

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月19日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659278

研究課題名（和文） 腱・靭帯の発生・再生メカニズムの解明

研究課題名（英文） Elucidation for mechanisms of development and regeneration in tendon and ligament

研究代表者

浅原 弘嗣 (ASAHARA HIROSHI)

独立行政法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・客員研究部長

研究者番号：70294460

研究成果の概要（和文）：

腱・靭帯は、運動機能に必須の結合組織であり、その発生・再生メカニズムの解明は、これら組織が再生困難な組織であることから、整形外科分野において重要な課題の1つとなっている。我々は、腱・靭帯で特異的に発現する転写因子としてMkxを同定した。このMkxのノックアウトマウスを作製し、生体内における機能を解析した結果、Mkxノックアウトマウスでは、腱が低形成になり、腱の主要成分であるI型コラーゲンが低下していることが分かり、Mkxが腱形成に重要な遺伝子であることを明らかにした。また、Mkxの上流・下流遺伝子のスクリーニングを行い、その候補遺伝子を同定した。これらの研究成果は、腱の分化メカニズムの解明につながり、腱損傷やエーラスダンロス症候群などの治療・診断の開発に重要な知見を提示する。

研究成果の概要（英文）：

Tendon and ligament are dense, fibrous connective tissues that allow for body movement. Elucidation for mechanisms of development and regeneration in these tissues is important research subject because tendon and ligament tissues heal very slowly and rarely recovers completely. We identified Mkx as a transcription factor specifically expressing in tendon and ligament. To investigate the *in vivo* functions of Mkx, we generated *Mkx*^{-/-} mice. These mice had hypoplastic tendons throughout the body. We also observed a downregulation of type I collagen in *Mkx*^{-/-} tendons. These data indicate that Mkx plays a critical role in tendon differentiation. We also performed the screening for upstream and downstream factors of Mkx, and identified the candidate genes. These findings will serve as a basis for understanding molecular mechanisms of tendon differentiation and may provide a therapeutic target for tendon injuries and tendon related diseases, such as Ehlers-Danlos syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・整形外科学

キーワード： 関節病学、Mohawk、腱、靭帯

1. 研究開始当初の背景

筋・骨格を機能的につなぎ、可動させる組織として、靭帯および靭帯を構成する細胞は、生物学的にも非常に興味深い対象であり、かつ医学的にも、肩腱板、上腕骨外側上顆、アキレス腱などの炎症および断裂の治療面から見ても重要な組織である。これらの病態に対する主な治療法として、抗炎症薬による一時的な痛みと炎症の改善、物理療法、あるいは腱縫合などの外科的手術などによる処置が行われているが更なる治療法の開発が望まれている。しかしながら、腱や靭帯の組織形成の分子機構に関しては解明されていない。(Sharma P, et al. J Bone Joint Surg Am. 2005) 四肢腱形成の分子機構に焦点を当てた近年の研究から、筋、軟骨、外胚葉などと同充織との組織間相互作用が腱特異的遺伝子発現を制御することが明らかになりつつある。例えば、四肢と体幹部の全ての腱および腱前駆体で発現する、bHLH 型転写因子である Scleraxis が FGF シグナルによって誘導され、腱・靭帯の分化形質の誘導・維持に重要な役割を果たしていること報告されているが (Brent AE, et al. Cell. 2003, Brent AE, et al. Development. 2005)、これまで報告されているこれらの腱関連遺伝子が腱の発生・分化、および再生機構で果たす役割は未解明の部分が多い。我々はマウス胚の *in situ* ハイブリダイゼーションによって、腱で特異的に発現する遺伝子 Mxk を見いだした (Yokoyama S et al, Developmental Cell, in press)。Mxk は多くの動物のボディープランに関わる制御的遺伝子に共通して見られるホメオドメインを持つホメオボックス遺伝子であった。最近、我々と同様にマウス胚を用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法による発現パターン解析の結果が報告され、腱の発生・分化の鍵となる遺伝子である可能性が示唆されている (Anderson DM, et al. Dev Dyn. 2006)。

腱組織形成は、体幹では体節の一部が皮節と筋節の相互作用により腱前駆体である syndetome を形成し、腱組織になると考えられている。また、四肢においては四肢間充織と外胚葉、ならびに筋肉との位置関係により腱組織形成が行われると考えられている。Mxk を中心とした腱発生・修復・再生過程における生理・病理解析は、ヒトの肩腱板炎、上腕骨外側上顆炎、膝蓋腱炎、アキレス腱炎や足底腱膜炎などの筋腱付着部障害の病態解明にも応用もできる可能性があり、意義がある。

2. 研究の目的

本研究では、腱発生時特異的に強く発現するホメオボックス遺伝子である ‘Mohawk (Mxk)’ の、ノックアウトマウスおよび組織特異的かつ恒常的なトランスジェニックマウスを作成することで、[I]腱の発生・分化における機能解明、[II]腱損傷時の再生における分子メカニズムの解明を行う。

以上の研究により、筋前駆細胞と軟骨前駆細胞の組織間相互作用による腱前駆細胞誘導機構の解明、腱前駆細胞の特徴づけ、新規腱・靭帯特異的マーカーの探索と腱損傷における病理診断・治療への基盤となる情報を得る。

3. 研究の方法

平成 22 年度

(1) ノックインマウスの表現型解析

腱形成における Mxk の役割について個体レベルでの解析を行うため、Mxk 遺伝子の Exon2 を Venus に置き換わるように遺伝子を改変した Mxk 遺伝子欠損マウスを作製した。Mxk 遺伝子欠損マウスはメンデルの法則に従い出生しており、胎生致死の可能性は低い。また、出生後に目立った異常は見られず、正常に成長しているように見られた。しかし、膝蓋腱、尾腱を、12 週齢の Mxk 遺伝子欠損マウスと野生型と比較したところ、腱組織の低形成が観察された。以上の結果より、Mxk が腱形成に関わることが示唆された。これらサンプルを用いて、H. E. 染色およびアザン染色を腱・靭帯が発生する胎生期 E14.5 日より生体まで、経時的に組織学的解析を行い、どの時点で、腱・靭帯の異常が見られるかを明らかにする。同時に、野生型を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションおよび免疫染色、ヘテロマウスを用いた GFP 発現より Mxk の発現を発生時期、生後にわたって解析する。また、これら KO マウスを用いて生理学的な靭帯・腱のフェノタイプ解析として、張力の測定を行う。

(2) 腱・靭帯組織の形成においては、結合組織の構成を電子顕微鏡を用いて解析する。研究協力者の岡山大学、解剖学、西田准教授の協力を得て、予備データとして、今までに報告のない靭帯の低形成のパターンが Mxk-KO マウスにおいて観察されており、さらに例数を増やし、経時的なフェノタイプの変化を観察する。

(3) 腱・靭帯などの強靭結合組織に発現す

る膜貫通型蛋白質であるテノモジュリンや、腱・靭帯の細胞外マトリックスの構成成分で、腱の粘弾性に関与している、Decorin、Aggrecan、Biglycan、Lumican、Fibromodulinの発現について解析する。また、腱、腱・靭帯の分化形質の誘導・維持に重要な役割を果たしていると推測されている bHLH 型転写因子 Scleraxis は、腱発生時に Mxk と同じく腱前駆細胞に発現すると報告されているが、両遺伝子間の発現制御機構は示されていない。Mxk 欠損胚において Scleraxis の発現解析を行い、両者の上下関係を示唆することにより、間葉系細胞からの腱前駆細胞への運命決定、腱への分化機構の解明に繋がる。

平成 23 年度

(1) Mxk 遺伝子の下流遺伝子群の転写制御解析

当研究で作製するノックインマウスおよびノックインヘテロマウスは Mxk 発現細胞で Venus 遺伝子が発現するように構築しており、これにより fluorescence-activated cell sorter (FACS) を用いて Venus を指標に Mxk 欠損細胞と Mxk 発現細胞を単離することができる。単離した Venus 発現細胞から、mRNA を精製しマイクロアレイを行い、Mxk 欠損細胞と Mxk 発現細胞との遺伝子発現比較解析を行う。結果、両者の間で発現量に変化が見られた遺伝子は Mxk が直接的若しくは間接的に発現を制御している標的遺伝子であることが示唆できる。また、Mxk 発現細胞で発現している遺伝子群の中には、新たな腱マーカー遺伝子となり得る遺伝子が含まれていることが期待でき、それらの遺伝子についてマウスの胎児および成体で発現解析を行うことにより、腱を特徴づける新たなマーカー遺伝子を発見することができる。以上の解析により、Mxk 遺伝子下流の転写調節機構を生体において網羅的に解析できる。また、現在その数が非常に少ない腱細胞・腱前駆細胞特異的遺伝子マーカーを取得できる可能性がある。

(2) 上記研究で Mxk の下流に位置する遺伝子であると予測された遺伝子群について、Mxk 欠損マウスを用いた発現解析、また、レポーターアッセイにより Mxk が直接制御する遺伝子を同定する。これにより、腱・靭帯の形成における遺伝子発現制御の分子メカニズムを明らかにする。

(3) Mxk 上流遺伝子のスクリーニング

Mxk の発現を制御する因子を明らかにするために、Mxk 遺伝子周辺の良く保存されたゲノム領域にルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポーターベクターを用いて約 6000 遺伝子の発現ベクターを用いたルシフェラーゼアッセイシステムにより行った。

4. 研究成果

腱形成における Mxk の役割について個体レベルでの解析を行うため、Mxk 遺伝子の Exon2 を Venus に置き換わるように遺伝子を改変した Mxk 遺伝子欠損マウスを作製した。膝蓋腱、尾腱、アキレス腱など、全身の腱を 12 週齢の Mxk 遺伝子欠損マウスと野生型と比較したところ、腱組織の低形成が観察された。以上の結果より、Mxk が腱形成に関わることが示唆された。このマウスを用いて、H. E. 染色およびアザン染色を腱・靭帯が発生する胎生期 E14.5 日より生体まで、経時的に組織学的解析を行い、どの時点で、腱・靭帯の異常が見られるかを検討したところ、尾腱においては E16.5 から、コラーゲン線維束の径が小さくなり始めることが分かった。また、これら KO マウスを用いて生理学的な靭帯・腱のフェノタイプ解析として、張力の測定を行い、そのぜい弱性を明らかにした。

腱組織の形成においては、結合組織の構成を電子顕微鏡によって解析し、腱の低形成のパターンが Mxk-KO マウスにおいて観察されたことから、Mxk が腱の発生後期に重要な機能を持つことが示唆された。

腱・靭帯の細胞外マトリックスの主要構成成分のコラーゲンと、腱の粘弾性に関与している、Decorin、Aggrecan、Biglycan、Lumican、Fibromodulin の発現を Mxk-KO マウスで解析し、Mxk の表現系を分子レベルで検討した。その結果、ノックアウトマウスのアキレス腱において I 型コラーゲンと Decorin の発現減少が観察された。

この Mxk の腱・靭帯における詳細な機能を明らかにするために、Mxk の上流・下流遺伝子のスクリーニングを行った。上流遺伝子のスクリーニングは、Mxk 遺伝子周辺の良く保存されたゲノム領域にルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポーターベクターを用いて約 6000 遺伝子の発現ベクターを用いたルシフェラーゼアッセイシステムにより行った。その結果、Mxk の発現を誘導する候補遺伝子として、2つの転写因子を同定した。

Mxk 遺伝子座に Venus をノックインしたヘテロおよびホモマウス胚から Venus 陽性細胞をソーティングし、マイクロアレイ解析を行った結果、骨・軟骨分化に関与するいくつかの遺伝子がホモマウスにおいて発現上昇していることが分かった。それら遺伝子のうち、骨芽細胞分化マーカー遺伝子の 1 つについて、よく保存されたゲノム領域をつないだレポーターベクターによるルシフェラーゼアッセイを行った結果、Mxk によって、レポーター活性が低下することを見出し、直接 Mxk が制御している可能性を示唆した。Mxk は転写抑制因子であることが示唆されているが、以上の結果から Mxk は骨・軟骨への分化を抑制して腱・靭帯への分化に寄与している可能

性が考えられた。

これらの成果は、間葉系細胞からの腱前駆細胞への運命決定、腱への分化機構の解明に繋がり、腱損傷やエーラスダンロス症候群などの治療・診断の開発に重要な知見を提示する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Ito Y, Toriuchi N, Yoshitaka T, Ueno-Kudoh H, Sato T, Yokoyama S, Nishida K, Akimoto T, Takahashi M, Miyaki S, Asahara H. The Mohawk homeobox gene is a critical regulator of tendon differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有. Vol. 107. No. 23. 2010. pp10538-10542.
DOI: 10.1073/pnas.1000525107

[学会発表] (計13件)

- ① 伊藤義晃, 他9名. 腱発生を制御する Mohawk homeobox 遺伝子の役割. 第25回日本軟骨代謝学会. 2012年3月10日. ウィルあいち (愛知県).
- ② Asahara H. Tendon and Ligament maturation is regulated by transcription factor Mxk. 第34回日本分子生物学会年会. 2011年12月16日. パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ③ 伊藤義晃, 他9名. Mohawk ホメオボックス遺伝子の腱発生における機能の解析. 第34回日本分子生物学会年会. 2011年12月13日. パシフィコ横浜 (神奈川県).
- ④ 浅原弘嗣. 運動器再建の要・腱をつくる転写因子 Mxk の機能と応用. 第30回日本運動器移植・再生医学研究会. 2011年9月25日. 福岡国際会議場 (福岡県).
- ⑤ 鬼塚奈緒子, 他2名. 腱・靭帯形成における Mxk の機能解析. 第12回運動器科学研究会. 2011年9月3日. 土佐ロイヤルホテル (高知県).
- ⑥ 浅原弘嗣. 腱・筋細胞分化を制御する転写因子. 第29回日本骨代謝学会学術集会. 2011年7月29日. 大阪国際会議場 (大阪府).
- ⑦ Asahara H. Transcription and RNA network regulating locomotive system development and homeostasis. Gordon Conferences -Cartilage Biology & Pathology-. 2011年3月7日. Ventura Beach Marriott (米国).
- ⑧ 浅原弘嗣. システムアプローチによる運動器の発生と疾患の解明. 第33回日

本分子生物学会年会 第83回 日本生化学会大会 合同大会. 2010年12月7日. 神戸ポートアイランド (兵庫県).

- ⑨ 浅原弘嗣. システム研究による運動器の発生メカニズムの解明と医療への応用. 第51回日本組織細胞化学会総会・学術集会. 2010年9月5日. 秋葉原コンベンションホール (東京都).
- ⑩ 浅原弘嗣. システムアプローチによる運動器の発生と疾患の解析. 第19回硬組織再生生物学会学術大会. 2010年9月4日. 就実大学E館 (教育実践センター) (岡山県).
- ⑪ 浅原弘嗣. システムアプローチによる運動器疾患の解明. 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会 (日本プロテオーム学会2010年会) 第6回日本臨床プロテオーム研究会. 2010年7月27日. 東京ベイホテル東急 (千葉県).
- ⑫ Asahara H. A systems approach reveals that the myogenesis genome network is regulated by the transcriptional repressor RP58. 2nd Joint Meeting of the French and Japanese Societies for Developmental Biology. 2010年5月27日. Institut Pasteur (フランス).
- ⑬ 浅原弘嗣. システムアプローチによる運動器発生メカニズムの解明. 第23回日本軟骨代謝学会. 2010年4月3日. 鹿児島県医師会館 (鹿児島県).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅原 弘嗣 (ASAHARA HIROSHI)
独立行政法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・客員研究部長
研究者番号: 70294460

(2) 研究分担者

味八木 茂 (MIYAKI SHIGERU)
独立行政法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・共同研究員
研究者番号: 10392490
(H22→H23: 研究協力者)

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

伊藤 義晃 (ITO YOSHIKI)
独立行政法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・共同研究員
研究者番号: 50111044