

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17999

研究課題名（和文）老化細胞と組織線維化を標的とした腱変性および腱損傷の新規治療の探索

研究課題名（英文）Exploratory research for tendon injury therapy targeting tissue fibrosis and heterotopic ossification

研究代表者

生田 祥也（Ikuta, Yasunari）

広島大学・病院（医）・助教

研究者番号：50856086

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）：マウスアキレス腱損傷モデルでは、癒痕形成や異所性骨化がみられ、腱修復能の低下が示された。そして、腱組織特異的Dicer遺伝子欠失マウスは腱修復能の低下がさらに顕著に現れた。癒痕形成や異所性骨化を標的としたレチノイン酸受容体アゴニストの投与によるマウスアキレス腱損傷モデルの解析では、レチノイン酸受容体アゴニストの投与により形態組織学的に良好な腱修復と異所性骨化の抑制を確認した。また単離した腱由来線維芽細胞を使用した実験系において同薬剤の添加は、軟骨分化やサイトカインの発現を抑制させることを確認した。アキレス腱損傷モデルにおいてレチノイン酸受容体アゴニストは、腱修復を促進することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腱修復過程における癒痕形成、異所性骨化は修復腱の強度を低下させ、再断裂のリスクとなるが、これらを直接標的とした腱修復治療はこれまで確立されていなかった。本研究は、腱修復過程の癒痕形成、異所性骨化に関連する分子機構の一部を明らかにした。さらにレチノイン酸受容体アゴニストの腱修復過程における癒痕化や異所性骨化の抑制効果を介した腱修復の促進効果を明らかにした。腱の線維化や異所性骨化を標的とした腱損傷に対する新たな治療法への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In the Achilles tendon injury model, scar formation and heterotopic ossification (HO) were observed during tendon repair. Tendon tissue-specific Dicer gene-deficient mice showed even more significant reduction in tendon repair ability. Local administration of a retinoic acid receptor agonist (RARA) targeting scar formation and HO in Achilles tendon injury model resulted in histologically favorable tendon repair. Furthermore, in vitro experiments using isolated tendon-derived fibroblasts, RARA inhibited cartilage differentiation and cytokine expression. Thus, RARA was shown to promote tendon repair in a mouse Achilles tendon injury model.

研究分野：整形外科

キーワード：腱修復 線維化 異所性骨化 マウスアキレス腱損傷モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦では65歳以上の高齢者人口は約3460万人、割合は総人口の27.3%と増加傾向にあり、高齢社会における健康寿命の延伸では運動器障害が大きな問題となる。スポーツ愛好家の障害と考えられてきたアキレス腱断裂の発生数は人口10万人あたり6.3人から37.3人と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。しかし、その治療法は以前よりほとんど変わっていない。アキレス腱断裂の病因の一つは、腱の退行性変化「変性」であると考えられる。腱は、組織学的に平行に配列したコラーゲン線維束と線維芽細胞から形成され、コラーゲン組織自体の伸縮性は乏しいが平行に配列した波状のコラーゲン線維が直線化することで張力が生じる。そして、加齢したヒトの腱では、コラーゲン線維の配向は不整となり、弾性、強度、腱細胞数と細胞増殖能が低下している。

現在のアキレス腱断裂治療における最大の問題点は再断裂であり、手術治療後の再断裂率は4.4%、保存治療後は10.6%である。腱損傷後の修復は炎症期、増殖期、リモデリング期と進むが、炎症期に線維化を惹起し、増殖期には過度の癒痕組織形成と3型コラーゲンの沈着により、主に癒痕組織による修復が生じる。また、異所性骨化(HO)も腱損傷後の修復腱で頻発される。このような腱修復過程における線維化・癒痕形成や異所性骨化は修復腱の力学的強度を低下させ、再断裂のリスクとなることが示唆されているが、この癒痕形成・HOを直接標的とした腱損傷の治療はこれまでにない。このため腱における癒痕形成やHOの分子機構解明は、癒痕形成やHOを標的とした治療への応用が期待されることから、修復腱の力学的強度の増加を介した再断裂の抑制に繋がる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腱修復過程の癒痕形成やHOを標的とした新たな腱損傷治療の確立に向けた腱修復に関する分子機構解明と新たな腱修復治療を探索することである。

3. 研究の方法

(1) 加齢および損傷にともなうマウスアキレス腱の変化

加齢にともなうマウスアキレス腱の変性について、老化促進マウスであるSAMP8 (Senescence Accelerated Mouse-Prone 8)、C57BL6Jマウスの自然加齢モデル(2~20ヶ月齢)とアキレス腱損傷モデル(損傷後4週)を作製し、下記の項目を実施した。

アキレス腱の形態組織学的解析

組織学的評価は、H.E染色、Safranin-O染色、Masson's Trichrome染色、Picro-Sirius Red染色および免疫染色(2型コラーゲン)を行なった。また、透過型電子顕微鏡(TEM)によるコラーゲン線維の観察を行なった。

アキレス腱の遺伝子発現解析

アキレス腱組織のRNAを抽出し、リアルタイムPCRによる腱関連遺伝子の発現を解析した。

(2) アキレス腱損傷モデルの解析

C57BL6Jマウスと腱・靭帯特異的Dicerノックアウトマウス(Dicer cKO)

腱特異的転写因子Scleraxis (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)マウスを作製した。各々10週齢マウスのアキレス腱を切離した損傷モデルを作製し、切離後4週時の修復腱における形態組織学的解析など下記の項目を実施した。

アキレス腱の形態組織学的および機能解析

組織学的評価は、H.E染色、Safranin-O染色、Masson's Trichrome染色、Picro-Sirius Red染色および免疫染色(2型コラーゲン)を行なった。そして、腱修復組織スコアリングシステムによりアキレス腱の修復程度の評価を行なった。また、腱組織の微細構造を解析するため透過型電子顕微鏡(TEM)によるコラーゲン線維の観察を行なった。機能評価として生体力学試験による腱の破断強度を測定した。またマウスをトレッドミル上で歩行させ、撮影した動画から歩行解析を行なった。

アキレス腱の遺伝子発現解析

アキレス腱組織のRNAを抽出し、リアルタイムPCRによる腱関連遺伝子の発現を解析した。

(3) アキレス腱損傷モデルにおけるレチノイン酸受容体アゴニストの効果

腱組織での線維化・癒痕形成やHOの抑制を標的とした腱修復について、これまでに特異性肺線維症や肝線維化や進行性骨化性線維異形成症(FOP)などで臨床試験に使用されている薬剤を選択した。10週齢のC57BL/6Jマウスのアキレス腱損傷モデルを作製し、術後3日目より腱損傷部へ薬剤の局所投与を行ない、癒痕やHOの抑制を介した腱修復への影響を調べるために下記の項目を実施した。

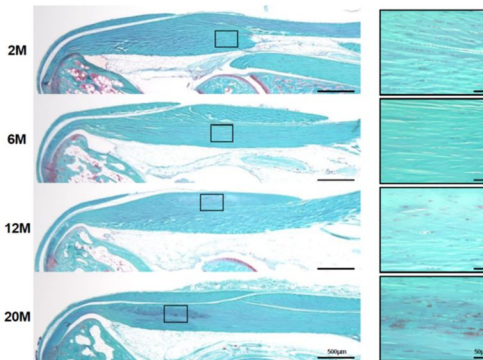
術後4週に形態組織学的評価としてSafranin-O染色、HE染色、Masson染色、Picrosirius Red

染色を行い、さらに腱前駆・幹細胞、腱細胞や軟骨マーカーの免疫染色を行い、腱修復への効果を調べた。そして、腱修復組織スコアリングシステムによりアキレス腱の修復程度の評価を行なった。また、損傷アキレス腱由来培養細胞に薬剤を添加し、軟骨分化誘導や増殖・遊走能、炎症などに対する評価および修復組織における遺伝子発現を解析した。

4. 研究成果

(1) 加齢にともなうマウスアキレス腱の解析

SAMP8 の骨関節組織における形態組織学的解析を行ったところ、9 週齢より骨密度の低下、11 週齢より半月板の変性、14 週齢より膝関節軟骨の変性など老化促進を反映した変化がみられた。さらに 23 週齢では変形性関節症を呈しており、対照マウスである SAMR1 の同週齢と比較して関節変性が有意に進行していた。一方でアキレス腱については肉眼的所見および HE 染色、Masson trichrome 染色での形態組織学的な差異はみられず、個体によっては Safranin O 染色において踵骨付着部周囲に腱の変性過程で生じる軟骨化生を認めたが、23 週齢において H0 のような変性の進行はみられなかった。C57BL6J マウスの自然加齢モデル (2~20 ヶ月齢) のアキレス腱については、12 ヶ月齢で形態的に軟骨様細胞が散見され、腱の変性過程で生じる軟骨化生を認め、20 ヶ月齢のアキレス腱実質部においては Safranin O 陽性の軟骨化生を認め、変性が進行していた (図)。TEM によるコラーゲン線維の観察では、顕著な変化は認められなかった。Scx や Mxk といった転写因子や腱基質である Tnmd などの腱関連遺伝子の発現は、加齢とともに減少していた。



C57BL/6Jマウスの自然加齢におけるアキレス腱の変性

(2) アキレス腱損傷モデルの解析

C57BL6J マウス:

C57BL/6J マウスのアキレス腱損傷モデルは、損傷後 4 週において炎症細胞が認められ、Safranin-0 や 2 型コラーゲン陽性となる軟骨化生の領域が増加しており、アキレス腱修復組織内の異所性軟骨化が観察された。TEM によるコラーゲン線維の観察では、ほとんどが未熟な線維であった。

Dicer cK0:

Dicer cK0 マウスのアキレス腱組織の断面積は、有意に小さく、TEM によるコラーゲン線維の観察では、小径のコラーゲン線維が有意に多く、対照マウスとは線維径の分布が異なっていた。また、引張試験によるアキレス腱の破断強度に有意差はみられなかったが、Dicer cK0 では引張時の伸長が大きかった。マウスの歩行動作解析では足関節の可動域が有意に拡大しており、過伸張による腱の機能低下が示唆された。アキレス腱損傷モデルにおいては、Dicer cK0 は、C57BL/6J マウスと比較して、損傷後 4 週時に修復腱においてより多くの軟骨化生を認め、Safranin-0 や 2 型コラーゲン陽性となる軟骨化生の領域が増加しており、アキレス腱修復組織内の H0 の増加を認め、腱修復スコアも低値を示した。

(3) アキレス腱損傷モデルにおけるレチノイン酸受容体アゴニストの効果

損傷後 4 週における組織学的解析では、レチノイン酸受容体アゴニストの投与により、Safranin-0 や 2 型コラーゲン陽性となる軟骨化生の領域が減少しており、アキレス腱修復組織内の H0 が抑制され、炎症細胞も減少するなど、腱修復スコアも有意に腱修復が促進していることを示した。また、レチノイン酸受容体アゴニストは、修復腱由来培養細胞を用いた軟骨分化誘導系においても、Sox9、Col2a1 などの発現を減少させ、軟骨分化を有意に抑制した。さらに、遊走能の増加や IL-1 刺激による IL-6 など炎症性サイトカインの遺伝子発現を抑制した。現在、トレッドミル上で歩行させ、撮影した動画から歩行解析を行っており、レチノイン酸受容体アゴニストによる修復アキレス腱の機能評価を行なっている。

結論

アキレス腱損傷モデルでは、癒痕形成や H0 がみられ、腱修復能の低下が示された。そして、腱組織特異的 Dicer 遺伝子欠失マウスは H0 の増加など腱修復能の低下がさらに顕著に現れた。癒痕形成や H0 を標的としたレチノイン酸受容体アゴニストの投与は、マウスアキレス腱損傷モデルにおいて形態組織学的に良好な腱修復と H0 の抑制を認めた。レチノイン酸受容体アゴニストは、培養腱由来線維芽細胞における軟骨分化誘導やサイトカインの発現を抑制し、遊走能を増加させた。本研究より、アキレス腱損傷モデルにおいてレチノイン酸受容体アゴニストは、腱修復を促進することが示された。レチノイン酸受容体アゴニストは、腱の癒痕化や H0 を標的とした腱損傷に対する新たな治療法への応用が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Omoto Takenori, Yimti Dilimulati, Sanada Yohei, Toriyama Minoru, Ding Chenyang, Hayashi Yuta, Ikuta Yasunari, Nakasa Tomoyuki, Ishikawa Masakazu, Sano Masayuki, Lee Minjung, Akimoto Takayuki, Shukunami Chisa, Miyaki Shigeru, Adachi Nobuo	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 Frontiers in Cell and Developmental Biology	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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