGF- $\beta$  シグナルによる制御が関わっている可能性が示唆された。

以上の結果から、発生過程で腱付着部の形成に寄与する Scx および Sox9 を発現する細胞集団が成体の腱板付着部損傷後の修復過程においても参画している可能性が示唆された。本研究における損傷後に付着部線維軟骨層が再生しないモデルにおいて、Scx および Sox9 を発現する細胞の増殖能は乏しく、その修復への寄与は限られている可能性が示唆された。本成果は Scx および Scx/Sox9

発現細胞を標的とした修復促進治療の確立につながる知見となることが期待される。今後は、修復過程における Scx および Scx/Sox9 発現細胞の動員および維持機構の解析を進め、修復部位においてこれらの細胞集団を増加させる方法の確立を目指している。

#### 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 1 件)

1. 徳永琢也, 有村仁志, 水田博志, 開祐司, 宿南知佐. エンテシスの形成と再生への展望. CLINICAL CALCIUM. Vol. 28:p335-343, 2018. <https://webview.isho.jp/journal/detail/abs/10.20837/4201803335>. (査読なし)

[学会発表](計 2 件)

1. 徳永琢也, 井手尾勝政, 米満龍史, 有村仁志, 唐杉樹, 井手淳二, 宿南知佐, 開祐司, 水田博志: 腱板付着部損傷後修復過程における Scx/Sox9 共発現細胞の参画と組織形態の関連 (シンポジウム: Bone tendon interface). 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2017 年 10 月 26 日. 沖縄コンベンションセンター. 沖縄.
2. 井手尾勝政, 徳永琢也, 米満龍史, 有村仁志, 唐杉樹, 井手淳二, 水田博志: 腱板付着部損傷後修復過程への Scx/Sox9 共発現細胞の参画. 第 44 回日本肩関節学会. 2017 年 10 月 6 日. グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール. 東京.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

徳永 琢也 (TOKUNAGA, Takuya)  
熊本大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号: 60759520

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

(4)研究協力者

井手尾 勝政 ( IDEO, Katsumasa )  
熊本大学大学院医学教育部・大学院生

米満 龍史 ( YONEMITSU, Ryuji )  
熊本大学大学院医学教育部・大学院生

宿南 知佐 ( SHUKUNAMI, Chisa )  
広島大学医歯薬保健学研究院(歯)・教授  
研究者番号：60303905

開 祐司 ( HIRAKI, Yuji )  
京都大学 ウイルス・再生医科学研究所・教授  
研究者番号：40144498