

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和4（2022）年度 中間評価用〕

令和4年3月31日現在

研究期間：2020年度～2024年度
課題番号：20H05696
研究課題名：節組織を繋ぐ要：腱・靭帯ホメオスタシスの分子メカニズムの解明

研究代表者氏名（ローマ字）：浅原 弘嗣（ASAHARA Hiroshi）
所属研究機関・部局・職：東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：70294460

研究の概要：

運動器は、筋と骨・軟骨が腱・靭帯によって正確かつ強靱に結ばれることで機能を発揮し、適切な運動刺激においてその機能が向上する。本研究計画においては、腱・靭帯における遺伝子発現ネットワークを、複数の遺伝子改変マウスによる研究と一細胞レベルの分子生物学的解析を有機的に組み合わせることで解明し、腱・靭帯の恒常性維持機構を明らかにする。

研究分野：

キーワード：腱・靭帯、Mkx、運動機能、遺伝子発現

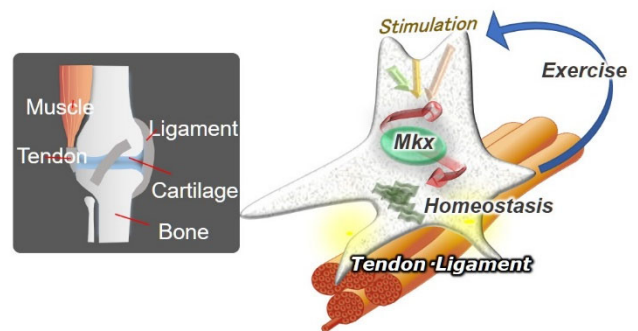
1. 研究開始当初の背景

腱は筋肉から骨へ力を伝達し、靭帯は関節の適切な可動性と安定性を維持する機能を有している。腱・靭帯は老化とともに組織の恒常性が失われ、その機能が低下する他、その損傷においては、再生能力に乏しいため、完全な機能回復が困難であり、アスリートはもちろん、一般人の日常生活における運動能力の低下の原因となることが多い。また、腱・靭帯の機能低下は、長期的に変形性膝関節症などの運動器疾患を引き起こすことも知られている。

2. 研究の目的

近年、我々を含む複数の研究者によって、転写因子 Mkx が腱・靭帯に特異的に発現し、腱・靭帯の発生に重要な機能をもつことが示されてきた。

これらの知見に基づき、本研究計画においては、腱・靭帯の恒常性維持や再生メカニズムの解明のため、この転写因子 Mkx に注目し、複数の遺伝子改変マウス・ラット作製による研究と一細胞レベルの分子生物学的解析を有機的に組み合わせることで、Mkx を起点とした腱・靭帯における遺伝子発現ネットワークとその生理学的意義を明らかにする。



図： 関節を構成する腱・靭帯の分子基盤の解明

3. 研究の方法

腱組織および腱様組織として口腔内歯根膜に存在する細胞集団を同定するため、1細胞レベルでのトランスクリプトーム解析を行い、腱および歯根膜を構成する、それぞれの細胞群を抽出、それぞれの細胞群の機能を特異的な遺伝子発現パターンより検討する。

特に腱組織の1細胞レベルでの ATAC シークエンス解析を行い、腱細胞における Mkx の遺伝子発現ネットワークを詳細に解析する。

個体レベルでは、腱・靭帯の成熟後の Mkx の機能をコンディショナル Mkx ノックアウトマウス・ラットを用いることで、分子生物学的、組織学的、生理学的に解析する。

さらに、Mkx の遺伝子発現を強めるカスケードを探索し、その不活化による腱・靭帯の恒常性維持および組織再生の検討を行う。

4. これまでの成果

特に腱組織および口腔内腱様組織である歯根膜に焦点をあて、1細胞 RNA シーケンス解析を行った。腱組織は、マウスおよびヒトから得られた筋腱組織を用いて行った。特に、マウス組織では、組織成熟の複数の過程において1細胞 RNA シーケンス解析と1細胞レベルでの ATAC シーケンスを並行して行い、腱組織を構築する細胞群の同定とともに、各細胞群における特異的遺伝子のクロマチン構造の変化を解析した。

腱組織との対比において、同様に M_{nkx} で発生と恒常性が制御される腱様組織の中で、特に我々によって研究が進んでいる口腔歯根膜の1細胞 RNA シーケンス解析を M_{nkx} ノックアウトラットを用いて行い、予想を超える重要な知見を得た。特に、M_{nkx} と S_{cx} が、腱においては同じ細胞群に発現しているのに対して、歯根膜においては、M_{nkx} 発現細胞群と S_{cx} 発現細胞群が別となっており、遺伝子発現プロファイルから、それぞれ異なった機能を有することが示唆された。

腱において M_{nkx} がメカノ刺激に反応し、その発現が促進されることに注目、その M_{nkx} の上流シグナルを解析することで、腱における生理学的メカノ刺激のアナボリックな作用を生み出す分子メカニズムの一端を解明した。

これらの遺伝子カスケードを制御するメカニズムから、腱の再生や修復を促すシステムの構築を行い、動物実験での検証を行った。

5. 今後の計画

腱・靭帯の損傷の修復に重要な分子機構の解明は、将来的な再建・再生医療への足掛かりとなる可能性がある。

また、適切な運動刺激が運動器の機能向上に及ぼすメカニズムの解明は、動物の運動機能の生理学的な意義に重要な知見をもたらすと思われる。

以上、腱・靭帯の遺伝子・分子レベルでの解析は、運動を司る組織の統合的な理解に寄与し、ヒトの健康寿命の充進に貢献することが期待される。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Takada K, Chiba T, Miyazaki T, Yagasaki L, Nakamichi R, Iwata T, Moriyama K, Harada H, Asahara H. Single cell RNA sequencing reveals critical functions of M_{nkx} in periodontal ligament homeostasis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022 Feb 4;10:795441.
2. Tsutsumi H, Kurimoto R, Chiba T, Nakamichi R, Matsushima T, Fujii Y, Sanada R, Kato T, Shishido K, Sakamaki Y, Kimura T, Kishida A, Asahara H. Generation of a tendon-like tissue from human iPS cells. *J Tissue Eng*. 2022 Jan 21;13:20417314221074018.
3. Ito Y, Matsuzaki T, Ayabe F, Mokuda S, Kurimoto R, Matsushima T, Mochizuki Y, Inotsume M, Tsutsumi H, Liu L, Shinohara M, Tanaka Y, Nakamichi R, Nishida K, Lotz M, Asahara H. Both microRNA-455-5p and -3p repress hypoxia-inducible factor-2 α expression and coordinately regulate cartilage homeostasis. *Nat Commun*. 2021 Jul 6;12(1):4148.
4. Miyazaki T, Kurimoto R, Chiba T, Matsushima T, Nakamichi R, Tsutsumi H, Takada K, Yagasaki L, Kato T, Shishido K, Kobayashi Y, Matsumoto T, Moriyama K, Asahara H. M_{nkx} regulates the orthodontic tooth movement via osteoclast induction. *JBMM*. 2021 May 14.
5. Uchida Y, Matsushima T, Kurimoto R, Chiba T, Inutani Y, Hiroshi Asahara H. Identification of chemical compounds regulating PD-L1 by introducing HiBiT-tagged cells. *FEBS Lett*. 2021 Mar;595(5):563-576. doi: 10.1002/1873-3468.14032. Epub 2021 Jan 20.
6. Chiba T, Kurimoto R, Matsushima T, Ito Y, Nakamichi R, Lotz M, Asahara H. MicroRNA expression profiling, and target identification and validation in chondrocytes. *Methods in Molecular Biology Book*. 2021;2245:151-166.

7. ホームページ等

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 システム発生・再生医学分野
<https://www.tmdusystemsbiomedicine.com/>