

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16616

研究課題名(和文)閉経モデルマウス滑膜内腱の網羅的遺伝子発現解析による狭窄性腱鞘炎の病態解明

研究課題名(英文)Elucidating the effect of estrogen deficiency on intrasynovial tendon by gene expression analysis in ovariectomized mice models

研究代表者

岩川 紘子(Iwakawa, Hiroko)

信州大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40770772

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): 8週齢メスC57BL/6マウスを卵巣切除による閉経モデルマウスを作成し、16週齢に滑膜内腱を採取しRNAを抽出しRNA-seqによる全遺伝子のプロファイリングを行った。結果: 発現変動遺伝子は閉経群で発現増加が30の遺伝子、発現低下が325の遺伝子が検出された。各種解析では変動遺伝子群では増加群で炎症と血管新生に関連する遺伝子群が、低下群ではユビキチン系プロセス、p38 MAPキナーゼ、筋骨格および心筋の新生、骨化に関与している遺伝子群の変動を認めた。本研究結果から閉経モデルマウスに生ずるエストロゲン欠乏状態が滑膜内腱において様々な遺伝子の発現を変動させることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エストロゲンは、妊娠および出産、閉経、女性特有の疾患などにおいて大きく血中濃度が変動し健康状態を左右する重要な性ホルモンであるが、本研究結果から閉経モデルマウスに生ずるエストロゲン欠乏状態が滑膜内腱において様々な遺伝子の発現を変動させることが明らかとなった。さらに発現が変動した遺伝子の中には腱の恒常性や機能の維持に重要な遺伝子が含まれていたことから、エストロゲン欠乏が狭窄性腱鞘炎発症に関与している可能性が示された。

研究成果の概要(英文): Stenosing tenosynovitis, representing trigger finger and de Quervain disease, is a common condition of the upper extremity in women. The relation between estrogen and stenosing tenosynovitis is often suggested as an essential factor of the disease. However, little is known about its etiology. We performed a next-generation sequence of the total RNA for the deep digital flexor in ovariectomized mice. In RNA-Seq, we completed a comprehensive gene analysis and investigated the biological process of the tendon. We found 30 up-regulated genes and 325 down-regulated genes in the ovariectomized mice group. Enrichment analysis showed identifications of acute-phase response, blood vessel morphogenesis, and organic hydroxyl compound metabolic processes in up-regulated genes. This study offers new insights into changes in tendon metabolism due to fluctuations in sex hormones with a particular focus on estrogen.

研究分野: 整形外科

キーワード: tendon biology estrogen sex hormones tenosynovitis

1. 研究開始当初の背景

ばね指やドゥケルバン病などの狭窄性腱鞘炎は手指の疼痛と機能障害を認める疾患であり、女性での発症率はばね指で6倍、ドゥケルバン病で4倍と報告されている^{1,2)}。好発年齢は40-60歳と、閉経から更年期を迎えた女性に多く、しばしば好発年齢を外れた周産期女性にも発症する。その他糖尿病、手指作業者、老化などが狭窄性腱鞘炎の発症の要因と考えられているが、前述の好発年齢とその特徴から、女性ホルモンがその発症に大きく関わっていることが長年推測されてきた。しかし、女性ホルモンとその発症機序との関わりについては未だ明らかとなっていない。

女性ホルモンであるエストロゲンは、分子量300程度の小さい脂溶性ステロイドで、標的細胞の受容体と結合し標的遺伝子の発現調整を行っている。エストロゲンの受容体にはエストロゲン受容体(以下ER α)とエストロゲン受容体(以下ER β)の2種類があり、これまでに腱や靭帯における両者の発現も報告されている³⁾。一方、我々の先行研究においても、屈筋腱などの滑膜内腱における両受容体の発現が確認されていることから、エストロゲンが滑膜内腱の代謝や恒常性維持にも深く関わっている可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は上記背景から、狭窄性腱鞘炎発症の要因の一つと考えられる女性ホルモンに焦点をあて、エストロゲン欠乏が滑膜内腱の遺伝子発現にどのような影響を与えるかを、閉経モデルマウスを用いて調査することを目的とした。

3. 研究の方法

材料と方法

(1) 動物

8週齢雌C57/BL6マウスを使用し、卵巣摘出による閉経処置を行なった(OVT群)。卵巣摘出後8週時にOVT群、対象(CT群)の後肢第2-4趾より深趾屈筋腱を採取した。

(2) RNAシーケンスによる網羅的遺伝子発現解析

RNAシーケンスは、OVT群N=3、CT群N=3で行ったRNeasy UCP micro kit (Qiagen, Hilden, Germany)を使用し、採取した深趾屈筋腱から全RNAを抽出後、RNAシーケンスを用いてOVT群とCT群の深趾屈筋腱における遺伝子発現を網羅的に解析した。データ解析は、第一解析としてマッピング、発現量、クオリティーチェックを行なった。第二解析として二群間を比較し、発現が変動した遺伝子の解析、クラスタリング処理、機能別に変動をみとめた遺伝子群を解析するgene ontology (GO)解析をおこなった。対照群に比して二倍以上かつ発現量10以上の遺伝子をDifferential expression genes(DEGs)とした。

(3) リアルタイムPCRによる発現量の定量解析

DEGsの基準に適合した遺伝子群から、腱鞘炎発症との関連性が示唆される遺伝子を選択しリアルタイムPCRによる遺伝子発現の定量を行った。検体は、シーケンスと同様の条件下で、マウス後肢より採取した深趾屈筋腱を用いた。検体は、OVT群N=6、CT群N=6とした。

(4) 組織学的評価

OVT群とCT群のマウス後肢を採取後、マウスのProximal pulleyレベルで短軸像の新鮮凍結切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、軟骨化生や線維結合織の評価目的にAlcian blue染色で評価した。

4. 研究成果

RNAシーケンス解析結果

(1) クオリティーチェック、マッピング

Samples	Total Reads	Total Mapped Reads	Unique Mapped	%Total Mapped Reads	%Unique Mapped Reads	Mean quality Score
Ovariectomy1	25,718,112	25,022,330	21,207,780	97.29	82.46	38.56
Ovariectomy2	24,561,258	23,920,669	20,303,384	97.39	82.66	38.45
Ovariectomy3	25,044,556	24,344,354	20,814,397	97.2	83.11	38.55
Control1	26,165,626	25,340,094	21,126,510	96.84	80.74	38.54
Control2	25,798,082	24,935,504	20,938,732	96.66	81.16	38.57
Control3	24,837,180	24,106,384	20,434,277	97.06	86.27	38.55

表1 各サンプルのリードとマッピングデータ

1 サンプルあたり、2000 万回以上のリードの読み込みが行われた。クオリティスコアは 97.82% Q30 で、また各サンプルの平均は 38.5(38.45-38.57)であり、クオリティは良好であった。各サンプルのリード数とマッピングデータを表 1 に示す。各サンプル間での total mapped reads, unique mapped reads の値にサンプル間の有意差は認めなかった。

(2) 遺伝子発現解析

OVT 群において発現増加を認める 30 の遺伝子、発現減少を認める 325 の遺伝子が検出された(図 1, 2)

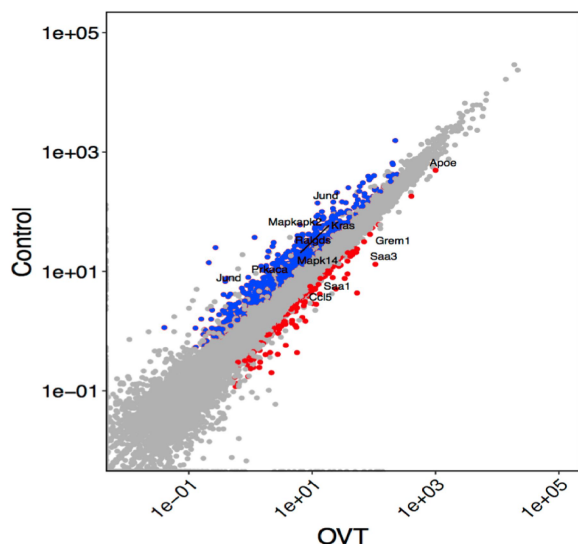


図 1 DEGs 上位 30 遺伝子のヒートマップ
発現増加遺伝子 (赤) 発現減少遺伝子 (青)

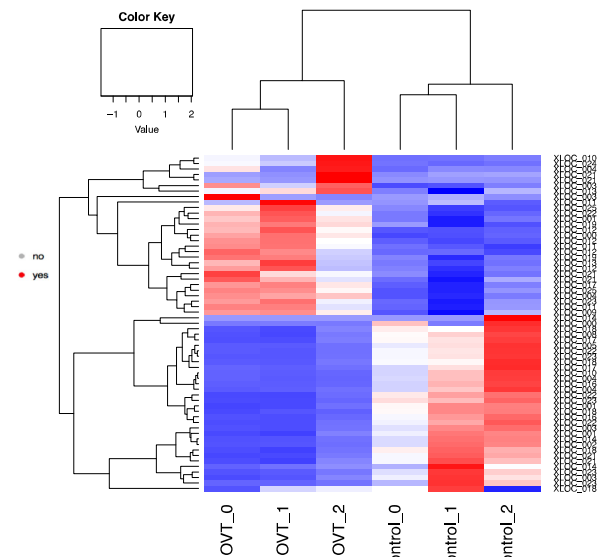


図 2 Volcano plot
発現増加遺伝子 (赤) 発現減少遺伝子 (青)

(3) GO 解析

GO 解析により、DEGs の遺伝子群から、有意性を認めた生物学的プロセスをリスト化した (図 3)。その結果、閉経モデルマウスで発現増加を認めた遺伝子群には、急性炎症、血管新生に関連している遺伝子群が含まれていた。その中には、アミロイドーシス、関節リウマチに関連する

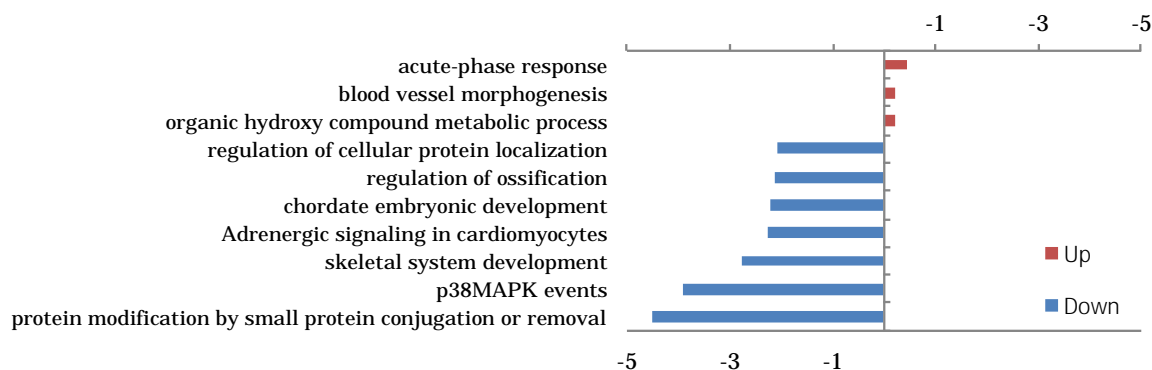


図 3 Gene Ontology 解析による変異遺伝子群の特性

急性炎症マーカーの Serum Amyloid A (SAA) 1, 3 や、炎症性ケモカインである Ccl5, 腱細胞分化マーカーであり血管新生抑制の働きを持つ Tenomodulin (TNMD), 脂質代謝に関する ApoE などを認めた (表 2)。一方、閉経モデルマウスにおいて発現減少を認めた遺伝子群の中には、ユビキチン系プロセス, p38 MAP キナーゼ, 筋骨格および心筋の新生, 骨化に関連している遺伝子が含まれており、その中には蛋白分解酵素である MMP の拮抗蛋白である TIMP2 が含まれていた。

特徴	変動遺伝子
急性炎症	Saa1, Saa3, Ccl5, Grem1, ApoE
血管新生	ApoE, Ptn, Ccl5, Grem1, Tnmd, Tmem2, Per2, Mmp3

(4) リアルタイム PCR による発現解析

閉経モデルマウスの滑膜内腱の遺伝子発現解析では、シーケンスでの発現増加遺伝子である SAA1, SAA3, TNMD, Ccl5 で発現量の有意差を認めた (図4)。

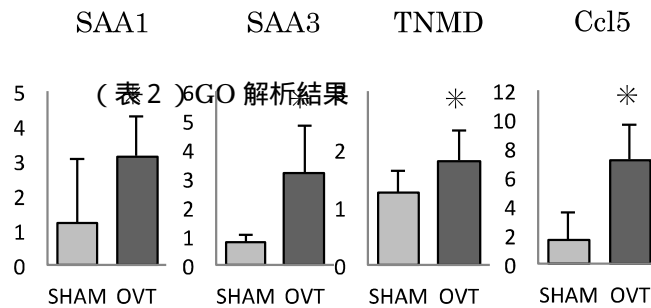


図4 リアルタイム PCR

(5) HE 染色, Alcian blue 染色によるマウス腱および周囲組織

HE 染色では腱, および腱鞘における核構造, および配列での両群の差は認めなかった。腱組織および腱鞘組織における組織の肥厚やコラーゲン配列の乱れなどは認めなかった。Alcian blue 染色では、軟骨化生および繊維結合組織の集積を示唆するような両群の差は認めなかった。(図5)

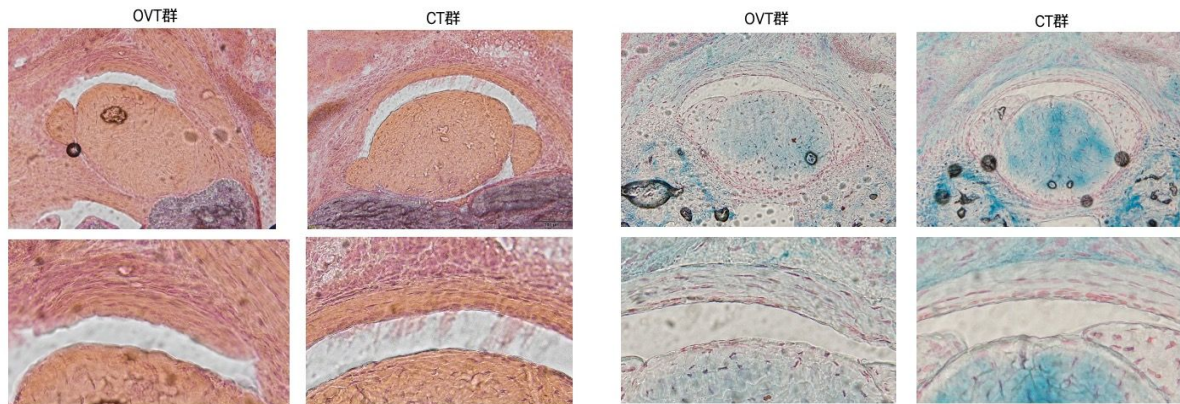


図5 HE 染色(左) アルシアンブルー(右)

結後

エストロゲンは、妊娠および出産、閉経、女性特有の疾患などにおいて大きく血中濃度が変動し健康状態を左右する重要な性ホルモンであるが、本研究結果から閉経モデルマウスに生ずるエストロゲン欠乏状態が滑膜内腱において様々な遺伝子の発現を変動させることが明らかとなった。さらに発現が変動した遺伝子の中には急性反応および血管新生に関連する遺伝子が含まれていた。組織像では腱鞘炎や腱変性を示唆する所見は認めなかったが、本研究の結果はエストロゲン欠乏が腱組織における遺伝子レベルでの関与の可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩川紘子, 林正徳, 北村陽, 内山茂晴, 加藤博之, 高橋淳
2. 発表標題 閉経モデルマウスを用いた狭窄性腱鞘炎発症機序の解析
3. 学会等名 第136回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩川紘子
2. 発表標題 閉経モデルマウスを用いた狭窄性腱鞘炎発症機序の解析
3. 学会等名 第 33 回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩川紘子
2. 発表標題 閉経モデルマウスを用いた狭窄性腱鞘炎発症機序の解析
3. 学会等名 第62回 日本手外科学会学術集会
4. 発表年 2019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	林 正徳 (Hayashi Masanori)		

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	二村 圭祐 (Nimura Keisuke)		
研究協力者	内山 茂晴 (Uchiyama Shigeharu)		
研究協力者	加藤 博之 (Kato Hiriyuki)		

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