

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462319

研究課題名(和文) 損傷した腱マトリクスの治癒過程におけるマクロファージ遊走阻止因子の役割の解明

研究課題名(英文) Deficiency of macrophage migration inhibitory factor gene delays healing of the damaged tendon matrix: A biomechanical and biological study

研究代表者

小野寺 純 (Onodera, Jun)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：90374511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージ遊走阻止因子(MIF)遺伝子欠損がアキレス腱損傷および腱・骨孔治癒過程に与える影響を明らかにする研究を行った。野生型マウス(WT群)およびMIF遺伝子欠損マウス(KO群)のアキレス腱損傷モデルと移植腱モデルを作成し、生体力学、組織学および分子生物学的評価を行った。最大破断荷重、線形剛性はKO群がWT群に比べ有意に低値であった。組織学的評価では術後KO群は膠原線維の配向が不規則であり、腱と骨の固着率が低かった。分子生物学的評価では術後3週におけるKO群のMMP-13は有意に低値であった。本研究は、MIF遺伝子欠損が腱損傷と腱・骨孔治癒過程を遅延させることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The role played by macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the process of wound healing is controversial. In this study, we hypothesized that the deficiency in MIF gene might delay tendon injury and bone-tendon healing in mice. Biomechanical testing showed that the structural properties were significantly lower in MIF gene-deficient mice (MIFKO) than in wild-type mice (WT). Histologically, healing tissues in MIFKO exhibited prolonged hypertrophy, poor vascularity, and prolonged increase in cell number compared with those in WT and low healing rate between grafted tendon and bone. Levels of matrix metalloproteinase (MMP)-13 mRNA in the healing tissue were significantly lower in MIFKO than in WT at 3 weeks after injury. Taken together, it was suggested that MIFKO exhibited delayed healing of the tendon and the bone-grafted tendon junction.

研究分野：医歯薬学

キーワード：運動器外傷学 腱損傷

1. 研究開始当初の背景

(1) 腱・靭帯組織のマトリクス修復・再生現象の解明と制御は、支持組織の機能的適応制御機構の解明という生命科学およびバイオメカニクス研究領域における重要な課題の一領域をなし、これまでに多くの研究がある。しかし、腱・靭帯組織のマトリクス修復・再生現象におけるマクロファージの関与についてはまったく不明であった。

(2) マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) は異物を認識した活性化 Tリンパ球より分泌されるリンフォカインとして報告され、マクロファージを炎症部位に留まらせ、炎症および免疫反応を惹起する液性因子として注目されてきた。近年、MIF は種々の組織、臓器においてその機能に大きな影響を与える液性因子であることが明らかにされており、各領域で研究報告が相次いでいる。また研究分担者らは、MIF は硬支持組織である骨代謝や骨折治癒過程に重要な影響を与えていることを見出した。しかし MIF が軟支持組織である腱損傷および移植腱と骨孔治癒過程の治癒過程に与える影響に関する研究はない。

2. 研究の目的

(1) アキレス腱損傷早期の治癒過程を独自に作製した MIF 遺伝子欠損マウスと野生型マウスとの間で生体力学的、組織学的および分子生物学的研究に比較し、「MIF 遺伝子の欠損はアキレス腱損傷後の治癒反応を遅延させるだろう」という仮説を検証する (研究 1)。

(2) さらに、腱損傷の治癒過程を考察していく段階で、実際に靭帯再建術で行われている腱組織とこれを移植した骨孔間の腱・骨孔治癒過程にも MIF 遺伝子の関与が考えられたため、「MIF 遺伝子の欠損は腱・骨孔治癒過程を遅延させるだろう」という仮説を検証する (研究 2)。

(3) 上記の解明により、腱組織損傷後および腱・骨孔治癒過程における MIF の役割を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1) アキレス腱損傷モデル (研究 1) と移植腱モデルの開発 (研究 2)

MIF 遺伝子欠損 (MIF KO) マウスおよび野生型 (WT) マウスを用いてアキレス腱損傷モデルおよび移植腱モデルを開発した。雌 8-10 週齢の MIF KO マウス、およびコントロールとして Balb/C の WT マウスを用いた。

Pentobarbital 腹腔内投与による全身麻酔下に 2.5 倍のサージカルルーペで観察を行いながらアキレス腱損傷モデルは、左アキレス腱部を展開し、29 ゲージの注射針を用いてアキレス腱を露出した。マイクロ用メスを用いて足関節レベルでアキレス腱の全層に横断裂を作製し (図 1)、5-0 ナイロン糸で皮膚を縫合した。右アキレス腱に対しては、アキレス腱を展開するだけの sham 手術を行った。術後はケージ内で自由に歩行を許可した。



図 1



図 2

移植腱モデルでは、移植腱用ドナーマウスアキレス腱を踵骨付きで全長採取し、レシピエントマウスの右膝蓋腱をメルクマールに右下腿前脛骨筋近位を骨膜まで剥離した。その後、23G 針で脛骨軸に水平方向へ骨孔を作成し、脛骨骨孔内へアキレス腱を刺入し、踵骨側を約 5mm 骨外へ留置した状態で皮膚を縫合した (図 2)。

(2) 生体力学的評価

術後採取した再生コラーゲン線維束、および脛骨 腱 踵骨複合体に対して引っ張り試験を行った。アキレス腱損傷モデルマウスは、術後 3、6、および 12 週で屠殺し、両下肢をアキレス腱 踵骨複合体として摘出し、移植腱モデルマウスは術後 1、2 週で屠殺し、生体力学的評価に供した。

引張試験は、万能引っ張り試験機を用い、毎分 0.5mm の速度でアキレス腱 踵骨複合体を破断させた。引張試験より得られた荷重 - 伸び曲線から最大破断荷重と荷重 - 伸び曲線の傾き (線形剛性) を求め、これらを統計学的に比較・評価した。

統計学的比較には ANOVA と t 検定を用い、有意水準は 5% とした。

(3) 組織学的評価

アキレス腱損傷モデルマウスを術後 3、6、および 12 週で屠殺し両下肢を摘出、移植腱モデルマウスは術後 4 日、1 週、2 週で屠殺し、患肢を摘出し組織学的評価に供した。採取した検体は 10% ホルマリンに浸し、脱灰したのちパラフィンに包埋した。HE 染色を行い、光学顕微鏡を用いて以下の定量的評価を行った。

研究 1 において、損傷部位の厚みは、DPC コントローラーを用いて測定した。Image J を用いてアキレス腱の損傷部位の細胞数を測定し、損傷部位付近の血管数を算出した。また、MMP-13 免疫染色した薄切片を光学顕微鏡にて観察した。

研究 2 では、骨孔の矢状断を作成し、各時期における骨孔周径上で移植腱と骨孔の固着率を計測した (図 3)。また、procollagen type 1、BMP-2、VEGF 免疫染色した薄切片を光学顕微鏡にて観察した。

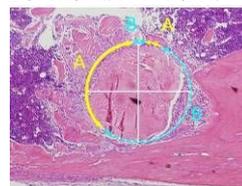


図 3: 固着率=A/A+B (%)

(3) 分子生物学的評価

アキレス腱損傷モデルを術後 3、6、および 12 週で屠殺し、両下肢を摘出し RT-PCR 解析へ供した。

RT-PCR 解析:採取したアキレス腱は両側ともに RNAiso に浸漬後、マイクロスマッシャーにて破碎した。RNA 抽出は、RNeasy キットを使用して行った。RNA を、PrimeScript RT キットを利用して、cDNA に逆転写する。全てのオリゴヌクレオチドプライマー (TNF、VEGF、および MMP-2、9、13) はこれまでに報告されている mRNA シークエンスを基に作成した。RT-PCR は、Thermal Cycler Dice TP800 を使用し行った。これらの結果は、Thermal Cycler Dice Real Time System ソフトウェアプログラムを使用して評価した。GAPDH プライマーをデータの標準化に使用した。

4. 研究成果

(1) 生体力学的評価

研究 1: 引張試験での破断様式は全て実質部断裂であり、健側の力学的特性に関して WT 群と KO 群との間に有意差はなかった(表 1)。

	Group		P value
Maximum load (N)	WT	10.3 (1.0)	P=0.9296
	KO	10.2 (1.1)	
Stiffness (N/mm)	WT	10.0 (0.6)	P=0.4015
	KO	10.5 (1.3)	
Elongation (mm)	WT	1.4 (0.3)	P=0.2863
	KO	1.3 (0.2)	

表 1

この事実、MIF 遺伝子の欠損は個体の発生から成熟において、アキレス腱の形成には有意の影響を及ぼしていない可能性を示唆し、したがって切断後の損傷治癒過程における力学的データを WT 群と KO 群間で直接比較することが可能であることを示した。

患側では、最大破断荷重と線形剛性はともに、KO 群が WT 群に比べ有意に低値であった(表 2、図 4)。

	Group	Period			P value
		3 weeks	6 weeks	12 weeks	
Maximum load (N)	WT	6.1 (1.0)	9.7 (1.1)	9.8 (0.8)	P<0.0001
	KO	4.6 (0.5)	7.1 (1.6)	9.0 (0.8)	
Stiffness (N/mm)	WT	3.3 (0.3)	6.1 (0.9)	5.7 (0.5)	P=0.0002
	KO	2.8 (0.6)	3.7 (1.4)	5.4 (0.5)	
Elongation (mm)	WT	2.3 (0.3)	2.0 (0.5)	3.3 (0.7)	P=0.3757
	KO	2.0 (0.3)	2.2 (0.5)	3.0 (0.2)	

表 2

両群間で、アキレス腱 踵骨複合体の生体力学特性は術後期間を通して徐々に増加し、3 週および 6 週の最大破断荷重に関して KO 群が WT 群に比べ有意に低値であった ($p=0.0107$, $p<0.0001$, 図 4) が、12 週では両群間に有意な差を認めなかった。この事実、両群ともに切断された後のアキレス腱には治癒機転が進行していることを示していると考えられた。

術後 6 週の線形剛性に関して KO 群が WT 群に比べ有意に低値であった ($p<0.0001$, 図 4)。

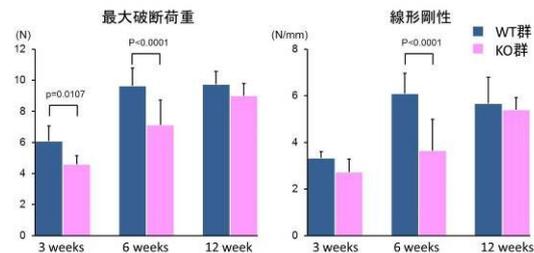


図 4

この結果は、MIF 遺伝子の欠損により KO 群の腱切断部位の繊維組織の修復が遅れ、その力学特性が有意に低下していることを示していると考えられる。

研究 2: 引張試験での破断様式は、両群とも術後 1 週で全て脛骨側からの引き抜けであり、術後 1 週の最大破断荷重および線形剛性に関して KO 群が WT 群に比べ有意に低値であった ($p=0.028$, $p=0.048$, 図 5)。術後 2 週での破断様式は、両群とも実質部断裂であり、いずれのパラメーターでも差は認めなかった(図 5)。

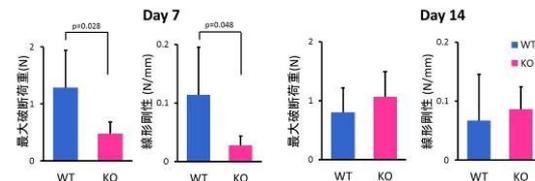


図 5

(2) 組織学的評価

研究 1: HE 染色では術後 3 週、6 週、および 12 週のいずれにおいても KO 群は WT 群に比べて肥厚しており膠原線維の配向も不規則であった(図 6)。

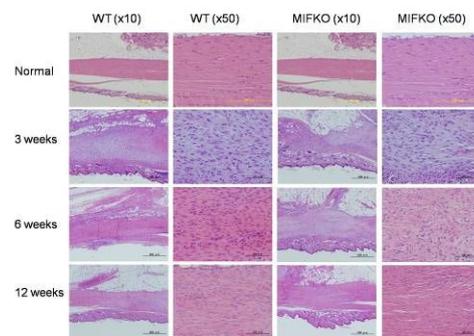


図 6

WT、KO 両群において、sham 手術を行った右アキレス腱は、楕円形の核を有する縦状の繊維芽細胞が存在する膠原線維が密に存在した。

損傷後 3 週の両群の組織像は、小円形または紡錘型核を有する細胞が存在する異形成線維組織が疎に存在した。WT 群では、損傷部位の組織の厚さと細胞密度は経過とともに減少し、膠原線維は縦状で密な分布へ変化した。一方、KO 群では、損傷部位の組織の厚さと細胞密度は経過とともに増加し、損傷後 6 週を経過しても同様の所見であった。

損傷部位の厚さと細胞数は、WT 群で損傷後 3 週において最も増加し、KO 群では 6 週で最も増加した。KO 群では、この測定値の増加は損傷後 12 週まで継続したが、WT 群では 6

週以降正常に近い値まで減少した。この結果は、MIF 遺伝子の欠損は、アキレス腱損傷後の組織治癒過程を遅延させる可能性を示唆した。

損傷部位付近の血管数は、損傷後 3 週において WT 群が KO 群に比べ有意に多かった ($p=0.0073$)。

MMP-13 免疫染色では、術後 3 週において、KO 群は WT 群に比べて MMP-13 陽性細胞の発現が認められなかった (図 7)。

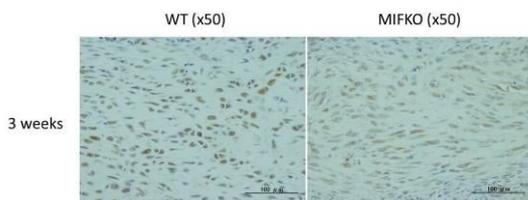


図 7

MMP は、アキレス腱組織の治癒過程にも一役を担うと考えられる。分子レベルでは、MMP を含む特殊なタンパク分解酵素がこの過程を制御することが報告されており、損傷腱の癒着成熟過程はマトリックスの異化と同化のバランスを含む多くの組織再構築を必要とすると考えられた。

研究 2: HE 染色では、術後 4 日および 1 週の両群で骨孔開口部付近において腱と骨との間に線維性組織が観察されたが、KO 群では線維性組織の増生がより少ない結果であった。また、矢状断面における骨孔全周に対する腱と骨の固着率は、術後 1 週において WT 群で有意に高かった ($p<0.05$ 、図 8)。

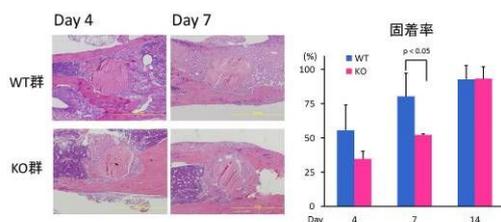


図 8

脛骨-アキレス腱-踵骨複合体の術後 1 週の構造特性は、MIF 遺伝子欠損マウスにおいて有意に低値を示し、組織学的検討で示唆された移植腱と骨との間の collagen 合成の遅延が、力学的な差に関与した可能性が考えられた。

免疫組織学的解析では、術後 4 日における WT 群の移植腱表面に Procollagen type 1 陽性細胞が多数認められたが、KO 群では認められなかった。BMP-2 と VEGF の発現に関しては両群に差を認めなかった。

以上の結果は、MIF 遺伝子が移植腱の骨孔内早期治癒過程において collagen 合成や、腱と骨との固着に関与する因子である可能性を示唆するものと考えられた。

(3)分子生物学的評価

研究 1: RT-PCR による遺伝子発現の定量的評価では、術後 3 週における KO 群の MMP-13

は WT 群のそれらに比べて有意に低値であった ($p=0.0358$)。その他の遺伝子発現に関して有意差はなかった (図 9)。

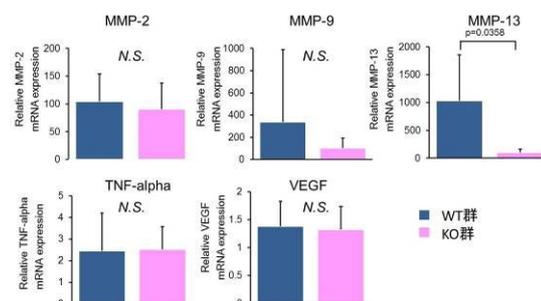


図 9

損傷後 3 週における MMP-13 遺伝子の発現は、WT 群で有意に高く同様に、組織学的評価でも WT 群に比べ KO 群の損傷部位付近の血管数は有意に少なかった。この結果は、損傷後 3 週における MMP-13 遺伝子の発現は、損傷部位の血管新生に重要な役割を担っており、MIF 遺伝子の欠損は MMP-13 遺伝子の発現抑制を介して血管新生が遅れる可能性を示唆された。

以上の結果から、本研究 1 は、MIF 遺伝子の欠損がアキレス腱断裂後の損傷治癒過程を遅延させることを明らかにした。この結果は、MIF が損傷した腱組織の治癒において重要な役割を果たしている可能性を示唆した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

小野寺純、近藤英司、北村信人、岩崎倫政、安田和則: マクロファージ遊走阻止因子遺伝子の欠損が移植腱の骨孔内治癒過程に与える影響, 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会, 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市), 2014.10.9-10

Onodera J, Kondo E, Kawaguchi Y, Kitamura N, Yasuda K: Deficiency of macrophage migration inhibitory factor gene delays bone tendon healing: a biomechanical and biological study. The 60th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, the Hyatt Regency (New Orleans, USA) 2014.3.15-18

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野寺 純 (ONODERA, Jun)
北海道大学・大学病院・助教
研究者番号：90374511

(2) 研究分担者

近藤 英司 (KONDO, Eiji)
北海道大学・医学研究科・特任教授
研究者番号：60374724

安田 和則 (YASUDA, Kazunori)
北海道大学・ - ・理事・副学長
研究者番号：20166507

(3) 研究協力者

保坂 緑 (HOSAKA, Midori)
北海道大学・医学研究科・実験助手