

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16767

研究課題名（和文）シングルセル解析によるMSCエクソソームによるアキレス腱修復促進機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Mechanism by Which MSC-Exosomes Facilitate Achilles Tendon Healing

研究代表者

林 悠太（Hayashi, Yuta）

広島大学・医系科学研究科（医）・寄附講座助教

研究者番号：20881296

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：アキレス腱断裂などの腱損傷は、運動器外傷の中でも頻度の多いスポーツ外傷の一つである。しかし、その治療法はこの数十年間で大きく変化していない。本研究では、間葉系幹細胞由来細胞外小胞（MSC-EV）やレチノイン酸受容体作動薬の局所投与がアキレス腱の修復を促進することを示すとともに、その腱修復に関与する細胞の一部を明らかにするための遺伝子改変マウスを作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

数十年大きく変化していない腱損傷の治療法であるが、MSC-EVやレチノイン酸受容体作動薬の局所投与がアキレス腱損傷における修復促進効果を示し、そのメカニズムの一部を明らかにしたこと、そのための解析ツールとして遺伝子改変マウスを作製したことに学術的および社会的な意義がある。

研究成果の概要（英文）：Tendon injuries, such as Achilles tendon rupture, are among the most frequent sports-related musculoskeletal injuries. However, treatment methods for these injuries have not significantly changed in recent decades. This study demonstrates that the local administration of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles (MSC-EVs) and retinoic acid receptor agonists facilitates Achilles tendon healing. Additionally, the involvement of tendon/ tendon progenitor cells such as Scleraxis- and Tpp3-positive cells in tendon healing is shown using newly generated genetically modified mice.

研究分野：整形外科

キーワード：アキレス腱 腱修復 間葉系幹細胞（MSC） 細胞外小胞 レチノイン酸受容体作動薬 細胞系統解析 遺伝子改変マウス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腱損傷は、運動器外傷の中でも頻度の多い疾患であり、スポーツ外傷の一つであるアキレス腱断裂、膝蓋腱断裂や、加齢性の関節変形に起因する手指伸筋腱断裂、外傷性手指屈筋腱断裂など、患者年齢や受傷機転は多岐にわたる。現在の治療は、ギプス固定と手術を組み合わせるが、早期スポーツ復帰、社会復帰が可能な治療法はいまだに存在せず、この20-30年間で治療法は大きく変化していない。腱損傷治療の主な合併症は、修復腱の初期強度不足による再断裂、腱の異所性骨化(石灰化)や腱と周囲組織間の癒着である。そのため、腱修復を促進させることで腱損傷治療の治療期間短縮と合併症低減が狙える、革新的な治療開発が望まれている。これまでに間葉系幹細胞(MSC)などの幹細胞移植治療が様々な疾患や組織修復に対して効果を示しているが、そのメカニズムは、移植細胞から目的細胞への分化による直接的な組織再生・修復というよりも、サイトカインなどの液性因子による再生環境制御であることが明らかになってきた。そして近年、MSCなどの幹細胞から分泌する液性因子のなかでもmicroRNAなどを内包する直径30~120nm程のエクソソームといった細胞外小胞が、細胞間コミュニケーションを司る、新たな組織再生因子として再生医療への応用が期待されている。申請者もマウスのアキレス腱切離モデルにおいて、MSC由来細胞外小胞(MSC-EV)の局所投与は、MSC移植と同程度に修復腱内における異所性石灰化や周囲組織との癒着を軽減し、腱修復を促進することを報告している。しかし、MSC-EVにより促進される腱修復に動員される細胞群は何かといったMSC-EVなどによる腱修復促進効果のメカニズムは未解明な部分が多い。

2. 研究の目的

MSC-EVなどによる腱修復促進機構における動員細胞群を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 修復アキレス腱における Scx および Tpp3 陽性細胞の局在と動態

腱/前駆細胞マーカーを標識可能な *Scx* および *Tpp3 Cre^{ERT}tdTomato* マウスの作製
腱細胞/腱前駆細胞マーカーとして報告されている *Scx* と *Tpp3* に着目し、*Scx* および *Tpp3* 陽性細胞をイメージング・追跡するために *Scx* および *Tpp3Cre^{ERT}* マウスと *Cre^{ERT}* リコンビナーゼ活性依存的に CAG プロモーターにより赤色蛍光タンパク質変異体(tdTomato)を発現する *Rosa26-CAG-*Isl1*-tdTomato* マウスを交配し、タモキシフェン(TAM)依存的に *Scx* および *Tpp3* 陽性細胞を蛍光標識することで系統追跡・細胞単離が可能な *ScxCre^{ERT}tdTomato* マウスと *Tpp3Cre^{ERT}tdTomato* マウスを作製した。

修復腱における *Scx* および *Tpp3* 陽性細胞の動態

修復腱における *Scx* 陽性細胞の動態を明らかにするために、アキレス腱切離前の8週齢で TAM 投与を開始する群と切離後5日から TAM 投与を開始する群の2群を作製し、各々術後2週、4週時点の腱修復部位における *Scx* 陽性細胞の動態および組織学的な評価を行った。さらに、*ScxCre^{ERT}tdTomato* マウスの腱より細胞集団を単離し、解析を行った。また、MSC-EV およびレチノイン酸受容体作動薬(CD153)のアキレス腱損傷部への局所投与による腱修復促進効果と *Scx* 陽性細胞の動態を観察した。

(2) アキレス腱における *Tpp3* 陽性細胞の役割

Tpp3Cre^{ERT}-ジフテリア毒素受容体(*DTR*) *tdTomato* マウスの作製
Tpp3Cre^{ERT} マウスと *Rosa-loxp-stop-loxp-DTR-tdTomato* マウスを交配することで、TAM 依存的

に腱前駆細胞マーカーTpp3 陽性細胞を標識でき、かつジフテリア毒素 (DT) 投与により誘導性に標識 Tpp3 陽性細胞を除去可能なマウスを作製した。

DT投与によるSSC/CPC標識細胞除去に向けた条件検討

作製した *Tpp3Cre^{ERT}-DTR-tdTomato* マウスを用いて、DT 投与による標識 Tpp3 陽性細胞の除去条件を検討した。

4. 研究成果

(1) 修復アキレス腱における Scx (Scx) 陽性細胞の局在と動態

Scx 陽性細胞を標識できる *ScxCre^{ERT}tdTomato* マウスを用いてアキレス腱切離モデルを作製し、損傷前に TAM 投与により標識した術後 4 週での修復腱における Scx 陽性細胞を観察した(図 1)。その結果、損傷前に標識した Scx 陽性細胞の割合は、修復腱において約 20%に低下し、SOX9 陽性の異所性の軟骨化生部位の細胞中

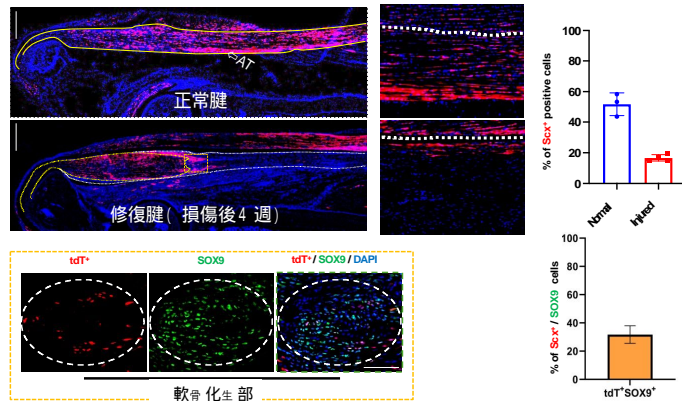


図1. 正常アキレス腱および修復腱におけるScx陽性細胞

には約 30%認められた。修復腱および修復腱で頻発する軟骨化生は、正常アキレス腱に内在していた Scx 陽性細胞よりも腱幹・前駆細胞などが関与していることが示唆された。さらに、腱前駆細胞マーカーとして報告されている Tpp3 にも着目し、*Tpp3Cre^{ERT}tdTomato* マウスを作製した。Tpp3 陽性細胞は、以前に報告されたようにアキレス腱のような腱組織における主に腱鞘部の細胞で認められたほか(図 2) 十字靭帯や滑膜などでも陽性細胞が認められた。また、軟骨の一部でも観察された。

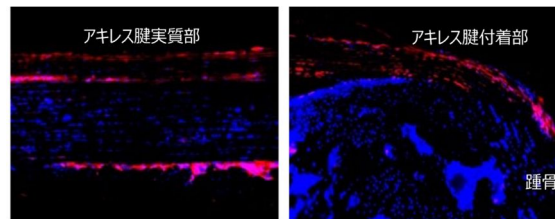


図2. 4週齢で標識したアキレス腱におけるTpp3陽性細胞の局在

マウスアキレス腱切離モデルを用いて、MSC-EV の局所投与がアキレス腱修復過程における軟骨化生・異所性骨化(石灰化)や周辺組織との癒着を抑制し、その修復を促進することを明らかにした。そして、培養 MSC の状態(継代数の違いによる細胞老化の程度)によって MSC-EV の治療効果が異なり、それは MSC-EV 表面に発現している糖鎖発現パターンの違いで評価できる可能性を示唆した(Hayashi Y et al. FEBS Lett 2022)。また同様に、CD1530 の局所投与は、修復腱における軟骨化生・異所性骨化の抑制を介し、腱修復を促進させた(図 3)。これは、in vitro

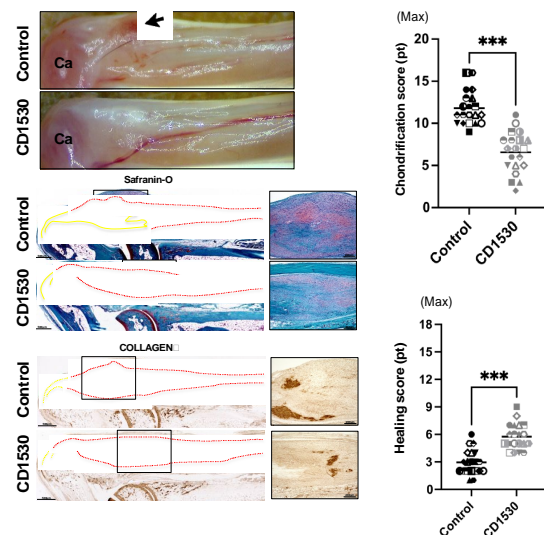


図3. レチニン酸受容体作動薬(CD1530) は修復腱における軟骨化生の抑制を介して腱修復を促進させる

実験において修復腱組織由来細胞を用いたペレット培養により軟骨細胞への分化誘導が認められる一方で、CD1530 の添加によりペレットのサイズやサフラニン O 染色による染色性の減少が

認められ、細胞形態からも軟骨細胞への分化誘導が強く抑制された。以上の結果より修復腱組織や軟骨化成に動員された細胞の由来は、正常アキレス腱に内在していた Scx 陽性細胞ではなく、PDGFRa や Tppp3 陽性腱幹・前駆細胞の増殖・分化に依存していることが予想される。しかし、本研究期間内中に *Tppp3Cre^{ERT}tdTomato* マウスを用いた結果を得ることはできなかったので、計画していたシングルセル RNA シーケンス解析を含めた今後の研究により明らかにしていく予定である。

(2) アキレス腱における Tppp3 陽性細胞の役割

Tppp3Cre^{ERT}-ジフテリア毒素受容体 (*DTR*) *tdTomato* マウスの作製と DT 投与の条件検討
腱幹・前駆細胞のマーカーである *Tppp3Cre^{ERT}DTR-dtTomato* マウスが作製し、DT 投与による Tppp3 陽性細胞除去のための条件検討を行い、投与量や投与回数を決定した。今後、DT 投与による Tppp3 陽性細胞除去によるアキレス腱など腱・靭帯組織の恒常性維持や腱・靭帯修復における Tppp3 陽性細胞の性質をさらに明らかにしていくとともに、MSC-EV や CD1530 による腱修復促進機構を明らかにしていく予定である。

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 0件）

1. 著者名 Hayashi Y, Yimiti D, Sanada Y, Ding C, Omoto T, Ogura T, Nakasa T, Ishikawa M, Hiemori K, Tateno H, Miyaki S, Adachi N.	4. 巻 596(8)
2. 論文標題 The therapeutic capacity of bone marrow MSC-derived extracellular vesicles in Achilles tendon healing is passage-dependent and indicated by specific glycans.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Lett	6. 最初と最後の頁 1047-1058
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14333.	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Dilimulati Yimiti, Kenta Uchibe, Minoru Toriyama, Yuta Hayashi, Yasunari Ikuta, Tomoyuki Nakasa, Haruhiko Akiyama, Chisa Shukunami, Nobuo Adachi, Shigeru Miyaki
2. 発表標題 Local Administration of CD1530, Selective RAR Agonist, Facilitates Tendon Healing by Modulating the Healing Environment Including Reduced Heterotopic Ossification in a Mouse Achilles Rupture Model
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2024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
---------	---------