

主論文の要旨

**Expression of tenocyte lineage-related factors in
regenerated tissue at sites of tendon defect**

〔 腱欠損部修復組織における腱細胞関連因子の検討 〕

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：西田 佳弘 准教授)

大間知 孝顕

【背景】

腱の断裂や損傷の際の治癒メカニズムは不明な点が多い。腱損傷モデルにおいて長期の経過観察を行っても、腱修復組織は完全に正常の腱組織には戻らないことが知られており、腱損傷部に介在するために修復後の強度に問題を生じる。このため腱の損傷・障害の治療成績の改善のためには腱修復組織の治癒機転の改善が必要であると考えられる。

腱の損傷治癒は、損傷直後から数日までの炎症期、数日から6週までのリモデリング期、6週から1年以上にわたるモデリング期の3相からなるといわれている。早期の損傷治癒機転の一つに血管新生があり、炎症細胞や線維芽細胞を損傷部位へ運ぶ役割を果たしている。hypoxia-inducible factor-1(HIF1)は、損傷部位での細胞間の低酸素状態に対する反応において重要な役割を果たす転写因子である。vascular endothelial growth factor(VEGF)は腱損傷後の血管新生を促進する因子であるが、HIF1は VEGF の発現を増強するために重要な働きをされている。

腱の損傷部には腱様組織のみならず、軟骨様組織や異所性骨化が生じることが知られている。一方、滑膜、骨髄、脂肪、腱などの組織から幹細胞が同定され、いずれも多能性を有し、腱様組織を形成することが報告されているが、生体内での腱修復においてこれらの細胞の関与は明らかにされていない。

腱の主な細胞外基質は type I collagen(COL1)である。また近年、腱形成関連因子として scleraxis(SCX)と tenomodulin(TNMD)が報告されている。SCX は個体発生時に腱の前駆体に発現する basic helix-loop-helix 構造を持つ転写因子であり、TNMD の上流にある制御因子である。TNMD は2型の膜貫通タンパクで、緻密な腱組織の維持に関わっていると報告されている。

軟骨の分化、形成においては Sex-determining region Y-box 9(SOX9)が重要な転写因子である。type 2 collagen(COL2)と aggrecan(AGG)は軟骨組織の細胞外基質に含まれる主要成分であり、その発現は SOX9に制御されている。

type X collagen(COL10)は肥大軟骨細胞のマーカーの一つであり、内軟骨骨化の指標となる。runt-related transcription factor 2(RUNX2)は骨芽細胞の前駆細胞での成長と分化を制御し、骨化の際の骨芽細胞の成熟を促す因子である。

今までのところ腱修復組織における腱形成関連因子に注目した研究は少ない。本研究の目的は、腱修復組織において腱形成関連因子を含めた分化関連因子の発現の経時的变化を調べることである。

【方法】

SD ラットの片側の膝蓋腱に部分欠損を作成し、3日目、1,2,3,6,12,20週目で組織を採取した(Fig.1)。対側の膝には腱の露出までの sham 手術を行ないコントロールとした。micro-computed tomography (micro-CT)で骨化巣の評価を行った後に組織を半割し、一方からはパラフィン包埋切片を作成し組織学的検討を行った(Fig.1a)。もう一方からは腱修復組織を切り出して ribonucleic acid (RNA)を抽出した(Fig.1b)。血管新生および

腱・軟骨・骨形成に関連する各因子および glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)の messenger RNA (mRNA)に対する primer を作成して reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)を行い、GAPDH をリファレンス遺伝子として Pfafflらの計算法を用いてコントロール側の腱組織との相対発現比を求めた。

【結果】

組織標本において(Fig.2)、腱修復組織は時間の経過とともに線維成分が増加していった。また、修復組織内部の血管数は3日、1週で増加しており、以後の期間においては漸減していくが、20週でも正常な腱よりも多かった。Safranin O 染色標本(Fig.3)では1週以降でプロテオグリカンの増加を示唆する赤染部を認め軟骨様組織の存在を示唆した。赤染部は腱修復組織の部にとどまらず周囲の組織まで波及していた。この所見は20週まで持続して存在した。また12週間から後のすべての腱修復組織において異所性骨化が検出された。

RT-PCR では、血管新生関連因子である alpha subunit of HIF1(HIF1A)および VEGF は2週目において発現亢進が有意となった(Fig.4)。腱形成関連因子では(Fig.5a)、SCX は2週目で最大値となった。TNMD は1,2週目で有意な発現亢進を認めた。Col1は1,2,6,20週で発現亢進が有意であった。軟骨形成関連因子では(Fig.5b)、SOX9は1,2,3,6週で、AGG は1,2,3週で、また Col2は12週で発現亢進が有意となった。骨形成関連因子では(Fig.5c)、RUNX2の有意な発現亢進は2,3,20週目に認められた。Col10は有意な変化を認めなかった。

micro-CT では6週で一部の検体に異所性骨化部が検出され(Fig.6b)、12週ではすべての検体で骨化を認めた(Fig.6c)。骨化部の体積は20週まで継時的な増加を認めた(Fig.6e)。

【考察】

我々の膝蓋腱部分欠損作成モデルの腱修復組織において、血管数は損傷後早期には増加していた。その後減少傾向を認めたが、20週までの観察では通常の腱のレベルにまでは減少しなかった。腱への血管の侵入は強度の低下につながるため、修復組織が完全に回復しない原因の一つと考えられた。また、軟骨への血流は骨形成の重要なメカニズムであり、異所性骨化の形成との関連が示唆された。

腱形成関連因子が最早期から発現亢進していたとすれば、腱細胞もしくは腱由来の幹細胞が腱修復組織の形成に関わる主な細胞である可能性が高いと考えられるが、3日目では腱形成関連因子の発現亢進は認められず、今回の実験の結果からは主に修復に関わった細胞種は同定できなかった。

分化関連因子の検討からは、腱の修復に関わった細胞が腱細胞へ分化するのは2週までの初期段階のみで、軟骨への分化は1週からの早い段階から比較的長期に渡って起こっている可能性が示唆された。

【結論】

腱修復組織においては、最終観察期間においても通常の腱組織とは異なり血管が残存していた。腱細胞への分化は早期のみに生じたように見える一方で、軟骨化生およびそれに引き続く異所性骨化は早期から後期にかけて持続して生じていた。これらのことから、腱修復の状態を改善するためには、腱細胞への分化をさらに促進、維持することと、早期に軟骨への分化を阻害することで幹細胞の” erroneous differentiation” すなわち誤った分化を避けることが必要であると考えられた。