

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16668

研究課題名(和文)細胞老化システムから解明する手根管症候群の病態メカニズムと新規治療法の開拓

研究課題名(英文) Cellular senescence system of carpal tunnel syndrome and development of novel therapeutic methods

研究代表者

齋藤 貴子(千見寺貴子)(Chikenji, Takako)

北海道大学・保健科学研究所・教授

研究者番号：40452982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：手根管症候群(CTS)は絞扼性神経障害の中で最も頻度が高く、新たな治療法の開発が期待されている。本研究では、CTS滑膜病変における細胞老化の関連性を検討した。CTS患者滑膜で、PDGFRa+細胞が細胞老化関連因子とマクロファージチェックポイント両方の発現上昇を認めた。PDGFRa+老化細胞は、マクロファージの貪食作用から回避すると同時に、隣接する線維芽細胞の増殖を促進した。細胞老化した線維芽細胞をウサギモデルの手根管に移植すると、滑膜組織で線維化関連遺伝子の上昇を認めた。最後に、老化細胞除去薬の有効性をin vitroで検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CTSは中高年の10人に1人が発症するとされるものの、その原因は未だ明らかでなく、有効な治療は外科介入に限られている。本研究によりCTS患者に対する新たな内科的治療法が明確になれば、世界中の患者に迅速に届けられる、低侵襲で安価かつ安全な治療法となり、学術的および社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Carpal tunnel syndrome (CTS) is the most common compression neuropathy. Effective treatments are limited to surgical interventions, and novel treatments have not yet been developed. In CTS patients, fibrosis of the subsynovial connective tissue surrounding the median nerve in the carpal tunnel is known as a pathological condition that compresses the median nerve in the carpal tunnel. In this study, we investigated cellular senescence in subsynovial connective tissue in CTS. In the CTS patients, PDGFRa+ cells expressed both senescence factors and the macrophage checkpoint. PDGFRa+ senescent cells avoided the phagocytosis of macrophages. Furthermore, PDGFRa+ senescent cells promoted the proliferation of adjacent fibroblasts. When senescent fibroblasts were transplanted into the carpal tunnel of a rabbit model, an increase in fibrosis-related genes was observed in the subsynovial connective tissue. Finally, one of senolytics induced apoptosis in PDGFRa+ rather than control cells.

研究分野：分子病態学

キーワード：手根管症候群 細胞老化 滑膜下結合組織 線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

手根管症候群(Carpal Tunnel Syndrome、CTS)の有病率は、国や人種によりばらつきがあるものの2~5%とされており非常に高い。ステロイド治療など内科的治療も行われているが、その効果は一時的で1年以内にはおよそ3/4の患者が外科治療の対象となっている。CTSの治療法として有効性が認められているものは外科治療に限られているため、病状が重篤になるまで手術を待つ患者も多く、その間の患者QOLは非常に低い。さらに、数多くのCTS患者が外科治療の対象となるため、たとえば、米国では年間10億ドル以上の医療費がCTS治療に費やされている。そのため、安価で低侵襲な治療法をめざした研究・開発は世界的に競争となっている(Pauda et al., Lancet; 2017, Moalem-Taylor et al., Scientific Reports; 2017)。

CTSの治療法の発展が難しい原因として、病因がいまだ不明である点があげられる。糖尿病や閉経女性などがリスク因子とされるが、多くが特異性とされており、病因の解明が新規治療法開発の一つとして注目されている。私はこれまでCTS病態メカニズムの解明として、正中神経を取り巻く滑膜の病態解析を行い、CTS患者の線維化した滑膜に間葉系細胞(PDGFR α +細胞)とTGF β が過剰発現することを明らかにしてきた(Chikenji T et al., J Orthop Res.2014, Chikenji T., et al. 2014)。また、並行して慢性炎症の病態メカニズム解明に関する研究を行い、間葉系細胞の細胞老化がさまざまな慢性炎症病態に影響することを明らかにしてきた。これら一連の研究成果の発想のもと、PDGFR α +細胞の細胞老化が、CTS滑膜線維化の本質として、細胞老化を制御することによりCTSの病態の制御に成功するものとの着想にいたった。

2. 研究の目的

本研究では、① CTS患者の滑膜線維化におけるPDGFR α +細胞の細胞老化の本質を明らかにするため、CTS患者および対照者の滑膜組織を採取し、細胞老化因子及び細胞老化関連分泌因子の検討を行い、さらに② PDGFR α +細胞の細胞老化を制御するための薬剤の治療効果をin vitroおよびin vitroで検討し、CTSの新規治療法の開発へ結びつけることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PDGFR α +細胞の細胞老化因子及び細胞老化関連分泌因子の検討。CTS患者(慢性炎症・線維化滑膜)および対照者(手関節外傷などにより外科的手術を必要とする患者; 急性炎症滑膜)から滑膜組織を採取した。CTS患者および対照者の滑膜組織について、SPiDER- β -Gal染色および細胞老化に関連する遺伝子発現について定量PCR解析をおこなった。

(2) TGF β はCTS滑膜線維化におけるkey regulatorとして知られることから、PDGFR α +細胞の細胞老化の検討として、CTS患者および対照者から採取したPDGFR α +細胞について、それぞれin vitroでTGF β もしくはIFN- γ 刺激を行い、PDGFR α +細胞の細胞老化因子の発現について定量PCR解析およびImmunofluorescence (IF)法で解析をおこなった。

(3) PDGFR α +細胞の細胞老化の特徴について、特に老化細胞のクリアランスにかかわる性質を検討するため、PMA誘導性マクロファージ(THP-1細胞)とTGF β 刺激により細胞老化を誘導したDiI標識PDGFR α +細胞の共培養を行い、フローサイトメトリー解析にてマクロファージの貪食能を評価した。

(4) さらに、PDGFR α +細胞の細胞老化の特徴について、線維芽細胞への影響を解析するため、PDGFR α +細胞に放射線照射により細胞老化を誘導し、PDGFR α +老化細胞と線維芽細胞の共培養を行い、スクラッチアッセイにて、細胞増殖性を検討した。

(5) (1)~(4)の結果から、細胞老化を起こしたPDGFR α +細胞がCTS滑膜線維化を誘導することが推測されたため、ウサギ皮膚由来間葉系細胞に放射線照射により細胞老化を誘導し、細胞老化をおこした間葉系細胞を、ウサギ手根管に移植し、滑膜線維化を誘導するか検討した。

(6) 最後に、CTS滑膜線維化治療として細胞老化除去薬として知られるダサチニブ+ケルセチンについて、細胞老化を誘導したPDGFR α +細胞に添加培養し、ダサチニブ+ケルセチンのPDGFR α +老化細胞に与える影響について解析した。

4. 研究成果

CTS患者および対照者の滑膜組織について、SPiDER- β -Gal染色および細胞老化に関連する遺伝子発現について定量PCR解析をおこなったところ、CTS患者滑膜においてSPiDER- β -Gal染色陽性細胞が増加しているのを認めた。さらに、定量PCR法および免疫蛍光組織科学染色にて、細胞老化因子のCDKN2B、抗アポトーシスBCL2、BC2L1、マクロファージ関連因子CD47、IFNGの上昇を認めた。

次に、TGF β はCTS滑膜線維化におけるkey regulatorとして知られることから、PDGFR α +細胞の細胞老化の検討として、CTS患者および対照者から採取したPDGFR α +細胞について、それぞれin vitroでTGF β 刺激を行い、細胞老化因子の検討をおこなった。すると、TGF β 刺激によってPDGFR α +細胞はCDKN2Bの発現を上昇させるが、BCL2、BC2L1、CD47などの発現は変化せず、CTS滑膜病態はTGF β だけではない可能性が示唆された。そのため、TGF β +IFN- γ 刺激を行うと、PDGFR α +細胞はCDKN2Bの発現だけでなく、CD47の発現も上昇させた。さらにこの遺伝子発

現の上昇は、放射線照射によって細胞老化を誘導した PDGFR α +細胞においても同様であった。さらに、CTS 滑膜病態で細胞老化を起こした PDGFR α +細胞が、クリアランスされずに蓄積する原因に、マクロファージチェックポイントである CD47 の発現が影響していると推測されたため、PMA-誘導性マクロファージ(THP-1 細胞)と細胞老化を誘導した DiI 標識 PDGFR α +細胞を共培養すると、マクロファージに貪食される PDGFR α +細胞が増加したことから、PDGFR α +老化細胞の蓄積に CD47 の関連性が示唆された。次に、細胞老化を起こした PDGFR α +細胞の周辺の線維芽細胞への影響を解析するため、PDGFR α +細胞に放射線照射により細胞老化を誘導し、PDGFR α +老化細胞と線維芽細胞の共培養を行い、スクラッチアッセイにて細胞増殖性を検討した。すると、PDGFR α +老化細胞と線維芽細胞を共培養すると、線維芽細胞の増殖が著しく上昇した。これらの結果から、PDGFR α +細胞の細胞老化が、CTS 滑膜病態に影響していると推測されたことから、ウサギ皮膚由来間葉系細胞に放射線照射により細胞老化を誘導し、ウサギ手根管に移植し手根管滑膜線維化を誘導するか検討した。すると、細胞老化を誘導した間葉系細胞を移植した群でのみ、滑膜の線維化が誘導された。最後に、CTS 滑膜病態の新たな治療薬の候補として、細胞老化除去薬として知られるダサチニブ+ケルセチンを用いて、in vitro で細胞老化を誘導した PDGFR α +細胞に添加した。すると、ダサチニブ+ケルセチンはコントロール細胞よりも細胞老化を誘導した PDGFR α +細胞はカスパーゼ 3/8 の上昇を誘導し、より老化細胞にアポトーシスを誘導することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Chikenji Takako S., Saito Yuki, Konari Naoto, Nakano Masako, Mizue Yuka, Otani Miho, Fujimiya Mineko	4. 巻 44
2. 論文標題 p16INK4A-expressing mesenchymal stromal cells restore the senescence-clearance-regeneration sequence that is impaired in chronic muscle inflammation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 86 ~ 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2019.05.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito Yuki, Chikenji Takako S., Matsumura Takashi, Nakano Masako, Fujimiya Mineko	4. 巻 11
2. 論文標題 Exercise enhances skeletal muscle regeneration by promoting senescence in fibro-adipogenic progenitors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 889
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-14734-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsumura Takashi, Saito Yuki, Suzuki Tomoyuki, Teramoto Atsushi, Ozasa Yasuhiro, Yamashita Toshihiko, Fujimiya Mineko, Saito-Chikenji Takako	4. 巻 10
2. 論文標題 Phosphorylated Platelet-Derived Growth Factor Receptor-Positive Cells With Anti-apoptotic Properties Accumulate in the Synovium of Patients With Rheumatoid Arthritis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.00241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Chikenji TS, Saito Y, Vrieze A, Passe S, Tchkonja T, Kirkland JL, Amadio PC, Gingery A
2. 発表標題 Senescent Cells Escape From Immune Clearance In Fibrotic Subsynovial Connective Tissue In Carpal Tunnel Syndrome.
3. 学会等名 Orthopedic Research Society 2020 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takako Saito Chikenji
2. 発表標題 Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha Signaling in Carpal Tunnel Syndrome
3. 学会等名 Mayo Clinic Musculoskeletal Research Conference (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sito Y, Matsumura T, Fujimiya M, Chikenji TS
2. 発表標題 Enhances Skeletal Muscle Regeneration By Promoting Senescence In Fibro-adipogenic Progenitors.
3. 学会等名 Orthopedic Research Society 2020 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chikenji TS
2. 発表標題 The role of platelet derived growth factor (PDGF) signaling in synovial fibrosis.
3. 学会等名 The 4th FHS International Conference. (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takako Saito Chikenji, and Yuki Saito
2. 発表標題 Platelet-Derived Growth Factor Receptor alpha signaling in carpal tunnel syndrome
3. 学会等名 Musculoskeletal Research Conference, Mayo Clinic (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saito Y, Chikenji TS, Vrieze A, Tchkonja T, Kirkland JL, Amadio PC, Gingery A
2. 発表標題 Cellular Senescence in Tendon Aging and Pathology
3. 学会等名 Orthopedic Research Society 2020 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 齋藤悠城、千見寺貴子	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 227
3. 書名 健康寿命の鍵を握る骨格筋(第3章) 個体の老化を支配する骨格筋の老化 運動による細胞老化制御と骨格筋再生	

〔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	齋藤 悠城 (Saito Yuki) (40758702)	札幌医科大学・医学部解剖学第二講座・講師 (20101)	

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		
米国	Mayo Clinic		