

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861192

研究課題名(和文) 腱損傷の治癒過程におけるサルコペニアの影響の検討

研究課題名(英文) Molecular changes of tendon and muscle after Achilles tendon repair in sarcopenia mouse

研究代表者

乾 淳幸 (Inui, Atsuyuki)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70457092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)： 腱縫合術後の予後を決める因子として、筋肉や腱の脂肪変性があげられる。サルコペニアモデルとして40週齢のSAMP6と、コントロール群としてSAMRを使用した。右足アキレス腱を切離・修復し、2週間後に筋重量・組織評価・遺伝子発現について検討した。

腱での3型コラーゲンの発現はSAM-P6群でSAMR群に比べて低く、両群とも腱の表層に脂肪滴の発現を認めた。筋肉での脂肪分化遺伝子はSAMP6群で高値であり、組織学的により多くの脂肪滴の発現を認めた。腱におけるコラーゲンの発現バランスの変化や、筋肉の脂肪変性が老化モデルマウスでは認められ、これが臨床成績を不良にする原因の1つであると考えられた。

研究成果の概要(英文)： We analyzed the molecular changes after tendon repair using senescence accelerated mouse (SAM) model. Forty weeks old animal was used. On the hind limb, Achilles tendon was transected then repaired. Two weeks after the surgery, frozen sections with Oil red-O staining and Real-time PCR was performed.

Tendon: Gene expression of collagen 3 and adipogenic markers were lower in SAM-P6 group. In oil red-O staining, oil droplets were observed at the surface of the tendon in both groups. Muscle: The gene expression of Atrogin was higher while Myogenin was lower in SAM-P6 group. Both PPAR and C/EBP were higher in SAM-P6 group. In oil red-O staining, more oil droplets were observed in muscle of SAM-P6 group. The molecular change of tendon and muscle after tendon repair showed novel insight to geriatric orthopaedics and would be helpful to treat elderly patients with tendon damage.

研究分野：整形外科 手外科

キーワード：腱損傷 サルコペニア 老化 脂肪変性

1. 研究開始当初の背景

サルコペニアは全身性の骨格筋量および筋力の低下を特徴とする比較的新しい疾患概念であり、その発症は高齢者のADLの低下に直結し、心肺機能の低下や易転倒性、外傷後のリハビリテーションの阻害因子、寝たきりにつながってゆく疾患である。その発生要因は複雑であり、生理的要因として加齢や消耗性疾患の存在、外的要因としての廃用や低栄養が関与するとされているが、明らかな発生メカニズムについては未だ解明されていない。

骨格筋は成体の組織のうちでも高い再生能力を有する組織であり、その再生能には筋サテライト細胞が関与していると考えられる。サルコペニアでは筋サテライト細胞の減少や機能不全が生じていると想定されている。また、病理学的には炎症性サイトカインの発現亢進や作用の遷延化に続発する、速筋の遅筋化や筋繊維の線維化や脂肪浸潤が認められる。

高齢者に好発する大腿骨近位部骨折や脊椎圧迫骨折等でサルコペニア有病率が高いことが報告されており、サルコペニアが骨折の危険因子となりえることから整形外科領域においてもサルコペニアの骨折発症や治療に及ぼす影響についての研究が報告されてきているが、骨折より頻度の高い外傷である、腱や靭帯損傷の治療過程におけるサルコペニアの影響についての報告は未だ無い。

2. 研究の目的

全身の骨格筋量の減少と筋力低下を特徴とするサルコペニアは高齢者のADLの低下に直結することから、近年その疾患の発生メカニズムについて研究が行われている。しかしながら、サルコペニア患者に腱損傷が生じた場合その起始である筋肉や腱の治療過程にどのような影響が生じるかについては未だに知見は得られていない。

今回の研究では早期老化動物モデルを使

用し、老化や筋肉量の減少が腱損傷の治療に及ぼす影響について分子生物学的側面より明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

<動物モデル>

サルコペニアモデルマウスとして、骨粗鬆症研究などで広く使用されている早期老化モデルマウスである40週齢のsenescence accelerated mouse P6 (SAM-P6)を使用し、コントロール群として同系統・同週齢で老化を生じないsenescence resistant mouse (SAM-R)を使用した。

すべての実験は施設の動物実験委員会の承認のもとに行った。

これらのマウスに全身麻酔下を行ったうえで、右下肢に対してアキレス腱修復術を施行した。アキレス腱は踵骨付着部より3mmで切離した後に4-0ナイロン糸にてマットレス縫合にて即時修復を行った。

左下肢については腱切離を行わないコントロールとして使用した。術後2週でマウスを安楽死させ、筋肉部分および腱実質について評価を行った。

<評価方法>

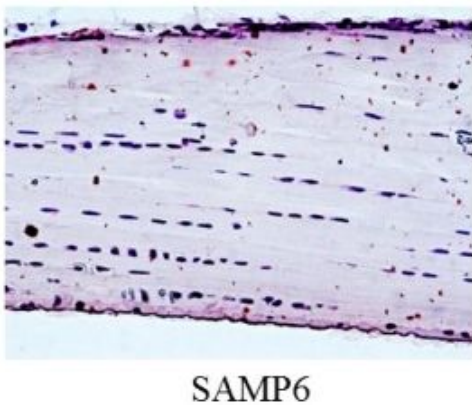
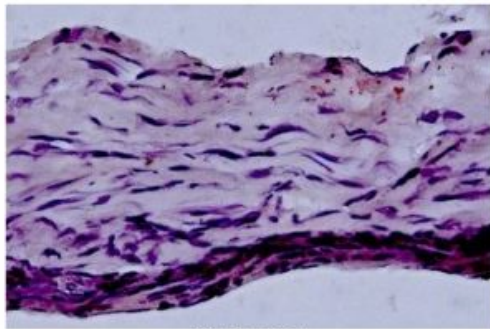
2週間後にアキレス腱と腓腹筋を各々採取した。筋肉については湿性筋重量の測定、組織学的解析として筋肉の短軸断面切片を作成し、Oil-Red-O染色による筋肉内脂肪浸潤の評価、real-time PCR法にて脂肪分化関連因子および筋萎縮マーカーについて解析を行った。

アキレス腱については腱の長軸切片を作成しOil-Red-O染色による脂肪浸潤の評価、real-time PCR法にてコラーゲンや脂肪分化関連遺伝子の発現について検討を行った。

統計学的検定として、群間の比較にはunpaired t検定を用いて解析を行い $P < 0.05$ を統計学的有意差ありと判断した。

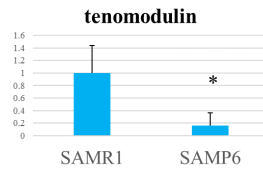
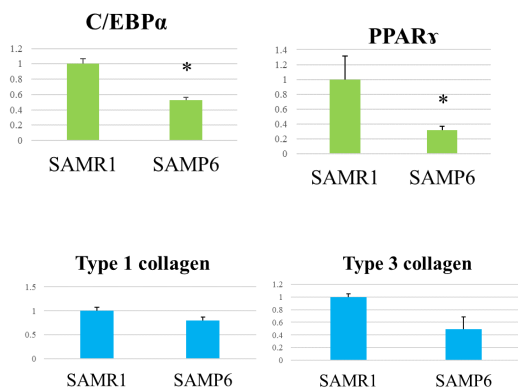
4. 研究成果

アキレス腱の Oil-Red-O 染色においては、SAM-P6 群および SAM-R 群（コントロール群）とも腱の表層に脂肪滴の発現を認め、SAM-P6 群において脂肪滴が多く発現している傾向は認めなかった（図 1）。



< 図 1：腱の Oil-Red-O 染色 上段：コントロール群、下段：老化マウス群 >

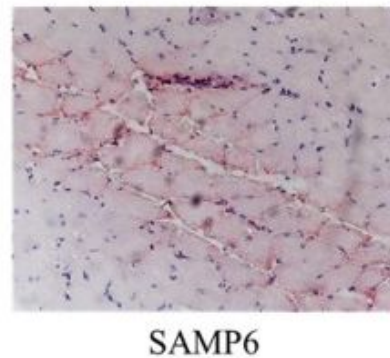
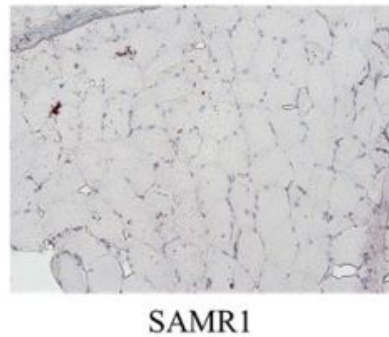
PCR 法による mRNA 発現の解析では腱組織における 3 型コラーゲンや tenomodulin の発現は SAM-P6 群で SAM-R 群に比べて低い一方で、腱の主成分である 1 型コラーゲンの発現には差を認めなかった。また、腱組織における脂肪分化関連因子である C/EBP α や PPAR γ の発現は SAM-P6 群において低値であった（図 2）。



< 図 2：腱組織における脂肪分化マーカー、腱合成マーカーの発現 >

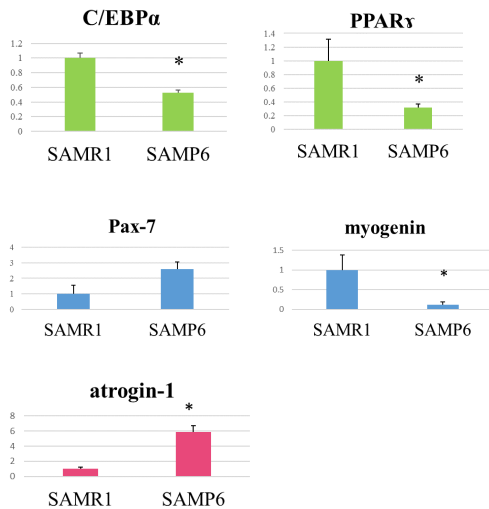
腓腹筋の湿性筋重量は SAM-P6 群で 114 mg であり SAM-R 群では 131 mg でありサルコペニアマウス群においては腱修復後の筋重量も低下している傾向を認めた。

腓腹筋の Oil-Red-O 染色においては SAM-P6 群でより多くの脂肪滴の発現を認めた（図 3）。



< 図 3：腓腹筋の Oil-Red-O 染色 上段：コントロール群、下段：老化マウス群 >

PCR 法による mRNA 発現の解析では、脂肪分化関連遺伝子の発現は SAM-P6 群でコントロール群より高値である一方で、筋分化マーカーである myogenin は低値を Pax-7 は高値を示した。筋萎縮マーカーである Atrogin は高値を示した（図 4）。



< 図 4：筋組織における脂肪分化マーカー、筋分化マーカー、筋萎縮マーカーの発現 >

< 考察 >

腱における腱合成マーカーの低下や、筋肉の脂肪変性が老化モデルマウスでは認められ、これが臨床成績を不良にする原因の1つであると考えられた。一方、腱組織そのものの脂肪分化の意義については今後、継時的な解析や大きい動物を用いての力学試験が必要と考えらる。

< 参考文献 >

1. Cruz-Jentoft, A. J. et al.. "Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People." *Age Ageing*, 2010.
2. 橋本明弘. 'サルコペニアの発症と筋幹細胞および筋再生システム' *Geriatric Med*, 2010.
3. 町田修一ら. 'サルコペニアの分子メカニズム' *Geriatric Med*, 2010.
4. 飛田哲朗ら. '骨粗鬆症性椎体骨折のリスク要因としてのサルコペニア(加齢性筋肉減少症)の現状および高齢者における上下肢筋肉分布の解明.' *Osteoporosis Japan*, 2012.
5. Shah K. et al. 'The role of muscle in bone

repair: the cells, signals, and tissue responses to injury.' *Curr Osteoporos Rep*, 2013.

6. Inui A et al. 'Application of layered poly (L-lactic acid) cell free scaffold in a rabbit rotator cuff defect model.' *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol*, 2011.
7. Inui A et al. 'Potency of double-layered Poly L-lactic Acid scaffold in tissue engineering of tendon tissue.' *Int Orthop*, 2009.
8. Inui A et al. 'Regeneration of rotator cuff tear using electrospun poly(D-L-lactide-co-glycolide) (PLG) scaffolds in a rabbit model.' *Arthroscopy*, 2013.
9. Muto et al. 'Platelet-rich plasma protects rotator cuff-derived cells from the deleterious effects of triamcinolone acetonide.' *J Orthop Res*, 2013.
10. Derave W. et al. 'No effects of lifelong creatine supplementation on sarcopenia in senescence-accelerated mice (SAMP8).' *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005.
11. Naito AT et al. 'Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes' *Cell*, 2012.

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)
該当なし

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 第 53 回日本リハビリテーション医学会 (2016.6.9-12 京都国際会議場 京都): 老化モデルマウスにおけるアキレス腱修復後の筋腱の脂肪変性の検討.

乾淳幸 植田安洋 西本華子 美舩泰 酒井良忠

2. Orthopaedic Research Society 62nd
Annual Meeting (2016.3.5-8 Orland, USA):
Molecular changes of tendon and muscle
after Achilles tendon repair in senescence
accelerated mouse.

Atsuyuki Inui, Yasuhiro Ueda , Takeshi
Kokubu , Yutaka Mifune, Ryosuke Sakata,
Yoshifumi Harada ; Fumiaki Takase ,
Takeshi Kataoka, Masahiro Kurosaka

〔図書〕(計0 件)
該当なし

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

乾 淳幸 (Inui Atsuyuki)
神戸大学医学附属病院整形外科 医員
研究者番号：70457092