

平成21年5月28日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19570205

研究課題名（和文） 腱・靭帯細胞の運命決定と組織化の分子機構

研究課題名（英文） Molecular analysis of tendon and ligament formation

研究代表者

宿南 知佐（SHUKUNAMI CHISA）

京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：60303905

研究成果の概要：

腱・靭帯は組織再生の重要な標的となっているにも関わらず、特異的分子マーカーが欠如していたので、腱・靭帯の形成・組織構築機構の分子・細胞レベルでの解析はこれまでほとんどなされてこなかった。本研究課題では、研究代表者が発見した *Tenomodulin* の発現を指標にして、腱・靭帯の機能や特性の維持に関与するシグナル分子、転写因子の一端を明らかにし、*in vitro* での腱・靭帯細胞誘導の足がかりを構築した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：細胞分化

1. 研究開始当初の背景

1) 腱・靭帯などの強靭結合組織は、血管網に富む皮下や粘膜下の疎性結合組織と異なり、栄養血管が極めて乏しい。従って、外傷などの瞬間的な外力によって、一旦、腱や靭帯が損傷されると、機能的、生体力学的に十分に再生させることは極めて困難である。腱・靭帯の機能障害は、変形性関節症などの発症にも密接に関連しており、運動器の中でも、組織再生の重要な標的となっている。しかしながら、腱・靭帯の形成がどのようなシグナル分子によって制御されているかほと

んど明らかにされていない。また、これまでに、骨髄由来の多能性間葉系細胞を *in vitro* で軟骨、骨、筋肉、脂肪細胞などに分化させる技術は開発されているが、培養系では疎性結合組織由来の繊維芽細胞と形態学的には区別がつかず、指標とする分子マーカーがなかったことから、腱・靭帯細胞の分化誘導システムは確立されていない。

2) 研究代表者が発見した *Tenomodulin* は腱・靭帯などの強靭結合組織に特異的に発現し、発生過程において分化した腱・靭帯細胞の分化の指標となる血管新生抑制因子であ

る。一方、Harvard 大学の C. Tabin らのグループは、basic helix-loop-helix (b-HLH) 型の転写因子である *Scleraxis* が腱・靭帯の初期の分化マーカーであることを報告し、前駆腱細胞を含む Syndetome という体節の4番目のコンポーネントが存在することを提唱した。*Scleraxis* は前駆腱細胞や腱細胞で発現しているが、*Scleraxis* 単独では未分化間葉細胞から腱細胞への分化を誘導することが出来ないことから、腱細胞の分化誘導には別の転写因子が関与していることが強く示唆されている。研究代表者は、ニワトリ胚を用いて *Tenomodulin* の発現パターンを詳細に解析し、腱形成過程では、*Scleraxis* が前駆腱細胞と腱細胞に発現しているのに対して、*Tenomodulin* は分化した腱細胞にのみ発現していることを明らかにした。*in vitro* においては、*Scleraxis* は腱細胞だけでなく軟骨や骨芽細胞などの骨格系の細胞にも発現が検出されるが、*Tenomodulin* は成熟した腱・靭帯細胞においてのみ発現が検出される。このように、*Tenomodulin* の発現は、*in vivo* だけでなく *in vitro* でも高い組織特異性を保持し、腱・靭帯細胞の分化機能の発現に密接に連動している。従って、*Tenomodulin* の遺伝子発現を制御する転写因子群は、腱・靭帯形成過程において重要な役割を果たしていることが予想された。

2. 研究の目的

皮下や粘膜下に存在する疎性結合組織は、血管に富み非常に柔らかく外力の負荷に応じて容易に変形しうる性質を有しているが、腱や靭帯は、膠原線維が規則正しく平行に走行する白色不透明の強靭結合組織（密性結合組織）に分類され、独自の強靭さを保持している。強靭結合組織は、血管網に富む皮下や粘膜下の疎性結合組織と異なり、栄養血管が極めて乏しい。従って、外傷などの瞬間的な外力によって、一旦、腱や靭帯が損傷されると、機能的、生体力学的に十分に再生させることは極めて困難である。腱・靭帯の機能障害は、変形性関節症などの発症にも密接に関連しており、運動器の中でも、組織再生の重要な標的となっている。しかしながら、腱・靭帯の形成がどのようなシグナル分子によって制御されているか、ほとんど明らかにされていない。本研究課題では、腱・靭帯細胞の分化マーカーである *Tenomodulin* の発現を手がかりにして、これまでほとんど明らかにされていない腱・靭帯形成、組織構築に関与する分子ネットワークの実体を明らかにし、それらの知見に基づいて、腱・靭帯細胞分化誘導システムを確立することを目指す。

3. 研究の方法

1) ニワトリ、ラット培養腱細胞を用いた *in vitro* での解析

これまでに腱・靭帯の形成過程で発現することが報告されている転写因子や分泌因子がニワトリ腱細胞の遺伝子発現レベルに及ぼす影響を解析する。また、ラット腱細胞や間葉系由来細胞株を用いて、腱・靭帯特異的発現を制御するマウス遺伝子の promoter/enhancer 領域の解析を行う。ニワトリ腱細胞は、15日目胚の脚の腱組織から、ラット腱細胞は、生後7日目のラットの四肢から酵素消化（トリプシン、コラゲナーゼなど）によって分離培養する。

2) ニワトリ・マウス胚を用いた *in vivo* での解析

ニワトリ前肢芽において転写因子の過剰発現実験を行う。遺伝子は、electroporation によって導入する。また、トランスジェニックマウス胚を用いて、腱・靭帯特異的発現を制御するマウス遺伝子の enhancer 領域の同定を試みる。enhancer 領域の同定には、LacZ reporter を使い、X-gal staining によって、enhancer 活性を検出する。

4. 研究成果

1) *Tenomodulin* の遺伝子発現に影響を及ぼす、細胞増殖・分化因子、転写因子の解析

TGF- β スーパーファミリーの因子である GDF5、GDF6、GDF7 や TGF- β 1、TGF- β 2 をニワトリ腱細胞に添加すると mRNA level が上昇することが明らかになった。b-HLH 型転写因子である *Twist*、*Dermol*、*Paraxis* をニワトリ腱細胞に過剰発現させると、*Scleraxis* と同様に、*Tenomodulin* の mRNA level が上昇した。また、homeobox を有する Mohawk をニワトリ腱細胞に過剰発現させると *Tenomodulin* の mRNA level が上昇するが、Hlx を過剰発現させると低下することが明らかになった。

2) 腱形成過程における Sox9 の役割の解析

軟骨性骨原基で発現する Sox9 をニワトリ腱細胞に異所性に発現させると、*Tenomodulin* の発現は消失し、*Tenomodulin* の関連遺伝子で軟骨の無血管領域に特異的に発現する *Chondromodulin-I* の発現が誘導された。更に、Sox9 のレトロウイルスベクターを electroporation によって前肢芽に導入して前肢で Sox9 を過剰発現させると、筋肉や疎性繊維組織には著明な変化は認められなかったが、軟骨性骨原基に近接した腱が軟骨様組織に変化していることが明らかになった。

3) マウス *Tenomodulin* 遺伝子の promoter 解析

マウス *Tenomodulin* 遺伝子は X 染色体 E3 領域に存在し、13 kb にわたる 7 つの exon から構成されている。CapSite Hunting 法によって、*Tenomodulin* 遺伝子の転写開始点は、翻訳開始点の上流-58 bp と-84 bp に同定され、-115 bp には TATA box が存在していた。転写開始点の下流+84 から上流-1024 bp までの様々な長さの領域を luciferase reporter に導入し、転写活性を測定した。その結果、+84 から-124 bp の領域には、臃細胞、NIH3T3 細胞、ATDC5 細胞いずれの細胞においても転写活性が見られ、細胞特異性を持たない普遍的な promoter が存在すると示唆された。一方、-125 bp より上流を含む断片には、臃細胞でのみ高い活性が見られた。最も高い活性は+84 から-769 bp の領域を用いた時に見られ、それ以上に長い領域を用いると、活性が低下する傾向が見られた。以上の結果から、-125 bp から-769 bp までの領域に臃細胞特異的なエンハンサーが存在し、-770 から-1024 までの領域には、転写活性に対して抑制的な作用をもたらすことが明らかになった。

4) マウス *Tenomodulin* 遺伝子の 臃・靭帯特異的発現制御領域の解析

トランスジェニックマウス胚とラット臃細胞を用いた解析によって、マウス promoter 近傍に、臃・靭帯特異的発現制御を担う領域を同定した。enhancer には 5 つの E-box と Ets 結合領域が含まれていたため、臃・靭帯で発現している b-HLH 型の転写因子 (E12、E47、Twist 1/2、Scleraxis) と Ets 転写因子 (Pea3、Erm) を enhancer の luciferase reporter と共発現させ、転写活性を測定した。その結果、この enhancer には、Twist/E12 が結合して転写活性を正に制御する E-box が存在することが判明した。Twist1/2 は、*Scleraxis* と同様にニワトリ臃細胞で過剰発現させると *Tenomodulin* の mRNA レベルを上昇させることが明らかになっている。

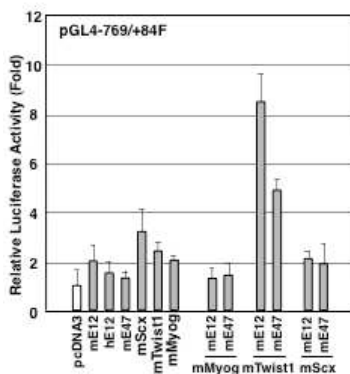


図 1. *Tenomodulin* enhancer に対する bHLH 型転写因子による転写活性化

5) マウス *Tenomodulin* 遺伝子の promoter 近傍に存在する 40 bp enhancer element の解析

2 つの E-box と 1 つの Ets site を含む 40 bp の領域を 7 コピー連結した luciferase reporter と Twist1/2、E12/E47、Pea3 をラット臃細胞に共発現させると相乗的に転写活性が上昇した (図 2)。また、*Tenomodulin* の発現していない NIH3T3 細胞でも、E12 と Twist2 を共発現させると、転写活性が 3.5 倍上昇した (図 3)。

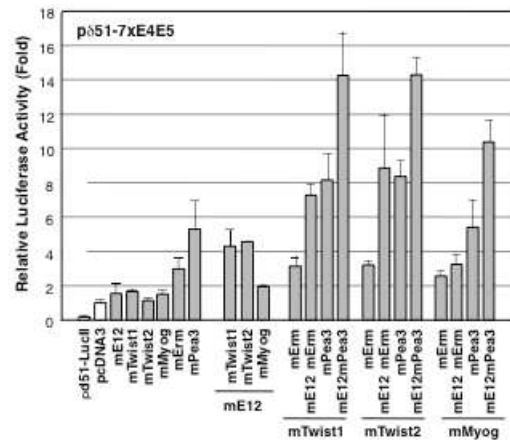


図 2. 臃細胞における Twist/E12、Pea3 による *Tenomodulin* enhancer element の相乗的な転写活性化

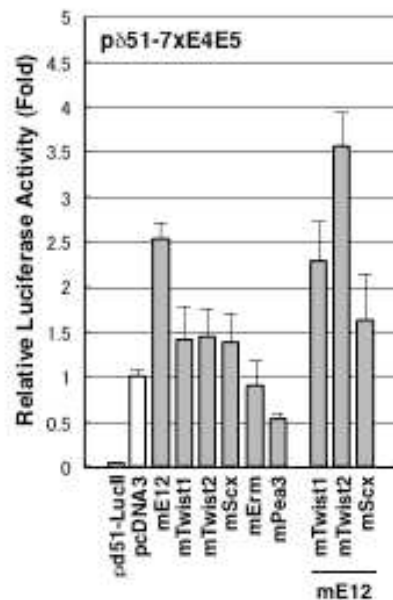


図 3. NIH3T3 細胞における Twist/E12 による *Tenomodulin* enhancer element の転写活性化

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 3件)

- ① N. Kimura, C. Shukunami, D. Hakuno, M. Yoshioka, S. Miura 他, Local tenomodulin absence, angiogenesis, and matrix metalloproteinase activation are associated with the rupture of the chordae tendineae cordis, *Circulation*, 118, 1737-1747, 2008, 査読有り
- ② C. Shukunami, A. Takimoto, S. Miura, Y. Nishizaki, Y. Hiraki, Chondromodulin-I and tenomodulin are differentially expressed in the avascular mesenchyme during mouse and chick development, *Cell Tissue Res.*, 332, 111-122, 2008, 査読有り
- ③ C. Shukunami, Y. Hiraki, *Curr. Chondromodulin-I and tenomodulin: the negative control of angiogenesis in connective tissue*, *Pham. Des*, 13, 2101-2112, 2007, 査読有り

[学会発表] (計 2件)

- ① 宿南 知佐、腱・靭帯に発現する血管新生抑制因子: Tenomodulin (2007年大高賞受賞講演)、第40回日本結合組織学会学術大会・第55回マトリックス研究会大会合同学術集会、2008.5.31、東京
- ② 西崎有利子、*Tenomodulin* 遺伝子の腱・靭帯特異的な転写制御領域の解析、第40回日本結合組織学会学術大会・第55回マトリックス研究会大会合同学術集会、2008.5.30、東京

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称; テノモジュリンを有効成分とする腱断裂性疾患治療剤

発明者; 福田 恵一、開 祐司、 宿南 知佐

権利者; 福田 恵一、開 祐司、 宿南 知佐

種類; 特許願

番号; C1-A0710

出願年月日; 2007年9月28日

国内外の別; 国内

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/te01/cd_gyouseki.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宿南 知佐 (SHUKUNAMI CHISA)

京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号; 60303905

(2) 研究分担者

西崎 有利子 (NISHIZAKI YURIKO)

京都大学・再生医科学研究所・研究員 (学術研究奨励)

研究者番号; 90378901

(3) 連携研究者

なし