

主論文の要旨

**Promethazine downregulates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and increases biomechanical forces of injured Achilles tendon**

〔プロメタジンは損傷アキレス腱のWnt/ $\beta$ -cateninを抑制し  
生体力学的特性を改善する〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
運動・形態外科学講座 整形外科学分野

(指導：今釜 史郎 教授)

坂口 健史

## 【緒言】

アキレス腱断裂は、年間 10 万人あたり 18~31 人の頻度で発生し、その頻度は増加傾向にある。損傷すると適切な生物学的および生体力学的特性で損傷前と同様の機能を取り戻すことはできない。腱修復を促進するために、胚性幹細胞、骨髄由来間質細胞などの移植や、成長因子の投与が実験レベルで行われている。しかし、腱の修復を促す薬剤は報告されていない。

コラーゲンなどの腱関連細胞外マトリックスは、分化した腱細胞から分泌されるが、これは転写因子である scleraxis (Scx) と mohawk (Mkx) によって促進されている。Scx は腱細胞の適切な分化に必要な初期マーカー、Mkx は腱細胞における I 型コラーゲン生成を制御する腱細胞の初期成熟マーカーである。細胞外マトリックスタンパク質の制御因子であるテノモジュリン (Tnmd) は、コラーゲン線維の成熟に必要な腱の発達を示す後期マーカーである。

Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは、様々な組織で組織の治癒と再生に関与している。Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル活性化すると、 $\beta$ -catenin の安定化と核内移行が促進され、標的遺伝子が活性化される。以前、我々は活性化した Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを特異的阻害剤である IWR-1 で抑制すると、Scx、Mkx、Tnmd の遺伝子発現を誘導することを報告した。しかし、損傷した腱組織における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達の役割についてはほとんど知られていない。

一方、私たちはプロメタジン (PH) が骨格筋の血小板由来成長因子受容体  $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ ) 陽性間葉系幹細胞の脂肪細胞分化を抑制することを明らかにした。PH は、Ethopropazine や Hydroxyzine を含む第一世代の抗ヒスタミン剤の一つで、PH と Ethopropazine は、Phenothiazine の誘導體である。PH は、抗ドーパミン作用、抗ヒスタミン作用、抗コリン作用を持ち、大きな副作用なくアレルギー、不眠症、吐き気の治療に使用されている。

本研究では、損傷した腱における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化について解析し、IWR-1 と PH による Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの阻害が腱治癒に及ぼす影響について検討した。

## 【方法】

ラットの右アキレス腱をパンチで損傷し、左の腱は偽手術を行った。術後 0.5 (3 日)、1、2、3、4、8 週で、両側のアキレス腱を採取し切片を作成した。各時期での、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化を  $\beta$ -catenin の免疫染色を用いて評価した。また、術後 2 週で引っ張り強度測定器を用いて、生体力学的特性を評価した。

ラットのアキレス腱を用いてプライマリーカルチャーを行い、腱由来細胞 (TDC) を分離した。TDC に PH や PH の類似薬剤、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル刺激剤や TGF- $\beta$ 、BMP の阻害剤を投与し、PCR で腱関連遺伝子や Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル下流の Axin2 に与える影響を確認した。

腱損傷を行ったラットに Wnt/ $\beta$ -catenin 阻害剤 IWR-1 と抗ヒスタミン剤 PH を術後 2

週間、それぞれ局所および筋肉内に注射した。術後 2 週間と 8 週間で修復腱を採取し、その組織学および生体力学的特性を評価した。

## 【結果】

ラットの損傷腱において、術後 1、2 週時点で Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化を認めた。また術後 2 週で、損傷側は偽手術側に比較して Peak Force、Stiffness、Peak Stress、Elastic Modulus が有意に低下し、Cross sectional area が増加した (Fig. 1)。

腱損傷ラットへの IWR-1 投与により、腱内の Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは抑制され、組織学的には改善された。一方で生体力学的特性は Vehicle 投与と比較して悪化する傾向にあった (Fig. 2)。

次に、抗ヒスタミン薬である PH の TDC に対する効果を検討した。PH の骨格である Phenothiazine、類似の構造を持つ Ethopropazine、同じく第一世代の抗ヒスタミン薬である Hydroxyzine と異なり、Axin2 の発現を抑制し、Mkx、Tnmd の発現を亢進させた。また、PH は Axin2 を濃度依存的に抑制し、Mkx を濃度依存的に亢進させた。Tnmd に対しては濃度依存性を認めなかったが、1 $\mu$ M をピークに発現を亢進させた (Fig. 3)。

腱損傷ラットへの PH 投与では、組織学的な改善は認めなかった。一方、損傷腱の  $\beta$ -catenin を減少させ、術後 2 週目の修復腱の Peak Force と Stiffness も有意に増加させた (Fig.4)。しかし、術後 8 週目には、有意差は減少していた。

## 【考察】

腱修復における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの役割についてはほとんど知られていなかった。本研究では、腱損傷後 2 週間、組織にムコ多糖が異常に蓄積している時期 (Fig. 1A) に、腱細胞で Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが活性化していることを見出した (Fig. 1B-D)。また、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル阻害剤である IWR-1 を腱損傷 2 週間後に局所投与すると、ムコ多糖の蓄積 (Fig. 2A) と Bonar スコアの改善が見られた (Fig. 2B)。Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは腱損傷後 2 週間活性化され、損傷部位のムコ多糖類を含む細胞外マトリックスを増加させると考えられる。IWR-1 の投与により、損傷腱と偽手術した両方の腱において生体力学的特性が損なわれた (Fig. 2E)。IWR-1 は治療目的で開発された薬剤ではないため、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達阻害作用を持つ薬物を FDA 既認可薬より探索した。

TDC において Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルに対する抗ヒスタミン剤の抑制効果について検討した。その結果、PH は、TDC の Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを抑制することがわかった。しかし、Ethopropazine、Phenothiazine、Hydroxyzine では同様の効果は見られなかった (Fig. 3A, B)。また、PH は TDC において Mkx と Tnmd の両方の発現を著しく増加させた (Fig. 3C)。PH は TGF- $\beta$  シグナルを直接増強しなかったが (Fig. 3E)、PH が誘導する Mkx と Tnmd の発現増加には TGF- $\beta$  シグナルが必要であることも見出した (Fig. 3D)。PH がどのように Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを介して Mkx と Tnmd の発現を制御し

ているのかを理解するためには、さらなる研究が必要である。

ラットの腱損傷モデルにおいて、PH の筋肉内注射が、損傷後 2 週間には Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを有意に減少させ (Fig. 4C、D)、修復したアキレス腱の生体力学的特性の改善を促進することを示している (Fig. 4E) が、8 週間後には差が消失していた。PH は腱の早期治癒を促進し、腱修復の治療薬となる可能性が示された。

#### **【結論】**

IWR-1 とプロメタジンとともに Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを抑制し、治癒した腱の組織学的異常を改善した。しかし、IWR-1 は治癒した腱の生体力学的特性を低下させたが、プロメタジンはそれを改善した。