

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09554

研究課題名(和文) 腱板断裂に対するヘッジホッグシグナルを介した修復促進治療の開発

研究課題名(英文) Development of a therapeutic modality for rotator cuff repair through Hedgehog signaling pathway

研究代表者

唐杉 樹 (Karasugi, Tatsuki)

熊本大学・病院・講師

研究者番号：80706482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：鏡視下腱板修復術は再断裂率が比較的高い。正常な腱板付着部の線維軟骨層の形成や損傷後の修復にHedgehog(Hh)シグナルが重要な役割を果たしていることが近年示されている。腱板修復術後の修復促進を目指し、ラット腱板修復モデルにHhシグナルアゴニストのSmoothened agonist(SAG)の投与を行い、採取した肩組織に対する以下の2つの実験をおこなった。張力測定器を用いた引っ張り破断試験では修復した腱板の力学的強度に変化は認めなかった。組織評価では組織学的な変化は認めなかった。以上より本研究においてラット腱板修復モデルに対するHhシグナルを介した腱板修復促進効果は検証できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正常な腱板付着部の構造である線維軟骨層の形成やその損傷後の修復にはHedgehog(Hh)シグナルが重要な役割を担っていることが報告されており、本研究ではラット腱板修復モデルに対してHhシグナルを増強するSmoothened agonist(SAG)を局所投与し腱板修復促進効果の検証を試みた。しかしながらSAGの局所投与では腱板修復部のHhシグナルは増強せず、力学強度や組織学的所見の変化を認めなかった。SAGの投与方法、またはHhシグナルに応答する細胞に対する解析が今後必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Retear rates following arthroscopic rotator cuff repair are relatively high. Hedgehog (Hh) signaling has been shown to play an important role in the formation of the fibrocartilage layer at normal rotator cuff insertions and in repair following injury. To promote healing following rotator cuff repair, we administered Smoothened agonist (SAG), an Hh signaling agonist, in a rat model of rotator cuff repair and performed the following two experiments on harvested shoulder tissue. (1) Tensile testing using a tension meter showed no change in the mechanical strength of the repaired rotator cuff. (2) Histological evaluation showed no histological changes. This study could not verify the benefit of Hh signaling in promoting rotator cuff repair in a rat model.

研究分野：整形外科

キーワード：腱板断裂 Hedgehogシグナル Smoothened agonist

1. 研究開始当初の背景

腱板断裂は肩関節の疼痛や上肢の挙上困難などの機能低下を引き起こす。わが国の疫学調査によると中高年以降にその有病率が急増することが示されており、健康寿命の延伸の観点からも本疾患への対策は重要と考えられる。通常、完全に断裂した腱板では自然治癒は起こらないため、症候性の患者では手術療法として腱板修復術が選択され、安定した臨床成績が報告されている。しかし、約 20%前後に生じるとされる術後の再断裂は未解決の課題であり、再断裂の大部分は術後 6 カ月以内の比較的早期に発生することから、社会復帰までに数カ月間の長期を要している。

腱骨付着部は血流に乏しく、損傷後や術後の修復能は限定的である。実際に、動物モデルの修復術後に本来の線維軟骨層を介した強靱な付着部構造の再生はみられず、腱骨間には線維性癒痕組織が介在し、力学強度は正常水準より劣ることが示されている。そのため、再断裂の減少や治療期間の短縮のために、力学強度の早期回復や本来の構造の再生を目指した様々な修復促進の試みが国内外で研究されている。

申請者らは、これまでに徐放担体を用いた成長因子の局所投与による修復促進に関する研究を行い、fibroblast growth factor2 (FGF-2)、platelet-derived growth factor (PDGF)-BB および transforming growth factor (TGF)- β 1 が動物モデルの腱板修復部の力学強度を高める効果があることを報告してきた(Tokunaga T, et al. Am J Sports Med 2015)。一方で、いずれの因子の投与においても本来の付着部構造の再構築はみられず、線維軟骨層の再生を実現するためには新たな因子が必要である可能性が推察される。

近年マウス腱板付着部発生および生後の成熟過程の細胞系譜追跡手法を用いた解析によって、Hh シグナル伝達系転写因子の Gli1 を発現する細胞のコンディショナルノックアウトによって生後の線維軟骨層の成熟や損傷後の修復が阻害されることが示され、線維軟骨層の形成・成熟および損傷後の修復において Hh シグナルが重要な役割を担っていることが報告された。さらに、申請者らはマウスモデルを用いた先行研究で、腱板付着部線維軟骨損傷後の修復過程において少数の Gli1 陽性細胞が損傷後 1 週をピークとして一過性にみられる結果を得ていた。これらの知見は、腱板修復部における Hh シグナルの活性化が修復促進につながる可能性を示唆させるものと考えられた。

2. 研究の目的

ラット腱板修復モデルを用いて、Hh シグナルアゴニストの Smoothed agonist(SAG)の投与による腱板修復促進効果を力学試験、組織評価により検証することを目的とした。

3. 研究の方法

SAG 投与による、**腱板修復部における Hh シグナル活性化の評価** **腱板修復部組織学的所見への影響** **腱板修復組織の力学強度への影響** を調べるためにそれぞれ下記の方法により研究を行った。

SAG 投与による腱板修復部の Hh シグナル活性化の評価

1. モデル作製・薬剤投与

先行研究(Tokunaga T, et al. Am J Sports Med 2015)に基づき、麻酔下に成熟 SD ラット(20 週齢)の左肩棘上筋腱を切離し、上腕骨付着部線維軟骨を除去後、断端をプロリン系で骨に修復する。SAG(1mM)を徐放担体(ゼラチンハイドロゲル)に含浸させ左肩に投与する群 (Lee S, et al. Plast Reconstr Surg 2017)を作製し、DMSO のみ投与した対照群と比較した。術後 1 週に肩組織を採取し組織評価を行った。

2. 組織学的評価

採取した組織を 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(Kawamoto T, et al. Arch Histol Cytol 2003)により凍結組織切片を作製し抗 Gli1 抗体(Santa Cruz GLI-1 (A-7): sc-515781)を一次抗体として 4°Cで終夜反応させた後、Alexa Fluor コンジュゲート二次抗体で反応後観察し、修復組織中の Hh シグナル活性化を評価した。

SAG 投与による腱板修復部組織学的所見への影響の評価

実験と同様にモデル(投与群、対照群)を作製し、術後 6 週に安楽死させ、凍結切片を作製した。修復部の組織所見を HE 染色により、石灰化の有無について Alizarin-Red 染色により評価し、また ALP 活性の局在と定性を評価した。

SAG 投与による腱板修復組織の力学強度への影響の評価

実験と同様のSAG投与群モデルと対照群を作製し、術後6週に安楽死させ肩組織を採取した。試料のトリミング後、張力測定器(STA1225, オリエンテック社, 東京)を用いて引っ張り破断試験を行った。断面積をマイクロキャリパーで測定し、最大破断強度(N)、剛性(N/mm)、最大破断応力(N/mm²)を算出した。

4. 研究成果

SAG 投与による腱板修復部の Hh シグナル活性化の評価 (組織学的評価)

SAG 投与による Hh シグナル活性化を Gli-1⁺細胞の局在により評価した。術後1週で腱板修復部に Gli-1⁺細胞は存在せず、上腕骨骨髓および骨梁に認められた。SAG 投与群と DMSO 群に明らかな差は認めなかった(図1)。

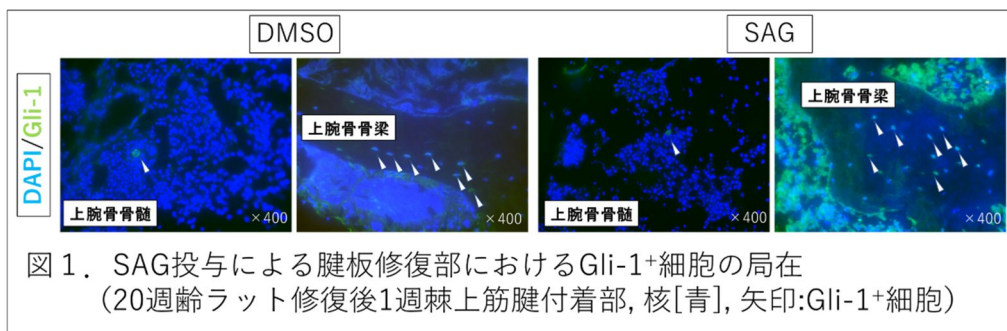


図1. SAG投与による腱板修復部におけるGli-1⁺細胞の局在 (20週齢ラット修復後1週棘上筋腱附着部, 核[青], 矢印:Gli-1⁺細胞)

SAG 投与による腱板修復部組織学的所見への影響の評価

腱板修復術後6週のラット棘上筋腱附着部組織のHE染色において、SAG投与群とDMSO群に細胞充実度、血管分布に有意差は認めなかった。また両群ともに腱板修復部に石灰化を認めず、ALP活性は両群に認めるものの附着部に限局し明らかな差は認めなかった(図2)。

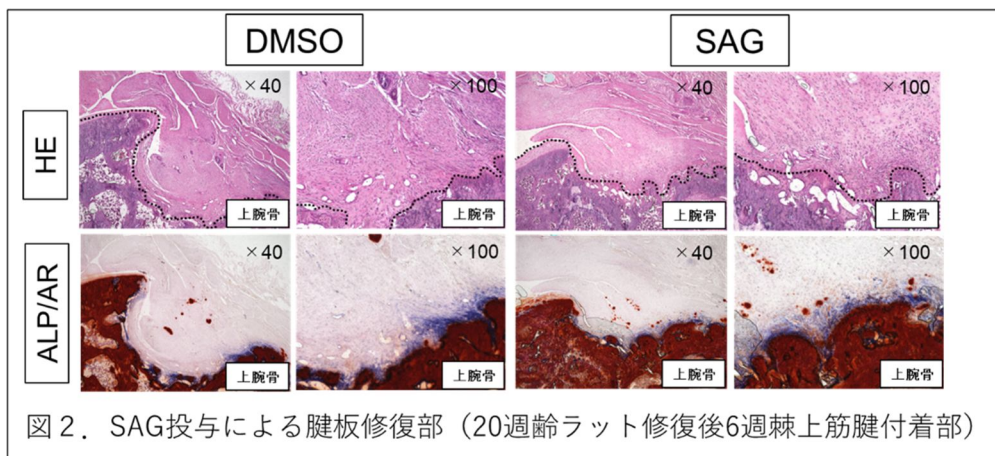


図2. SAG投与による腱板修復部 (20週齢ラット修復後6週棘上筋腱附着部)

SAG 投与による腱板修復組織の力学強度への影響の評価

術後6週の力学強度試験において、最大破断強度(N)、剛性(N/mm)、最大破断応力(N/mm²)を評価したところ、SAG投与群とDMSO投与群の間に有意な差はなかった。

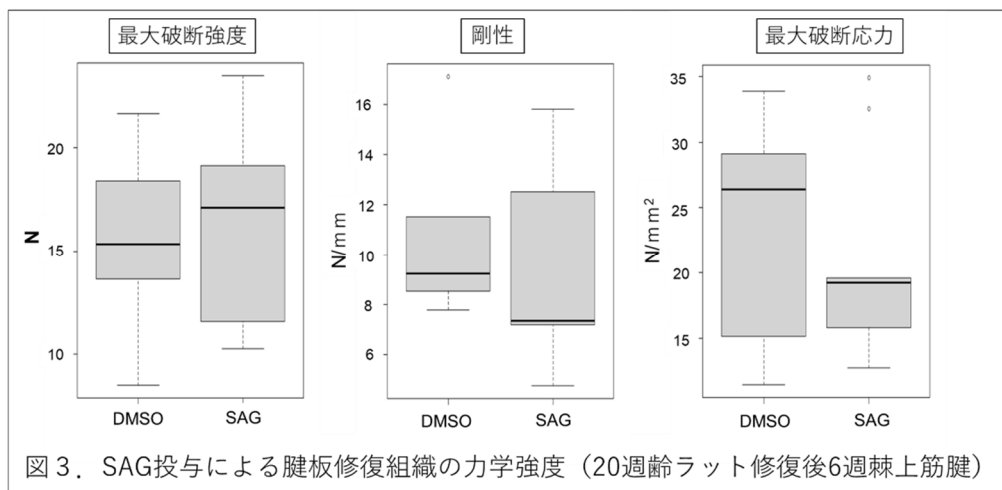


図3. SAG投与による腱板修復組織の力学強度 (20週齢ラット修復後6週棘上筋腱)

以上の結果より本研究では SAG の投与によりラット腱板修復モデルの腱板修復促進効果を力学試験、組織評価から確認することが出来なかった。

本研究において腱板修復部に Gli-1⁺細胞は認めず SAG を投与しても変化を認めなかった。われわれはラット腱板修復モデルの腱板修復部の Single-cell RNA-Seq を施行し、Gli-1⁺細胞の解析を行ったところ、その比率は低く本研究と同様の結果であった。今後の研究として改めて SAG の投与法や Gli-1⁺細胞に対する解析を継続したいと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 米満 龍史, 徳永 琢也, 谷村 峻太郎, 福間 裕子, 井手尾 勝政, 唐杉 樹, 宮本 健史
2. 発表標題 術後の腱板修復に影響を与える因子腱板修復における成長因子の局所投与の影響（シンポジウム）
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021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
研究分担者	徳永 琢也 (Tokunaga Takuya) (60759520)	熊本大学・病院・特任助教 (17401)	

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
---------	---------