

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18003

研究課題名(和文) 前十字靭帯再建術後の移植腱に対するScx, Sox9陽性細胞の解析

研究課題名(英文) Involvement of Scx and Sox-9 positive cells on graft remodeling in anterior cruciate ligament reconstruction

研究代表者

舩田 哲朗 (Masuda, Tetsuro)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：20794530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ACL再建術後におけるScx陽性細胞とSox9陽性細胞の移植腱への関与を評価した。ScxGFP 遺伝子改変ラットを用いたACL再建モデルでは、術後4週で移植腱実質部に広くScx陽性細胞を認めた。ACL切離モデルでは、経時的に遺残組織内にScx陽性細胞が広く分布し、遺残組織を温存したACL再建モデルは、郭清モデルと比較し、術後移植腱内に多くのScx陽性細胞を認めた。また温存モデルでは術後移植腱の最大破断強度が有意に大きかった。本結果よりACL再建術後、移植腱の再靭帯化にScx陽性細胞が関与する可能性があり、遺残組織を温存することで移植腱の力学的強度が早期に改善する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過去の報告では前十字靭帯(ACL)発生過程においてScx, Sox9陽性細胞が関与することが示されている。本研究ではACL再建術後における移植腱の再構築過程に、Scx陽性細胞が寄与している可能性を示唆させる結果を得た。また、ACL遺残組織にScx陽性細胞が認められ、遺残組織を温存することで早期に移植腱の力学的強度を改善する可能性が示唆された。本結果は、移植腱の再構築過程の機序を明らかにし、移植腱の力学的強度の早期回復へ繋がる知見となることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：A multipotent cell population co-expressing a basic-helix-loop-helix transcription factor

scleraxis (Scx) and SRY-box 9 (Sox9) has been expressed in anterior cruciate ligament (ACL) during mouse embryonic development. We investigate the involvement of Scx+ cells on graft remodeling in ACL reconstruction using ScxGFP transgenic rat. We demonstrate that Scx+ cells are localized in substantial part of graft after ACL reconstruction. Further, Scx+ cell was seen in ACL remnant tissue after ACL injury. Remnant tissue preservation group in ACL reconstruction had significantly higher ultimate load to failure than the resection group at 6weeks after surgery. These findings indicate that Scx+ cell may be able to act as remodeling progenitor-like cells and possibility suggested that preservation of remnant tissue improves biomechanical strength of graft after ACL reconstruction.

研究分野：21212

キーワード：前十字靭帯 Scleraxis 遺残組織

1. 研究開始当初の背景

前十字靭帯 (ACL) 損傷はスポーツなどにより高頻度に生じる外傷であり、疼痛、可動域制限、膝ぐずれ症状により、スポーツ活動の継続や日常生活に支障をきたす。ACL 損傷に対する適切な治療と早期のスポーツ、日常生活への復帰は重要な課題である。術後臨床成績は向上しているが、術後早期に移植腱の内在性線維芽細胞は阻血性壊死に陥り、力学的強度は劣化し、その回復に長期間を要するとされ、その力学的強度は術後 12 カ月を経過しても正常化しないと報告されている。ACL 損傷膝において、遺残組織は滑膜叢内血流が豊富であり、遺残組織温存による ACL 再建術は細胞浸潤および再血管化によって移植腱の再構築過程が促進される可能性があると報告されている (Kondo et al. Am J Sports Med 2015)。また遺残組織内の間葉系幹細胞 (MSC) が移植腱の再靭帯化に寄与しているとも報告されている (Weili Fu et al. International Orthopaedics 2016)。

近年、発生過程における細胞系譜追跡の手法を用いた解析によって、マウスの前十字靭帯発生過程に Scleraxis (Scx) と SRY-box containing gene 9 (Sox9) を共発現する細胞がみられることが明らかとなった (Sugimoto Y, et al. Development 2013)。これらの細胞は、MSC より分化し、その後それぞれの単独発現細胞へ分化することが報告されている。また、Scx 欠失マウスは、発生過程で腱・靭帯において、成熟マーカー分子である Tenomodulin (Tnmd) の発現がほぼ消失していることが報告されている。我々は、ラット肩腱板修復術モデルにおいて、術後の修復部に Scx や Sox9 を発現する細胞がみられること、修復組織中の Scx 発現細胞を増加させることによって、強靭な線維組織の形成が促進されることを報告した (Tokunaga T, et al. Am J Sports Med 2015)。以上の知見は、Scx, Sox9 陽性細胞が前十字靭帯再建術後の移植腱の線維組織修復に関与すると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

これまでの研究では、ACL 靭帯遺残組織中に MSC が存在することが報告されているが、移植腱の再靭帯化における機序は不明である。本研究は、移植腱再靭帯化促進治療の標的として、発生過程で前十字靭帯の形成を担う Scx, Sox9 陽性細胞に着目した。Scx 発現細胞を可視化する遺伝子改変動物を使用し、前十字靭帯再建術後の移植腱再靭帯化および遺残組織中の Scx, Sox9 陽性細胞の関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究方法

(1) ラット前十字靭帯再建モデル作製および前十字靭帯遺残組織の評価

本学施設で飼育・繁殖した野生型および ScxGFP 遺伝子改変ラットを用いた (11~12 週齢)。麻酔下に前十字靭帯を切離し、切離後 2 日, 1 週, 2 週, 4 週に膝組織を採取し、遺残組織を RT-PCR および組織学的に評価した。RT-PCR では Scx, Sox9, Tenomodulin (Tnmd), Collagen type 1 (Col-1), TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 の発現を確認した。また、麻酔下にラットの長趾屈筋腱を採取し、大腿骨、脛骨に骨孔を作成後、長趾屈筋腱を通し両断端を

固定して、前十字靭帯再建モデルを作製した。モデル作製の際に遺残組織を温存した群と郭清した群にわけ、再建術後4週、6週、8週に膝組織を採取した。

(2) 組織学的、免疫組織学的評価

採取した組織は20%スクロース含有4%PFAで16時間固定後に凍結包埋し、粘着フィルム法により凍結組織切片を作製し、移植腱の組織所見を評価した。移植腱中のScx、Sox9陽性細胞は抗GFP抗体、抗Sox9抗体を一次抗体として4℃で終夜反応させた後、Alexa Fluorコンジュゲート二次抗体で反応後観察した。また、移植腱線維組織の評価をCol-1、間葉系幹細胞の評価をCD90、増殖期細胞マーカーとしてKi-67の免疫染色を行った。

(3) 移植腱力学的強度への影響の評価

術後6、8週に膝組織を採取し、大腿骨、脛骨を固定後、張力測定器(EZ-Test、島津製作所)を用いて、引っ張り破断試験を行った。破断部断面積をマイクロキャリパーで測定し、移植腱の最大破断強度(N)、最大破断応力(N/mm²)を算出し、遺残組織温存群と郭清群で比較を行った。

4. 研究成果

(1) ラット ACL 再建モデルおよび ACL 切離モデルにおける遺残組織の解析

ScxGFP 遺伝子改変ラットの ACL を切離・郭清後、ACL 再建モデルを作製した結果、移植腱内に Scx 陽性細胞を認めた(図1)。Sox9 陽性細胞は移植腱実質部にはみられなかった。

野生型ラットの ACL を切離後、遺残組織を採取し RT-PCR をおこなった結果、切離前の ACL と比較し、Scx、TGF- β 1、TGF- β 2 の発現が切離後2、4週で有意に増加した。Sox9、Tnmd、Col-1、TGF- β 3 の発現に有意差はみられなかった。ScxGFP 遺伝子改変ラットの ACL を切離後におこなった遺残組織の免疫組織学的評価では、経時的に移植腱内に Scx 陽性細胞が広く分布する結果がみられた(図2)。

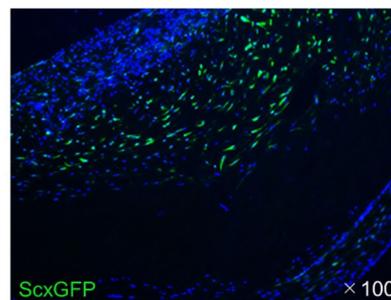


図1 ScxGFPラットACL再建術後4週
移植腱中央部
Scx陽性(緑)、核(青)

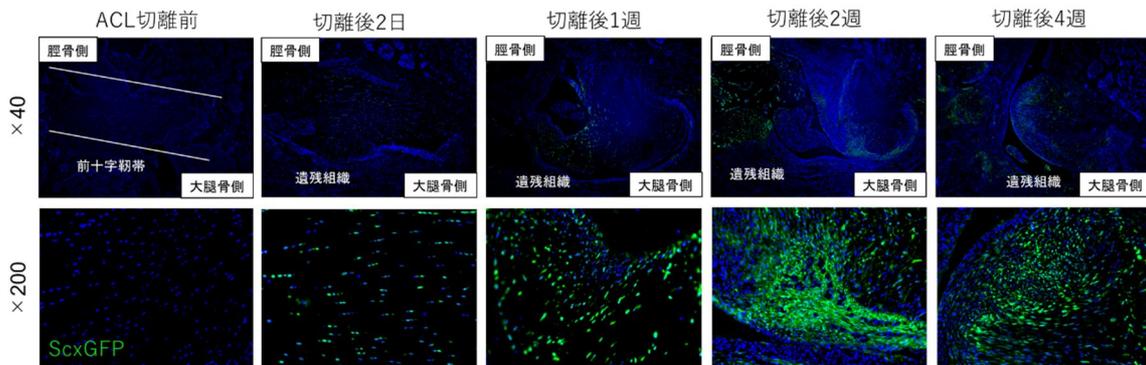


図2 ScxGFP 遺伝子改変ラットACL切離後
Scx陽性(緑), 核(青)

(2) ラット ACL 再建モデル術後の組織学的評価

ScxGFP 遺伝子改変ラットの ACL 再建モデルを遺残組織温存群と郭清群にわけ、免疫組織学的評価を行った。遺残組織温存群では、郭清群と比較し、術後4, 6週において移植腱内に Scx 陽性細胞を多く認めた(図3)。Sox9, Col-1, CD90, Ki-67 陽性細胞数にあきらかな差はみられなかった。

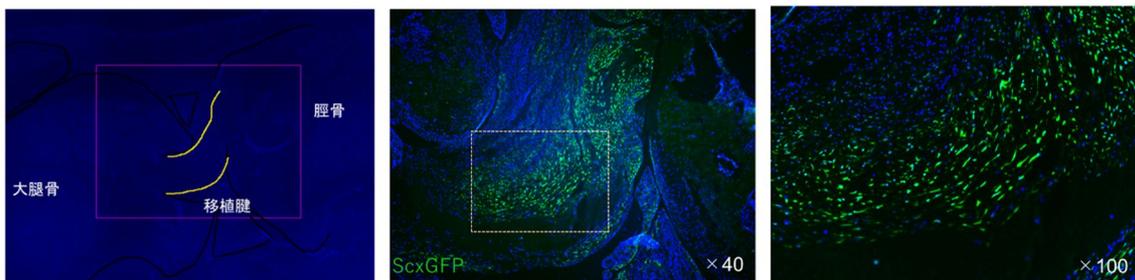


図3 ScxGFP 遺伝子改変ラット 遺残組織温存ACL再建術後4週
Scx陽性(緑), 核(青)

(3) 遺残組織温存, 郭清 ACL 再建術後の力学的評価

野生型ラット ACL 再建術後の移植腱力学的評価では、遺残組織温存群では術後6, 8週の最大破断強度が $9.50 \pm 4.15(N)$, $11.39 \pm 2.03(N)$, 最大破断応力が $7.90 \pm 3.05(N/mm^2)$, $9.24 \pm 1.93(N/mm^2)$ であった。遺残組織郭清群では術後6, 8週の最大破断強度が $6.84 \pm 1.94(N)$, $9.92 \pm 2.88(N)$, 最大破断応力が $6.06 \pm 1.99(N/mm^2)$, $8.31 \pm 2.47(N/mm^2)$ であった。最大破断強度は術後6週において温存群が郭清群と比較し有意に大きかった ($p < 0.05$)。術後8週では有意差はみられなかった。また、郭清群では術後6週と比較し、術後8週で有意に大きかった。最大破断応力は術後6週, 8週ともに温存群, 郭清群間に有意差はみられなかった。また郭清群では術後6週と比較し、術後8週で有意に大きかった ($p < 0.05$)(図4)。

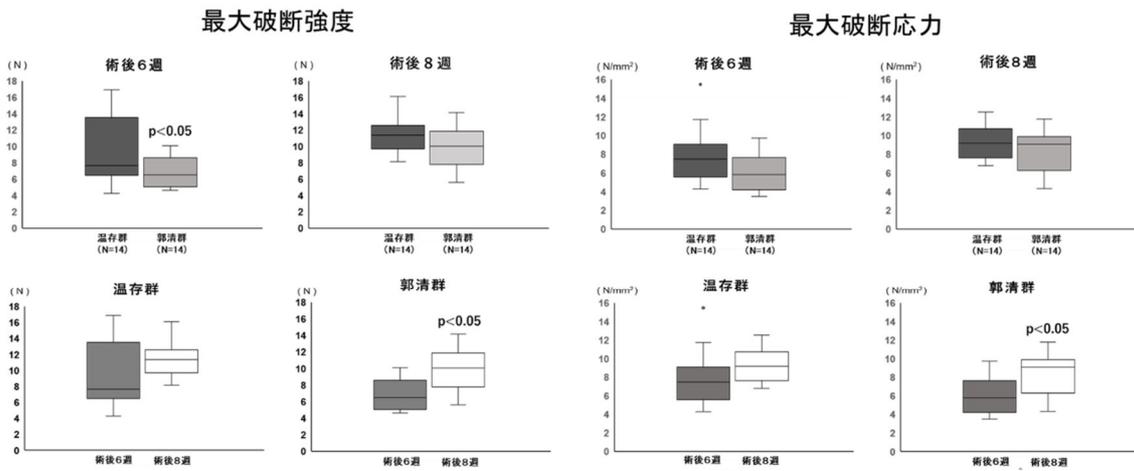


図4 野生型ラットACL再建モデル術後6, 8週
移植腱力学的評価

以上の結果から、ACL 再建術後の移植腱再構築過程において Scx 陽性細胞の関与が明らかとなった。ACL 切離後、遺残組織中に経時的に Scx 陽性細胞が多く分布し、遺残組織を温存することで、術後の移植腱実質部に広く Scx 陽性細胞を認めた。遺残組織温存モデルでは術後早期に移植腱の力学的強度が回復する結果がみられ、移植腱の再靭帯化過程に Scx 陽性細胞が関与し、力学的強度を促進する可能性が示唆された。今後は前十字靭帯再建モデルを用いて、移植腱内の Scx 陽性細胞を増加する方法とその再靭帯化促進作用の検証を進め、術後早期のスポーツ、社会生活への復帰を目指す予定である。

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 河上 純輝、舛田 哲朗、久永 哲、宮本 健史
2. 発表標題 前十字靭帯再建術における遺残組織中のScleraxis陽性細胞の効果
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
---------	---------