

主論文の要旨

Wnt/ β -catenin signaling suppresses expressions of *Scx*, *Mkx*, and *Tnmd* in tendon-derived cells

Wnt/ β -カテニンシグナルは腱由来細胞において
Scx、*Mkx*、および *Tnmd* の発現を抑制する

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：石黒 直樹 教授)

岸本 烈純

【緒言】

アキレス腱断裂や腱板断裂は日常診療でよく遭遇する外傷である。これらの腱損傷に対して手術治療や保存療法を行うが、瘢痕形成を伴って治癒するため完全な組織修復は困難であり、治療期間の長期化や再断裂する危険性がある。このため損傷した腱の治癒促進や腱組織により近い状態で修復させる治療法の確立は重要であり、間葉系幹細胞や成長因子を用いて損傷腱の修復を促進させる治療法などが損傷腱動物モデルにおいて検討されている。

腱の発生に関しては、重要な転写因子である *Scleraxis (Scx)* や *Mohawk (Mkx)*、腱の成熟に重要な腱関連遺伝子 *Tenomodulin (Tnmd)* などがあり、これらの腱関連遺伝子の発現に関する重要な因子として TGF- β (transforming growth factor-beta) シグナルが知られている。Wnt/ β -カテニンシグナル経路は組織の発生、分化等に重要な役割を担っており、損傷腱モデルにおいて腱損傷部での Wnt/ β -カテニンシグナルの活性化を示した報告や、骨髄由来幹細胞において TNMD の発現調整に Wnt/ β -カテニンシグナルが関係しているという報告がある。しかし、腱細胞において Wnt/ β -カテニンシグナルと腱関連遺伝子の発現の関連性を評価した報告はない。

そこで、本研究では腱細胞において Wnt/ β -カテニンシグナルが腱関連遺伝子発現に与える影響を評価した。また、TGF- β シグナルが Wnt/ β -カテニンシグナルによる腱関連遺伝子発現に関与しているかも評価した。

【対象および方法】

Sprague-Dawley rat (6 週齢、オス) のアキレス腱から遊走した細胞を単層培養にて 3 代継代した細胞 (tendon derived cells : TDCs) を腱由来細胞として、また、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株に *SCX* を遺伝子導入して強制発現させた細胞株 (hMSC-Scx) を腱前駆細胞株として使用した。Wnt/ β -カテニンシグナル経路の活性化剤として 6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO) と human recombinant Wnt3a タンパク (Wnt3a) を、阻害剤として Inhibitors of Wnt response (IWR) を用いた。TGF- β シグナル経路の活性化剤として human recombinant TGF- β 1 タンパク (TGF- β 1) を、阻害剤として SD208 を用いた。

Wnt/ β -カテニンシグナル経路の活性化を評価するために標的遺伝子である *AXIN2* と、腱関連遺伝子である *SCX*、*MKX*、そして *TNMD* の mRNA 発現量の変化を Real-Time PCR 法により解析した。TGF- β シグナル経路の活性化の指標として TGF- β /Smad シグナル経路の転写因子である Smad2、Smad3、リン酸化 Smad2/3(p-Smad2/3) の蛋白量の変化を Western blot により評価し、*Smad2*、*Smad3* の mRNA 発現量を Real-Time PCR 法により評価した。

【結果】

TDCs では、Wnt3a 添加によって低下した *Scx*、*Mkx*、*Tnmd* の mRNA 発現量は IWR の添加によりレスキューされた (Figure 1A)。BIO 添加により *Axin2* は上昇を示し、*Scx*、

Mkx、*Tnmd* の発現は有意に低下し、IWR 添加により *Axin2* は低下を示し、*Scx*、*Mkx*、*Tnmd* の発現は有意に上昇した(Figure 1BC)。一方で、TGF- β 1 添加により *Scx* の mRNA 発現は有意に上昇し、SD208 の添加により有意に低下したが、*MKX*、*TNMD* の発現量は有意な変化は示さなかった(Figure 1DE)。また、BIO の添加により p-Smad2/3、Smad2、Smad3 の蛋白発現量が減少し、*Smad2*、*Smad3* の mRNA 発現量も減少した(Figure 2 AB)。BIO の添加による *Scx* の mRNA 発現量の減少は TGF- β 1 添加によりレスキューされた(Figure 2C)。

hMSC-*Scx* では、TDCs と同様に Wnt3a 添加によって低下した *MKX*、*TNMD* の mRNA 発現量は IWR の添加によりレスキューされ、*MKX*、*TNMD* の mRNA 発現量は BIO の添加により有意に低下し、IWR の添加により有意に上昇した(Figure 3)。TDCs と同様に、TGF- β 1 と SD208 の添加では *MKX*、*TNMD* の発現量は有意な変化は示さず(Figure 4AB)、BIO の添加により p-Smad2/3、Smad2、Smad3 の蛋白量が減少した(Figure 4CD)。

【考察】

本研究により、TDCs において Wnt/ β -カテニンシグナルは腱関連遺伝子発現を抑制することが示された。また、TGF- β シグナルは *Scx* の遺伝子発現を活性化することと Wnt/ β -カテニンシグナルが TGF- β /Smad シグナル経路を抑制することも示され、TGF- β /Smad シグナル経路を介して Wnt/ β -カテニンシグナルは *Scx* の遺伝子発現を調整していることが示唆された。

hMSC-*Scx* においても TDCs と同様に、Wnt/ β -カテニンシグナルにより *MKX*、*TNMD* の mRNA 発現量も Smad2/3 の発現も抑制されていたが、TGF- β シグナルによって *MKX*、*TNMD* の mRNA 発現量は有意な変化は示さなかった。TDCs の結果と併せ、*Scx* の遺伝子発現は TGF- β /Smad シグナル経路を介して Wnt/ β -カテニンシグナルにより調整され、*Mkx*、*Tnmd* の遺伝子発現は TGF- β /Smad シグナル経路を介さずに Wnt/ β -カテニンシグナルにより調整されている可能性が示唆された。

Tnmd は *Scx* と *Mkx* により遺伝子発現が調整されているという報告もあるため、*Tnmd* の遺伝子発現は Wnt/ β -カテニンシグナルの他に *Scx* や *Mkx* からの影響も受けている可能性がある(Figure 4F)。

Wnt/ β -カテニンシグナル経路は腱関連遺伝子発現や TGF- β /Smad シグナル経路に影響を与えており、これらのシグナル経路を調整する薬剤は損傷腱の治療に貢献する事が期待される。

【結論】

ラット腱由来細胞とヒト腱前駆細胞株において、Wnt/ β -カテニンシグナル経路は腱関連遺伝子の発現に影響を与えた。