

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03805

研究課題名(和文) 腱・靭帯の分子生物学的情報を基盤とした新たな治療法の開発

研究課題名(英文) Development of tendon/ligament injury treatment based on the understanding of its molecular mechanism

研究代表者

安達 伸生 (Adachi, Nobuo)

広島大学・医系科学研究科(医)・教授

研究者番号：30294383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、microRNA(miRNA)の腱・靭帯における機能に着目するとともに、miRNAを含む細胞外小胞による腱修復促進効果を検討した。腱・靭帯特異的Dicerノックアウトマウスは、腱・靭帯における関連遺伝子の発現低下による低形成を示した。そして、腱組織で高発現しているmiRNAを同定し、その腱前駆細胞への過剰導入は、腱関連遺伝子の発現を誘導した。また、アキレス腱損傷モデルにおいて、間葉系幹細胞由来細胞外小胞(MSC-EV)は、腱修復過程における石灰化や癒着を抑制し、その修復を促進するとともに、MSC-EV表面に発現している糖鎖発現パターンで治療効果(質)を評価できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腱や靭帯は、運動機能の中心的役割を担うが、分子生物学的な情報は他の運動器に比べて極めて少なく、その治療を促進する治療法は未だ開発されていない。本研究は、遺伝子発現制御ネットワークに重要な因子であるmiRNAの腱・靭帯における機能を明らかにし、腱組織で高発現しているmiRNAを同定した。そして、miRNAを含むMSC-EVによる腱修復促進効果を明らかにするだけでなく、MSC-EV表面に発現している糖鎖発現パターンによるMSC-EVの質(治療効果)を評価できる可能性を提唱した。よって、目的miRNAを豊富に含んだMSC-EV投与による腱損傷における新たな治療法の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the functions of microRNA(miRNA) in tendons and ligaments, and investigated the effect of miRNA-containing extracellular vesicles on promoting tendon repair. Tendon- and ligament-specific Dicer knockout mice exhibited hypoplasia of tendon due to decreased expression of related genes in tendons and ligaments. Then, we identified a highly expressed miRNA in tendon tissue, and its over-introduction into tendon progenitor cells induced the expression of tendon-related genes. In Achilles tendon injury models, mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles(MSC-EVs) inhibited calcification and adhesion during the tendon healing, promoted their repair. Furthermore, the glycan expressed on the surface of MSC-EVs and it was shown that it is possible to evaluate the therapeutic effect(quality) based on the glycan expression pattern.

研究分野：整形外科、関節外科

キーワード：腱・靭帯 microRNA 間葉系幹細胞 細胞外小胞 腱修復

1. 研究開始当初の背景

筋と骨を繋ぐ“腱”や骨と骨を繋ぐ“靭帯”は主にコラーゲン線維の束ではあるが、その機能は我々の日常生活からスポーツ選手の選手生命に至るまで“しなやかに動く”ために非常に重要なものである。例えば、膝関節の安定性に重要な役割を担っている前十字靭帯 (ACL) の損傷は、時としてスポーツ競技生命などを脅かすだけでなく、将来的にもその損傷は、膝の不安定性を誘導することから容易に変形性関節症 (OA) へと発展する。また、アキレス腱損傷は近年増加傾向であり、壮年期ではスポーツ活動、老年期では転倒に関連して発生する。このように運動機能の中心的役割を担う靭帯や腱の機能維持や再生・修復機構を明らかにすることは靭帯・靭帯損傷の新たな治療法の開発につながるだけでなく、関節疾患の予防や治療法を開発する上でも重要な要素である。しかし、腱・靭帯についてはこれまで生体力学的研究は盛んに行なわれてきたが、腱や靭帯細胞マーカーとなる分子が同定されていない。この10年ほどで、転写因子である *Scleraxis* (*Scx*)、*Egr1* や *Mohawk* (*Mkx*) はマウス発生期より腱・靭帯形成部位に発現し、腱の発生・成熟に重要であることが遺伝子改変マウスの解析より明らかになりつつあるが、腱・靭帯細胞の性質や間葉系幹細胞 (MSC) から腱・靭帯細胞への分化メカニズムなどの分子生物学的な情報は他の運動器に比べても極めて少なく、その治療法は、未だに長期間に渡るギプス固定による保存的治療もしくは縫合術や自家腱移植手術によるもので、その治癒を促進する治療法は未だ開発されていない。

エピジェネティクス含む遺伝子発現制御のネットワークは、分子生物学的な情報における重要な要素である。申請者は、遺伝子発現制御に重要な因子として転写因子だけでなく、ノンコーディング RNA である microRNA (miRNA) に注目し、研究を行っている。miRNA は、組織や疾患特異的な発現様式を示し、発生や疾患など様々な生命現象に関与することが明らかになってきた。しかし、miRNA の腱・靭帯の発生/成熟および組織修復への関与は、マウスなど個体レベルでは明らかにされていない。そこで、多くの miRNA の生成に重要な酵素である DICER を腱・靭帯特異的にノックアウト (KO) したマウス (*Dicer* cKO) を解析することは非常に意義があると考えた。つまり、このマウスを解析することは、これまでマウスなど個体レベルで一切明らかになっていない miRNAs による腱・靭帯組織の発生・成熟機構への関与を解明できることを意味し、腱・靭帯において鍵となる特異的 miRNA や遺伝子の探索においても *Dicer* KO 表現系依存性および転写因子 *Scx* 制御下の miRNA や mRNA を明らかにできる可能性がある。

また、治療への応用については、MSC 移植治療による作用機序は、目的細胞への分化のみならず、MSC 由来のサイトカインなど液性因子によると考えられており、MSC 由来の分泌物を利用した有効性に基づく品質評価が容易な再生医療が望まれる。近年、分泌物の中でも miRNA などが含まれた細胞外小胞 (EVs いわゆるエクソソーム) が細胞間で相互作用するサイトカインのような機能を持つことで注目されはじめている。

2. 研究の目的

Dicer-miRNA による腱・靭帯組織の形成・成熟および修復機構への関与を解明すると同時に細胞外小胞 (EVs) を用いた新たな治療法の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) 腱・靭帯特異的 *Dicer* ノックアウトマウス (*Dicer* cKO) の解析

腱・靭帯特異的転写因子 *Scx* の発現制御領域下に *Cre* リコンビナーゼをノックイン (KI) した

Scx:CreKI マウスと *Dicer* floxed マウスを交配させ、腱特異的 *Dicer* 欠失 (*Dicer* cKO) マウスを作製・解析を行なった。若齢マウス(4 週齢)及び成獣マウス(10 週齢)の主な腱・靭帯、さらに 10 週齢 *Dicer* cKO のアキレス腱を切離し、切離後 4 週の腱の形態組織学的解析および機能評価を行なった。

腱の形態組織学的解析および機能評価

形態組織学的評価：肉眼的所見および HE 染色、Safranin-O 染色、Masson's Trichrome 染色、Picro-Sirius Red 染色 (I 型と III 型コラーゲン)による形態組織学的解析を行なった。免疫染色は、腱・靭帯構成マトリックスや増殖細胞やアポトーシスへの影響を調べるために BrdU や TUNEL 染色を行なった。また、腱・靭帯組織の微細構造を解析するために透過電子顕微鏡(TEM)によるコラーゲンフィブリル径の観察を行なった。機能評価については、マウス用の握力測定装置を用いた筋力測定および生体力学試験による腱・靭帯の破断強度の測定を行なった。さらに、トレッドミル上をマウスに歩行させ、動画による歩行解析を行なった。

(2) 腱・靭帯特異的 *Dicer* ノックアウトマウス (*Dicer* cKO) の遺伝子発現解析と腱・靭帯特異的 miRNA の同定

Dicer cKO の腱における遺伝子発現制御のネットワークから解明するために、各々マウスのアキレス腱組織より RNA を精製し、RNA-sequence により miRNA および mRNA の網羅的発現解析を行なった。また、同定した miRNA は、損傷腱由来腱線維芽細胞への miRNA mimic 過剰導入による遺伝子発現を解析した。

(3) MSC 由来細胞外小胞 (MSC-EVs) を用いた新たな治療法の開発

継代培養による MSC と MSC-EVs の性質の変化

継代数 5 と 12 のヒト骨髄由来 MSC (P5 MSC、P12 MSC) の細胞老化の状態を評価した。

P5 EVs および P12 EVs のアキレス腱修復促進効果を検証するため、P5 EVs および P12 EVs を培養腱線維芽細胞に添加した際の取り込まれ率、細胞増殖能と遊走能を評価した。

MSC-EVs によるアキレス腱損傷に対する治療効果

アキレス腱損傷モデルマウスを用いて、アキレス腱切離後翌日と 1 週後に切離部にそれぞれ P5 EVs、P12 EVs と対象群として PBS を注射した。切離後 1 週の修復組織内の線維量の違いをマッソントリクローム染色による組織学的評価、さらに切離後 4 週の修復組織を組織修復スコアリングシステムにより評価した。また、切離後 4 週時点の修復組織内のコラーゲン線維径を TEM により評価した。同定した miRNA およびコントロール miRNA をリポフェクション法により MSC に導入し、培養上清から目的 miRNA を豊富に含むエクソソームを精製し、実験に用いた。

MSC および MSC-EVs 表面の糖鎖プロファイリング

P5 および P12 MSC および MSC-EVs 表面の糖鎖プロファイリングを評価するためにレクチンアレーを用いて糖鎖プロファイリングを行なった。

4. 研究成果

(1) 腱・靭帯特異的 *Dicer* ノックアウトマウス (*Dicer* cKO) の解析

Dicer は細胞死や増殖、分化に関与しているとされるが、生後 3 日の *Dicer* cKO のアキレス腱では EdU 陽性である増殖腱線維芽細胞数が有意に低下していた。一方で、TUNEL 陽性腱線維芽細胞は検出されなかった。10 週齢で体長や体重などに顕著な差はなかったが、アキレス腱、膝蓋腱、前腕筋腱で

の肉眼的脆弱性を認めた。アキレス腱組織の横断面積は *Dicer* cKO で有意に小さく、単位面積あたりの細胞数には差がなかった。さらに、TEM によるコラーゲン線維径を計測したところ、*Dicer* cKO おいで小径のコラーゲンが多数有意に存在し、線維径の分布が乱れていた。さらに、肉眼的、組織的に脆弱性を呈した *Dicer* cKO の腱の機能について解析を行なった。筋力(握力)測定やアキレス腱実質の引っ張り試験による破断強度において有意な差はなかったが、引っ張りによる伸長が大きいことがわかった。また、歩行動作解析ではそれを反映するように足関節の可動域が有意に拡大していた。以上の結果より、*Dicer* cKO は腱の脆弱性をともなう機能低下を示した。さらに、アキレス腱損傷モデルを作成し、損傷後4週での腱修復における組織学的な違いについて腱修復スコアリングシステムを用いて比較した。*Dicer* cKO では、修復腱に異所整骨化へと至る軟骨化生像が散見され、治癒能力の有意な低下を認めた。

(2) 腱・靭帯特異的 *Dicer* ノックアウトマウス (*Dicer* cKO) の遺伝子発現解析と腱・靭帯特異的 miRNA の同定

Dicer cKO による miRNA の発現低下や遺伝子発現の変化が腱の低形成に関与している可能性がある。そこで RNA シーケンスによる網羅的遺伝子および miRNA 発現解析、さらにリアルタイム PCR により検証を行ったところ、*Dicer* cKO のアキレス腱で腱関連転写因子である *Scx*、*Mkx*、*Egr1* の発現が有意に低下しており、それらに制御されている主要な腱関連基質である *Col1a1*、*Col3a1*、*Tnmd* などの発現低下を認めた。また、腱幹/前駆細胞のマーカー遺伝子として報告のある *Pdgfr* や *Tppp3* の発現も有意に低下していた。実際、遺伝子オントロジー (GO) 解析によっても *Dicer* cKO により発現が減少した遺伝子群は、骨格系の発生や細胞外マトリクスの組織化といった生物学的プロセスや分子機能に関与していることが示された。さらに、腱で高発現し、*Dicer* cKO によって発現が減少する miRNA が *Dicer* cKO の表現型に深く関与しており、腱特異的 miRNA ではないかと考え、コントロールマウスに比べて *Dicer* cKO のアキレス腱において発現差の著しい上位 10 の miRNA に着目した。中でも miR-135a と miR-1247 は腱特異的な発現パターンを有しており、*Dicer* cKO において有意に発現が低下していた。そこで、損傷腱由来腱線維芽細胞に miR-135a mimic と miR-1247 mimic の過剰導入を試みたところ、miR-135a mimic の導入により転写因子 *Scx* や *Tnmd* などの腱基質遺伝子や腱幹/前駆細胞マーカー遺伝子 *Tppp3* の発現を誘導した。そして、*Dicer* cKO において発現が増加していた遺伝子群 (miR-135a の標的候補遺伝子を含む) は、GO 分析において細胞周期に最も関連していた。それゆえ、miR-135a は、腱幹/前駆細胞の増殖・分化などに関与しており、*Dicer* cKO で観察された腱の低形成に関連しているのかもしれない。

(3) MSC 由来細胞外小胞 (EVs) を用いた新たな治療法の開発

継代培養による MSC と MSC-EVs の性質の変化

継代培養による MSC と MSC-EVs の性質の変化を調べた。P12 MSC は、P5 MSC と比較し有意に増殖能が低下しており、SA-Gal 陽性細胞の割合や老化マーカー遺伝子の発現が有意に増加していたことから、細胞老化が誘導されていることが示された。P5 および P12 MSC より分泌した P5 MSC-EVs (P5 EVs) および P12 MSC-EVs (P12 EVs) の粒子数、粒子径は P5 EVs と P12 EVs で有意な差がなかった。

また、腱線維芽細胞への EVs 取り込み効率は P5 EVs、P12 EVs の間に差がなかったが、P5 EVs を添加した腱線維芽細胞では増殖能および遊走能が P12 EVs に比べて有意に増加した。

MSC-EVs によるアキレス腱損傷に対する治療効果

アキレス腱損傷モデルマウスへの MSC-EVs 投与実験において、切離後 1 週では修復組織内のコラーゲン線維量が P5 EVs 投与群で有意に増加していることが明らかとなり、さらに 4 週では有意に組織修復スコアが高かった。一方で P12 EVs 群は修復組織内の異所性軟骨化や修復組織周辺との癒着を起こす頻度が高かった。TEM による解析では、修復組織内のコラーゲン線維径が対照群および P12 EVs と比較し P5 EVs で有意に太いコラーゲン線維の形成が促進されていた。以上より、P5 MSC-EVs は老化した P12 MSC-EVs と比較して異所性軟骨化や癒着を抑えた良好なアキレス腱修復を促すことが明らかになった。さらに、miR-135 を豊富に含む EVs を添加した腱線維芽細胞では、細胞内における miR-135 が増加しており、今後アキレス腱損傷モデルマウスへの投与による修復促進効果とその分子機構について解析していく予定である。

MSC および MSC-EVs 表面の糖鎖プロファイリング

P5 および P12 MSC および MSC-EVs 表面の糖鎖プロファイリングを評価するため、レクチンアレーを用いて糖鎖プロファイリングを行った。フコース特異的レクチンである TJS- は、P12 EV と比較して P5 EV 表面に有意に高発現していた。糖鎖を指標とした MSC-EVs の質を評価できる可能性が示唆された。

本研究は、靭帯・腱特異的 *Dicer* KO マウスが腱関連遺伝子や miRNA の発現減少を介した腱の脆弱性や機能低下、治癒能力の低下を示したことから、DICER-miRNA は腱の成熟に関与しており、中でも miR-135a が腱の成熟や治癒に重要な役割があることが示唆された。また、MSC-EVs はアキレス腱修復を促進し、治療効果の高い（質の高い）MSC-EVs は EVs 分泌細胞の継代数に依存しており、その指標として EVs 表面の糖鎖が利用できることを提唱した。今後、miR-135a の標的遺伝子の同定や腱発生や成熟への関与を遺伝子改変マウスにより明らかにするとともに、miR-135a を利用した MSC-EVs の実用化に向けて EVs 表面の糖鎖を利用した EVs の質の評価法やより質の高い EVs のみを単離する技術などの開発により、新たな腱再生・修復治療法へと発展することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hayashi Y, Yimiti D, Sanada Y, Ding C, Omoto T, Ogura T, Nakasa T, Ishikawa M, Hiemori K, Tateno H, Miyaki S, Adachi N.	4. 巻 596(8)
2. 論文標題 The therapeutic capacity of bone marrow MSC-derived extracellular vesicles in Achilles tendon healing is passage-dependent and indicated by specific glycans.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Lett.	6. 最初と最後の頁 1047-1058
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14333.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Omoto T, Yimiti D, Sanada Y, Toriyama M, Ding C, Hayashi Y, Ikuta Y, Nakasa T, Ishikawa M, Sano M, Lee M, Akimoto T, Shukunami C, Miyaki S, Adachi N.	4. 巻 10
2. 論文標題 Tendon-Specific Dicer Deficient Mice Exhibit Hypoplastic Tendon Through the Downregulation of Tendon-Related Genes and MicroRNAs.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2022.898428	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Dilimulati Yimiti、味八木茂、内部健太、中佐智幸、石川正和、安達伸生
2. 発表標題 腱修復時における異所性骨化に対するレチノイン酸受容体アゴニストの治療効果
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Omoto T, Miyaki S, Sanada Y, Toriyama M, Hayashi Y, Nakasa T, Ishikawa M, Adachi N.
2. 発表標題 The role of Dicer-miRNA pathway in development/maturation of tendon
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society (ORS)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大本武児、味八木茂、眞田洋平、中佐智幸、石川正和、亀井直輔、宿南知佐、安達伸生
2. 発表標題 RNAプロセッシング酵素Dicerは腱の発生・成熟および損傷修復過程に關与する
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

1. 発表者名 Hayashi Y, Miyaki S, Sanada Y Tateno H, Kamei N, Ishikawa M, Nakasa T, Adachi N.
2. 発表標題 Mesenchymal stem cells-derived exosomes in Achilles tendon repair and its quality evaluation by glycan epitopes.
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society (ORS),
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大本武児、味八木茂、眞田洋平、中佐智幸、石川正和、亀井直輔、宿南知佐、安達伸生
2. 発表標題 腱の発生および損傷修復過程におけるRNAプロセッシング酵素Dicerの役割
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020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	味八木 茂 (Miyaki Shigeru) (10392490)	広島大学・病院(医)・講師 (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	亀井 直輔 (Kamei Naosuke) (70444685)	広島大学・医系科学研究科(医)・准教授 (15401)	
研究分担者	石川 正和 (Ishikawa Masakazu) (60372158)	香川大学・医学部・教授 (16201)	
研究分担者	中佐 智幸 (Nakasa Tomoyuki) (60467769)	広島大学・病院(医)・講師 (15401)	
研究分担者	宿南 知佐 (Shukunami Chisa) (60303905)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授 (15401)	

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