

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20943

研究課題名（和文）屈筋腱損傷における治癒メカニズムの解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of healing mechanisms and development of new treatment methods in flexor tendon injuries

研究代表者

岩永 康秀（Iwanaga, Yasuhide）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・特任助教

研究者番号：80906610

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、通常の屈筋腱損傷で誘導されるScleraxis陽性細胞を腱由来線維芽細胞と定義し、それが治癒過程にどの程度関与するかを明らかにした。通常の治癒過程では、腱外から侵入する線維芽細胞により癒痕組織となるが、腱の中心部ではScx陽性細胞が観察された。一方、腱をハイドロゲルで被覆した場合、癒痕組織が形成されることなく、主に腱周囲組織からScx陽性細胞が増殖し治癒を促すことが分かった。このことから、腱の治癒過程では通常、腱外からくる線維芽細胞が治癒の中心的な役割を果たすが、その侵入を抑えると、Scx陽性細胞が腱周囲組織より増殖し、治癒を促す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

本研究では、屈筋腱の一般的な治癒過程と、腱外の線維芽細胞の侵入を抑制した環境での治癒過程を比較し、Scx陽性細胞の関わりを解析した。その結果、通常の腱の治癒過程では、線維芽細胞が治癒の中心的な役割を果たすが、線維芽細胞の侵入を抑制すると、Scx陽性細胞が腱周囲組織から増殖し、治癒を促進することが明らかとなった。本研究により、腱の治癒過程のメカニズムの一端を明らかにでき、今後の腱の治療に応用されることを期待している。

研究成果の概要（英文）：In this study, we defined Scleraxis-positive cells induced in normal flexor tendon injuries as tendon-derived fibroblasts and determined the extent to which they are involved in the healing process. During the normal healing process, Scx-positive cells were observed in the central part of the tendon, whereas fibroblasts invading from outside the tendon resulted in scar tissue. On the other hand, when the tendon was coated with hydrogel, Scx-positive cells proliferated mainly from the peritendinous tissue and promoted healing without scar tissue formation. This indicates that fibroblasts from outside the tendon usually play a central role in the normal healing process of tendons, but when their invasion is suppressed, Scx-positive cells proliferate from the surrounding tendon tissue and promote healing.

研究分野：整形外科

キーワード：屈筋腱損傷 治癒過程 Scleraxis

## 1. 研究開始当初の背景

腱損傷はスポーツ活動のみならず予期せぬ怪我や事故などでも生じ、幅広い年齢層で問題となる運動器疾患である。現在では腱縫合法やリハビリテーションが改良され、術後成績は改善傾向にあるものの、術後可動域制限などの後遺症による QOL の低下は喫緊の課題である。一般に腱損傷を起こした場合、その治癒過程では主に腱由来線維芽細胞と腱外由来線維芽細胞が増殖し損傷部を修復すると考えられている。しかしながら、一般的な治癒過程では腱外由来線維芽細胞の増殖が強く起こり、周辺組織との癒着形成や腱の力学特性の低下を招く。そのため、損傷した腱が腱本来の特性を持ち合わせた組織に再生することはない。一方で、腱由来線維芽細胞による修復は理想的な治癒過程と考えられている。最近の研究では、腱損傷後 2 週目よりパラテノンに存在する腱前駆細胞が腱分化マーカー遺伝子である Scleraxis を発現し、治癒に関与することが明らかとなった (JBC, 2018)。しかしながら、損傷した腱の修復過程では、炎症性細胞や造血幹細胞、腱外由来線維芽細胞などの多くの細胞が関わり、Scleraxis 陽性細胞のみで治癒させることは難しい。そこで、本研究では、まず通常の屈筋腱損傷で誘導される Scleraxis 陽性細胞を腱由来線維芽細胞と定義し、それが治癒過程にどの程度関与するかを明らかにする。Scleraxis 陽性細胞の判別は Scleraxis を蛍光標識した Scx-GFP ラットで行う。さらに、当研究室で開発されたハイドロゲル (Tetra-Peg gel) を使用することで、腱外由来線維芽細胞の進入を物理的に排除し、腱由来線維芽細胞 (Scleraxis 陽性細胞) による治癒を最大限引き出す方法の開発に挑戦する。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、腱の治癒過程における腱由来線維芽細胞による治癒メカニズムを明らかにし、ハイドロゲルを使用することで腱由来線維芽細胞による治癒効率を最大限高めることである。

## 3. 研究の方法

本研究では、まず腱の治癒メカニズムを Scx-GFP ラットを使用することで明らかにし、さらにハイドロゲルを使用することで、腱由来線維芽細胞による治癒を最大限引き出すことである。そこで、以下のように実験を計画している。

### 1) Scx-GFP ラットによる屈筋腱損傷モデルの作成と治癒過程の解析

Scx-GFP ラットの後足を使用する。足底部第三趾屈筋腱を切断し、腱縫合を行う。縫合した腱の治癒過程を術後 1 週、2 週、3 週、4 週、6 週、と経時的に組織学的評価を行う。また、リアルタイム RT-PCR を用いた遺伝子発現解析や、RNA-seq での網羅的発現解析も行う。

### 2) Tetra-Peg gel の至適条件の決定

Tetra-PEG gel はその均一性から力学特性、分解性、ゲル化時間の調整などを調節することが可能である。In vitro/vivo での条件検討を行い、より生体内で適しており且つ臨床的に使用可能なゲルの条件を最適化していく。具体的には、力学特性については生体内で使用しても問題ないゲルの硬さを in vivo で模索し、ゲルの至適硬度を決定する。分解性、ゲル化時間は臨床的に使用可能な範囲で検討をする。

### 3) Tetra-Peg gel を用いた腱由来線維芽細胞による治癒の検証

上記 1) で作成した Scx-GFP ラットによる屈筋腱損傷モデルを使用し、ゲルで被覆する実験群と生理食塩水を使用した対照群とで比較検討する。具体的な評価項目としては、癒着や縫合腱のマクロ的な評価と、組織学的な評価を行う。癒着の評価としては、既報のスコアリングを参考にし、治癒過程の評価は免疫染色を含めた組織学的評価で行う。また、腱の強度の評価として rheometer (サン科学) を使用し、破断強度を比較する。

## 4. 研究成果

### 1) Scx-GFP ラットによる屈筋腱損傷モデルの作成と治癒過程の解析

屈筋腱の損傷モデルを作成するため、ラット足底の屈筋腱を使用。ラット屈筋腱の術後再断裂を予防するため、強固な縫合法を開発した。ラット屈筋腱は直径 1 mm 程であり、縫合自体が非常に難しいが、単縫合のみで行うと容易に断裂してしまう。そこで、単縫合ではなく、最初に後方を figure of eight (縫合糸をクロスさせて 8 の字で固定する方法) で縫合した後、ループ針で core suture を行い、最後に表面を 2 カ所 figure of eight で固定する方法を行った。すると、単縫合で行ったものと比較し、約 3 倍程度の縫合強度ができることが分かった。この方法で行うと、術後にギプス固定などで固定を行わなくても、再断裂率が低下するため、腱の治癒過程の観察に適切であると考えられた。このモデルを使用し、屈筋腱の治癒過程の遺

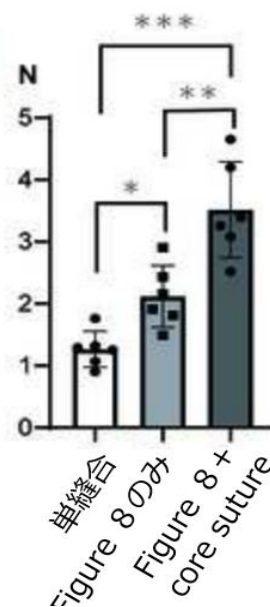


図 1 .

伝子発現解析を経時的に行った(図2)。その結果、腱に関する転写因子である Scx, Mkx, Egr1 は、治癒過程で大きな変化が見られなかった。また、コラーゲン合成に関しては Col1a1, Col3a1 の上昇が損傷から約 1 週目でピークを迎え、徐々に発現が減少していくことが分かった。このことから、腱の一般的な治癒過程では、いわゆる腱の転写因子が強く活性化しているわけではなく、周辺組織からの線維芽細胞によるコラーゲン合成が行われることが示唆された。

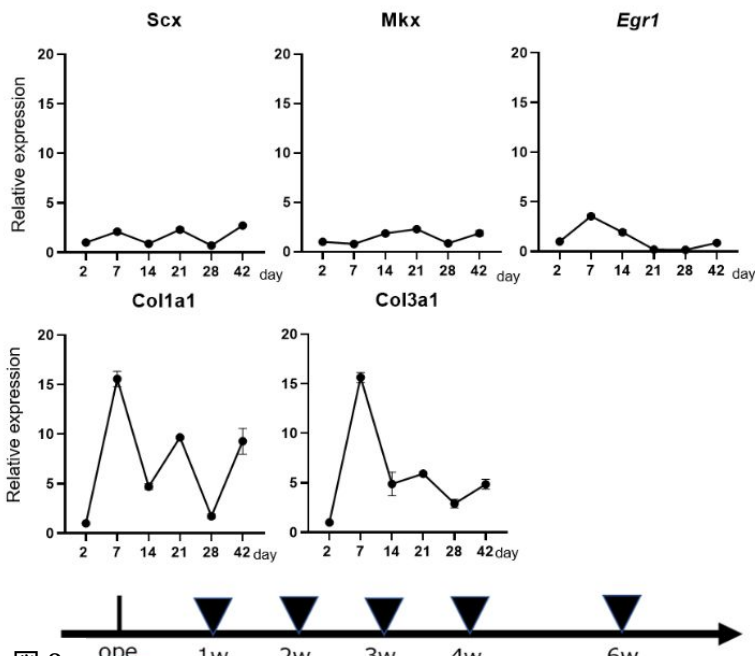


図2. 屈筋腱切断モデルの作成と経時的に治癒過程の解析

## 2) Tetra-Peg gel の至適条件の決定

今回、腱そのものの治癒過程を観察するため、東京大学工学系研究科で開発された、ハイドロゲルを使用することにした。ハイドロゲルは、硬度やゲル化時間を主に調整できることから、今回は工学部と相談の上、ポリエチレングリコールの濃度を 2.5% とし、Buffer を pH 5.2 程度のクエン酸バッファーを使用することで、ゲル化時間を約 1 分程度に調整した。これで、腱縫合後にストレスなくゲル化が行えることを確認した。また、分解性についても工学部と検討をしたが、エステル結合を付与することで分解性をもたせることができるが、それにより炎症を惹起する可能性が示唆されたため、今回の実験では行わなかった。in vivo でゲル化を行う際、プレゲル溶液が腱の周辺に留まるようにするため、腱を縫合後、図3のようなシリコンシートに腱を乗せ、その上でプレゲル溶液を注入することで、腱全体をゲルで被覆することが可能になった。

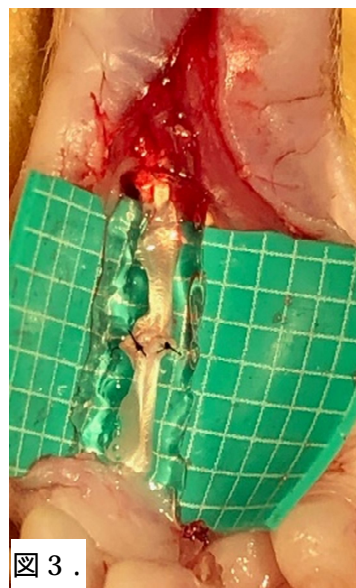


図3.

## 3) Tetra-Peg gel を用いた腱由来線維芽細胞による治癒の検証

本研究の目的は、Scx-GFP ラットを使用して、実際の腱の治癒過程に関わる細胞集団の中で、Scx 陽性細胞がどの程度関与するかを明らかにすることである。そこで、熊本大学から供与された Scx-GFP ラットを使用し、組織学的に解析を行った。上記1) の遺伝子解析の結果から、腱に関する転写因子はあまり発現がないと予想されたが、Scx-GFP ラットの組織学的解析では、損傷後から 1~2 週程度で腱内部には Scx 陽性細胞の増殖がみられた。しかしながら、一般的な治癒過程では、周辺組織から侵入する線維芽細胞により癒痕形成を起こすことから、腱組織はほとんどが線維芽細胞により占拠されていた。一方、ハイドロゲルで被覆した群では、腱外の線維芽細胞の侵入を抑えられるため、線維芽細胞による癒痕形成は起こらなかった。代わりに、腱周囲組織であるパラテノンの腱側やエピテノンの周辺では、図4のように Scx 陽性細胞が増殖し、治癒を促していることが分かった。このことから、通常の腱の治癒過程では、線維芽細胞が治癒の中心的な役割を果たすが、線維芽細胞の侵入を抑制すると、Scx 陽性細胞が腱周囲組織から増殖し、治癒を促進することが明らかとなった。

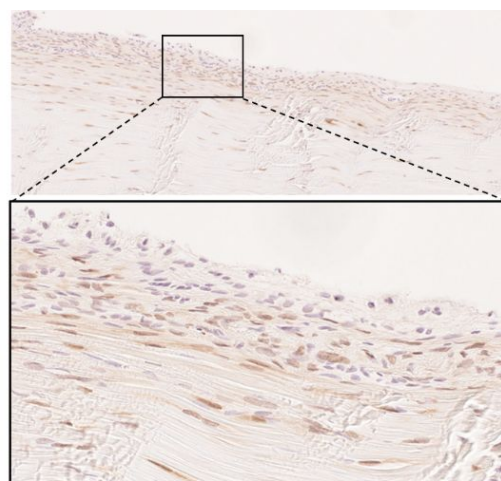


図4.

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 岩永康秀
2. 発表標題 Tetra-Peg gelを用いた損傷腱のintrinsic healingの検討
3. 学会等名 日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------