

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16677

研究課題名(和文)性ステロイドホルモンに着目した組織線維化機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of tissue fibrosis focusing on estradiol

研究代表者

山中 芳亮(Yamanaka, Yoshiaki)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：60644862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：手根管滑膜の線維化が主な原因として指摘されている特発性手根管症候群の患者から採取した線維芽細胞を用いて、性ステロイドホルモンが組織線維化に与える影響を明らかにした。本研究結果より、ER を介したシグナルはCol1A1、Col3A1の発現抑制に関与しており、その作用はER の発現量に依存する可能性が示唆された。今後、特発性手根管症候群患者の個々の滑膜内線維芽細胞のER 陽性率を正確に把握することで、効率的なエストロゲン補充療法が新たな治療の選択肢の一つとして使用できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エストロゲンは、骨、筋肉、結合組織の成長および発達に広く影響し、細胞外マトリックスの中心的役割を果たすコラーゲンの発現にも様々な影響を与えていることが知られている。本研究では、手根管滑膜の線維化が主な病因である、特発性手根管症候群における性ステロイドホルモンと線維化の関連について明らかにした。他の線維化疾患においても性ステロイドの関連は否定できず、本研究結果が他の線維化疾患と性ステロイドホルモンの関連を検討していく上で一助となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Fibrosis of the subsynovial connective tissue (SSCT) is a characteristic finding in patients with idiopathic carpal tunnel syndrome (CTS). Idiopathic CTS frequently occurs in postmenopausal women; therefore, female steroid hormones, especially estrogens, may be involved in its development. In this study, we evaluated the effect of the estradiol on the expression of genes and proteins related to fibrosis of SSCT fibroblasts from patients with idiopathic CTS. Our results indicated that ER-mediated signaling may be involved in the regulation of Col1A1, and its regulatory effect may be dependent on the ER expression level. The accurate evaluation of ER expression level in the SSCT of individual patients with idiopathic CTS might guide the effective use of new estrogen replacement therapy.

研究分野：整形外科

キーワード：線維化 性ステロイドホルモン 特発性手根管症候群

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

組織の線維化は臓器不全に共通の病態である。したがって、線維化の機序を解明することは、臓器不全の進展予防や治療法の開発に重要である。申請者らは、手根管内の屈筋腱周囲滑膜の線維化が主な原因として指摘されている、特発性手根管症候群の線維化機序を中心に検討を行ってきた。研究成果の一つとして、線維化において重要な役割を果たす TGF- β の受容体を阻害することにより線維化関連遺伝子の発現を抑制できることを明らかにした (Yamanaka Y, et al. J Cell Physiol. 2017)。しかし、すでに活性化された TGF- β シグナルを受容体阻害剤により抑制するより、TGF- β シグナル活性化の詳細な機序を明らかにすることで、活性化を予防的に抑制することが重要と考えた。

特発性手根管症候群の特徴として、女性が男性と比較して3~10倍罹患しやすく、女性の中でも妊娠中や閉経後など性ステロイドホルモンが大きく変化する時期に多く発症することから、性ステロイドホルモン、特にエストロゲンの関与が示唆されている。しかし、エストロゲンと滑膜線維化との関連について検討している報告はない。エストロゲンと TGF- β シグナルの関連としては、乳がん分子細胞学的に検討されている報告は散見されるが、組織線維化との関連について検討している報告は少なく、詳細な機序は不明である。このような経緯で、特発性手根管症候群における滑膜線維化の機序を、エストロゲンおよび TGF- β シグナルの関連に着目して明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

特発性手根管症候群の手根管滑膜の線維化の機序を、性ステロイドホルモンおよび TGF- β シグナルに着目して明らかにすることである。

3. 研究の方法

対象は閉経後特発性手根管症候群患者10名(平均76歳;59~89歳)。臨床所見および電気生理学的検査で手根管症候群の診断が可能であった症例を対象とした。

細胞培養

患者の同意下で手根管開放術時に Subsynovial connective tissue (SSCT) を採取した。採取した SSCT をコラゲナーゼ処理して線維芽細胞を分離した。分離した細胞は、5% CO₂ 37°C 条件下で培養した。本研究では継代数3または4の細胞を用いた。

RNA抽出と Quantitative real-time polymerase chain reaction による mRNA の定量

線維芽細胞をエストラジオール非添加群(コントロール群)およびエストラジオール添加群(10⁻⁴、10⁻⁶、10⁻⁸、10⁻¹⁰、10⁻¹² M)の2群に分けて、線維化関連遺伝子の発現の相違を Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) を用いて検討した。培養した細胞を6well dishに播種し(1well:2×10⁶)、24時間後に培養液を除去し、コントロール群およびエストラジオール添加群(10⁻⁴、10⁻⁶、10⁻⁸、10⁻¹⁰、10⁻¹² M)の2群を作製した。エストラジオール添加24時間後に、コントロール群およびエストラジオール添加群ともに線維化関連遺伝子である collagen type I A1 (Col1A1)、collagen type III A1 (Col3A1)、connective tissue growth factor (CTGF)、vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現量を検討した。また、エストロゲンレセプターの発現量とエストラジオール添加による線維化関連遺伝子の発現量の変化を明らかにするために、エストロゲンレセプター- α (ER α)および ER β の発現量とエストラジオール添加(10⁻⁴ M)時の線維化関連遺伝子の変化率についても検討を行った。

免疫蛍光染色

培養した細胞を96well dishに播種し(1well:3×10⁴)、24時間後に培養液を除去し、エストラジオール(10⁻⁴ M)を加えた。4%パラホルムアルデヒドで37°C、15分間固定を行った。洗浄後に0.5% TritonX-100で膜透過処理を行い、3% BSA溶液により室温で1時間ブロッキングを行った。洗浄後に、ER α 、ER β 、Col1、Col3を一次抗体として加えて4°Cで一晩反応させた。洗浄後、FITC標識抗ウサギIgG抗体と1時間反応させた。洗浄後、蛍光顕微鏡BZ-X700を使用して画像を取得した。

免疫組織化学染色

採取した SSCT を4%パラホルムアルデヒドで固定後、通法のごとくパラフィン包埋を行い、5 μ mの薄切切片を作製した。20 μ g/mLのproteinase Kで10分間(37°C)処理した後に、0.3%過酸化水素水に20分間浸した。一次抗体は免疫蛍光染色で使用した抗体を用いて、37°Cで2時間反応させた。その後、二次抗体で30分間処理した後に、DABで発色させた。染色した切片は、蛍光顕微鏡BZ-X700を使用して画像を取得した。

4. 研究成果

qRT-PCR

Col1A1の発現は、10⁻⁶、10⁻⁸、10⁻¹⁰ M添加群でコントロール群と比較して有意に亢進していた(P<0.01)。Col3A1の発現は、10⁻⁴、10⁻¹² M添加群でコントロール群と比較して有意に低下していた(P<0.01、P<0.05)。CTGFの発現は、10⁻⁶ M添加群でコントロール群と比較して有意に亢進していた(P<0.05)。VEGFの発現は、10⁻¹² M添加群でコントロール群と比較して有意に亢進していた(P<0.05)。コントロール群におけるER α 発現量とCol1A1およびCol3A1発現量の間には、ともに相関は認めなかった。エストラジオール添加(10⁻⁴ M)によるCol1A1の発現変化率

は ER α の発現と負の相関を認めた ($r=-0.903$, $P<0.01$)。Col3A1 の発現変化率も同様に ER α の発現と負の相関を認める傾向にあった ($r=-0.624$, $P=0.054$) (図 1)。

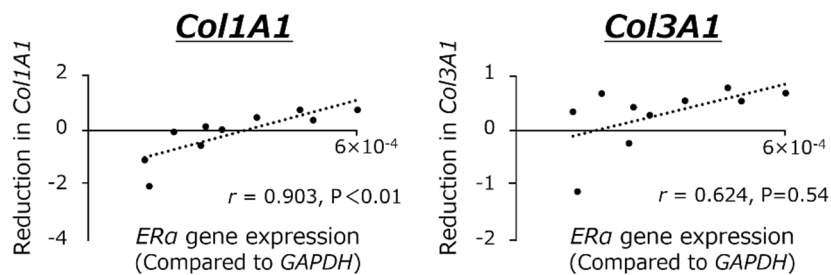
免疫蛍光染色

コントロール群の Col1 および Col3 陽性率は、 $20.3 \pm 2.9\%$ および $47.2 \pm 11.7\%$ であった。エストラジオール添加群 (10^{-4} M) の Col1 および Col3 陽性率は、 10.9 ± 2.3 および 15.0 ± 2.6 であり、Col1 および Col3 とともにエストラジオール添加により有意に陽性率は低下した (ともに $P<0.05$)。

免疫組織化学染色

ER α および ER β 陽性率は、 $29.0 \pm 2.9\%$ と $22.4 \pm 4.8\%$ であり、陽性率に有意差は認めなかった。Col1 と Col3 の染色面積は、 $31630 \pm 2440 \text{ mm}^2$ と $23841 \pm 1201 \text{ mm}^2$ であり、Col1 の染色面積が有意に大きかった ($P < 0.05$)。ER α および ER β 陽性率と Col1 と Col3 の染色面積の間に相関は認めなかった。

(図 1)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamanaka Yoshiaki, Menuki Kunitaka, Tajima Takafumi, Okada Yasuaki, Kosugi Kenji, Zenke Yukichi, Sakai Akinori	4. 巻 233
2. 論文標題 Effect of estradiol on fibroblasts from postmenopausal idiopathic carpal tunnel syndrome patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 8723 ~ 8730
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.26752	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 山中芳亮、目貫邦隆、田島貴文、岡田祥明、小杉健二、善家雄吉、酒井昭典	4. 巻 30
2. 論文標題 エストラジオールが閉経後特発性手根管症候群患者の手根管内屈筋腱滑膜に与える効果	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 末梢神経	6. 最初と最後の頁 76 ~ 84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 山中芳亮、目貫 邦隆、田島 貴文、岡田 祥明、善家 雄吉、酒井 昭典
2. 発表標題 エストラジオールが閉経後特発性手根管症候群患者の手根管内屈筋腱滑膜に与える効果
3. 学会等名 第29回日本末梢神経学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山中芳亮、目貫 邦隆、田島 貴文、岡田 祥明、小杉 健二、善家 雄吉、酒井 昭典
2. 発表標題 エストラジオールは閉経後特発性手根管症候群患者のsubsynovial connective tissueの線維化を抑制する
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 山中芳亮, 目貫 邦隆, 田島 貴文, 岡田 祥明, 小杉 健二, 善家 雄吉, 酒井 昭典
2. 発表標題 エストラジオールが閉経後特発性手根管症候群患者のsubsynovial connective tissueに与える影響
3. 学会等名 第50回日本結合組織学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山中芳亮, 目貫 邦隆, 田島 貴文, 岡田 祥明, 小杉 健二, 善家 雄吉, 酒井 昭典
2. 発表標題 エストラジオールが特発性手根管症候群患者の屈筋腱鞘滑膜内線維芽細胞に与える効果の検討
3. 学会等名 第61回日本手外科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山中芳亮, 目貫 邦隆, 田島 貴文, 岡田 祥明, 善家 雄吉, 酒井 昭典
2. 発表標題 特発性手根管症候群閉経後女性患者における屈筋腱周囲滑膜内線維芽細胞にエストラジオールが与える効果の検討
3. 学会等名 第91回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshiaki Yamanaka, Kunitaka Menuki, Takafumi Tajima, Yasuaki Okada, Yukichi Zenke, Akinori Sakai
2. 発表標題 Effect of Estradiol on Fibroblasts from Idiopathic Carpal Tunnel Syndrome Patients
3. 学会等名 American Society for the Surgery of the Hand Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshiaki Yamanaka, Kunitaka Menuki, Takafumi Tajima, Yasuaki Okada, Yukichi Zenke, Akinori Sakai
2. 発表標題 The Effect of Estradiol on the Expression of Profibrotic Markers in Fibroblasts Derived from the Subsynovial Connective Tissue of Patients with Idiopathic Carpal Tunnel Syndrome
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society Annual Meeting (国際学会)
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