

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10191

研究課題名(和文) 咀嚼筋腱・腱膜過形成症の新規治療法へ向けた基礎研究～"筋内腱"発生機序の探索～

研究課題名(英文) The Mechanism of Intramuscular Tendon Development in Masticatory Muscle Tendon-Aponeurosis Hyperplasia

研究代表者

山本 将仁 (Masahito, Yamamoto)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：90733767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：咀嚼筋の内部には多数の“筋内腱”が存在し、アキレス腱のような筋の外にある腱とは性質が異なる。近年、『咀嚼筋腱腱膜過形成症』という新たな概念の疾患が注目されている。本疾患の主な病態は骨格筋内の腱の過形成であり、その病因を解明するためには“筋内腱”の発生機序を明らかにする必要がある。そこで本研究では、“筋内腱”と骨の境目(エンテシス)の発生機序を明らかにすることとした。その結果、エンテシス発生に必須のSox9が、胎生初期にのみ高い発現を示し、その後ダウンレギュレーションすることを明らかにした。すなわち、“筋内腱”エンテシスの発生機序は、一般的なエンテシスとは異なることを示すことが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は咀嚼筋腱・腱膜過形成症の新規治療法へ向けた基礎研究であり、その第一歩として、筋内腱の腱-骨接合部の発生を検索した。その結果、アキレス腱などに代表される一般的な腱-骨接合部とは、その発生機序が異なることが明らかとなった。すなわち筋内腱には独自の発生パターンが存在し、この発生機序の全容解明が咀嚼筋腱・腱膜過形成症の新規治療法への第一歩になるとことを確信した。世界的に見て、腱研究はアキレス腱のような筋外腱のみが注目されており、我々の注目している筋内腱を独自ルートで追い求める意義を感じた。

研究成果の概要(英文)：In the masticatory muscles, numerous ‘intramuscular tendons’ exist within the muscle itself, distinct from tendons outside the muscle, such as the Achilles tendon. Recently, a novel condition called ‘masticatory muscle tendon-aponeurosis hyperplasia’ has gained attention. The main pathology of this condition involves excessive formation of tendons within skeletal muscles. To elucidate its etiology, it is essential to understand the developmental mechanism of ‘intramuscular tendons’ at the tendon-bone interface (enthesis). Our study revealed that Sox9, crucial for entheses formation, exhibits high expression only during early fetal development and subsequently downregulates. Thus, the developmental process of ‘intramuscular tendon’ entheses differs from that of typical entheses.

研究分野：筋-腱-骨複合体(運動器)

キーワード：筋内腱 発生 マウス 咀嚼筋腱腱膜過形成症

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

咀嚼筋腱・腱膜過形成症は、咬筋や側頭筋の腱および腱膜の過形成により筋に伸展障害が生じ開口障害を呈する、新しい概念の疾患である。本疾患の病態は近年少しずつ明らかとなり、咬筋の“筋内腱”が過剰に増えるとの報告がある。しかしながら現在、疾患に対する治療法は腱・腱膜切除術などの外科的手法のみとなり、患者の負担が軽減する治療法の考案はなされていない。故に、腱および腱膜の過形成に対する新規治療法の開発が急務である。

腱組織は筋と骨をつなぐ役割を担っており、一般的にはアキレス腱のような“筋外腱”のことを指す。その一方で筋内にも腱組織は存在し、“筋内腱”と呼ばれている。機能的には、“筋外腱”と“筋内腱”は異なるとの報告があり、これら 2 つの腱は意図的に分離して研究を進める必要がある。発生メカニズムに関しても、現在まで一貫して“筋外腱”の研究が行われており、“筋内腱”は未開拓領域である。“筋内腱”の発生プロセスを一刻も早く明らかにすることは、咀嚼筋腱・腱膜過形成症の原因解明につながると申請者は考えている。これまで申請者は、筋・腱接合部(筋と腱の結合部)の形態形成を中心に、筋・腱・骨がどのように複合的な 1 つの運動器を作り上げるのかについて興味を持ち研究を遂行してきた(Yamamoto et al. 2020)。その中で、マウスの胎児標本の観察中に、第一咽頭弓由来の筋芽細胞群の中に、突如として腱原基が発生することを見いだした(Nara, Yamamoto et al. 2017)。この結果から、“筋内腱”の由来に強く惹かれ、研究を開始しようと考えた。

2. 研究の目的

咀嚼筋の“筋内腱”の大半は骨格筋に囲まれており、その結果筋束の大部分が筋との接合部である。しかし、骨との境目も認められ、その部位はエンターシス(腱-骨接合部)と呼ばれる。本研究では咀嚼筋の“筋内腱”発生研究の第一歩として、筋内腱の『腱-骨接合部』の構築メカニズムを明らかにすることとした。

3. 研究の方法

胎生 13.5~18.5 日齢と 12 週齢の C57BL6J マウスを用いた。観察対象部位は咀嚼筋 1 つである外側翼突筋とし、その“筋内腱”のエンターシス部の発生機序を明らかにすることとした。続いて、エンターシス発生に必須の転写因子である *Sox9* に着目し、*Sox9* 陽性細胞の系譜解析のために *Sox9CreER; tdTomato* マウスを、エンターシスを含めた神経堤由来細胞の *Sox9* を欠失させるために *Wnt1Cre; Sox9^{f/f}* マウスを用いた。

4. 研究成果

(1) 外側翼突筋内の筋内腱の組織学的解析とその発生プロセス

外側翼突筋に筋内腱が存在することを示すために、12 週齢の C57BL6J マウスを用いて組織学的に解析した。外側翼突筋は下顎頭ではなく下顎頸部に付着しており、同部の骨膜から筋内にむけて細い筋内腱が認められた。つづいて胎生期の『筋内腱-骨接合部』すなわちエンターシスの発生過程を、C57BL6J マウスを用いて観察すると、発生初期の *Scleraxis* (*Scx*) 陽性の腱前駆細胞は筋と骨の間に存在し、経時的にそのスペースが小さくなることが明らかとなった(図 1)。また胎生 18 日においてはじめて、この小さなスペースから前方に向けて筋内腱が出現した。したがってこの小さなスペースを“筋内腱”エンターシスと定義した。

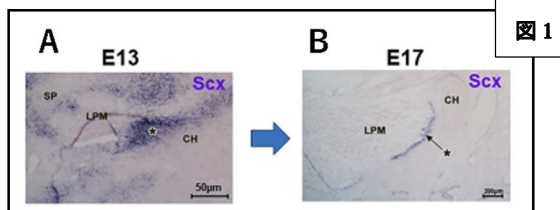


図 1

(2) 筋内腱エンターシスにおける *Sox9* の発現

続いてこのスペースの解析を試みるために、*Sox9CreER; tdTomato* マウスを用いて *Sox9* 陽性細胞の系譜解析をおこなった。胎生 13 日にタモキシフェンを投与すると、エンターシス内に *tdTomato* 陽性細胞が認められた。一方で胎生 15 日に投与すると、エンターシス内に *tdTomato* 陽性細胞は認められなかった。すなわち *Sox9* はエンターシス内で経時的にダウンレギュレーションすることが示唆された。*Sox9* のダウンレギュレーションを明らかにするために、免疫組織学的染色とリアルタイム PCR、さらには BrdU による細胞増殖活性をおこなった。その結果、免疫組織学的染色では *Sox9* の発現が経時的に低下し(図 2)、リアルタイム

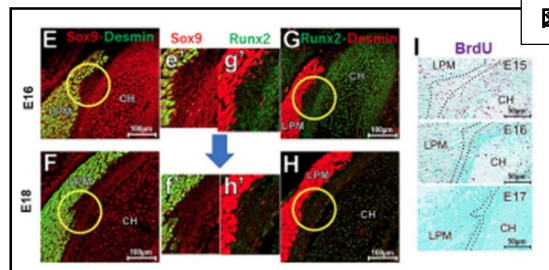


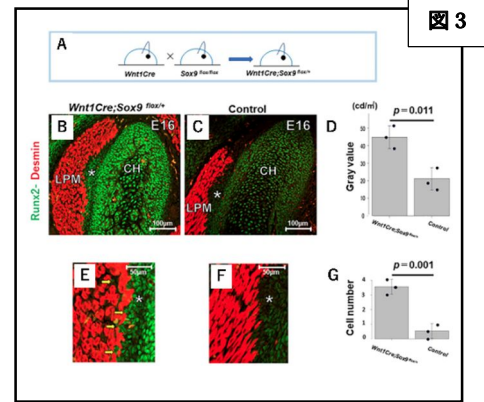
図 2

△ PCR でも同様にその発現量が低下することことを同定した。また同部の細胞増殖活性を観察すると、経時的に増殖性細胞の数が低下した(図 2)。

(3) 筋内腱エンターシスにおける Sox9 の役割

Sox9 がダウンレギュレーションするものの、エンターシスでの Sox9 の役割を示すために、*Wnt1Cre; Sox9^{f/f}* マウスを用いた。その結果、*Wnt1Cre; Sox9^{f/f}* マウスはエンターシスの形成不全を示した(図 3)。本研究により、筋内腱のエンターシスには Sox9 は必須であるものの、この転写因子はダウンレギュレーションすることが明らかとなった。これは明らかにアキレス腱などの一般的な腱のエンターシスとは異なる結果であった。

本研究により、“筋内腱”エンターシスの発生機序は、一般的なエンターシスとは異なることを示すことが出来た。



(参考文献)

Yamamoto M, Abe S. Mechanism of muscle-tendon-bone complex development in the head. *Anat Sci Int.* 2020 Mar;95(2):165-173. doi: 10.1007/s12565-019-00523-0.

Nara M, Kitamura K, Yamamoto M, Nagakura R, Mitomo K, Matsunaga S, Abe S. Developmental mechanism of muscle-tendon-bone complex in the fetal soft palate. *Arch Oral Biol.* 2017 Oct;82:71-78. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.06.001.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kitamura Asahi, Yamamoto Masahito, Hirouchi Hidetomo, Watanabe Genji, Taniguchi Shuichiro, Sekiya Sayo, Ishizuka Satoshi, Jeong Juhee, Higa Kazunari, Yamashita Shuichiro, Abe Shinichi	4. 巻 19
2. 論文標題 Downregulation of SOX9 expression in developing entheses adjacent to intramembranous bone	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0301080
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0301080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Amemiya Hikari, Yamamoto Masahito, Higa Kazunari, Watanabe Genji, Taniguchi Shuichiro, Kitamura Kei, Jeong Juhee, Yanagisawa Nobuaki, Fukuda Ken-ichi, Abe Shinichi	4. 巻 24
2. 論文標題 Effects of Myostatin on Nuclear Morphology at the Myotendinous Junction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6634 ~ 6634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24076634	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamamoto Masahito, Hirota Yoshinosuke, Watanabe Genji, Taniguchi Shuichiro, Murakami Gen, Rodr?guez V?zquez Jos? Francisco, Abe Shin ichi	4. 巻 Epub ahead of print.
2. 論文標題 Development and growth of median structures in the human tongue: A histological study using human fetuses and adult cadavers	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Anatomical Record	6. 最初と最後の頁 -----
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ar.25198	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamamoto Masahito, Sakiyama Koji, Kitamura Kei, Yamamoto Yutaro, Takagi Takahiro, Sekiya Sayo, Watanabe Genji, Taniguchi Shuichiro, Ogawa Yudai, Ishizuka Satoshi, Sugiyama Yuki, Takayama Takeshi, Hayashi Katsuhiko, Chang Wei-Jen, Abe Shinichi	4. 巻 23
2. 論文標題 Development and Regeneration of Muscle, Tendon, and Myotendinous Junctions in Striated Skeletal Muscle	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3006 ~ 3006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23063006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Masahito, Sakiyama Koji, Kitamura Kei, Yamamoto Yutaro, Takagi Takahiro, Sekiya Sayo, Watanabe Genji, Taniguchi Shuichiro, Ogawa Yudai, Ishizuka Satoshi, Sugiyama Yuki, Takayama Takeshi, Hayashi Katsuhiko, Chang Wei-Jen, Abe Shinichi	4. 巻 23
2. 論文標題 Development and Regeneration of Muscle, Tendon, and Myotendinous Junctions in Striated Skeletal Muscle	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3006 ~ 3006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23063006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Abe Shinichi, Yamamoto Masahito	4. 巻 22
2. 論文標題 Factors Involved in Morphogenesis in the Muscle?Tendon?Bone Complex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6365 ~ 6365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22126365	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ogawa Yudai, Yamamoto Masahito, Sato Masaki, Odaka Kento, Kasahara Masaaki, Hinata Nobuyuki, Sakiyama Koji, Abe Shinichi	4. 巻 235
2. 論文標題 Localization of T-cell factor 4 positive fibroblasts and CD206-positive macrophages during skeletal muscle regeneration in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger	6. 最初と最後の頁 151694 ~ 151694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aanat.2021.151694	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagakura Ryotaro, Yamamoto Masahito, Jeong Juhee, Hinata Nobuyuki, Katori Yukio, Chang Wei-Jen, Abe Shinichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Switching of Sox9 expression during musculoskeletal system development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-65339-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamamoto Masahito, Abe Shinichi	4. 巻 95
2. 論文標題 Mechanism of muscle-tendon-bone complex development in the head	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anatomical Science International	6. 最初と最後の頁 165 ~ 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12565-019-00523-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Masahito, Takada Hiromasa, Ishizuka Satoshi, Kitamura Kei, Jeong Juhee, Sato Masaki, Hinata Nobuyuki, Abe Shinichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Morphological association between the muscles and bones in the craniofacial region	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0227301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0227301	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 渡辺元次, 山本将仁, 山本悠太郎, 関谷紗世, 谷口修一朗, 廣内英智, 松永智, 阿部伸一
2. 発表標題 腱損傷修復時に発現するSox9の役割解明
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷口修一朗, 山本将仁, 関谷紗世, 渡辺元次, 山本悠太郎, 高木貴博, 阿部伸一
2. 発表標題 筋腱接合部の発育過程にみられるSox 9 発現の切り替え
3. 学会等名 第312回東京歯科大学学会 (総会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内藤 哲, 比嘉 一成, 関谷 紗世, 山中 基, 渡辺 元次, 山本 将仁, 島崎 潤, 阿部 伸一
2. 発表標題 三次元的共培養モデルの確立: GDF - 8 (Myostatin) による腱分化誘導の検索
3. 学会等名 第311回東京歯科大学学会 (例会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本 将仁, 内藤 哲, 金平 智恵美, 松永 智, 北村 啓, 山本 仁, 阿部 伸一
2. 発表標題 筋-腱-骨複合体の組織構築過程におけるSox9のスイッチング
3. 学会等名 第126回解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamamoto Masahito, Tetsu Naito, Takahiro Takagi, Chiemi Kanehira, Satoru Mastunaga, Kei, Hitoshi Yamamoto, Shinichi Abe
2. 発表標題 Switching of Sox9 expression during musculoskeletal system development.
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------