

学位論文の要旨

Bevacizumab promotes tenogenic differentiation and
maturation of rat tendon-derived cells in vitro

(ベバシズマブは in vitro においてラット腱由来細胞の
分化・成熟を促進する)

March, 2024

(2024 年 3 月)

Yohei Kusaba

草場 洋平

Department of Orthopaedic Surgery and Musculoskeletal Science

Yokohama City University Graduate School of Medicine

横浜市立大学 大学院医学研究科 医科学専攻

運動器病態学

(Doctoral Supervisor : Yutaka Inaba, Professor)

(指導教員 : 稲葉 裕 教授)

学位論文の要旨

Bevacizumab promotes tenogenic differentiation and maturation of rat tendon-derived cells in vitro

(ベバシズマブはin vitroにおいてラット腱由来細胞の分化・成熟を促進する)

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0293463>

1. 序論

腱の損傷はスポーツや日常生活の中でも発症する一般外傷であるが、自然修復に時間がかかり治療に難渋することも多い。腱の修復過程は、炎症、増殖、リモデリングの三つの段階を含む複雑なプロセスであり、多くの分子や細胞が関与し未だに不明な点が多い。

腱幹/前駆細胞 (Tendon stem/progenitor cell : TSPC) は、損傷した腱の修復において腱細胞の遊走、増殖、分化に重要な役割を果たしている。2007年 Bi らが、ハムストリング腱の中に、腱の治癒に重要な働きを持つ TSPC を発見した。TSPC には、腱周囲膜由来の細胞 (paratenon-derived cells : PDCs) と腱実質由来の細胞 (tendon proper-derived cells : TDCs) があり、PDCs は急性期の治癒に、TDCs は急性期以降の治癒に関与している。これら二種類の TSPC は、損傷部位に応答し、腱特異的マーカーである Scleraxis (Scx) などの発現を通じて腱の修復を促進する。TSPC から腱特性を持つ細胞への分化を促進する治療戦略は、患者の治癒能力を増強し、腱の修復を促す可能性がある。

腱は I 型コラーゲンを多く含む細胞外基質から構成され、血管が乏しい組織である。腱が損傷すると治癒過程の初期には血管新生が起こるが、腱が成熟する過程では血管が退縮することが知られている。臨床の現場でも、腱損傷後、長期に血管が残存し、痛みを訴える症例をしばしば経験する。我々は先行研究で、ラットのアキレス腱から単離した PDCs, TDCs に、血管新生に関与する Vascular endothelial growth factor (VEGF : 血管内皮細胞増殖因子) を投与し培養した。その結果、成熟した腱細胞に発現する遺伝子マーカー Tenomodulin (Tnmd) が抑制されたことを示している (Imai et al., 2019)。そこで本研究は、抗 VEGF 抗体であるベバシズマブを PDCs, TDCs に投与することで、腱幹/前駆細胞の分化・成熟が促進するという仮説をたて *in vitro* で検証することを目的とした。

2. 実験材料と方法

この研究計画は、横浜市立大学の動物実験委員会の承認を受けた (承認番号 F-A-15-045)。6-7 週齢のオス Sprague-Dawley ラットからアキレス腱を周囲膜とともに切離後コラ

ゲナーゼ処理を行った。腱周囲膜と腱実質からそれぞれ別々に幹・前駆細胞を単離し、PDCs および TDCs として継代培養した。PDCs, TDCs を 4 日間培養した後、VEGF-A を投与し、コントロール群と VEGF 群として 3 日間培養した。腱成熟度を評価するマーカーとして Scx と Tnmd の遺伝子マーカーを real-time PCR を用いて測定した。また、PDCs, TDCs をコラーゲンゲルに混入し 3 次元培養した(Mienaltowski et al., 2013)。コントロール群とベバシズマブ群の遺伝子発現を 7 日目、14 日目に、Scx と Tnmd、腱を構成するコラーゲンのマーカー collagen type I alpha 1 (Colla1) を real-time PCR を用いて測定した。PDCs, TDCs を 14 日間培養し得られた腱様組織から組織切片を作製し、免疫蛍光染色により Tnmd の発現を評価した。測定は蛍光顕微鏡(BZ-X800, Keyence, Osaka, Japan)を用いた。VEGF のシグナル伝達に対する抗 VEGF 抗体の影響を確認するために、14 日目の腱様組織からタンパク質を抽出し Western blotting 法にて VEGF の主要なレセプターである VEGFR-1, VEGFR-2 のリン酸化を評価した。さらに、ベバシズマブの細胞毒性を評価するために、PDCs, TDCs の増殖、遊走、アポトーシスを調査した。増殖の評価は Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo, Kumamoto, Japan)を用い、培地をコントロール群とベバシズマブ群に交換後、1, 2, 3 日での細胞増殖を吸光度で評価した。遊走の評価は The scratch assay (Oris cell migration assay, Funakoshi, Tokyo, Japan)を使用し、培地をコントロール群とベバシズマブ群に交換したのち 24 時間での遊走能を評価した。また免疫蛍光染色と同様、14 日目の腱様組織から組織切片を作製し、the CF Dye TUNEL Assay Apoptosis Detection Kits (Biotium, Fremont, CA, USA)を用いてアポトーシスの評価を行った。測定、解析は蛍光顕微鏡 BZ-X800 を用いた。

3. 結果

PDCs, TDCs とともに VEGF 投与により Tnmd の遺伝子発現が有意に減少した($P < 0.05$)。3D 培養においては、Scx の発現は 7 日目の PDCs, TDCs とともにベバシズマブ群が有意に増加した($P < 0.05$)。Tnmd の発現は 14 日目の PDCs, TDCs においてベバシズマブ群が有意に増加した($P < 0.05$)。Colla1 の発現は 14 日目の PDCs, 7 日目の TDCs においてベバシズマブ群が有意に増加した ($P < 0.05$)。免疫蛍光染色において 14 日目の PDCs, TDCs のいずれも、ベバシズマブ群で Tnmd の発現が有意に増加した。Western blotting 法では PDC, TDC とともに pVEGFR-2 タンパク質の発現が抑制された。細胞増殖において PDCs, TDCs とともにコントロール群とベバシズマブ群の間に有意差を認めなかった。遊走においても同様に 2 群間に有意差を認めなかった。アポトーシスに関しても 2 群間に有意差を認めず、ベバシズマブの PDCs, TDCs に対する細胞毒性は認めなかった。

4. 考察

本研究の最も重要な発見は、*in Vitro*でベバシズマブがラットのアキレス腱由来の二つの異なるTSPC, PDCs, とTDCsの分化と成熟を促進したことである。

TSPCは自己複製能, クローン形成能, および多能性を示し, 腱実質由来及び腱周囲膜由来の2つの亜集団が存在することが報告されている (Mienaltowski et al., 2013)

. 腱損傷後, 治癒の初期過程においては, PDCsがScxを発現し, 損傷部位に遊走して細胞外基質を産生して欠損部位を埋める (Sakabe et al., 2018). 初期過程の後にTDCsが関与するが, TDCsは Scx, Tnmd の発現が高く, TDCsを介した内在性修復を促進することも腱損傷治癒の重要な治療戦略の一つとなり得る (Mienaltowski et al., 2014).

ベバシズマブは, VEGF-Aに特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体である. この作用により, VEGF-Aの生物学的活性が抑制され, 血管新生が抑制される. 血管新生は創傷治癒における生理的過程であるが, 無秩序な血管の成長や血管退縮の障害は瘢痕形成につながる可能性がある (Korntner et al., 2019). 本来成熟した腱は血管が少ないが, 慢性腱症などの病的状態では過剰な血管新生が生じており, 腱におけるVEGFによる長期的な血管新生は腱治癒と機能回復を阻害する可能性がある (Tempfer et al., 2015). したがって, 適切な腱修復のためには血管新生を制御することが重要である. 動物モデルを用いた腱修復のための抗VEGF投与の臨床研究では, 血管新生の減少と腱コラーゲン組織と機械的特性の改善が示された (Riggin et al., 2021) (Dallaudiere et al., 2013). これらの*in vivo*研究では, 血管新生の抑制が腱修復に関連する改善に役割を果たすことが結論付けられたが, TSPCへの影響は示されていない.

本研究は, ベバシズマブが2種類のTSPC, PDCsおよびTDCsの分化に及ぼす洞察を示すものである. これまでの研究でPDCs, TDCsが腱修復に寄与することが示されており, VEGFを抑制することによるPDCs, TDCsの分化と成熟の誘導は, 腱修復を促進するための治療オプションとなる可能性がある.

【引用文献】

Bi YM, Ehirchiou D, Kilts TM, Inkson CA, Embree MC, Sonoyama W, et al. (2007), Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nature Med.*, 13, 1219-1227.

Dallaudiere B, Lempicki M, Pesquer L, Louedec L, Preux PM, Meyer P, et al. (2013), Acceleration of tendon healing using US guided intratendinous injection of bevacizumab: first pre-clinical study on a murine model, *Eur J Radiol.*, 82, e823-828.

Imai S, Kumagai K, Yamaguchi Y, Miyatake K, Saito T. (2019), Platelet-rich plasma promotes migration, proliferation, and the gene expression of scleraxis and vascular endothelial growth factor in paratenon-derived cells in vitro. *Sports Health.*, 11, 142-148.

Korntner S, Lehner C, Gehwolf R, Wagner A, Grutz M, Kunkel N, et al. (2019), Limiting angiogenesis to modulate scar formation. *Adv Drug Deliv Rev.*, 146, 170-189.

Mienaltowski MJ, Adams SM, Birk DE. (2019), Regional differences in stem cell/progenitor cell populations from the mouse achilles tendon. *Tissue Eng Part A.*, 19, 199-210.

Mienaltowski MJ, Adams SM, Birk DE. (2014), Tendon proper- and peritenon-derived progenitor cells have unique tenogenic properties. *Stem Cell Res Ther.*, 5.

Riggin CN, Rodriguez AB, Weiss SN, Raja HA, Chen M, Schultz SM, et al. (2021), Modulation of vascular response after injury in the rat Achilles tendon alters healing capacity. *J Orthop Res.*, 39, 2000-2016.

Sakabe T, Sakai K, Maeda T, Sunaga A, Furuta N, Schweitzer R, et al. (2018), Transcription factor scleraxis vitally contributes to progenitor lineage direction in wound healing of adult tendon in mice. *J Biol Chem.*, 293, 5766-5780.

Tempfer H, Traweger A. (2015), Tendon vasculature in health and disease. *Front Physiol.*, 6, 330.

【論文目録】

I 主論文

Bevacizumab promotes tenogenic differentiation and maturation of rat tendon-derived cells in vitro

Kusaba, Y. , Kumagai, K. , Ishikawa, K. , Choe, H. , Ike, H. , Kobayashi N. , Inaba Y. :
PLoS One, 2023, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0293463>