

平成30年6月15日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15667

研究課題名(和文) microRNAによる腱・靭帯成熟機構の解明と靭帯特異的分子の探索

研究課題名(英文) The role of microRNA in maturation of tendon /ligament

研究代表者

味八木 茂 (MIYAKI, Shigeru)

広島大学・病院(医)・講師

研究者番号：10392490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、遺伝子発現の制御因子であるmicroRNA(miRNA)の腱・靭帯発生および成熟機構を遺伝子改変マウスの解析を通して明らかにすることを目的とした。マウスのアキレス腱組織および細胞由来のRNAを用いてmiRNAの発現プロファイルを行い、腱で高発現しているmiRNAを把握した。Scleraxis-Cre KI: Dicer floxマウスの解析により腱・靭帯特異的にDicerをノックアウトしたマウスは、腱・靭帯の成熟や修復機構に異常が認められ、これら機構へのmiRNAの関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to examine the role of microRNA (miRNA) in the development and maturation of tendon/ligament using Scleraxis-Cre knock-in:Dicer flox mice. We performed miRNA expression profiling using achilles tendon tissues and Achilles tendon-derived cells. Several miRNAs highly expressed in Achilles tendon. To examine the role of miRNAs in development and maturation of tendon/ligament, we generated Scleraxis-Cre knock-in:Dicer flox mice. Dicer is one of the most important enzyme in miRNA biogenesis. Scleraxis-Cre knock-in:Dicer flox mice showed impaired tendon maturation and healing. Highly expressed miRNAs in tendon were decreased in achilles tendon of these mice. Thus, these data suggest that miRNA play an important role in maturation and healing of tendon/ligament.

研究分野：整形外科学

キーワード：腱 靭帯 microRNA Dicer Scleraxis 発生・成熟 組織修復

1. 研究開始当初の背景

アキレス腱や膝関節の安定性に重要な役割を担っている前十字靭帯 (ACL) をはじめとした腱・靭帯の損傷は、スポーツ競技生命などを脅かすと同時に、その損傷や変性は、膝の不安定性を誘導することから容易に軟骨破壊に至る変形性関節症 (OA) へと発展する。この関節の中心的機能を担う靭帯や腱の機能維持や再生機構を明らかにすることは関節疾患の予防や治療法を開発する上でも重要な要素である。しかし、腱・靭帯についてはこれまで生体力学的研究は盛んに行なわれてきたが、腱・靭帯細胞マーカーとなる分子が同定されていないことから腱や靭帯細胞の性質や間葉系幹細胞から腱や靭帯細胞への分化メカニズムなどの分子生物学的な情報はほとんど明らかになっていない。

申請者らは、ACL 由来細胞よりシグナルシークエンストラップ法を用いて分泌タンパク質に注目してマーカー分子の探索を行ったが同定するには至らなかった (*Materials Sci Eng C*, 2004)。そこで、転写因子約 1600 種類についてマウス胚を用いたホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法により発現パターンを網羅的に解析した (*Dev Cell*, 2009)。その中で、これまでに唯一、腱・靭帯発生に関与することが知られている Scleraxis (Scx) 以外に Mxk という転写因子がマウス発生期において腱・靭帯部位に発現しており、腱の成熟に重要であることを遺伝子改変マウスの解析より明らかにした (*PNAS*, 2010)。

さらに遺伝子発現の新たな制御因子である miRNA にも注目して研究を行っている。miRNA は、組織や疾患特異的な発現様式を示し、様々な生命現象に関与することが明らかになってきた。これまでに申請者は、miR-140 が軟骨分化に伴い発現が増加し、変形性関節症の関節軟骨でその発現が低下していること (*Arthritis Rheum*, 2009) や軟骨特異的遺伝子と同じように転写因子 SOX トリオによってその発現が制御されていることを明らかにした (*JBC*, 2012)。そして、miR-140 の遺伝子改変マウスにより、miR-140 が軟骨発生や OA 発症に関与していることを明らかにした (*Gene Dev*, 2010)。このように、miRNA が軟骨機能維持に重要であることを明らかにしたが、腱・靭帯におけるその役割は全く明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究は、腱・靭帯細胞で高発現している miRNA に注目し、miRNA による腱・靭帯の発生/成熟機構や組織修復機構への役割を明らかにし、靭帯特異的な miRNA や遺伝子を探索することで、新たな腱・靭帯研究の基盤となる成果を得ることを期待する研究である。本研究では、以下の 2 つを目的とする。

- ・miRNA が腱・靭帯発生/成熟および再生機構に関与することを明らかにする
- ・靭帯細胞特異的なマーカー分子の同定

3. 研究の方法

(1) miRNA が腱・靭帯発生/成熟および再生機構に関与するかを明らかにする

① 腱・靭帯特異的 Dicer ノックアウト (KO) マウスの作製

miRNA が靭帯の形成/成熟および組織修復に関与するのかをマウスレベルで明らかにするために、“腱・靭帯で miRNA が発現しないとどうなるか?” について遺伝子改変マウスを用いて解析する。ほぼ全ての miRNA は Dicer という酵素によってプロセッシングされることで成熟した機能性 miRNA になる。すなわち、この Dicer の欠失は多くの miRNA の発現や機能が低下することが示されている。そこで、腱・靭帯特異的に Dicer が KO されたマウスを解析することが重要となる。Scx のプロモーターを利用した Cre マウスと Dicer flox マウスを交配することで腱・靭帯特異的 Dicer KO (Dicer KO) マウスを作製した。

② 腱・靭帯特異的 Dicer KO マウスにおける腱および靭帯の組織学的解析

Dicer KO マウスを用いて腱・靭帯の形成/成熟や機能における miRNA の役割を調べた。形成/成熟期のノックアウトマウスのアキレス腱、膝蓋腱、膝関節より十字靭帯の組織切片を作製し、HE 染色やコラーゲン解析のための Picrosirius Red 染色、免疫染色などによる組織学的解析を行った。また、コラーゲン線維を観察するために、透過型電子顕微鏡による観察を行った。

③ 腱・靭帯特異的 Dicer ノックアウトマウスの腱および靭帯損傷からの再生過程の解析

Dicer KO マウスのアキレス腱切離による損傷を与え、その修復程度を上記 2) のように組織学的解析により miRNA による組織再生への

関与を評価した。

④ 腱・靭帯特異的 Dicer ノックアウトマウスの腱および靭帯の生体力学的解析

上記1-2) および1-3) での Dicer KO マウスの膝蓋腱やアキレス腱、前十字靭帯の生体力学的解析を行う。

(2) 腱・靭帯細胞特異的マーカー分子を同定する

腱・靭帯関連 miRNA の探索

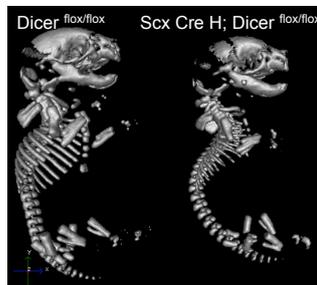
比較対象として軟骨細胞、破骨細胞とアキレス腱組織およびアキレス由来培養腱細胞で発現している miRNA を nCounter 解析システム (nanoString 社) によりプロファイルリングを行った。

4. 研究成果

(1) miRNA が腱・靭帯発生/成熟および再生機構に関与することを明らかにする

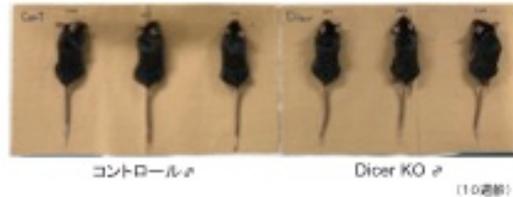
① 腱・靭帯特異的 Dicer ノックアウトマウス tannpakusitu

まず、Scx-Cre 高発現トランスジェニック (Tg) マウス (分担研究者の宿南らによって作製, *Gnesis*, 2013) と交配して得られた ScxCre H Tg:Dicer^{flox/flox} マウスは、生後直後に致死となった。Scx-Cre 低発現 Tg マウスを用いて ScxCre L Tg:Dicer^{flox/flox} マウスを作製したが、同様に生後直後に致死となった。これは、Scx は心臓や肋骨でも発現していることが知られているが、使用した Scx Cre マウスは Tg マウスであるために内在性 Scx の発現量よりも多量に Cre タンパク質が発現してしまったために、より広範囲で Dicer が KO されたことで多くの miRNA の機能が低下した結果、腱・靭帯だけでなく、胸郭の形成不全により死亡に至ったと考えられる (未発表、右図)。



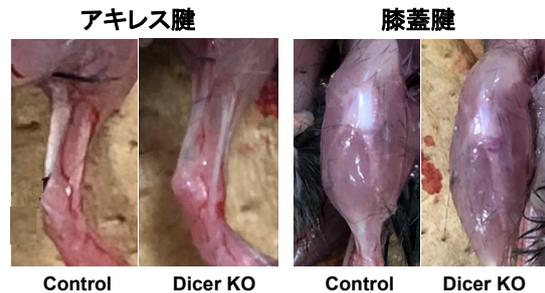
そこで腱・靭帯特異的 Dicer KO マウスを得るために、より内在性の発現制御機構に依存した発現量が期待される Scx-Cre ノックイン (KI) マウス (研究分担者 宿南教授作製 *Sci Rep* 2017) と Dicer-flox マウスを交配

させることで、生後直後に致死とならず、大きな骨格系の異常も認められずに成長するマウスを得ることができた (下図)。このマウスより採取したアキレス腱より RNA を精製し、数種類の miRNA の発現を解析したところ、その発現が減少している miRNA を確認した。



② 腱・靭帯特異的 Dicer ノックアウトマウスにおける腱および靭帯の組織学的解析

Dicer KO マウスのアキレス腱、膝蓋腱、axial ligament は、肉眼的にも組織学的にも明らかに光沢や張りなどがなく、脆弱な腱組織であった (下図)。透過型電子顕微鏡による観察により Dicer KO マウスのアキレス腱のコラーゲン線維は線維径が小さくなり、線維経がばらついていた。



③ 腱・靭帯特異的 Dicer ノックアウトマウスの腱および靭帯損傷からの再生過程の解析

アキレス腱切離による損傷モデルを作製し、Dicer KO マウスにおける修復過程を観察した。コントロールマウスに比べ腱組織の修復にも違いが見られ、癒痕の形成もほとんど認められなかった

(2) 腱・靭帯細胞特異的マーカー分子の同定

腱・靭帯関連 miRNA の探索

nCounter 解析システム (nanoString 社) による miRNA のプロファイルリングの結果、腱組織で発現の高い miRNA を同定した。腱組織で発現の高い miRNA は、Dicer KO マウスのアキレス腱でその発現が低下していた。しかし、全ての miRNA が低下しておらず、Dicer を介

さない miRNA の生成機構が示唆された。

Cre マウスの決定に時間がかかり、Dicer KO マウスの生体力学的な解析を含むさらなる詳細な解析が必要であり。コントロールマウスと Dicer KO マウスのアキレス腱および膝蓋腱より RNA を回収し、Dicer KO のアキレス腱および膝蓋腱で miRNA の発現が顕著に減少している miRNA および遺伝子に注目し、腱でより重要な miRNA や遺伝子の同定を試みる。そして、Dicer KO で観察された表現系がどの miRNA に依存しているのか、またその miRNA が標的としている遺伝子を同定することにより腱・靭帯の特異的な分子の同定にもつながると考えられる。以上のことから今後の腱・靭帯研究の発展に大きく寄与する基盤となる成果が本研究より得られた。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

林 悠太, 味八木 茂, 眞田洋平, 亀井直輔,
石川正和, 中佐智幸, 安達伸生.

MSC 由来エクソソームによるアキレス腱修復
促進効果とエクソソーム表面糖鎖解析の検
証.

第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会.

2017 年 10 月 26-27 日, 宜野湾市.

〔図書〕 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

味八木 茂 (MIYAKI, Shigeru)

広島大学・病院・講師

研究者番号: 1 0 3 9 2 4 9 0

(2) 研究分担者

宿南 知佐 (SHUKUNAMI, Chisa)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・教授

研究者番号: 6 0 3 0 3 9 0 5