

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09481

研究課題名（和文）TGF- $\beta$ 2によるScx/Sox9共陽性細胞を標的とした腱板修復促進治療の開発研究課題名（英文）Effects of TGF- $\beta$ 2 on mobilization of enthesis-related progenitor and tendon-to-bone healing in a rat rotator cuff repair model

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では腱板修復過程におけるTGF- $\beta$ 2のScx/Sox9共発現細胞の動員と修復促進効果を野生型とScxGFP遺伝子改変ラットモデルで検証した。術後6週の力学試験では群間に有意差はなかった。また、術後2週の組織では両群で骨近傍に少数のScx/Sox9共発現細胞が確認され、術後4週ではScx/Sox9共発現細胞は減少し、線維軟骨層の修復はみられなかった。本モデルにおいてTGF- $\beta$ 2によるScx/Sox9共発現細胞の動員促進、線維軟骨層修復促進、および力学強度の上昇などの効果は確認されなかった。その一因として、Scx/Sox9共発現細胞に分化する内在性の前駆細胞の不足の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

本研究では成熟ラットの腱板縫合後の腱骨間の修復過程において、TGF- $\beta$ 2の投与による修復促進効果は認められなかった。また、成熟動物の修復過程において内在性のTGF- $\beta$ シグナルはある程度充足している一方で、線維軟骨層の修復に寄与する前駆細胞が著しく不足している可能性が示唆された。これらの結果は今後の腱板修復を促進する治療法の確立のための新たな戦略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）：Specific multipotent Scleraxis (Scx)- and Sox9-positive progenitors contribute to enthesis development. We verified the effects of TGF- $\beta$ 2 on the mobilization of Scx+ and Scx+/Sox9+ progenitors and repair-promotion after rotator cuff (RC) repair in mature ScxGFP transgenic rats. We found that few Scx+ and Scx+/Sox9+ cells transiently emerged at the repair site but failed to heal fibrocartilaginous enthesis within 4 weeks after surgery in both groups; many pSmad3-positive cells were also found between the tendon and bone, suggesting sufficient endogenous TGF- $\beta$  signals. In this model, TGF- $\beta$ 2 did not enhance the recruitment of Scx+/Sox9+ cells and regeneration of the fibrocartilage layer or increase the mechanical strength at the repair site. This may be due to the lack of endogenous progenitors that respond to TGF- $\beta$  signals and contribute to healing after surgery. Our findings could lead to new strategies for establishing repair-promoting treatments after RC repair in the future.

研究分野：整形外科

キーワード：腱板修復 enthesis Scleraxis Sox9 TGF- $\beta$ 2 progenitor

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

腱板修復術後の再断裂は未だに臨床上の課題である。我々は過去に動物モデルを用いて fibroblast growth factor (FGF) -2 などの腱板修復過程で内在性に作用するサイトカインを局所投与することで、術後の組織学的所見や力学強度が改善することを報告してきたが (Tokunaga T, et al. Am J Sports Med 2015) 本来の線維軟骨層を介した腱板付着部構造の再生を促す治療法は確立されていない。

発生過程の細胞系譜追跡の手法を用いた研究で、軟骨細胞や腱細胞に分化し、腱付着部を形成する前駆細胞として bHLH 型転写因子の scleraxis (Scx) と SRY-box 9 (Sox9) を共発現する細胞が同定された (Sugimoto Y, et al. Development 2013) 。また、腱発生過程における前駆細胞の制御因子の一つとして transforming growth factor (TGF- $\beta$ ) シグナルが報告されている (Pryce BA, et al. Development 2009) 。

近年、我々は腱・靭帯細胞の転写因子である Scx の発現制御領域の下流に EGFP 遺伝子を挿入し Scx の発現を EGFP の発現でモニター可能とした 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、内在性の Scx/Sox9 共発現細胞が成体の腱板付着部損傷後の修復過程に一過性に参画すること、また、3 週齢の幼若期では Scx/Sox9 共発現細胞が線維軟骨層の修復に寄与する可能性を報告した (Ideo K, Tokunaga T, et al. PLoS One 2020) 。これらの結果は、内在性の Scx/Sox9 共発現細胞による修復機構が成体でも限定的に備わっており、この細胞が TGF- $\beta$  シグナルに制御されている可能性を示唆するものと考えられた。これらの知見から、「TGF- $\beta$ 2 が内在性の Scx/Sox9 共発現細胞の動員を促し線維軟骨層の再構築および力学強度の上昇に寄与する可能性」という本研究の仮説に至った。さらに、当教室では ScxGFP 遺伝子改変ラットの作製に成功し、マウスではサイズの難しい腱板の縫合手術や薬剤の局所投与実験が可能となった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ScxGFP 遺伝子改変ラットの腱板 (棘上筋腱) 縫合モデルを用いて TGF- $\beta$ 2 の局所投与の Scx/Sox9 共発現細胞の動員への影響と腱板修復促進効果を力学試験と組織評価により検証することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 腱板修復 (棘上筋腱縫合) モデルの作製と TGF- $\beta$ 2 の局所投与

組織学的評価は本学施設で飼育、繁殖した ScxGFP 遺伝子改変ラット (18 - 20 週齢) を使用し、力学強度評価は購入した野生型 SD ラット (18 - 20 週齢) を使用した。過去の報告 (Tokunaga T, et al. Am J Sports Med 2015) と同様に、全身麻酔下に左肩の皮膚と三角筋を展開し棘上筋腱を露出後、メスで鋭的に切離し上腕骨付着部線維軟骨を円筒形電動ドリルで除去後に断端をプロリン糸で骨に縫合した。修復の際に TGF- $\beta$ 2 (R&D Systems) (100 ng/site) を徐放担体 (ゼラチンハイドロゲル: Medgel シート, 株式会社メドジェル) に含浸させ腱骨間に留置した TGF 群と PBS 含浸担体を留置した対照群を比較した。術後 2 週、4 週で組織学的評価を行い、術後 6 週に力学試験を行った。

### (2) 力学試験

術後 6 週に肩組織を採取し、トリミングした棘上筋腱・上腕骨修復部試料を張力測定器 (EZ-

Test, 島津製作所) による引っ張り破断試験で修復組織の力学強度を評価した。また、破断部の断面積をマイクロキャリパーで測定し、修復組織の最大破断強度(N)、剛性(N/mm)、最大破断応力(N/mm<sup>2</sup>)を算出し TGF 群と対照群を比較した。

### (3) 組織学的評価および免疫組織学的評価

採取組織を 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、修復部の組織所見をトルイジンブルー染色、アリザリンレッド・アルカリフォスファターゼ (AP) 染色により評価した。修復組織中の Scx と Sox9 の発現は抗 GFP 抗体 (Abcam)、抗 Sox9 抗体 (Millipore) を一次抗体として 4°Cで終夜反応させた後、Alexa Fluor コンジュケート二次抗体 (Thermo Fisher Scientific) で反応後観察した。修復組織中の TGF-β シグナルの評価は抗 pSmad3 抗体 (Rockland Immunochemicals) を一次抗体として 4°Cで終夜反応させた後 Alexa Fluor コンジュケート二次抗体 (Thermo Fisher Scientific) で反応後観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 腱板縫合モデルに対する TGF-β2 の局所投与の修復部力学強度への影響

術後 6 週の最大破断強度 (TGF 群, 17.2±4.8; 対照群 14.9±5.0[N], p=0.26)、剛性 (TGF 群, 9.5±3.3; 対照群 11.4±2.7[N/mm], p=0.08)、修復部断面積 (TGF 群, 10.1±1.8; 対照群 10.3±1.8[mm<sup>2</sup>], p=0.93)、最大破断応力 (TGF 群, 1.8±0.7; 対照群 1.5±0.5[N/mm<sup>2</sup>], p=0.35) はいずれも TGF 群と対照群の間に有意な差はなかった (図 1)。

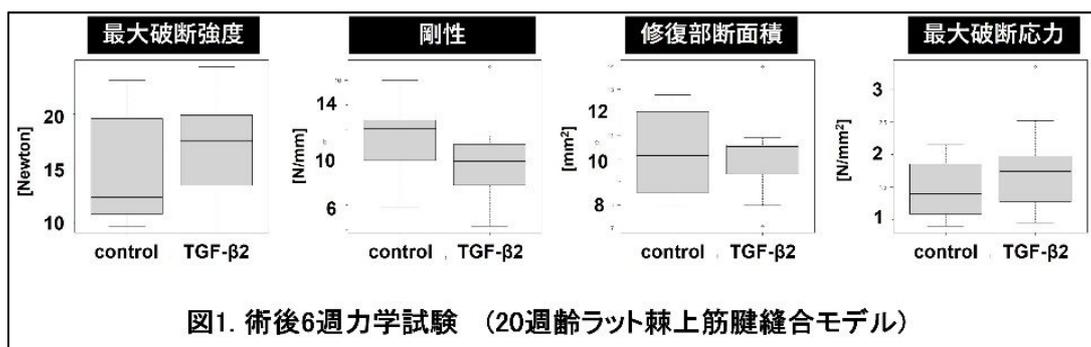


図1. 術後6週力学試験 (20週齢ラット棘上筋腱縫合モデル)

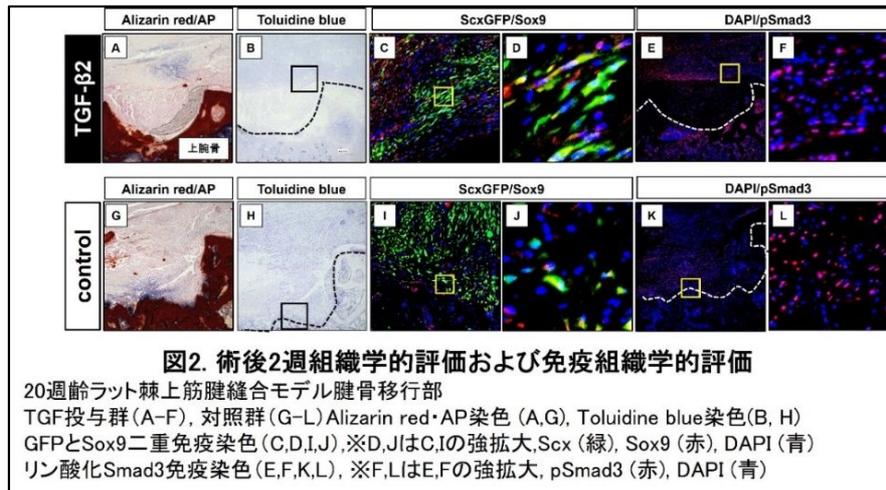
### (2) 腱板修復過程における TGF-β2 の局所投与の組織学的所見への影響

術後 2 週では、両群で腱骨間に残存した担体シートを認め、シートの表層と深層に血管が豊富な疎性線維性組織の形成が認められた。アリザリンレッド・AP 染色では、修復組織中の石灰化領域や AP 活性領域に群間で明らかな差はなかった (図 2A, G)。また、トルイジンブルー染色では、両群で線維軟骨層の形成はみられなかった (図 2B, H)。術後 4 週では腱骨間の担体シートは吸収され、血管と細胞が豊富な疎性線維性組織中の形成が認められた。術後 2 週と同様にアリザリンレッド・AP 染色では、修復組織中の石灰化領域や AP 活性領域に群間で明らかな差はなく (図 3A, F)、トルイジンブルー染色では両群で線維軟骨層の形成はみられなかった (図 3B, G)。

### (3) 腱板修復過程における TGF-β2 の局所投与の Scx/Sox9 共発現細胞の動員への影響

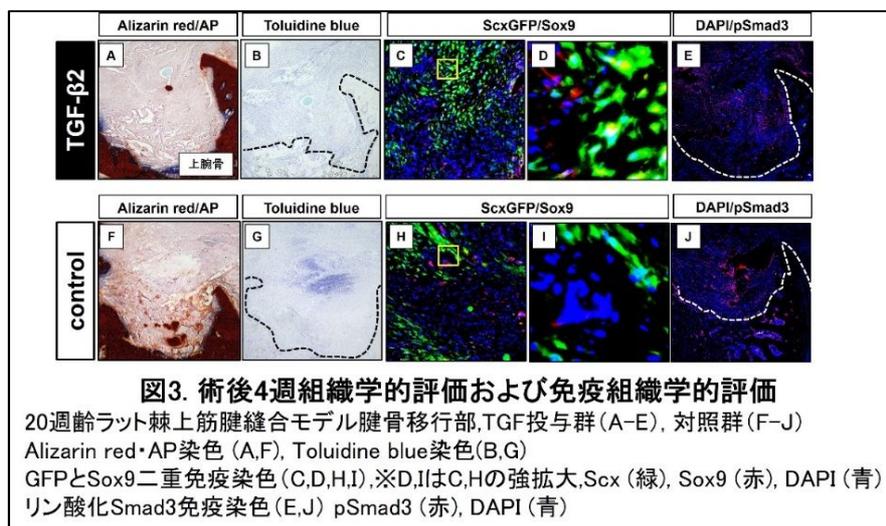
術後 2 週の TGF 群では腱骨間に残存した担体シートの表層に局在する多数の Scx 発現細胞と少数の Sox9 発現を認め、一部は Scx と Sox9 を共発現していた (図 2C, D)。対照群にお

いてもその局在に明らかな差はなく、腱骨移行部の修復組織中に少数の Scx/Sox9 共発現細胞が認められた（図 2I, J）。術後 4 週では、両群ともに腱骨移行部から腱実質に広く分布する Scx 発現細胞を認めたが、Sox9 発現細胞は 2 週と比較して減少し、Scx/Sox9 共発現細胞はほとんど認められなかった（図 3C, D, H, I）。本モデルへの TGF- $\beta$ 2 の局所投与により明らかな Scx/Sox9 共発現細胞の動員促進作用は確認されなかった。



#### (4) 腱板修復過程における TGF- シグナル

術後 2 週の TGF 群では腱骨間に残存した担体シートの表層に局在する pSmad3 発現細胞を認め、Scx 発現細胞の局在と類似していた。（図 2E, F）。対照群では、シート表層に局限する局在パターンはみられなかったが、腱骨移行部に広く分布する pSmad3 発現細胞が認められた（図 2K, L）。術後 4 週では、両群ともに腱骨移行部に形成された血管が豊富な線維性組織内と腱側に分布する pSmad3 発現細胞がみられ、その局在パターンは群間に明らかな差は認められなかった（図 3E, J）。これらの結果から、術後 2 週ではシートに含浸した TGF- $\beta$ 2 が、修復組織中の細胞に非選択的に作用した可能性が示唆された。また、対照群においても修復組織中に広く pSmad3 発現細胞がみられたことから、内在性の TGF- $\beta$  の影響が示唆された。



本研究ではラット腱板縫合モデルへの TGF- $\beta$ 2 の局所投与による Scx/Sox9 共発現細胞の動員促進や線維軟骨層の修復促進、および力学強度の上昇はみられなかった。幼若マウスモデルを用いた先行研究では、3 週齢マウスの腱板付着部損傷後において 20 週齢の成熟マウスより多数の Scx/Sox9 共発現細胞が動員され、4 週までに付着部線維軟骨層の再構築がみられることを報告した (Ideo K, Tokunaga T, et al. PLoS One 2020)。さらに、幼若マウスの修復過程では、pSmad3 陽性細胞が増加することが確認された。本研究では、過去のラットモデルを用いた研究 (Tokunaga T, et al. Am J Sports Med 2015) と同様に、薬剤投与群においても術後に腱骨間の線維軟骨層の再構築はみられなかった。また、ラット棘上筋腱縫合モデルで TGF- $\beta$ 1 の局所投与の効果を検証した先行研究 (Arimura H, et al. Am J Sports Med 2017) では、TGF- $\beta$ 1 の腱板修復部への局所投与によって早期の修復組織中の Scx の発現の上昇はみられず、成熟動物の修復過程では、内在性に動員される腱および軟骨の前駆細胞が不十分であることが示唆された。今回の成熟した ScxGFP 遺伝子改変ラットモデルの解析では、腱板修復過程において Scx 発現細胞の参画が確認されたが、Sox9 発現細胞および Scx/Sox9 共発現細胞の参画は限定的であった。これは、成熟動物の腱板修復過程において Scx/Sox9 共発現細胞より未分化な前駆細胞の動員が不十分である可能性、また、TGF- $\beta$  シグナルに応答する前駆細胞が不十分である可能性が示唆された。今後の修復過程における Scx/Sox9 共発現細胞の由来や制御因子のさらなる研究は、効果的な腱板修復促進治療の確立に繋がることが期待される。

#### [参考文献]

1. Tokunaga T, Shukunami C, Okamoto N, et al. FGF-2 stimulates the growth of tenogenic progenitor cells to facilitate the generation of enomodulin-positive tenocytes in a rat rotator cuff healing model. Am J Sports Med. 2015;43(10):2411-2422.
2. Sugimoto Y, Takimoto A, Akiyama H, et al. Scx1/Sox91 progenitors contribute to the establishment of the junction between cartilage and tendon/ligament. Development. 2013;140(11):2280-2288.
3. Pryce BA, Watson SS, Murchison ND, et al. Recruitment and maintenance of tendon progenitors by TGFbeta signaling are essential for tendon formation. Development. 2009;136(8):1351-1361.
4. Ideo K, Tokunaga T, Shukunami C, et al. Role of Scx+/Sox9+ cells as potential progenitor cells for postnatal supraspinatus enthesis formation and healing after injury in mice. PLoS One. 2020;15(12):e0242286.
5. Kawamoto T. Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants. Arch Histol Cytol. 2003;66 (2):123-143.
6. Arimura H, Shukunami C, Tokunaga T, et al. TGF-beta1 improves biomechanical strength by extracellular matrix accumulation without increasing the number of tenogenic lineage cells in a rat rotator cuff repair model. Am J Sports Med. 2017;45(10):2394-2404.

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 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
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福間 裕子, 徳永 琢也, 井手尾 勝政, 谷村 峻太郎, 唐杉 樹, 宮本 健史
2. 発表標題 ScxGFP遺伝子改変ラットを用いた腱板修復過程の解析
3. 学会等名 第48回日本肩関節学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福間 裕子, 徳永 琢也, 谷村 峻太郎, 井手尾 勝政, 唐杉 樹, 宮本 健史
2. 発表標題 ScxGFP遺伝子改変ラット腱板修復過程における前駆細胞の解析
3. 学会等名 第49回日本肩関節学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福間 裕子, 徳永 琢也, 谷村 峻太郎, 唐杉 樹, 宮本 健史
2. 発表標題 ScxGFP遺伝子改変ラットを用いた腱板成熟および修復過程の解析
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 徳永 琢也, 谷村 峻太郎, 福間 裕子, 米満 龍史, 井手尾 勝政, 唐杉 樹, 宮本 健史
2. 発表標題 腱板修復を担う前駆細胞の探索と修復促進の試み
3. 学会等名 第21回運動器科学研究会
4. 発表年 2022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	唐杉 樹  (Karasugi Tatsuki)  (80706482)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・講師   (17401)	

	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	福間 裕子  (Fukuma Yuko)	熊本大学・大学院医学教育部・大学院生   (17401)	
研究協力者	谷村 峻太郎  (Tanimura Shuntaro)	熊本大学・大学院医学教育部・大学院生   (17401)	
研究協力者	宮本 健史  (Miyamoto Takeshi)  (70383768)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授   (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
---------	---------