

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16618

研究課題名(和文) ヒアルロン酸による腱由来間葉系幹細胞の分化制御の解明と腱変性予防への応用

研究課題名(英文) High molecular hyaluronic acid regulates the differentiation of injured tendon-derived progenitor cells

研究代表者

浅井 秀司 (Asai, Shuji)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00770893

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)：本研究では、アキレス腱損傷マウスモデルとその腱損傷部から単離した損傷腱由来間葉系幹細胞を用いて以下のことを明らかにした。高分子ヒアルロン酸は、損傷腱由来間葉系幹細胞の軟骨分化を抑制し腱分化を促進する。ヒアルロン酸合成阻害剤4-メチルウンベリフェロン(4-MU)は、損傷腱由来間葉系幹細胞の軟骨分化を促進する。アキレス腱損傷マウスモデルにおいて、高分子ヒアルロン酸は異所性骨化を抑制する。4-MUは異所性骨化を促進する。これらの結果から、高分子ヒアルロン酸は損傷した腱の変性を抑制し修復を促進する可能性が示唆される。その分子機構を明らかにすることが今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腱損傷部の修復を促進するために、骨髄や脂肪由来の間葉系幹細胞に成長因子を投与することにより腱分化を誘導し、それらの細胞をscaffoldとともに損傷部位に移植する研究が行われている。しかし、いずれの研究も動物実験段階であり、完全な腱組織の獲得には至っていない。また、臨床応用するためには、ドナー細胞を採取する侵襲が患者に加わることが問題のひとつである。本研究で用いた方法により、腱損傷部に自然誘導される幹細胞の腱分化を促進できる可能性があり、ドナー細胞を採取する侵襲を避けることができる。また、ヒアルロン酸は既承認薬であり安全性が担保されており、本研究で得られた成果は臨床に応用しやすいと考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, using a mouse Achilles tendon injury model and progenitor-like cells isolated from the injured tendon, we found the followings: (1) high molecular weight hyaluronic acid inhibits chondrogenic differentiation of injured tendon-derived progenitor-like cells and promotes tenogenic differentiation, (2) 4-Methylumbelliferone (4-MU), an inhibitor of hyaluronan synthesis, promotes chondrogenic differentiation of injured tendon-derived progenitor-like cells, 3) high molecular weight hyaluronic acid inhibits heterotopic mineralization in a mouse Achilles tendon injury model, and 4) 4-MU promotes heterotopic mineralization. These results suggest that high molecular weight hyaluronic acid may inhibit degeneration and promote repair of injured tendons. Further studies are needed to elucidate the molecular mechanism.

研究分野：整形外科

キーワード：腱 変性 ヒアルロン酸 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

腱は修復能に乏しい組織である。そのため、腱は外傷や酷使により損傷すると生物学的にも生体力学的にも元の状態まで回復することは困難であり、加齢とともに変性を生じやすくなる。構造的には、変性の過程で腱組織に血管増生、軟骨化生、異所性骨化、膠原線維の不整走行などが生じる。今のところ変性した腱に対して根本的な治療法はなく、いかに腱の変性を予防するかが重要な課題である。腱において内因性の修復能を高め、損傷の治癒を促進するとともに変性を予防する新たな治療法の開発は急務である。

研究代表者らは、これまでも腱損傷後に生じる変性に関する研究を行ってきた。まずマウスのアキレス腱損傷モデルを作成し、腱損傷部では軟骨化生を経て異所性骨化が100%の確率で誘導されることを確認した。このモデルマウスを用いて以下のことを明らかにした。

- (1) 腱損傷後 1 週時点で損傷部には正常腱に比較して 25 倍多い間葉系幹細胞が存在しており、その間葉系幹細胞(損傷腱由来間葉系幹細胞)が腱の修復と変性の両方に直接関与する。
- (2) 腱損傷部の軟骨化生と異所性骨化には pro-chondrogenic regulator である TGF/BMP シグナリングが関与している。
- (3) 損傷腱由来間葉系幹細胞の軟骨分化は、BMP I 型受容体阻害剤および TGF/BMP シグナリングの下流である MAPK (p38, Erk1/2) 阻害剤で阻害される。
- (4) BMP I 型受容体阻害剤および p38 MAPK 阻害剤は、マウスのアキレス腱損傷部に生じる軟骨化生と異所性骨化を抑制する。
- (5) 同様の特性を持つ間葉系幹細胞がヒトのアキレス腱損傷部にも存在する。
- (6) 損傷腱由来間葉系幹細胞にはヒアルロン酸レセプターである CD44 が発現している。

過去の臨床研究では、腱の変性に起因する肩腱板炎や上腕骨外上顆炎の患者においてヒアルロン酸の注射が短期的に疼痛や機能を改善することが報告されている。また、基礎研究では、ヒアルロン酸が腱周囲の癒着を防止し腱の走行を滑らかにすることが示されている。しかし、ヒアルロン酸の腱組織や腱細胞への作用は十分には検討されておらず、細胞内情報伝達機構も明らかでない。一方、軟骨細胞や滑膜細胞をはじめとする様々な細胞において、ヒアルロン酸は CD44 を介して MAPK のリン酸化を抑制することが報告されている。

以上より、腱損傷部における軟骨化生を抑制する薬剤としてヒアルロン酸に注目し、「ヒアルロン酸は腱損傷部に誘導される間葉系幹細胞において CD44 を介して MAPK のリン酸化を抑制し、腱損傷後の軟骨化生を抑制するとともに腱の修復を促進する」という仮説を立てた。

2. 研究の目的

腱に対するヒアルロン酸の変性予防効果と細胞内情報伝達機構を検討すること。

3. 研究の方法

実験 1. アキレス腱損傷部に対するヒアルロン酸の効果

(1)CD1 マウスのアキレス腱を切断し、高分子ヒアルロン酸もしくは vehicle を局所投与し、アキレス腱損傷部における異所性骨化の程度を μ CT 検査により定量的に評価した。

(2)ヒアルロン酸合成阻害剤 4-メチルウンベリフェロン(4-MU)を用いて同様の実験を行った。

実験 2. 損傷腱由来間葉系幹細胞の分化能に対するヒアルロン酸の作用

(1)CD-1 マウスのアキレス腱損傷部から単離した損傷腱由来間葉系幹細胞を高分子ヒアルロン酸もしくは生食で前処理し、軟骨細胞および腱細胞へ分化誘導した。細胞染色の画像解析およびリアルタイム PCR を用いた遺伝子発現解析により、軟骨分化能および腱分化能をヒアルロン酸処理細胞と生食処理細胞で比較した。

(2)4-MU を用いて同様の実験を行った。

実験 3. 損傷腱由来間葉系幹細胞における高分子ヒアルロン酸の細胞内情報伝達機構

(1)CD-1 マウスのアキレス腱損傷部から単離した損傷腱由来間葉系幹細胞にヒアルロン酸を添加し、MAPK(Erk1/2, p38 MAPK, JNK)のリン酸化を Western blotting によりタンパク質レベルで検討した。

(2)さらに、ヒアルロン酸レセプターである CD44 を阻害し、ヒアルロン酸の MAPK リン酸化に対する作用および軟骨分化に対する作用を検討した。

4. 研究成果

実験 1.

(1)ヒアルロン酸投与群では vehicle 投与群に比べ異所性骨化の体積が有意に小さかった。

(2)4-MU 投与群では vehicle 投与群に比べ異所性骨化の体積が有意に大きかった。

実験 2.

(1)ヒアルロン酸は、アルシアンブルー染色の integrated density を濃度依存的に減少させた。また、高濃度のヒアルロン酸は軟骨分化マーカー(aggrecan, Sox9, II 型コラーゲン)の遺伝子発現量を減少させ、腱分化マーカー(Mohawk, I 型コラーゲン)の遺伝子発現量を増加させた。

(2)4-MU により aggrecan の遺伝子発現量は増加したが、Mohawk の遺伝子発現量に有意な

変化は認められなかった.

実験 3. では有意な結果を得ることができなかった.

これらの結果から, 高分子ヒアルロン酸は腱損傷部に誘導される間葉系幹細胞の軟骨分化を抑制し, 腱損傷部の軟骨化生や異所性骨化を抑制することが示唆される. その分子機構を明らかにすることが今後の課題である.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 羽賀貴博, 浅井秀司, 石塚真哉, 大羽宏樹, 坂口健史, 水野隆文, 川島至, 栗山香菜恵, 福井順, 藤井整, 今釜史郎
2. 発表標題 ヒアルロン酸はTSPCの軟骨分化を抑制し腱修復を促進する
3. 学会等名 第37回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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