

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10956

研究課題名(和文) 腱再生を担う細胞群の特性と再生制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of tendon regeneration mechanism using achilles tendon resection model.

研究代表者

上原 浩介 (Uehara, Kosuke)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20599063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：腱再生に関わるメカニズムを解明するため、8週齢C57BL/6Jマウスのアキレス腱を全切除した後に再生してくる線維性組織を経時的に観察した。再生組織は術後3ヶ月においても異所性軟骨・石灰化を伴い、コラーゲン配列の乱れた正常腱とは程遠い組織でありReal time PCRにおいても同様の結果であった。さらにLaser micro dissection(LMD)法で正常腱と再生組織の部位別にRNAを抽出し、RNAシーケンスを行ったところいくつかの腱再生に関与していると推察される複数のサイトカイン、分子シグナルが同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腱の障害は、若年者のスポーツ外傷から高齢者の変性断裂に至るまで、全年齢層で起こりうる病態であり日常生活に重大な影響を与えることが知られている。一方、骨や軟骨と比べると、腱の再生に関する研究は決して盛んとは言えず、多くは謎に包まれている。本研究において得られた知見は腱再生のメカニズムの解明につながる可能性があり、この知見を用いた腱障害の新たな薬剤や治療法の開発は腱障害における重大な日常生活の影響を低減するだけでなく、医療費の軽減にもつながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：To identify the mechanism involved in tendon regeneration, we analyzed time-dependent changes in fibrous tissue that regenerated after total excision of the Achilles tendon of 8-week-old C57BL / 6J mice. The regenerated tissue was completely different from the normal tendon with heterotopic cartilage and calcification in which the collagen arrangement was disturbed even 3 months after the operation, and the results were the almost same in the real time PCR. Furthermore, we extracted RNAs from multiple regenerated tissues over time using the Laser micro dissection (LMD) method and performed RNA sequence, and identified multiple cytokines and molecular signals that might be involved in tendon regeneration.

研究分野：整形外科学

キーワード：腱 腱再生 LMD RNAシーケンス

## 1. 研究開始当初の背景

整形外科外来診療において腱障害・断裂に由来する疼痛に遭遇する頻度は高く、スポーツ活動や日常生活での負担に加えて、高齢化に伴う腱の変性も障害・断裂の原因となるため、全年齢層で腱障害・断裂が起こりうる。そして腱障害や断裂は、関節の運動機能障害に加えて強い疼痛を引き起こし、生活の質や医療コストに多大な影響を与える。しかしながら、腱の発生、維持、再生に関する研究は、骨、軟骨など整形外科の他の分野と比較しても盛んとは言えず、多くは謎に包まれている。それゆえ、腱の再生を可能とする本質的な治療技術は未だ確立されていない。

我々はマウスのアキレス腱を全切除すると経時的に異所性軟骨・石灰化を伴う線維性組織が再生することを突き止めた。再生組織は正常腱とは程遠い組織であったが、この組織が再生する過程を詳細に解析し正常腱とのプロファイルの比較を行うことで腱再生のメカニズムに迫ることが出来るのではと考え実験を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究では 1.で述べたようにアキレス腱全切除後の再生組織と正常腱の経時的な比較を基にアキレス腱の再生に関わる分子生物学的メカニズムを解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) アキレス腱再生組織の経時的な組織学的解析

まず正常アキレス腱組織と、アキレス腱全切除後の再生組織を 3,5,7 日、2,4,6,8,12,16,20 週と時系列にサンプリングする。組織切片においては H&E 染色、Masson trichrome 染色、各マーカーの抗体を用いた免疫組織染色を行う。また、どの部位にどのような特性の細胞が集簇するかを知るため、間葉系幹細胞マーカー (CD90、CD105 など)、軟骨細胞マーカー (Sox9 など)、腱細胞マーカー (Scx など)、骨芽細胞マーカー (Runx2, Osx など)、血管内皮細胞マーカー (CD31 など) を用いた免疫組織染色を重点的に実施し、次項の研究に繋げる。

### (2) FACS によるアキレス腱再生組織の構成細胞の特性解析

(1)の解析から、再生過程で経時的にどのような変化が起きているかのアウトラインは把握でき、およそどのような細胞群が存在するかは分かるが、その細胞群の厳密な特性まで決定することは難しい。そのため各段階での再生組織から細胞を単離し、(1)の免疫組織染色で用いた表面抗原抗体によって FACS を行い、ソートした細胞から mRNA を回収、RNA シークエンスを行ってそれぞれの細胞群の発現遺伝子プロファイルを調べ、その特性を厳密に決定する。

### (3) LMD を用いた微小領域の発現解析

(1)(2)の解析によって再生過程で登場する細胞群の特性が明らかになる。次に、これらの細胞がどのような空間的制御を行っているかを知るため、Laser micro

dissection(LMD)による解析を行う。アキレス腱全切除後の再生組織には一部に腱組織の再生が見られる一方、脆弱で非特異的な線維組織に混じって軟骨様組織も散在している。これらの細胞群の遺伝子発現プロファイルは(2)の解析から明らかになるであろうが、その周囲の細胞がどのような影響を受ける、といった空間的な情報までは得られない。そのため LMD を行い、腱再生が成功している部位と、失敗している部位で集中的に微小領域発現解析を行い、細胞群間でのシグナルのやりとりを解析する。発現変動の強い遺伝子の中から、特にサイトカインなどの液性因子に注目し、腱再生促進に利用できるタンパクや阻害剤の候補分子を絞り込んで行く。

#### (4) 培養細胞系を用いた腱再生因子の絞り込み

(3)で得られた候補分子を培養細胞に投与し、腱再生促進作用の有無を検証する。まず候補分子について、アゴニストやアンタゴニストも含め、リコンビナントタンパクを準備するとともに、その作用を修飾するような阻害剤などの化合物を探し、入手する。これらをマウス未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2、マウス線維芽細胞、ヒト間葉系幹細胞などに添加して、細胞の形状変化やマーカーの発現を調べ、腱細胞方向に分化誘導するかを検討する。

#### (5) アキレス腱再生モデルを用いた腱再生促進因子の検討

(4)で有望な結果が得られたタンパクや化合物について、アキレス腱再生モデルに局所投与し、再生組織の変化を検討する。組織学的には再生組織を正常腱組織と比較し、構成細胞を比較するとともに、血管侵入や軟骨・骨組織の混在する割合を定量化する。また mRNA を回収して腱細胞マーカーの発現レベルを確認する。腱自体の成熟度の判定としては、線維の配向や密度を比較するほか、力学試験機にて破断強度を測定する。これらの実験の結果腱の再生、治癒を促進する手法が複数得られれば、これらを組み合わせてさらに効果的な方法の開発に挑戦する。さらにアキレス腱を切断後に縫合するモデルや、大型動物を用いたモデルでの検証を行い、臨床応用へとつなげていく予定である。

## 4 . 研究成果

アキレス腱再生モデルにおける再生腱の経時的な組織学的解析によって再生組織は正常腱と異なり異所性軟骨組織、骨組織を含みコラーゲン線維の成熟度の低い組織であることが分かった。Real time PCR においても腱細胞マーカーである *Tnmd* や *Scx* は発現が乏しく、軟骨細胞マーカーである *Sox9* や骨芽細胞マーカーである *Runx2* の発現が有意であった。これらの結果を元に FACS を用いて腱再生に関わる細胞群の特定を試みたがマーカーの選定に難渋し、一定の結果が得られなかった。しかし LMD で正常腱と

再生組織の部位別に RNA を抽出し RNA シークエンスを行ったところ、腱再生に関与していると推察される複数のサイトカイン、分子シグナルが同定された。

今後の後続研究事業では、アキレス腱再生モデル以外のより生理的な系を探索しつつ、それらのモデルに今回の実験で得られた知見を用いることで腱再生のメカニズムの解明に繋げてゆきたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Izawa N, Hirose J, Fujii T, Oka H, Uehara K, Naito M, Matsumoto T, Tanaka S, Tohma S.	4. 巻 18
2. 論文標題 The utility of 25-question Geriatric Locomotive Function Scale for evaluating functional ability and disease activity in Japanese rheumatoid arthritis patients: A cross-sectional study using NinJa database.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2018.1457422.	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 -
1. 著者名 Makii Y, Asaka M, Setogawa S, Fujiki S, Hosaka Y, Yano F, Oka H, Tanaka S, Fukui N, Yanagihara D, Saito T.	4. 巻 26
2. 論文標題 Alteration of gait parameters in a mouse model of surgically induced knee osteoarthritis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Orthop Surg (Hong Kong).	6. 最初と最後の頁 328-334
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/2309499018768017.	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 -
1. 著者名 Oichi T, Taniguchi Y, Soma K, Chang SH, Yano F, Tanaka S, Saito T.	4. 巻 9
2. 論文標題 A Mouse Intervertebral Disc Degeneration Model by Surgically-Induced Instability.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Spine	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/BRS.0000000000002427.	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 -
1. 著者名 Fujii Y, Kawase-Koga Y, Hojo H, Yano F, Sato M, Chung UI, Ohba S, Chikazu D.	4. 巻 9
2. 論文標題 Bone regeneration by human dental pulp stem cells using a helioxanthin derivative and cell-sheet technology.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Res Ther	6. 最初と最後の頁 24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-018-0783-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Uehara K, Akai M, Doi T, Oka H, Iwaya T.	4. 巻 17
2. 論文標題 Relationship between X-ray findings of lumbar spondylosis and knee pain.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Musculoskelet Disord.	6. 最初と最後の頁 379-384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12891-019-2755-1.	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 -

1. 著者名 Miura T, Ando M, Tanaka S, Uehara K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Assessment of Dorsal Subluxation in Thumb Carpometacarpal Osteoarthritis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Hand Microsurg.	6. 最初と最後の頁 125-129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1055/s-0038-1636730.	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 -

1. 著者名 Uehara K, Zhao C, Amadio PC.	4. 巻 43
2. 論文標題 Fibrin glue as an alternative to peripheral sutures does not increase tendon repair strength in an in vitro model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Hand Surg Eur Vol.	6. 最初と最後の頁 995-997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1753193418782675.	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 -

1. 著者名 Chang SH, Mori D, Kobayashi H, Mori Y, Nakamoto H, Okada K, Taniguchi Y, Sugita S, Yano F, Chung UI, Kim-Kaneyama JR, Yanagita M, Economides A, Canalis E, Chen D, Tanaka S, Saito T.	4. 巻 29
2. 論文標題 Excessive mechanical loading promotes osteoarthritis through the gremlin-1-NF- B pathway.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 1442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-09491-5.	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 -

1. 著者名 Okada K, Mori D, Makii Y, Nakamoto H, Murahashi Y, Yano F, Chang SH, Taniguchi Y, Kobayashi H, Semba H, Takeda N, Piao W, Hanaoka K, Nagano T, Tanaka S, Saito T.	4. 巻 25
2. 論文標題 Hypoxia-inducible factor-1 alpha maintains mouse articular cartilage through suppression of NF- $\kappa$ B signaling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 5425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-62463-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawabata K, Matsumoto T, Kasai T, Chang SH, Hirose J, Tanaka S.	4. 巻 1-7
2. 論文標題 Association between fall history and performance-based physical function and postural sway in patients with rheumatoid arthritis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2020.1731134	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 -

1. 著者名 Xuan F, Yano F, Mori D, Chijimatsu R, Maenohara Y, Nakamoto H, Mori Y, Makii Y, Oichi T, Taketo MM, Hojo H, Ohba S, Chung UI, Tanaka S, Saito T.	4. 巻 27
2. 論文標題 Wnt/ $\beta$ -catenin signaling contributes to articular cartilage homeostasis through lubricin induction in the superficial zone.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arthritis Res Ther.	6. 最初と最後の頁 247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-019-2041-5.	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 -

1. 著者名 Hamamoto S, Chijimatsu R, Shimomura K, Kobayashi M, Jacob G, Yano F, Saito T, Chung UI, Tanaka S, Nakamura N.	4. 巻 7
2. 論文標題 Enhancement of chondrogenic differentiation supplemented by a novel small compound for chondrocyte-based tissue engineering.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Exp Orthop.	6. 最初と最後の頁 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40634-020-00228-8.	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 -

1. 著者名 Murahashi Y, Yano F, Chijimatsu R, Nakamoto H, Maenohara Y, Amakawa M, Miyake Y, Yamanaka H, Iba K, Yamashita T, Tanaka S, Saito T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Oral administration of EP4-selective agonist KAG-308 suppresses mouse knee osteoarthritis development through reduction of chondrocyte hypertrophy and TNF secretion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 20329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56861-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yano F, Ohba S, Murahashi Y, Tanaka S, Saito T, Chung UI.	4. 巻 9
2. 論文標題 Runx1 contributes to articular cartilage maintenance by enhancement of cartilage matrix production and suppression of hypertrophic differentiation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 7666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-43948-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawata M, Mori D, Kanke K, Hojo H, Ohba S, Chung UI, Yano F, Masaki H, Otsu M, Nakauchi H, Tanaka S, Saito T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Simple and Robust Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells toward Chondrocytes by Two Small-Molecule Compounds.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports.	6. 最初と最後の頁 530-544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2019.07.012.	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
研究分担者	森崎 裕 (Morizaki Yutaka) (30508099)	東京大学・医学部附属病院・講師  (12601)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	矢野 文子  (Yano Fumiko)  (80529040)	東京大学・医学部附属病院・特任准教授   (12601)	
研究 分担者	張 成虎  (Chang Song Ho)  (80780551)	東京大学・医学部附属病院・助教   (12601)	