

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16628

研究課題名(和文) 腱板付着部の修復におけるScx/Sox9共陽性前駆細胞の制御因子の解明

研究課題名(英文) Involvement of the Scx and Sox9 double-positive cells in the healing process of fibrocartilaginous entheses of supraspinatus following injury in mice

研究代表者

徳永 琢也 (Tokunaga, Takuya)

熊本大学・病院・特任助教

研究者番号：60759520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では修復能の高い幼若(3週齢) ScxGFP遺伝子改変マウスの腱板付着部損傷モデルを用いて、過去に腱付着部の発生に寄与することが示されているScx+/Sox9+細胞と線維軟骨修復との関連を評価した。幼若マウスでは損傷後4週に線維軟骨層が修復され、損傷後3日から4週にかけて修復部と線維軟骨表層に局在するScx+/Sox9+細胞および修復部に広く分布するpSmad3陽性細胞が確認された。本結果は発生過程におけるScx+/Sox9+細胞の局在の推移と類似しており、Scx+/Sox9+細胞は線維軟骨の修復過程に寄与し、その修復にTGF-シグナルが関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Scx+/Sox9+前駆細胞は発生期に腱・靭帯の付着部の形成に寄与することが示されている。本研究では、幼若マウスの腱板付着部損傷後の線維軟骨層の修復にScx+/Sox9+細胞が寄与している可能性を示唆させる結果を得た。これは、内在性のScx+/Sox9+細胞の修復部への動員が線維軟骨修復に関連する可能性を示唆する結果であり、成体におけるScx+/Sox9+細胞を介した新たな修復促進治療につながる知見となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Scx+/Sox9+ cells, a specific multipotent cell population, have been shown to contribute to the enthesis formation during mouse embryonic development. We investigated the involvement of Scx+/Sox9+ cells in fibrocartilaginous (FC) enthesis healing using a supraspinatus enthesis healing model established in juvenile (3-week-old) ScxGFP Tg mice. In juvenile mice, Scx+/Sox9+ cells were widely distributed in injury site in early phase, and they were located near the surface of the repaired FC at 4 week post-injury. The spatiotemporal localization pattern of Scx+/Sox9+ cells in juvenile mice was similar to that in postnatal FC enthesis formation. These findings indicate that Scx+/Sox9+ cells may be able to act as enthesial progenitors in postnatal healing. Moreover, their healing action may be related to the TGF-beta/pSmad3 pathway, as evidenced by the higher pSmad3-positive cell count during healing.

研究分野：整形外科

キーワード：Scleraxis Sox9 enthesis healing rotator cuff

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中高年以降に急増する腱板断裂は、肩関節の痛みや機能障害を引き起こす。健康寿命の延伸の観点からも本疾患への対策は重要であるが、腱板修復術後の再断裂は20%前後とも報告されており、臨床上の課題の一つとして知られている。腱板は線維軟骨層を介して強靱に骨に付着する一方で、この構造は栄養血管に乏しく、損傷後や修復術後には脆弱な線維性癒痕が形成され、本来の構造の再生は困難であることが示されている。これまで、修復過程における付着部の前駆細胞や制御因子はほとんど解明されておらず、機能的な腱板付着部を再生させる治療法は確立されていない。

近年、腱細胞の特異的なマーカー遺伝子のbHLH型転写因子Scleraxis (Scx)を用いた細胞系譜追跡解析によって、マウスアキレス腱付着部の発生過程における前駆細胞としてScxとSox9を共発現する細胞集団(Scx⁺/Sox9⁺細胞)が見出された。また、ScxGFP遺伝子改変マウスの腱板付着部損傷モデルを用いた先行研究で、成体の腱板損傷後の修復過程において、内在性のScx⁺/Sox9⁺細胞が一過性に出現することが確認され、成体においてもScx⁺/Sox9⁺細胞が修復に寄与する可能性が示唆されている。これまで発生期の腱付着部形成において、fibroblast growth factor (FGF)、transforming growth factor (TGF)、bone morphogenetic protein (BMP)が腱およびその付着部の前駆細胞の動員・維持を制御することが報告されている。また、Hedgehog (Hh)シグナルに応答する前駆細胞が線維軟骨層の形成と成熟(石灰化)に寄与することが示されている(Schwartz AG, et al. Development 2017)。以上の知見から、修復過程における内在性のScx⁺/Sox9⁺細胞の動員、維持が線維軟骨層の修復および再生に寄与すると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、修復能が高い幼若なScxGFP遺伝子改変マウスモデルを用いて、腱板付着部損傷後の修復過程におけるScx⁺/Sox9⁺細胞の参画と線維軟骨形成の関連を明らかにし、さらに、Scx⁺/Sox9⁺細胞の修復部への動員、維持に関わる因子を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス腱板付着部修復モデル作製

ScxGFP遺伝子改変マウス棘上筋腱の上腕骨付着部に、直径1 mmの円筒形バー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。また、対側の棘上筋腱付着部を露出し閉創するSham手術群を作製した。損傷後3日、1週、2週、4週に肩関節組織を採取し組織学的評価をおこなった。Scxの発現が成体より高く、修復能が高いことが示されている幼若マウス(3週齢)モデルを作製し(Schwartz AG, et al. Development 2017)、成熟マウス(20週齢)モデルと比較した。

(2) 組織学的評価

採取した組織は20%スクロース含有4%PFAで16時間固定後に凍結包埋し、粘着フィルム法により凍結組織切片を作製した。損傷部の線維軟骨層の修復についてToluidinblue染色により評価し、コラーゲン線維配列について二光子レーザー顕微鏡(オリンパスFV1000MPE)を用いたコラーゲン線維に対する第二高調波発生(Second harmonic generation: SHG)観察により評価した。

(3) 免疫組織学的評価

修復組織におけるScx⁺/Sox9⁺細胞の評価

0.25M EDTAで1時間脱灰後に抗GFP抗体(ナカライテスク)、抗Sox9抗体(Millipore)を

一次抗体として 4 で終夜反応させた後、Alexa Fluor 488, Alexa Fluor594 (Thermo Fisher Scientific) で反応後評価した。また、連続切片を用いて抗 Ki-67 抗体 (Abcam) と抗 GFP 抗体を一次抗体として 4 で終夜反応させた後、Alexa Fluor 488, Alexa Fluor594 (Thermo Fisher Scientific) で反応後観察し増殖期細胞を評価した。

修復過程における TGF, BMP, FGF, Hh シグナルの解析

Scx⁺/Sox9⁺細胞評価の連続切片を用いて、修復組織中の FGF シグナルについて抗リン酸化 MAPK 抗体 (Abcam), TGF-シグナルについて抗リン酸化 Smad3 抗体 (Rockland), BMP シグナルについて抗リン酸化 Smad1/5 抗体 (Cell Signaling), Hh シグナルについて抗 Gli1 抗体 (Abcam) を一次抗体として 4 で終夜反応させた後、Alexa Fluor コンジュケート二次抗体で反応後評価した。

4. 研究成果

(1) 幼若マウスの腱板附着部損傷後の修復過程

3 週齢マウスの正常棘上筋腱附着部の線維軟骨層では線維軟骨細胞が柱状に配列し、コラーゲン線維の配列を示す SHG シグナルが高値であった。損傷後 3 日では疎な線維性組織中に少数の細胞を認め、修復組織中の SHG シグナルはほとんど検出されなかった。損傷後 1 週から 2 週では、多数の紡錘形細胞と血管を含む修復組織の形成を認め、損傷後 4 週にかけて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。損傷後 4 週では、損傷部骨表面に線維軟骨層の形成が確認されたが、正常組織にみられた軟骨細胞の柱状配列は認められなかった (図 1)。

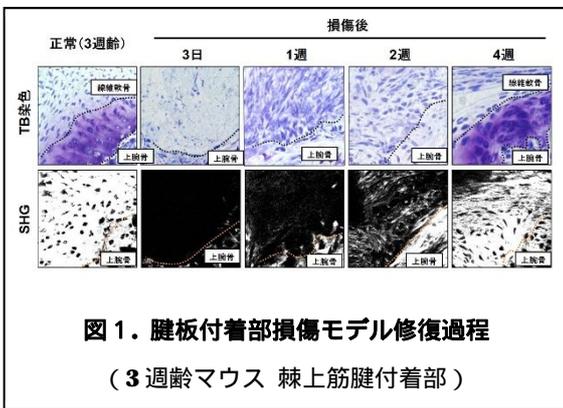


図 1. 腱板附着部損傷モデル修復過程
(3 週齢マウス 棘上筋腱附着部)

(2) 幼若マウスの修復過程における Scx⁺/Sox9⁺細胞の局在

20 週齢マウスの棘上筋腱附着部では Scx⁺/Sox9⁺細胞は認められなかった。また、修復過程では損傷後 1 週の修復組織中に最も多くの Scx⁺/Sox9⁺細胞を認めたが、経時的に減少し損傷後 4 週ではほとんど認められなかった。

3 週齢マウスの正常附着部では棘上筋腱と線維軟骨層の境界の近傍に局在する少数の Scx⁺/Sox9⁺細胞が認められた。損傷後 3 日では、少数の Scx⁺細胞がみられ損傷後 1-2 週では、修復組織内に広く分布する Scx⁺/Sox9⁺細胞が確認され、損傷後 4 週では修復された線維軟骨層と腱との境界近傍に局在していた。

全ての評価時期において Scx⁺/Sox9⁺細胞は 20 週齢マウスより多かった (図 2)。

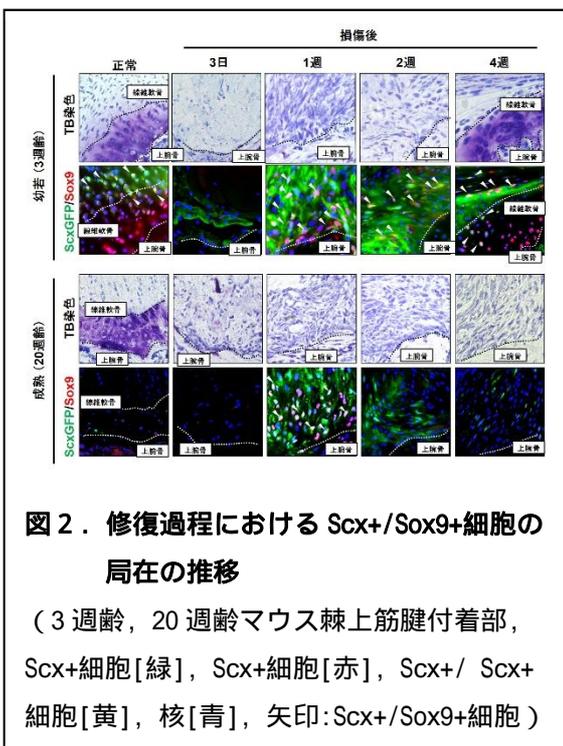


図 2. 修復過程における Scx⁺/Sox9⁺細胞の局在の推移

(3 週齢, 20 週齢マウス棘上筋腱附着部, Scx⁺細胞[緑], Scx⁺細胞[赤], Scx⁺/Scx⁺細胞[黄], 核[青], 矢印: Scx⁺/Sox9⁺細胞)

連続切片を用いて、20週齢マウスおよび3週齢マウス損傷後1週のKi-67を評価した。3週齢マウスの修復部組織中に多くのKi-67⁺細胞とScx⁺/Ki-67⁺細胞を認めた。20週齢では、Scx⁺/Ki-67⁺細胞はほとんど認められなかった。

(3) 修復過程における TGF, BMP, FGF シグナル

3週齢マウスでは、損傷後3日の棘上腱断端と上腕骨損傷部に局在するpSmad3⁺細胞を認めたが、pSmad1/5⁺、およびpMAPK⁺細胞はほとんど検出されなかった。損傷後1週では、修復組織中に広く分布する多数のScx⁺/pSmad3⁺細胞を認めた(図3)。また、Scx⁺/pSmad3⁺細胞より少数のScx⁺/pSmad1/5⁺細胞、およびScx⁺/pMAPK⁺細胞が認められた(図3)。修復組織中のpSmad3⁺、pSmad1/5⁺、およびpMAPK⁺細胞はいずれも経時的に減少し、2週以降では修復組織中にScx⁺/pSmad1/5⁺細胞、Scx⁺/pMAPK⁺細胞はほぼ検出されなかった。一方、Scx⁺/pSmad3⁺細胞は2週以降においても修復組織中に観察され、損傷後4

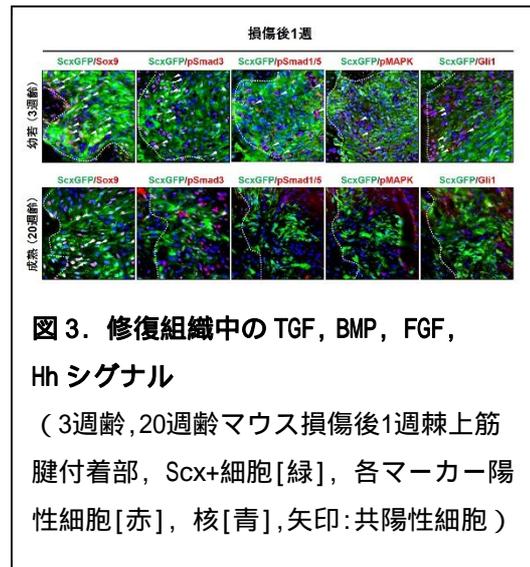


図3. 修復組織中の TGF, BMP, FGF, Hh シグナル

(3週齢, 20週齢マウス損傷後1週棘上筋腱付着部, Scx⁺細胞[緑], 各マーカー陽性細胞[赤], 核[青], 矢印: 共陽性細胞)

週の腱実質部と上腕骨表層の線維軟骨近傍への局在が認められた。20週齢マウスでは、pSmad3⁺細胞、およびpMAPK⁺細胞はいずれも損傷後1週をピークとして3週齢マウスの修復過程と類似した局在パターンを示したが、pSmad1/5⁺細胞はほとんど認められなかった。また、全ての評価時期において各マーカー陽性細胞は3週齢マウスより少数であり、損傷後2週と4週においてScxとの共陽性細胞はほとんど認められなかった。以上より、3週齢マウスの修復過程早期におけるSmad3を介したTGF- β 、Smad1/5を介したBMP、MAPKを介したFGFシグナルの関与が示唆された。また、観察期間を通してpSmad3⁺細胞の局在が維持されていたことから、TGF- β が線維軟骨組織の修復に関わっている可能性が示唆された。

(4) 修復過程における Hh シグナル

3週齢マウスでは、損傷後3日の棘上筋腱損傷部周囲に局在するGli1⁺細胞が認められた。また、修復組織中に少数のScx⁺/Gli1⁺細胞を認めた。損傷後1週の修復部では、棘上筋腱損傷部近傍に多数のGli1⁺細胞を認め、上腕骨損傷部表層にScx⁺/Gli1⁺細胞が認められた。その局在はScx⁺/Sox9⁺細胞と一致していなかった(図3)。修復組織中のGli1⁺細胞は経時的に減少し、2週以降では、主に上腕骨損傷部の表層に限局していた。20週齢マウスの修復過程において、少数のGli1⁺細胞が損傷部周囲の骨表層への局在が確認され、Scx⁺/Gli1⁺細胞はほとんど検出されなかった(図3)。以上より、修復過程においてHhシグナルは石灰化を伴う修復組織の再構築に関与している可能性が示唆された。

以上の結果から、幼若マウス(3週齢)では、棘上筋腱付着部の線維軟骨表層にScx⁺/Sox9⁺細胞が局在し、その修復過程において線維軟骨層が修復されることが明らかとなった。一方、成熟マウス(20週齢)の修復過程では、Scx⁺/Sox9⁺細胞の参画は一過性で幼若モデルより少数であり、線維軟骨層の修復はみられなかった。これらの結果から、腱板付着部損傷後の修復過程において、Scx⁺/Sox9⁺細胞が線維軟骨層の修復に寄与し、TGF- β がその制御に関わっている可能性が示唆された。今後は、腱板修復モデルを用いて、修復過程においてScx⁺/Sox9⁺細胞を増加させる方法とその修復促進作用の検証を進め、内在性のScx⁺/Sox9⁺細胞を介した修復促進治療の確立を目指す予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井手尾勝政, 徳永琢也, 米満龍史, 唐杉樹, 中村英一
2. 発表標題 腱板付着部損傷後の修復過程における Scx/Sox9 共陽性細胞に対する hedgehog シグナルの関与
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井手尾勝政, 徳永琢也, 米満龍史, 唐杉樹, 井手淳二, 中村英一
2. 発表標題 腱板修復過程におけるのScx/Sox9共陽性細胞におけるHedgehogシグナル制御
3. 学会等名 第45回日本肩関節学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 徳永 琢也
2. 発表標題 シンポジウム4 腱及び腱骨付着部組織のバイオメカニクス 成長因子を用いた腱板付着部組織の修復促進
3. 学会等名 第46回日本臨床バイオメカニクス学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井手尾 勝政, 徳永 琢也, 米満 龍史, 唐杉 樹, 宮本 健史
2. 発表標題 腱板付着部損傷後の線維軟骨形成におけるScx+/Sox9+細胞の関与
3. 学会等名 第46回日本肩関節学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井手尾 勝政, 徳永 琢也, 米満 龍史, 唐杉 樹, 中村 英一
2. 発表標題 腱板付着部損傷後の線維軟骨再構築におけるScx/Sox9共陽性細胞の参画
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019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
研究協力者	井手尾 勝政 (IDEO Katsumasa) (20868971)	熊本大学・熊本大学病院 (17401)	