

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16617

研究課題名（和文）腱再生を制御する分子制御機構の解明による腱再生能力賦活化治療の開発

研究課題名（英文）Development of novel tendon regenerative therapy by elucidating the molecular mechanism that regulates native regenerative potential in tendons.

研究代表者

河村 真吾（Komura, Shingo）

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30456511

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：腱細胞に生来備わる再生能力を規定する分子制御機構を解明するため、若齢および高齢マウスのアキレス腱損傷モデルのRNAシーケンス解析を行い、若齢マウスの損傷腱で特異的に活性化されるシグナルXを同定した。若齢マウスのアキレス腱損傷モデルにおいて、腱損傷後2～3日でシグナルXが最も活性化すること、そしてシグナルX阻害剤投与によって腱再生が阻害されることを確認した。さらに、腱細胞特異的にシグナルX活性化が誘導可能な高齢マウス（Scx-CreERT2/Gene A flox/flox）のアキレス腱損傷モデルにおいて、腱再生の改善を認めた。生理的腱再生を制御する分子制御機構の1つとしてシグナルXを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腱組織は再生能力が低いいため、損傷した腱の修復には年単位を要し、生理学的に健全な腱の状態へ再生することは困難である。本研究では、腱細胞の再生能力を規定する分子制御機構の一つとしてシグナルXを同定した。本研究成果は、治療に難渋する成人・高齢者の腱疾患に対して、本シグナルを標的とした生理的腱再生を誘導する新規治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In order to elucidate the molecular mechanism that regulates the regenerative potential in tendon cells, we performed RNA sequence analysis of Achilles tendons in young and aged mice and picked up signal X that is specifically activated in the injured tendon of young mice. In a model of Achilles tendon injury in young mice, it was confirmed that signal X was strongly activated 2-3 days after tendon injury, and that signal X inhibitor administration into the mice inhibited tendon regeneration. Furthermore, in an Achilles tendon injury model of an aged mouse with Scx-CreERT2 / Gene A flox / flox alleles in which signal X activation can be induced specifically for tendon cells, tendon regeneration was improved. We identified signal X as one of the molecular mechanisms that regulate physiological tendon regeneration.

研究分野：整形外科

キーワード：腱再生医療

1. 研究開始当初の背景

腱組織は低代謝のため虚血に強いが、一方で再生能力が低いという特徴がある。故に、損傷した腱の修復には年単位を要し、生理学的に健全な腱の状態へ再生することは困難となっている。運動器領域では骨・軟骨疾患(骨粗鬆症や変形性関節症)の基礎研究が盛んであり、これらに対する再生医療、新規薬物治療が臨床応用されつつあるが、腱疾患においては有効な治療が少ないため新規治療開発が望まれている。

近年の報告によって、若齢マウスでは腱損傷部に腱断端から腱細胞が誘導されて生理的腱状態に修復されるが、高齢マウスでは腱損傷部に腱細胞の誘導がなく、線維芽細胞由来の瘢痕組織で修復され、腱再生部には組織強度低下を残すことが明らかとなった(Howell et al. Sci Rep. 2017)。日常診療においても、成人・高齢者の腱損傷と比較して小児・若年者の腱損傷においては治癒期間も短く、再断裂や癒着をきたすことは少ないことを経験する。これらの結果は、腱細胞には生来再生能力が備わっていること、それは加齢に伴い減弱、消失することを示唆しているが、加齢に伴い変化する腱細胞の再生能力を規定する分子制御機構は未解明である。本分子制御機構の同定は、治療に難渋する成人・高齢者の腱疾患に対して生理的腱再生を誘導する新規治療法開発のプレイクスルーになると期待された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、加齢に伴う腱細胞の再生能力の変化を網羅的遺伝子発現解析、エピゲノム解析によって調査し、腱再生を制御するシグナル伝達経路および遺伝子群を同定すること、さらに腱再生シグナル分子および遺伝子に作用するシード化合物を同定することで、再生能力を失った加齢腱細胞に再生能力を誘導する新規薬物治療を開発することである。

3. 研究の方法

加齢により失われる腱再生シグナル伝達経路および腱再生関連遺伝子の同定

Gain of function/loss of function 実験による腱再生シグナル伝達経路および腱再生関連遺伝子の機能解析

同定した標的シグナル分子/遺伝子発現に作用するシード化合物の探索およびシード化合物投与による腱再生効果の検証

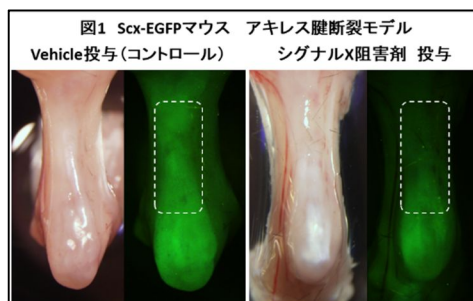
4. 研究成果

加齢により失われる腱再生シグナル伝達経路および腱再生関連遺伝子の同定

若齢(1週齢)および高齢(6ヶ月齢)の Scx-EGFP マウスを用いて、アキレス腱損傷モデルを作製した。損傷前、損傷5日後のアキレス腱を採取し、RNA シークエンスによる網羅的遺伝子発現解析を行い、若齢腱 > 高齢腱 : 2倍以上、若齢損傷腱 > 若齢健全腱 : 2倍以上となる遺伝子を抽出した。DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>)を用いて KEGG pathway 解析を行い、若齢マウスのアキレス腱損傷部で特異的に活性化されるシグナル X をピックアップした。若齢マウスアキレス腱損傷モデルからアキレス腱を採取し、ウエスタンブロットングを行った結果、シグナル X はアキレス腱損傷後 2-3 日目に最も活性化することを同定した。

Gain of function/loss of function 実験による腱再生シグナル伝達経路および腱再生関連遺伝子の機能解析

Scx-EGFP 若齢(1週齢)マウスのアキレス腱損傷モデルを作製後、シグナル X 選択的阻害剤および vehicle (コントロール) を連日経口投与した。アキレス腱損傷後 14 日目に標本作製し、アキレス腱再生部を実態顕微鏡および免疫染色にて評価した。コントロールと比較し、シグナル X 阻害剤投与により EGFP 発現の減弱に示される腱再生能の低下を認めた(図1)。



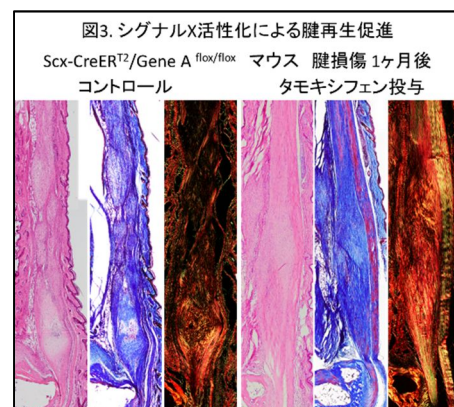
次に、腱特異的タモキシフェン誘導性 Cre 発現マウス Scx-CreERT2 と Rosa26-stop-tdTomato(Ai9)(R26-tdT)を交配し、Scx-CreERT2/R26-tdT を作製した。Scx-CreERT2/R26-tdT 若齢マウス(1週齢)にタモキシフェン投与、シグナル X 選択的阻害剤および vehicle(コントロール)の連日経口投与を行い、アキレス腱損傷モデルを作製した。

腱損傷 2 時間後、3 日後、14 日後、28 日後に組織標本を作製した。過去の報告に一致し (Maeda et al. Curr Biol. 2011)、腱損傷 2 時間後の TUNEL 染色にて、アキレス腱断端に存在する腱細胞のアポトーシスを認めしたが、両群間でアポトーシス細胞数に有意な差は認めなかった。しかし、腱損傷 3 日後の免疫染色 (tdT/Ki67) にて、コントロール群で tdT 陽性腱細胞の腱断端への遊走・増殖を認めしたが、シグナル X 選択的阻害剤投与群では tdT 陽性腱細胞の腱断端への遊走・増殖は見られなかった。さらに、14 日後、28 日後の免疫染色 (tdT/ SMA) によって、シグナル X 選択的阻害剤投与群では



tdT 陽性腱細胞の腱再生部への遊走が阻害されることを同定した (図 2)。一方、過去の報告 (Howell et al. Sci Rep. 2017) と異なり、コントロール群の再生腱においても、tdT 陰性の非 Scx リネージ細胞が多数存在することが明らかとなった。以上より、シグナル X が若齢マウスにおいて腱細胞に備わる intrinsic healing (tdT 陽性細胞による腱再生) を制御していることが証明されたが、シグナル X は extrinsic healing (tdT 陰性細胞からの Scx-EGFP 陽性細胞への転換) にも影響を与えることが示唆された。しかし同時に、これらの結果より、腱再生に関与する腱細胞以外の細胞起源の重要性が明らかとなった。その候補となる細胞には腱鞘滑膜細胞、筋線維芽細胞が考えられた。既所有の腱鞘滑膜細胞特異的 Cre 誘導マウス Tpp3-CreERT2 Komura et al. Nat Commun. 2019) に加え、筋線維芽細胞特異的 Cre 誘導マウス SMA-CreERT2 (2019 年度 AdAMS 先端モデル動物支援) さらにシグナル X に対する抑制遺伝子 A のコンディショナル強制発現マウス (シグナル X コンディショナル抑制マウス) である Rosa26-stop-GeneA マウス (2020 年度 AdAMS 先端モデル動物支援) を作製した。現在、Scx、Tpp3、SMA の各 Cre-driver マウスと Rosa26-stop-GeneA マウスを交配し、各細胞種におけるシグナル X の役割を解析中である。

最後に、高齢マウスの腱損傷モデルにおいて、シグナル X 活性化を誘導することで生理的腱再生が見られるか否かを検証した。シグナル X に対する抑制遺伝子 A のコンディショナルノックアウトマウス Gene A^{flox} を入手し、腱特異的シグナル X 活性化マウス (Scx-CreERT2/Gene A^{flox/flox}) を作製した。4 ヶ月齢のマウスにタモキシフェンを投与後、腱損傷モデルを作製し、腱再生能を評価したところ、コントロールマウスと比較し、腱再生能の改善を認めた (図 3)。また現在、腱鞘滑膜特異的 (Tpp3-CreERT2/Gene A^{flox/flox}) および筋線維芽細胞特異的 (SMA-CreERT2/Gene A^{flox/flox}) シグナル X の活性化マウスを作製しており、それらの細胞種においてシグナル X がもたらす腱再生効果を解析中である。



同定した標的シグナル分子/遺伝子発現に作用するシード化合物の探索およびシード化合物投与による腱再生効果の検証

シグナル X の恒常的活性化は発がんのリスクがあると報告されており、薬剤全身投与による有益性が乏しいと考えられた。そのため、安全かつ有益な腱再生治療を目指すべく、腱損傷部で活性化されるシグナル X の上流制御因子を検索中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Komura S, Satake T, Goto A, Aoki H, Shibata H, Ito K, Hirakawa H, Yamada Y, Akiyama H	4. 巻 10
2. 論文標題 Induced pluripotent stem cell-derived tenocyte-like cells promote the regeneration of injured tendons in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3992
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-61063-6.	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河村真吾、佐竹崇志、後藤篤史、青木仁美、柴田博史、伊藤謙治、平川明弘、山田泰広、秋山治彦
2. 発表標題 マウスiPS細胞由来腱様細胞は腱損傷部の再生を促進する
3. 学会等名 第64回日本手外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河村真吾、佐竹崇志、後藤篤史、青木仁美、柴田博史、伊藤謙治、平川明弘、山田泰広、秋山治彦
2. 発表標題 マウスiPS細胞由来腱様細胞は腱損傷部の再生を促進する
3. 学会等名 第35回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河村真吾、佐竹崇志、平川明弘、秋山治彦、山田泰広
2. 発表標題 マウスiPS細胞由来腱細胞は腱損傷部の再生に寄与する
3. 学会等名 第34回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河村真吾、佐竹崇志、平川明弘、秋山治彦、山田泰広
2. 発表標題 マウスiPS細胞由来腱細胞の分化誘導法開発の試み
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

〔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	山田 泰広 (Yamada Yasuhiro)	東京大学 医科学研究所・システム疾患モデル研究センター 先進病態モデル研究分野・教授 (12601)	
研究協力者	今井 祐記 (Imai Yuuki)	愛媛大学・病態生理学講座・教授 (16301)	
研究協力者	後藤 篤史 (Goto Atsushi)	岐阜大学・整形外科・大学院生 (13701)	

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
---------	---------