

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号： 1 7 4 0 1

研究種目： 若手研究

研究期間： 2020 ~ 2021

課題番号： 2 0 K 1 8 0 3 3

研究課題名（和文） 腱板修復術後のScx/Sox9共陽性細胞を介した修復機序の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the healing mechanism mediated by Scx+/Sox9+ cells after rotator cuff repair

研究代表者

井手尾 勝政（Ideo, Katsumasa）

熊本大学・病院・特任助教

研究者番号： 2 0 8 6 8 9 7 1

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では腱板縫合後の腱骨修復過程におけるScxおよびSox9陽性細胞の影響を明らかにするために異なる週齢のScxGFP遺伝子改変ラットの腱板修復モデルを用いて修復過程を組織学的に評価した。その結果、3-12週齢で正常の線維軟骨層の修復は認めなかったが、3週齢の術後4週の一部の修復部に軟骨様組織の形成が確認された。また、生後の成熟および修復過程の早期の腱骨移行部にScx、Sox9陽性細胞と少数の共陽性細胞が確認された。これらの結果から腱骨移行部の成熟過程に存在するScx、Sox9陽性細胞が前駆細胞様の特性を有し、成体の腱板縫合後の修復過程に限定的に参画している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

肩腱板断裂は肩関節の機能低下をきたす疾患であり、加齢に伴い増加することが示されている。今後の高齢化社会において手術患者の増加が予想される。腱板修復術後の課題として再断裂や術後長期の固定を要する点が挙げられる。本研究では、新たな腱板修復促進の標的として、腱と骨の連結部の前駆細胞の候補として、発生期に腱付着部の形成に寄与するScx/Sox9共陽性細胞に着目し、遺伝子改変ラット腱板修復モデルを用いて解析を行った。その結果、内在性のScx/Sox9共陽性細胞の腱板修復への参画が示唆された。本成果は、これらの前駆細胞を標的とした修復促進治療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）：Studies have shown that Scx and Sox9 expressing cells, specific progenitors, have contributed towards enthesis formation during mouse embryonic development. Here, we histologically investigated the involvement of Scx+ and Sox9+ cells in tendon-to-bone healing after rotator cuff (RC) surgical repair using a ScxGFP Tg rat model with different ages. A normal fibrocartilage layer was not recreated in 3-12-week-old rats by six weeks post-operative, but the formation of osteochondral-like tissue was observed in some 3-week-old rats by four weeks post-operative. Localization of Scx, Sox9, and several Scx and Sox9 co-expressing cells were noted at the RC tendon-to-bone insertion site during postnatal maturation and early phase of post-operative healing. More cells were observed in 3-week-old rats. This indicates that Scx and Sox9 expressing cells may have progenitor cell-like characteristics and may be limitedly involved during tendon-to-bone healing after RC surgical repair.

研究分野： 腱板修復

キーワード： 腱板修復 scleraxis SRY-box 9 Scx/Sox9共陽性細胞 線維軟骨性付着部

1. 研究開始当初の背景

腱板断裂は肩関節の運動障害や疼痛を主症状とする。断裂は付着部近傍に生じることが多く、手術療法として、断裂した腱板を元の付着部に縫着する腱板修復術が行われるが、術後の再断裂は臨床上的な重要な課題である。その一因として、術後の腱骨間には脆弱な線維性瘢痕が形成され、本来の水準の力学強度への回復は困難であることが動物モデルで示されている。そのため、腱板修復促進に関する基礎研究が行われてきたが、これまでに実験レベルにおいても機能的な正常構造の再生は困難とされ、腱とその付着部構造の修復、再生に寄与する前駆細胞に関してほとんど解明されていない。

近年、胎生期のマウスアキレス腱付着部の腱原基と軟骨原基の間に bHLH 型転写因子の Scleraxis と、軟骨組織のマスター転写因子である Sox9 を共発現する細胞の局在が確認された。さらに、遺伝子改変動物を用いた系譜追跡および欠失実験により Scx/Sox9 共陽性細胞が腱付着部の形成に寄与する前駆細胞である可能性が示されている。

申請者は先行研究で *ScxGFP* 遺伝子改変マウスの棘上筋腱付着部に欠損を作製する損傷モデルの修復過程を解析し、Scx/Sox9 共陽性細胞が生後の成熟過程(3 週齢まで)の腱板付着部に局在すること、また、成体(20 週齢)の修復過程において、一過性に少数の Scx/Sox9 共陽性細胞がみられることを報告した。さらに、若齢(3 週齢)では損傷後 4 週までに線維軟骨層の修復がみられ、その修復過程において成体より多くの Scx/Sox9 共陽性細胞が修復部に動員されることを報告した。これらの結果は、生後の腱板修復過程においても、Scx/Sox9 共陽性細胞が腱付着部組織の前駆細胞としての役割を有する可能性を示唆するものと考えられた。

先行研究で用いたマウスモデルは、付着部に欠損を作製しその修復過程を解析するモデルであり、マウスではサイズ面から腱板を骨に縫合した後の修復過程を再現する縫合モデルの作製が困難であったため、今回新たに *ScxGFP* 遺伝子改変ラットを樹立した。これにより、幼若な週齢においても比較的高い再現性で腱板を骨に縫合する腱板修復モデルの作製が可能となった。

2. 研究の目的

今回新たに樹立した *ScxGFP* 遺伝子改変ラット(Scx の発現を GFP の発現でモニターすることを可能としたラット)の腱板修復モデルを用いて、修復過程における Scx および Scx/Sox9 共陽性細胞の動員と線維軟骨組織の修復との関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(i) *ScxGFP* 遺伝子改変ラットの解析およびラット腱板修復モデルの作製

ScxGFP 遺伝子改変ラットは大阪大学医学部附属動物実験施設生殖工学ユニットに作製を依頼し新たに樹立したラインを使用した。本ラットは先行研究で用いた内在性の Scx に一致して GFP が発現する *ScxGFP* 遺伝子改変マウスと同様の手法で作製した。0 日齢と 3 週齢のラットの表皮を除去後に蛍光実体顕微鏡で四肢および尾腱の GFP 光を評価した(図 1)。また、0 日齢、3 週齢、6 週齢、12 週齢の正常肩組織を採取した。

腱板修復モデルは、まず全身麻酔後に三角筋を縦割し左肩棘上筋腱を露出し、付着部で切離後に付着部の線維軟骨を高速回転ドリルで完全に除去した。その後、棘上筋腱断端に通した 6-0 プロリン糸を骨孔に通し元の位置に縫着した。対側には棘上筋腱付着部を露出し閉創する Sham 手術を行った。週齢毎の修復組織形態を評価するため、3、4、5、6、8、12 週齢ラットの腱板修復モデル(図 1)を作製し、術後 4 週組織を評価した。次に、術後早期の評価目的に、3、6 週齢ラットの腱板修復モデルを作製し、術後 1 週、4 週、6 週組織を評価した。

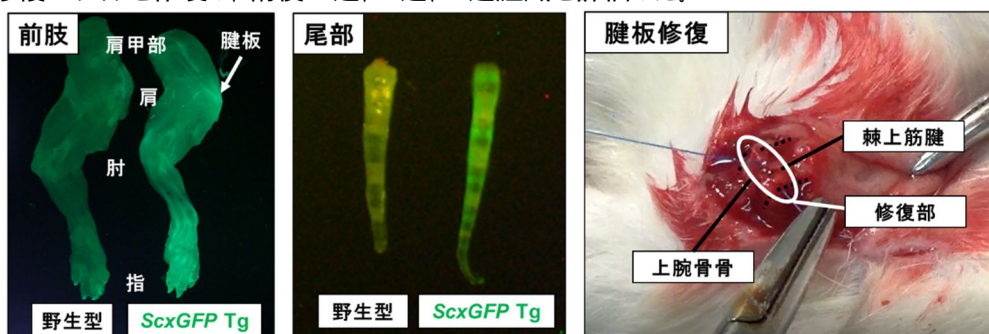


図 1. *ScxGFP* 遺伝子改変(Tg)ラットの蛍光実体顕微鏡画像および腱板修復モデル
(前肢(0 日齢)、尾部(3 週齢)、腱板修復モデル手術写真)

(ii) 組織学的評価

凍結非脱灰切片作製と軟骨組織および石灰化組織の評価

全身麻酔下に灌流固定を行い、組織を採取した。後固定の後、凍結包埋し粘着フィルム法により非脱灰凍結組織切片(4 μ m)を作製した。軟骨組織の評価を toluidine blue 染色(pH 4, Wako)

石灰化およびアルカリホスファターゼ(ALP)活性について ALP/alizarin red S 染色(Cosmobio, Sigma-Aldrich)を行い評価した。染色した切片はオールインワン蛍光顕微鏡(キーエンス BZ-X700)で観察した。

免疫組織学的評価

と同様に作製した非脱灰凍結組織切片(4 μ m)を用いて、1 次抗体として抗 GFP 抗体(abcam)、抗 Sox9 抗体(Millipore)を 4 $^{\circ}$ 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)で反応させ、Scx および Sox9 の発現の局在をオールインワン蛍光顕微鏡で評価した。

4. 研究成果

(1) 生後のラット線維軟骨性付着部成熟過程における Scx および Sox9 陽性細胞の局在

3 週齢では棘上筋腱は軟骨に付着し、上腕骨頭の軟骨組織中にアリザリンレッドで染色される骨端核がみられ、骨端核と軟骨細胞に ALP 活性を認めた。4 週齢ではさらに上腕骨の骨化が拡大し、棘上筋腱は線維軟骨層を介して上腕骨に付着していた。また、軟骨層から表層に ALP 活性を持つ細胞の局在を認めた。6 週齢では、付着部の石灰化線維軟骨層の表層に非石灰化線維軟骨層が認められ、いわゆる 4 層構造の成熟した付着部構造を呈していた(図 2)。

Scx と Sox9 陽性細胞の評価では、3 週齢では腱実質に多数の Scx 陽性細胞、付着部の軟骨組織中に多数の Sox9 陽性細胞が局在し、腱の軟骨付着部近傍に Scx/Sox9 共陽性細胞がみられた。6 週齢では、細胞外基質の成熟に伴って腱実質部の Scx 陽性細胞は減少し、Sox9 陽性細胞は関節軟骨および線維軟骨層に限局していた。また、石灰化線維軟骨表層の非石灰化線維軟骨層と推定される領域に少数の Scx/Sox9 共陽性細胞(図 3)の局在が確認された。以上の局在パターンは先行研究のマウスの成熟過程と類似した結果であり、Scx/Sox9 共陽性細胞とそれぞれの単独陽性細胞は生後の線維軟骨性付着部の形成に寄与をしている可能性が示唆された。

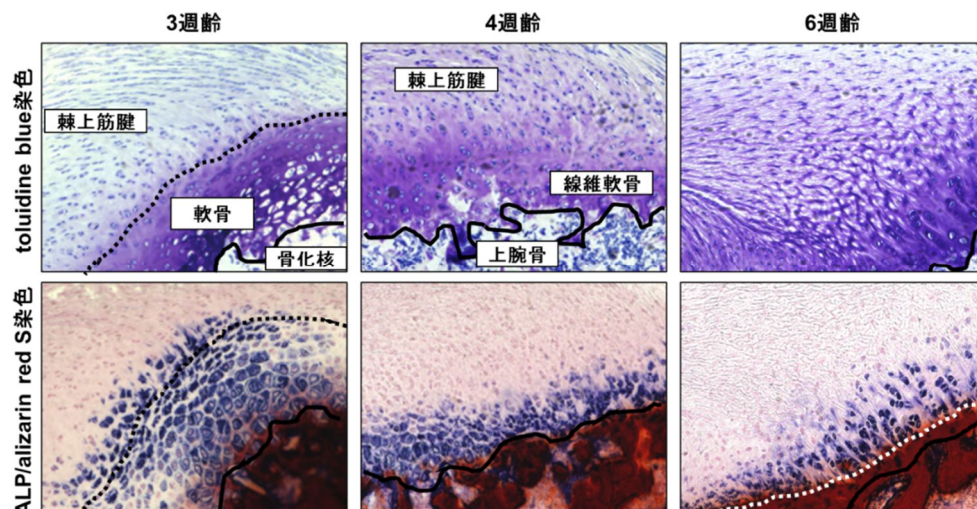


図 2. 線維性軟骨性付着部の形成過程
(ラット棘上筋腱付着部)

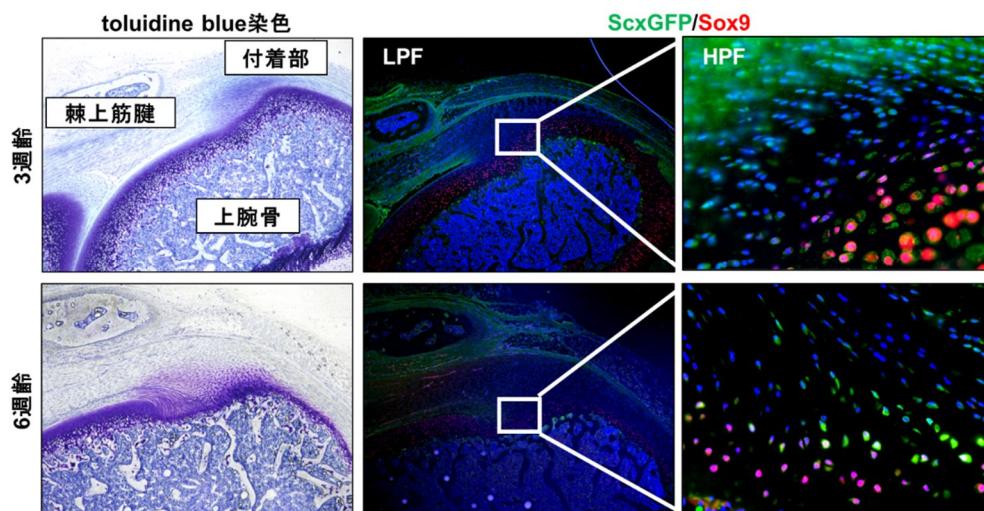


図 3. 腱板付着部成熟過程における Scx および Sox9 陽性細胞の局在
(棘上筋腱付着部、Scx 陽性細胞[緑]、Sox9 陽性細胞[赤]、Scx/Sox9 共陽性細胞[黄]、核[青])

(2) 週齢別ラットの腱板修復過程における組織形態

マウスモデルを用いた先行研究では若齢(3週齢)において修復初期に、より多数のScxおよびScx/Sox9共陽性細胞が修復組織中に動員され、損傷後4週までに線維軟骨組織の修復が確認された。そこで、ラット腱板修復モデルの週齢毎の修復組織形態を評価するため、3、4、5、6、8、12週齢ラットの腱板修復モデルを作製し術後4週組織を評価した。その結果、全ての週齢において術後4週の腱骨移行部に線維軟骨層の修復はみられなかった(図4)。一方で3週齢ラットの一部の標本で、修復組織中にアリザリンレッドで染色される石灰化領域をとみなう軟骨様組織の形成が認められた。以上の結果は、過去の研究の3週齢の幼若マウスモデルにおいて確認された線維軟骨層の修復と異なる結果であり、腱骨移行部の修復過程における線維軟骨の形成には欠損部のサイズが影響する可能性が示唆された。

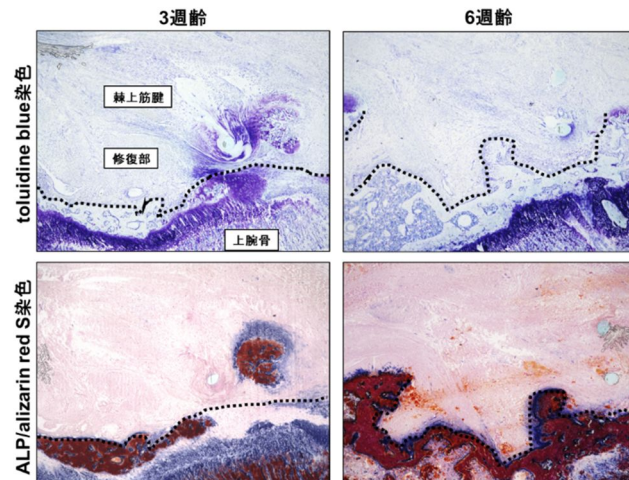


図4. 腱板修復モデルの腱骨修復部
(縫合後4週)

(3) ラット腱板修復モデルの修復過程におけるScxおよびSox9陽性細胞の評価

(1)(2)の結果から、早期のScxとSox9陽性細胞の動員を評価するため、3週齢、6週齢ラットの腱板修復モデルを作製し、術後1、4、6週組織を評価し比較した。術前の内在性のScx、Sox9の発現が多い3週齢ラットの術後4、6週の一部の標本において、修復組織中の関節包側に骨軟骨様組織の形成が確認された(図5)。一方、6週齢ラットでは術後6週までに腱骨移行部の線維軟骨層の修復は確認されなかったが、縫合糸周囲に微小な軟骨様組織の形成が認められた。蛍光免疫染色では、修復過程の早期の骨近傍の修復組織中にScxとSox9の単独陽性細胞と、少数のScx/Sox9共陽性細胞が認められた(図6)。3週齢モデルの腱骨修復部では、6週齢モデルと比較して、より多くのScxとSox9を発現する細胞を認めた。また、縫合糸周囲に形成された微小な軟骨様組織にSox9単独陽性細胞と少数のScx/Sox9共陽性細胞の局在が確認された(図7)。以上の結果から、内在性のScxとSox9の発現が残存している若齢(3週齢)では、腱板縫合術後のScxとSox9陽性細胞の動員が成熟個体より多いこと、また、成長とともに内在性のScxとSox9の発現が減少し、修復過程における動員も減少することが示唆された。また、本モデルにおいて、腱板に通した縫合糸周囲に微小な軟骨様組織が形成され、同部位にScx/Sox9共陽性細胞の局在が確認されたことから、修復組織への張力や圧縮力などの力学環境がScxやSox9陽性細胞の動員および分化を制御している可能性が示唆された。

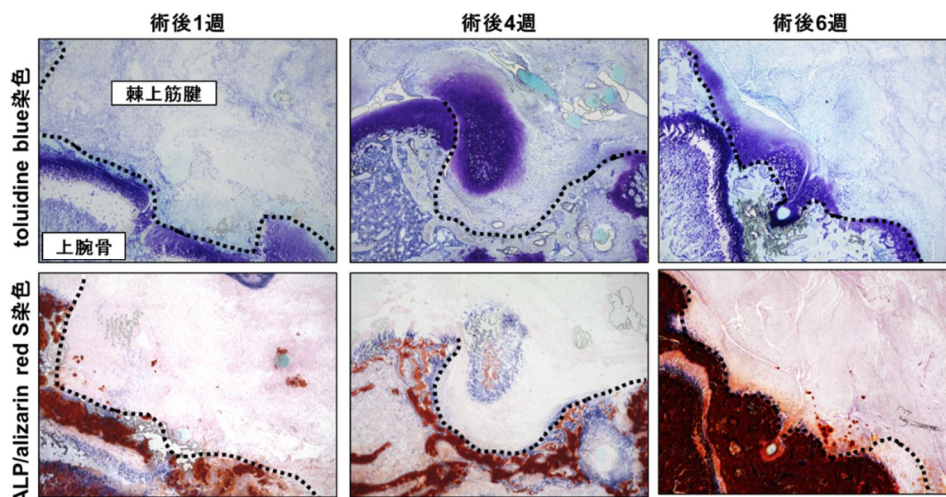


図5. 3週齢腱板修復モデルの修復過程
(腱骨修復部の組織像)

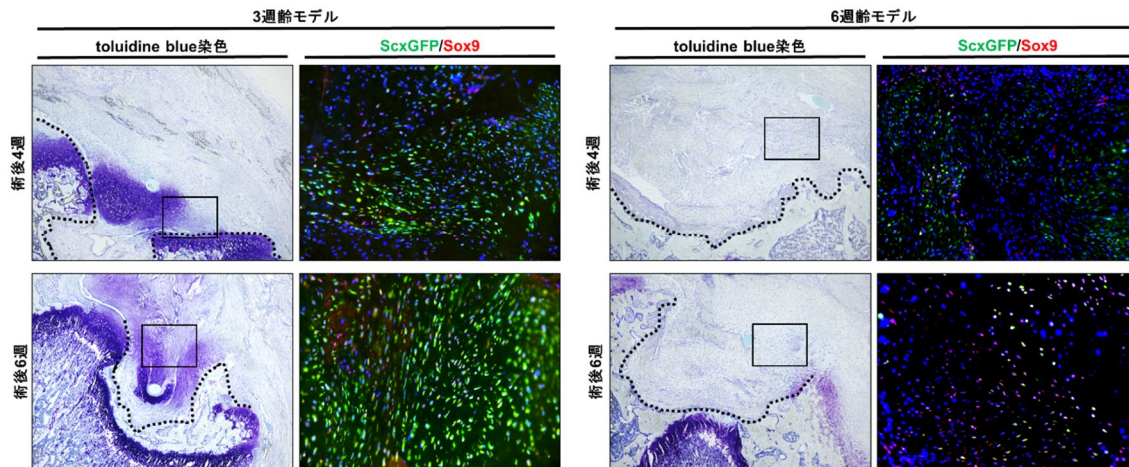


図 6. 腱骨修復部における Scx 陽性、Sox9 陽性、Scx/Sox9 共陽性細胞の局在 (Scx 陽性細胞[緑]、Sox9 陽性細胞[赤]、Scx/Sox9 共陽性細胞[黄]、核[青])

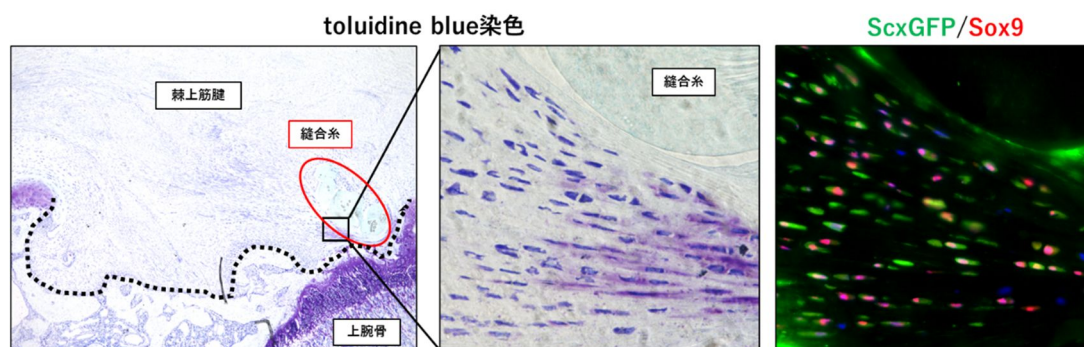


図 7. 腱骨修復部の縫合糸周囲にみられる Scx 陽性、Sox9 陽性、Scx/Sox9 共陽性細胞 (6 週齢モデル、縫合後 4 週、Scx 陽性細胞[緑]、Sox9 陽性細胞[赤]、Scx/Sox9 共陽性細胞[黄]、核[青])

本研究では先行研究の *ScxGFP* 遺伝子改変マウスモデルを用いた結果を踏まえ、幼若な週齢においても比較的高い再現性で腱板の骨への縫合が可能である *ScxGFP* 遺伝子改変ラットモデルを用いて以下の成果を得た。

腱板付着部の成熟に伴い内在性の Scx、Sox9 および Scx/Sox9 共陽性細胞は減少する。

3 週齢から 12 週齢までのラット腱板修復モデル (棘上筋腱を付着部で切離後、線維軟骨を完全除去した後に上腕骨に縫合するモデル) の術後 4 週までに腱骨移行部の線維軟骨層の再生、修復はみられない。

内在性の Scx と Sox9 の発現が残存している若齢 (3 週齢) モデルでは、術後の修復組織中に動員される Scx、Sox9 陽性細胞が多く、3 週齢の一部の標本で縫合した腱骨移行部の深層に術後 4 週で骨軟骨組織が形成される。

修復組織の縫合糸周囲に軟骨様組織の形成がみられ少数の Sox9 および Scx/Sox9 共陽性細胞が局在している

これらの結果から、腱骨移行部の成熟過程に存在する Scx や Sox9 を発現する細胞が付着部組織の前駆細胞様の特性を有しており、成体の腱板縫合後の修復過程においても限定的ながら参画している可能性が示唆された。今後は腱板縫合後の修復組織中の細胞のシングルセル解析を行い、Scx や Sox9 単独陽性の細胞や Scx/Sox9 共陽性の細胞集団の特性を明らかにし、内在性の前駆細胞の刺激を介した修復促進治療の確立を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2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 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
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

〔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
研究協力者	福間 裕子 (FUKUMA Yuko)		
研究協力者	谷村 峻太郎 (TANIMURA Shuntaro)		

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
研究協力者	徳永 琢也 (TOKUNAGA Takuya)		

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