

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23249071

研究課題名(和文)筋：腱複合組織発生メカニズムの解明と疾患研究への応用

研究課題名(英文) Analysis of Muscle and Tendon Development and its application to Medicine

研究代表者

浅原 弘嗣 (Asahara, Hiroshi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：70294460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,900,000円、(間接経費) 11,070,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、運動機能に必須の筋・腱複合組織の形成について、筋で発現し、筋発生に重要な転写抑制因子RP58と、腱・靭帯で発現し、腱発生に重要な転写抑制因子Mkxを起点とした研究を行った。Mkxの発現誘導機序を明らかにする為にプロモーター・エンハンサーの同定と発現制御因子の同定を実施し、Mkxの発現誘導に関わる可能性のある3つの転写因子を同定した。またMkxが制御する遺伝子についても同定した。RP58はde novo DNAメチル化酵素であるDNMT3Aに結合することから、DNAメチル化をゲノムワイドに解析し、メチル化変動のある領域を同定した。

研究成果の概要(英文)：The research focused on the formation of muscle-tendon structure complex, which is essential for motor function. RP58, a transcription factor required in the development of muscle and Mkx, essential in normal growth of tendons and ligaments were investigated. In order for to determine the mechanism for Mkx expression, promoter/enhancer region of Mkx was localized and 3 candidate transcription factors were identified. Mkx regulated genes were also investigated and identified. RP58 is known to bind to DNMT3, a de novo DNA methyltransferase, and hence DNA methylation was analyzed genome-wide and regions of methylation activity were identified.

研究分野：整形外科学

科研費の分科・細目：関節病学

キーワード：筋 腱 Mkx RP58

1. 研究開始当初の背景

運動器は四肢の機能を通じて生物をして動物たらしめる重要なシステムであり、その傷害や疾病による損傷は患者に著しい苦痛と日常生活の制限を強いる。小児における先天性の運動器疾患は、生涯にわたって(キャリアオーバー)症状を被る可能性があり、また、外見上の問題から受ける精神的苦痛も測りしれない。また、日本が高齢社会に突入するにあたり、加齢とともに激増する骨粗鬆症、変形性関節症、サルコペニア(筋肉量の減少)など運動器疾患は、“寝たきり”などによる日常生活の低下と2次的な疾病の原因となり、社会的な損失も甚大である。

運動器とは、筋、骨、軟骨といった主要組織が腱・靭帯で強固に結びつくことによって動力機能を得るもので、これまで、筋、骨、軟骨といった組織単体に対する研究は発生・再生の両面から強力に進められてきたが、それら複数組織がいかに一つの機能的な組織を作り上げるかという命題に対して、未だ十分な仮説すら提示されていない。すなわち、再生医療において、iPS細胞や間葉系幹細胞から、筋、軟骨などの単一組織が分化誘導されるようになってきたが、それら組織をどう機能的に構築するか、お互いを強靭に融合させるかといった点については全く不明である。これは、組織構築の中心的な要素となる腱・靭帯の発生・分化メカニズムが長い間不明のままであったことが一因とされるであろう。我々は世界で初めて、腱・靭帯の発生に必須のMkxを含めた運動器発生の遺伝子ネットワークの同定に成功した。これにより、今まで困難であった、腱・靭帯の損傷治療研究や、未だ多くの症例が原因不明の腱の障害を起こすタイプのエーラスダンロス(Ehlers Danlos)症候群、悪性の運動器腫瘍の病因解明に期待がかかる。腱・靭帯の研究は、運動器という複合組織をいかに機能的に再生できるかという、再生医療に新しい局面につながり、これは次世代再生研究における運動器研究のアドバンテージとして、他の組織・臓器の再生医療、疾患治療にも大きく貢献するテーマである。

2. 研究の目的

運動器は、筋と骨・軟骨が腱・靭帯によって正確かつ強靭に結ばれることで機能を発揮する。しかしながら、その発生研究、再生医療は十分に進展していない。

本研究では、我々の構築した発生期における転写因子の発現データベース EMBRY5 を基に、腱、筋発生それぞれに特異的な転写抑制因子MkxとRP58を介した制御機構による腱：筋の発生メカニズムを明らかにすることを目的とした。また、この腱・筋分化メカニズムの破綻による先天性疾患・肉腫の病

態を解析する。以上の研究によって、運動器発生と再生をモデルに分化誘導した細胞の運命安定化と異種細胞群の組織融和—発生機序、その破綻による難治疾患病態を解明する。

3. 研究の方法

腱・靭帯特異的に発現し、腱形成に必須の転写因子であるMkxについて、その発現制御機構を明らかにする為に、遺伝子ライブラリーを用いた細胞ベースのスクリーニングを行った。Mkxの翻訳開始点から上流7kb、下流3kbのゲノム領域をルシフェラーゼ遺伝子の上流、下流にそれぞれ挿入したレポーターベクターを作製し、約6000遺伝子のノンバイアスな発現ベクターライブラリーとコトランスフェクションさせ、ルシフェラーゼの活性を上昇させる遺伝子のスクリーニングを行った。また、ここで使用したゲノム領域を用いてトランスジェニックマウスの作製を行い、in vivoでのプロモーターおよびエンハンサー領域の同定を試みた。さらに、Mkx-Venusノックイン-ノックアウトマウス胚(ヘテロおよびホモマウス胚)のVenus陽性細胞をソーティングして、マイクロアレイ解析を行い、その標的遺伝子のスクリーニングを行った。

さらに筋、腱複合組織がどのようにできていくかを理解する為に、腱特異的転写因子であるScxのCreマウス、および初期筋分化で発現する転写因子Pax3のCreマウスとROSA-LacZレポーターマウスを用いたりニージェマッピングを実施した。

また、筋分化で発現し、筋形成に必須の転写抑制因子であるRP58は、de novo DNAメチル化酵素であるDnmt3aおよびDnmt3bと相互作用することが知られており、筋分化におけるDNAメチル化に関与していることが予想される。そこで、ヒト筋芽細胞の筋分化系を用いたゲノムワイドなDNAメチル化領域について調査した。さらにin vivoでの筋分化でのメチル化の意義を明らかにする為に、Dnmt3aおよびDnmt3bのfloxマウスとMyf5-Creマウスの掛け合わせを行った。

4. 研究成果

本研究では、腱・靭帯特異的遺伝子Mkxのプロモーター領域の同定と、この領域に結合する候補転写因子の同定を行った。Mkx遺伝子のの上流領域を乗せたLacZベクターを用い、トランスジェニックマウスを作成し、染色した。更にMkxの翻訳開始点から上流7kb、下流3kbのゲノム領域をルシフェラーゼ遺伝子の上流、下流にそれぞれ挿入したレポーターベクターと、発現ベクターライブラリーを用いたハイスループットスクリーニングを行った。その結果、6049のexpression vector

の中から、Luciferase 活性を上昇させるものとして3つの候補転写因子を同定した。これら3つの転写因子は、E14.5 Mxk-Venus ノックアウトマウス胚から採取した Venus 陽性細胞で発現が見られ、また免疫染色にて成体アキレス腱で発現していることを確認した。

また、ヘテロおよびホモの E14.5 Mxk-Venus ノックアウトマウス胚から Venus 陽性細胞をソーティングして採取した RNA を用いてマイクロアレイ解析を実施し、その標的遺伝子の同定を試みた。マイクロアレイにより Mxk ノックアウトマウスで発現が上昇している遺伝子を同定し、さらに C3H10T1/2 細胞を用いた Mxk 過剰発現細胞の発現解析などにより、Mxk が軟骨分化に関連するいくつかの遺伝子を抑制している可能性を示唆し、その一部の遺伝子は Mxk の直接のターゲット遺伝子であることをルシフェラーゼアッセイにより示唆した。

また、Mxk のメカニカルストレスとの関連について調査する為に、マウスのアキレス腱より腱細胞を採取し、Mxk ノックアウトマウス、Mxk-Venus ヘテロマウスにおいて Venus 遺伝子の発現を確認し、さらに野生型と Mxk ノックアウトマウスより採取した腱細胞にメカニカルストレスを加えて micro-array を行った。その結果、腱組織特異的遺伝子の発現を確認すると共に、メカニカルストレスの有無により変化する遺伝子をいくつか同定した。さらに、腱前駆細胞の発生に重要であると考えられる腱周囲組織である endotenon, epitenon や paratenon における Mxk の発現について、Mxk-Venus ノックアウトマウスの Venus 発現により解析した。また、Mxk の腱損傷における機能を検討する為に、腱損傷モデルを実施した。アキレス腱を損傷させ、経時的に観察し、免疫染色と quantitative PCR での評価を行った。

また、筋・腱細胞の相互乗り入れが筋・腱複合組織構築に重要であるという仮説のもと、Scx-Cre マウスおよび Pax3-Cre マウスと ROSA-LacZ レポーターマウスとの掛け合わせによるリニエージマッピングを実施した。その結果、Scx 発現細胞が、四肢筋肉において存在は認められず、また Pax3 発現細胞の四肢腱組織での存在も認められなかった。さらに、筋肉筋特異的転写抑制因子 RP58 は、de novo DNA メチル化酵素である Dnmt3a および Dnmt3b と結合することが知られており、RP58 が筋分化において DNA メチル化に関わる可能性がある。そこで筋分化における DNA メチル化の変動をヒト筋芽細胞の分化系を用いてゲノムワイドに調査した。その結果、de novo DNA メチル化が起こる DNA 領域が複数あることを明らかにした。また Dnmt3a および Dnmt3b のコンディショナルノックアウトマウスを、これらの flox マウスと、Mf5-Cre マウスとの掛け合わせにより作製した。その結果、これらコンディショナルノックアウトマウスが出生に異常がないことが分かった。また、筋

再生における RP58 の機能を明らかにする為に、RP58-flox マウスを作製した。

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 8 件)

以下すべて査読あり

1. Takasawa K, Kashimada K, Pelosi E, Takagi M, Morio T, Asahara H, Schlessinger D, Mizutani S, Koopman P. FOXL2 transcriptionally represses Sf1 expression by antagonizing WT1 during ovarian development in mice. *The FASEB Journal* 28 (5) 2014 2020-28 doi:10.1096/fj.13-246108
2. Onizuka N, Ito Y, Inagawa M, Nakahara H, Takada S, Lotz M, Toyama Y, Asahara H. The Mohawk homeobox transcription factor regulates the differentiation of tendons and volar plates. *J Orthop Sci.* Jan;19(1) 2014 172-80. doi: 10.1007/s00776-013-0485-z.
3. Takada S, Sato T, Ito Y, Yamashita S, Kato T, Kawasumi M, Kanai-Azuma M, Igarashi A, Kato T, Tamano M, Asahara H. Targeted gene deletion of miRNAs in mice by TALEN system, *PLOS One.* 8(10):e76004. 2013 doi: 10.1371/journal.pone.0076004.
4. Shimizu H, Kubo A, Uchibe K, Hashimoto M, Yokoyama S, Takada S, Mitsuoka K, Asahara H, The AERO System: a 3D-like Approach for Recording Gene Expression Patterns in the Whole Mouse Embryo, *PLOS One.* 8(10):e75754. 2013 doi: 10.1371/journal.pone.0075754.
5. Yoshitaka T, Kawai A, Miyaki S, Numoto K, Kikuta K, Ozaki T, Lotz M, Asahara H. Analysis of microRNAs expressions in chondrosarcoma. *J Orthop Res.* 31(12): 2013 1992-8. doi: 10.1002/jor.22457
6. Nakahara H, Hasegawa A, Otobe K, Ayabe F, Matsukawa T, Onizuka N, Ito Y, Ozaki T, Lotz MK, Asahara H. Transcription factor mohawk and the pathogenesis of human anterior cruciate ligament degradation. *Arthritis Rheum.* 65(8) 2013 2081-9 doi: 10.1002/art.38020.
7. Watanabe T, Oyama T, Asada M, Harada D, Ito Y, Inagawa M, Suzuki Y, Sugano S, Katsube K, Karsenty G, Komori T,

Kitagawa M, Asahara H. MAML1 enhances the transcriptional activity of Runx2 and plays a role in bone development. PLOS Genetics. 9(1):e1003132. 2013
doi: 10.1371/journal.pgen.1003132.

8. Uchibe K, Shimizu H, Yokoyama S, Kuboki T, Asahara H. Identification of novel transcription-regulating genes expressed during murine molar development. DevDyn. Jul;241(7) 2013 1217-26.doi:10.1002/dvdy.23808.

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅原 弘嗣 (ASAHARA, Hiroshi)
東京医科歯科大学 医歯(薬)学総合研究
科・教授
研究者番号：70294460

(2)研究分担者

高田 修治 (TAKADA, Syuji)
独)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 部長
研究者番号：20382856