

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09544

研究課題名（和文）コンディショナルノックアウトラットを用いたMkxの発生・恒常性維持機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of Mkx in development and homeostasis using conditional knockout rats

研究代表者

伊藤 義晃（Ito, Yoshiaki）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：50511044

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、腱疾患の病因解明や治療法確立の基盤となる腱の形成・維持機構を解明することを目的に、腱の形成・恒常性維持におけるMkxの機能についてラットを用いた解析を試みた。ラットの尾腱およびアキレス腱から腱細胞を取得する方法について検討し、Mkx floxラット腱細胞を取得することに成功した。4週齢のMkx-Floxラットのアキレス腱から細胞を採取し、Cre遺伝子を導入してqPCRによる発現解析を行った結果、Mkxの発現が抑制されることを確認した。さらに腱・靭帯の主成分であるCol1a1などの腱マーカー遺伝子の発現が減少し、軟骨マスター遺伝子であるSox9の発現が上昇することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりMkxの腱恒常性維持に重要な遺伝子であることが改めて確認された。今後のMkxに関する研究により腱関連疾患の病態解明や新規治療法開発の基盤となりうる腱の形成や恒常性維持メカニズムの解明への寄与が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, in order to elucidate the mechanism of tendon formation and maintenance that is the basis for elucidating the etiology of tendon diseases and establishing treatment methods. We investigated how to obtain tendon cells from rat tail tendon and Achilles tendon, and succeeded in obtaining Mkx-flox rat tendon cells. As a result of collecting cells from the Achilles tendon of 4-week-old Mkx-flox rats, introducing the Cre gene and analyzing the expression by qPCR, it was confirmed that the expression of Mkx was suppressed. Furthermore, it was found that the decreased expression of tendon marker genes, and the increased expression of Sox9, a cartilage master gene.

研究分野：分子生物学

キーワード：腱 Mkx

1. 研究開始当初の背景

(1) 腱と疾患

腱は、I型コラーゲンを主成分とした細胞外基質とそれを産生する腱細胞で構成される、筋肉と骨をつなぐ線維性の結合組織で、力や運動を伝達し、我々の"動く"という重要な生理機能を担う要となっている。外傷や疾病、加齢などによる腱の損傷・変性は、QOLの著しい低下を招くが、腱は栄養血管が少ないため治癒力は非常に弱く、再生が困難であり、新しい再生医療技術等の開発が望まれている。しかしながら、その基盤となる腱の発生・成熟およびコラーゲン線維形成機構は、良い培養系がなく、マーカー遺伝子や重要因子が長らく不明であったことから、未知な部分が多い。またアキレス腱骨化症など異所性骨化を来す病態は、疼痛や可動性低下を来し日常生活の制限を招く疾患であるが、本疾患の原因および腱の恒常性維持メカニズムについてはよく分かっていない。

(2) Mohawk homeobox

Mohawk homeobox (Mkx)遺伝子は、腱・靭帯において未分化な前駆細胞から成熟細胞まで発現する転写因子で、K0 マウスでは全身の腱の低形成が見られ、コラーゲン fibril の径が細く幼若になることから、これまで長らく不明であった腱発生、特にコラーゲン線維形成 (Fibrillogenesis)において重要な遺伝子であることが明らかになった (Ito et al, Proc Natl Acad Sci USA 2010)。また、腱・靭帯関連遺伝子の発現低下並びに骨・軟骨関連遺伝子の発現上昇が見られることから Mkx が骨・軟骨等の他細胞への分化を抑え、腱細胞への分化に導く機能を有していることが示唆された (Nakamichi et al, Nat Commun 2016)。さらに加齢により靭帯様組織である椎間板線維輪の変性、およびアキレス腱内部で骨・軟骨系列細胞への分化転換が示唆される異所性骨化が確認され、腱・靭帯の恒常性維持にも重要な遺伝子であることも明らかにした。

Mkx K0 マウスではE16.5付近から腱の主要成分であるI型コラーゲンやTnmdなどの腱マーカー遺伝子の発現減少が見られ、生後5日以降には fibrillogenesis の低下に伴うコラーゲン fibril 径の縮小が観察されるが (Liu et al, Mol Cell Biol 2010)、初期分化異常による未熟な腱細胞が原因でコラーゲン線維形成に異常を来すのか、それともコラーゲン線維形成自体に Mkx が直接関わるのかは不明なままである。またアキレス腱の異所性骨化についても、アキレス腱の低形成が原因で過度のメカニカルストレスがかかり骨化を生じるのか、他細胞系列への分化を抑える Mkx の機能がないことが原因で分化転換が生じるのかについても不明である。

2. 研究の目的

K0 マウスの解析により重要な知見が得られた一方、マウスを用いた腱の研究では、細胞成分に乏しい腱組織において、マウスから十分量の細胞を得ることが難しい、外科的手術を腱組織で正確に行うにはマウスの体格は小さい、生理学的な研究にはよりヒトに近い動物が好ましい、といった課題もある。そのため、運動器領域の研究にはマウスより体格が大きく、生理学的にもヒトにより近いラットがしばしば用いられてきた。

個体レベルでの機能解析に強力なツールである遺伝子改変動物の解析は、ラットにおいてはその胚性幹細胞の樹立が難しく、その作製自体困難であったが、近年ゲノム編集技術が開発され、遺伝子改変ラットの作製が可能となった。申請者らは、Mkx K0 ラットを CRISPR/Cas9 システムにより作製、解析したところ、マウス同様全身の腱の低形成、コラーゲン fibril の縮小を認めた。さらに、マウスでは2.5ヶ月齢ほどで骨化が確認できる個体が現れ始めるが、体格が大きくメカニカルストレスがより大きくかかるラットでは出生直後にアキレス腱内に軟骨集積が認められ、5週齢には全てのK0ラットで骨化が確認された (Suzuki et al, Proc Natl Acad Sci USA 2016)。さらに、申請者らは未だ作製報告の無い Mkx-flox ラットの作製にも成功し、時期特異的なコンディショナルノックアウト (CKO)を大型なラットで作製・解析することが可能となった。本研究では、腱組織の発生・恒常性維持メカニズムという重要な医学的問題について、Mkx の機能を起点とした CKO ラットを用いたアプローチにより解明し、コラーゲン線維形成および異所性骨化における分化転換について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) in vivo 解析

Mkx の時期特異的なノックアウトを行うために Mkx 遺伝子座に CreER 遺伝子をノックインした Mkx-CreER ノックインラットの作製を試みた。Mkx-flox ラットはすでに作製に成功している。

CRISPR-Cas9 システムを用いて Mxk 翻訳開始点付近をターゲットとする gRNA を設計し、ノックインのためのターゲティングベクターを作製した。これら gRNA およびターゲティングベクターと Cas9 タンパク質をエレクトロポレーションにてラット受精卵に導入し、産まれたラットの genotyping を行い、ノックインの確認を行った。

(2) in vitro 解析

Mxk-flox ラットの尾腱およびアキレス腱より腱細胞を取得する方法について検討した。得られた腱細胞を用いて Cre 遺伝子をレンチウイルスを用いて導入し Mxk ノックアウトを行った。得られた Mxk ノックアウト細胞を用いて qPCR を行い、発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) in vivo 解析

Mxk-CreER ノックインラットを作製するために、複数の gRNA およびターゲティングベクターのデザイン・作製を行った。これら gRNA およびターゲティングベクターを用いて様々な条件下でエレクトロポレーションによるラット受精卵への導入を試みた結果、標的となる配列付近でのゲノムの切断は確認できたものの、CreER がノックインされた個体を取得することはできなかった。

(2) in vitro 解析

Mxk-flox ラットから取得したアキレス腱および尾腱から腱細胞を取得する方法を検討した。腱を採取・ミンスし、コラゲナーゼ処理を行い 20%FBS MEM 培地にて培養した結果、十分量の腱細胞を取れることを確認した。

得られた腱細胞から RNA を抽出し、qPCR を行った結果、腱細胞で発現が高い Mxk、Scx、Col1a1 および Tnmd の発現が高いことを確認した。

Mxk-flox ラットのアキレス腱から上記手法で腱細胞を分離し、本細胞を用いて Cre 遺伝子をレンチウイルスベクターによる導入して発現解析を qPCR により行った。まず Mxk の発現が Cre 遺伝子導入により低下することを確認した。腱関連遺伝子として Col1a1、Scx および Tnmd の発現を調査した結果、Cre 遺伝子導入により Col1a1 および Tnmd の発現低下を確認し、Mxk が腱マーカー遺伝子の発現に重要な遺伝子であることを改めて示した。さらに軟骨マスター遺伝子である Sox9 の発現を調査した結果、Mxk ノックアウトでは Sox9 の発現が上昇していた。本結果から Mxk は腱細胞としての機能を維持し、軟骨細胞などの多系統への分化を抑制している可能性が示唆される。

< 引用文献 >

1. Y. Ito et al, The Mohawk homeobox gene is a critical regulator of tendon differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107(23), 10538-10542, 2010.
2. R. Nakamichi et al, Mohawk promotes the maintenance and regeneration of the outer annulus fibrosus of intervertebral discs. Nat. Commun., 7:12503, 2016.
3. W. Liu et al, The atypical homeodomain transcription factor Mohawk controls tendon morphogenesis. Mol. Cell Biol., 30(20):4797-4807, 2010.
4. H. Suzuki et al, Gene targeting of the transcription factor Mohawk in rats causes heterotopic ossification of Achilles tendon via failed tenogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 113(28), 7840-7845, 2016.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------