

学位論文抄録

Potential function of Scx+/Sox9+ cells as progenitor cells in rotator cuff tear repair in rats
(ラットにおける肩腱板断裂修復術での前駆細胞としての Scx/Sox9 共陽性細胞の機能)

福 間 裕 子

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻整形外科学

指導教員

宮本 健史 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻整形外科学

Abstract of the Thesis

Background and Purpose: Tendons and their attachment sites to bone, fibrocartilaginous tissues, have poor self-repair capacity when they rupture, and have risks of retear even after surgical repair. Thus, defining mechanisms underlying their repair is required in order to stimulate tendon repairing capacity. Here we used a rat surgical rotator cuff tear repair model and identified cells expressing the transcription factors Scleraxis (Scx) and SRY-box 9 (Sox9) as playing a crucial role in rotator cuff tendon-to-bone repair. Given the challenges of establishing stably reproducible models of surgical rotator cuff tear repair in mice, we newly established Scx-GFP transgenic rats in which Scx expression can be monitored by GFP.

Methods: We used 3-, 6-, and 12-week-old ScxGFP transgenic rats that underwent unilateral surgery for supraspinatus tendon repair immediately after transection. At 2, 4, and 6 weeks postoperatively, the rats were euthanized; the histological morphology and Scx and Sox9 localization at the healing sites were evaluated via toluidine blue staining, alizarin red/alkaline phosphatase staining, and fluorescent immunostaining for GFP and Sox9.

Results: We observed tissue-specific GFP expression along tendons in developing ScxGFP transgenic rats and were able to successfully monitor tissue-specific Scx expression based on GFP signals. Among 3-, 6-, and 12-week-old ScxGFP rats, Scx+/Sox9+ cells were most abundant in 3-week-old rats near the site of humerus bone attachment to the rotator cuff tendon, while we observed significantly fewer cells in the same area in 6- or 12-week-old rats. We then applied a rotator cuff repair model using ScxGFP rats and observed the largest number of Scx+/Sox9+ cells at postoperative repair sites of 3-week-old relative to 6- or 12-week-old rats. Tendons attach to bone via fibrocartilaginous tissue, and cartilage-like tissue was seen at repair sites of 3-week-old but not 6- or 12-week-old rats during postoperative evaluation.

Conclusions: Scx+/Sox9+ cells may function in rotator cuff repair, and that ScxGFP rats could serve as useful tools to develop therapies to promote rotator cuff repair by enabling analysis of these activities.

学位論文抄録

[目的] 腱の骨への付着部位である線維軟骨組織は、断裂したときの自己修復能力が低く、外科的修復を行っても再断裂の危険性がある。したがって、腱の修復を促進するためには腱の修復過程の解明が必要である。ScxGFP 遺伝子改変(Tg)マウスの腱板付着部損傷モデルを用いた先行研究で、腱・軟骨細胞マーカーである Scleraxis(Scx) および SRY-box 9 (Sox9)発現細胞が生後の修復過程に寄与する可能性を報告したが、マウスではサイズ面から腱板縫合後の修復過程の評価が困難であった。今回新たに ScxGFP Tg ラットを樹立し、腱板成熟過程と縫合後の修復過程における Scx および Sox9 発現細胞の参画を評価した。

[方法] 3、6、12 週齢の ScxGFP Tg ラットの棘上筋腱を切離し腱板修復術を施行した。術後 2、4、6 週で灌流固定を行い組織を採取し、粘着フィルム法で作製した非脱灰凍結切片を組織学的に評価した。HE 染色で修復部の組織形態、Toluidine Blue(TB)染色で修復部の線維軟骨形成、alizarin red/ ALP 染色で石灰化および ALP 活性について評価し、Scx と Sox9 の局在について抗 GFP 抗体と抗 Sox9 抗体を用いた二重免疫染色で評価した。

[結果] ScxGFP Tg ラットの成熟過程において、腱に沿って組織特異的な GFP 発現を観察し、GFP シグナルに基づいて組織特異的な Scx 発現を観察することに成功した。3 週齢、6 週齢、12 週齢の ScxGFP Tg ラットの中で、Scx+/Sox9+細胞は 3 週齢のラットで腱板腱に上腕骨が付着する部位付近に最も多く存在したが、6 週齢や 12 週齢のラットでは同部位に有意に少ない細胞が観察された。次に、ScxGFP Tg ラットを用いた腱板修復モデルを観察したところ、術後の修復部位では、6 週齢や 12 週齢のラットに比べて、3 週齢のラットで最も多くの Scx+/Sox9+細胞が観察された。腱は線維軟骨組織を介して骨に付着し、軟骨様組織は 3 週齢の修復部位で見られたが、6 週齢や 12 週齢のラットの術後評価では見られなかった。

[結論] Scx+/Sox9+細胞は腱板修復に関与している可能性があり、ScxGFP Tg ラットは腱板修復を促進する治療法を開発するための有用なツールとなる可能性がある。