

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860144

研究課題名(和文) 手根管症候群の滑膜組織変化における局所間葉系幹細胞の役割と性ホルモンの影響の解析

研究課題名(英文) The Effects of Estradiol on Mesenchymal Stem Cells in Subsynovial Connective Tissue of Carpal Tunnel Syndrome

研究代表者

千見寺 貴子 (Chikenji, Takako)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：40452982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：女性に多く認められる手根管症候群(CTS)は、滑膜下結合組織(SSCT)の線維化が病因の一つと言われている。本研究では、抗炎症作用をもつ間葉系幹細胞(MSC)に着目し、CTS患者のMSCの機能とエストロゲンの影響について検討した。また、我々は組織線維化の要因の一つとして注目される血小板成長因子受容体(PDGFR)陽性の間葉系細胞に着目し、CTS患者のSSCTでPDGFR陽性細胞の過剰増殖を認めた。さらに、PDGFRシグナルを標的とした、AMPK活性化作用を有する糖尿病治療薬メトフォルミンおよびAICARの効果を解析し、AMPK活性化が有効な治療ターゲットである可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：An increased risk of carpal tunnel syndrome (CTS) has been reported in postmenopausal women. Fibrosis of subsynovial connective tissue (SSCT) is a prominent feature of CTS. Mesenchymal stem cells (MSCs) is considered to maintain the turnover of skeletal tissues in homeostasis. The purpose of this study was to assess the effect of the estradiol (E2) on SSCT-derived MSC (SSCT-MSC) of CTS patients in vitro. The proliferation activity of the SSCT-MSC was increased with E2. P16 mRNA expression and TP53 expression was significantly downregulated with E2. TGF- $\beta$  was also downregulated with E2. We demonstrated that the effect of estradiol on SSCT-MSC in CTS patients, which increased the cell proliferation and inhibited the cellular senescence with downregulation of the TGF- $\beta$ . Our findings suggested that the functional deterioration of SSCT-MSC might reside in the postmenopausal CTS patients, and relate to the homeostatic imbalance in SSCT fibrosis.

研究分野：解剖学

キーワード：手根管症候群 間葉系幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

特発性手根管症候群 (Carpal Tunnel Syndrome, CTS) は最も頻度の高い絞扼性神経障害とされる。手関節の過剰な運動が発症原因の一つとも言われるがその病因・病態は未解明である。一般人口における有病率は、10万人あたり女性が500人、男性200~250人と極めて高い。特徴として女性が男性と比べ2-3倍罹患しやすく (Gelfman et al. Neurology 2009)、特に閉経後や妊娠中、経口避妊薬や卵巣摘出時に発症するため女性ホルモンとの関連が強く推定されている。

近年、手根管の横手根靭帯及び滑膜下結合組織の肥厚・線維化が正中神経の圧迫をまねき CTS を発生すると報告された。我々は、本疾患の線維化した滑膜下結合組織 (Subsynovial Connective Tissue; SSCT) には Transforming Growth Factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) が対照群と比較して有意に高発現していることを明らかにした (Chikenji et al. J Orthop Res. 2014)。TGF- $\beta$ 1 は障害刺激の反復により炎症細胞や障害部位周囲の間葉系細胞から産生されて線維化を促進し、これが慢性化すると組織の過剰線維化・瘢痕を引き起こす (Border et al. N Engl J Med 1994)。エストロゲンは TGF- $\beta$ 1 を抑制するため、本疾患の病因にホルモンバランスの変化が推測されるが、詳細は明らかでない。

女性ホルモンと手根管症候群の関連について、Interleukin-6 (IL-6) と Prostaglandin E2 (PGE2) (Freeland et al. Microsurgery 2002, Sud et al. Microsurgery 2005)、Progesterone receptor (PR) (Toesca et al. Cell Biol Int. 2008)、Estrogen receptor (ER) 及び (Kim et al. J Orthop Res. 2010) が特発性手根管症候群の SSCT に有意に高く発現すると報告された。IL-6 や PGE2 は卵巣摘出により上昇し、エストロゲン補充によって抑制されるため (Manolagas et al. Endocr Rev. 2000)、性ホルモンと特発性手根管症候群との関連が推測されるが明らかでない。また過剰発現する ER や PR も本疾患と性ホルモンの関連を推測させる。

骨髄由来間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell, MSC) は、組織障害部位に集積し、さまざまな液性因子を放出して、局所での炎症及び免疫反応を抑制する性質を有する。MSC は手根管にも存在することが知られており (Iqbal SA et al. Stem Cells Dev. 2012)、近年、MSC にエストロゲンレセプターが発現していることが報告された。そのため、MSC はエストロゲンにより性質を変化させると予測させるが明らかでない。

### 2. 研究の目的

CTS は更年期の女性に多く認められ、女性ホルモンと発症の関連性が推測されている。また、CTS の病態として、手根管内で正中神経を取り巻く SSCT の線維化が報告され、間葉系組織の Key regulator である

MSC との関連性も注目されている。

本研究では、まず 1) CTS 患者およびコントロールの SSCT から MSC を採取し、MSC の機能について検討を行った。さらに、2) CTS 患者における SSCT-MSC に対するエストロゲンの影響について *in vitro* で検討した。また、我々は新たに CTS における SSCT の線維化において、組織線維化の要因の一つとして注目される血小板成長因子受容体 (Platelet-derived Growth Factor Receptor alpha, PDGFR) 陽性間葉系細胞に着目し、CTS 及びコントロールの SSCT における 3) PDGFR 陽性間葉系細胞 (SSCT 細胞) と超微細形態について検討を行った。その結果、我々は CTS 患者の SSCT において PDGFR 陽性細胞の増加を認めた。癌や線維性疾患に対し、PDGFR シグナルを標的として、AMP キナーゼ (AMPK) 活性化が、細胞増殖および線維化を抑制することが報告されている。我々はさらに、4) AMPK 活性化作用を有する糖尿病治療薬メトフォルミンおよび AICAR (AMPK アゴニスト) が SSCT 細胞の細胞増殖および線維化遺伝子発現に対する影響を解析した。

### 3. 研究の方法

1) SSCT に存在する MSC の機能について CTS 患者および Control から手根管開放術時に SSCT を採取した。採取組織はコラゲナーゼ酵素処理後に、10% Fetal Bovine Serum を含む  $\alpha$ -minimal essential medium にてプラスチックプレート接着培養を行った。得られた細胞は、位相差顕微鏡観察、フローサイトメトリーによる細胞表面抗原分析 (CD73, CD105, CD13, CD10, CD45, CD34)、増殖能、形態、分化能について、CTS (CTS-MSC) とコントロール (Control-MSC) で比較検討を行った。

2) CTS 患者における SSCT-MSC に対するエストロゲンの影響について

女性 CTS 患者 6 名から手根管開放術時に滑膜下結合組織を採取した。採取組織はコラゲナーゼ酵素処理後に、 $17\beta$ -Estradiol 添加有り (E2+) もしくは添加なし (E2-) 培地にてプラスチックプレート接着培養を行った。培養細胞は、フローサイトメトリーによる細胞表面抗原分析 (CD73, CD105, CD90, CD45, CD34, CD11b)、増殖能、骨・軟骨・脂肪分化能解析を行った。また、Real Time PCR を用いて Pro-fibrotic factor の TGF- $\beta$ 1、CTGF、Cell Senescence として TP53, P16<sup>INK4A</sup>, P21 について比較検討を行った。

3) PDGFR 陽性間葉系細胞と超微細形態について

CTS 患者およびコントロールの手根管より SSCT を採取した。超微細形態観察のため、オスミウム固定後、超薄切片を作製し、電

子染色を施した。免疫組織学的解析のため、凍結切片を作製し PDGFR、Cadherin-11 抗体で免疫組織染色を行い、1視野あたりの細胞密度、PDGFR、Cadherin-11 陽性細胞の割合を算出した。結果の解析は CTS 患者の SSCT を CTS 群、コントロールおよび遺体標本の SSCT を対象群とし、One way ANOVA 及び Tukey-Kramer test を用いて群間比較をした ( $\alpha = 0.05$ )。

4) AMPK 活性化作用を有する糖尿病治療薬メトフォルミンおよび AICAR (AMPK アゴニスト) が SSCT 細胞の細胞増殖および線維化遺伝子発現に対する影響について

SSCT をコラゲナーゼ処理し、単細胞懸濁液としてプラスチックプレートに播種した。プレートに接着した細胞を SSCT 細胞とした。細胞培養液には 10% ウシ血清、1% ペニシリン/ストレプトマイシンを含む  $\alpha$ -modified Eagle's medium で培養した。実験には 3-5 継代の細胞を使用した。SSCT 細胞の表面抗原解析のため、フローサイトメトリーおよび免疫細胞染色を実施した。また PDGF-AA 刺激の有無、PDGFR シグナル阻害剤の有無が SSCT 細胞の細胞増殖能力および線維化関連遺伝子発現量に与える影響を解析するため、WST-8 アッセイおよび Real-time PCR 法を用いて解析した。さらに、SSCT 細胞の細胞外基質 (ECM) 産生を評価するため、SSCT 細胞を 2 週間、3 次元膜上で培養した。培養後の膜にて免疫染色をおこない、タイプ 1 およびタイプ 3 コラーゲンの産生量を評価した。

#### 4. 研究成果

1) SSCT に存在する MSC の機能について

位相差顕微鏡観察において、CTS 患者由来 MSC (CTS-MSC) は細胞質が広がり、扁平であったが、コントロール由来 MSC (Control-MSC) では MSC に特徴的な紡錘形を呈していた。表面抗原の発現は、CTS-MSC、Control-MSC とともに同じであった。分化能については、CTS-MSC、Control-MSC とともに骨・軟骨・脂肪分化能を認めたと、CTS-MSC で Control-MSC よりも有意に脂肪分化能が低下していた ( $p < 0.01$ )。増殖能においても、CTS-MSC が Control-MSC よりも有意に低かった ( $p < 0.01$ )。CTS 患者、コントロールともに手根管の滑膜下結合組織に MSC を認めた。CTS 患者の MSC は、コントロールよりも増殖能、脂肪分化能が低下していた。

2) CTS 患者における SSCT-MSC に対するエストロゲンの影響について

MSC の細胞表面抗原と分化能は、E2+ と E2- で差はなかった。MSC の増殖能は、E2+ で E2- よりも高かった。TGF- $\alpha$  の mRNA 発現は E2+ の MSC にて低下し ( $P < 0.05$ )、P16<sup>Ink4A</sup> の mRNA 発現は E2+ にて低下した。また、

immunocytochemistry の結果、p53/CTS 患者の線維化した滑膜下結合組織では、間葉系細胞にて Pro-fibrotic factor の TGF- $\beta$  の過剰発現が報告されている。本研究で、CTS の滑膜下結合組織由来 MSC は、エストロゲンにより増殖能を高め、TGF- $\beta$  の発現を低下させた。エストロゲンは Smad2/3 の分解を促進して TGF- $\beta$  シグナル伝達を阻害すると言われる。今後さらなる検討が必要であるが、エストロゲンが CTS 患者の滑膜下結合組織由来 MSC の機能に影響している可能性が示唆された。

3) PDGFR 陽性間葉系細胞 (SSCT 細胞) と超微細形態について

CTS 群における間葉系細胞の超微細形態所見では細胞質内の豊富な筋フィラメントと細胞質周囲に大量のコラーゲン様線維産生を認めた。CTS 群における PDGFR 陽性細胞の割合は対象群より有意に高値を示したが、Cadherin-11 陽性細胞の割合は有意に低値を示した。さらに PDGFR 陽性かつ Cadherin-11 陽性細胞の割合が CTS 群にて有意に低値を示した。CTS 群において PDGFR 陽性間葉系細胞の過剰増殖を認め、同時に正常な滑膜線維芽細胞のマーカーである Cadherin-11 を発現する細胞が減少した。これらの結果から、CTS における SSCT の線維化には PDGFR 陽性間葉系細胞の関与が示唆された。

4) AMPK 活性化作用を有する糖尿病治療薬メトフォルミンおよび AICAR (AMPK アゴニスト) が SSCT 細胞の細胞増殖および線維化遺伝子発現に対する影響について

a) PDGFR シグナル阻害が SSCT 細胞の増殖、線維化関連遺伝子に与える影響  
SSCT 細胞は *in vitro* で PDGFR を発現していることをフローサイトメトリーおよび免疫細胞染色にて確認した。SSCT 細胞は PDGF-AA 刺激によって細胞増殖を亢進させ、PDGFR シグナル阻害剤であるイマチニブを添加したところ、濃度に依存して細胞増殖を抑制した。さらに、PDGFR シグナルのうち特に関連が強いシグナルを解明するため、下流因子の PI3K および MEK1/2 をそれぞれの阻害剤 LY294002 (PI3K 阻害剤)、U0126 (MEK 阻害剤) を用いて細胞増殖評価を行ったところ、PI3K 阻害剤に最も高い細胞増殖抑制効果を認めた。

つぎに、PI3K 阻害が SSCT 細胞の遺伝子発現に与える影響を検討したところ、PI3K 阻害では TGF- $\beta$ 、CTGF、Collagen 1、Collagen 3、Smad3 の遺伝子発現を抑制することができなかった。

b) AMP キナーゼ (AMPK) 活性化が SSCT 細胞の増殖、線維化関連遺伝子に与える影響  
SSCT 細胞に AMPK 活性化剤の AICAR およびメ

トフォルミンを添加したところ、SSCT 細胞で AMPK のタンパク発現が増加することを免疫細胞染色にて確認した。次に、PDGF-AA 刺激した SSCT 細胞に AICAR およびメトフォルミンを添加したところ、AICAR およびメトフォルミンは SSCT 細胞の増殖を抑制することがわかった。さらに AMPK 活性化によって、TGF- $\beta$ 、Smad3 の遺伝子発現を抑制した。

c) PDGF シグナル活性および AMPK 活性が SSCT 細胞の ECM 産生に与える影響  
SSCT 細胞を 3 次元膜培養したところ、PDGF シグナルを活性化することによってタイプ 1 コラーゲンの産生が低下し、タイプ 3 コラーゲンの産生が増加した。一方で AMPK 活性によって、タイプ 1 コラーゲンの産生が増加し、タイプ 3 コラーゲンの産生が低下することを明らかにした。

以上の結果から、AMPK 活性化が SSCT 細胞の増殖および線維化関連遺伝子の発現を抑制し、SSCT において正常とされるタイプ 1 コラーゲンを多く産生することから、AMPK 活性化が有効な治療ターゲットであ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 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

Takako Chikenji, Yuki Saito, Yasuhiro Ozasa, Takashi Matsumura, Mineko Fujimiya, Toshihiko Yamashita, Kousuke Iba. The Effects of Estradiol on Mesenchymal Stem Cells in Subsynovial Connective Tissue of Carpal Tunnel Syndrome In vitro. ORS Annual Meeting, San Diego, USA, Mar. 2017

Yuki Saito, Takako Chikenji, Yasuhiro Ozasa, Takashi Matsumura, Mineko Fujimiya, Toshihiko Yamashita, Kousuke Iba, PDGF Receptor Signaling Activate Mesenchymal Cells Proliferation via PI3K-Akt Signaling Pathway in Idiopathic Carpal Tunnel Syndrome. ORS Annual Meeting, San Diego, USA, Mar. 2017

Takako Chikenji, Yuki Saito, Yuka Mizue, Kanna Nagaishi, Mineko Fujimiya, Toshihiko Yamashita, Kousuke Iba. Mesenchymal Stem Cells in Subsynovial Connective Tissue in Carpal Tunnel. ORS Annual Meeting, Orlando, USA, Mar. 2016.

Yuki Saito, Takako Chikenji, Yuka Mizue, Kanna Nagaishi, Mineko Fujimiya, Toshihiko Yamashita, Kousuke Iba, Platelet-derived Growth Factor Receptor alpha Positive Mesenchymal Cell Accumulate in the Subsynovial Connective Tissue of Patients

with Idiopathic Carpal Tunnel Syndrome. ORS Annual Meeting, Orlando, USA, Mar. 2016.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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

千見寺 貴子 (CHIKENJI, Takako)  
札幌医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40452982

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

齋藤 悠城 (SAITO, Yuki)  
札幌医科大学・医学部・研究員  
研究者番号：40758702  
小笹 泰宏 (OZASA, Yasuhiro)  
札幌医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40404636  
藤宮 峯子 (FUJIMIYA, Mineko)  
札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10199359  
射場 浩介 (IBA, Kosuke)  
札幌医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：60363686

#### (4)研究協力者