

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16706

研究課題名(和文) 腱における運動応答性遺伝子Mohawkによるコラーゲン成熟メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of collagen maturation in tendons regulated by mechanosensitive gene Mohawk

研究代表者

嘉山 智大 (Kayama, Tomohiro)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：80793702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：1：本研究では腱と靭帯の成熟メカニズムを解析した。動物のアキレス腱は運動負荷で電子顕微鏡下でコラーゲン線維の増大を確認しているが、物理的な強度試験では明らかな強度の差を認めなかった。これは腱・骨移行部、そして筋・腱移行部での強度のばらつきが原因と考えられる。

2：前十字靭帯断裂の手術に用いられる移植腱のコラーゲン解析を行い、腱と骨の付着部を促進するチタンウェブを用いることで、組織的に良好な生着を認めた。強固な移植腱の固定を得ることで腱の実質部への物理刺激が伝わり、コラーゲンの成熟が断裂前の腱のコラーゲン成熟パターンにより近くなることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腱・靭帯の損傷や断裂は日常生活やスポーツに支障をきたし、保存療法や手術療法を用いても正常な成熟・修復が困難である。本研究は腱・靭帯の主成分であるコラーゲンの成熟が腱と骨の生着強度に關与することを示した。腱が骨に強固に癒合することで、移植腱に物理刺激が伝わり、腱の成熟に影響することが示唆された。本研究は腱・靭帯の成熟・修復に重要な遺伝子とコラーゲン架橋の關係性を明らかにし、今後の保存療法や手術方法、そしてリハビリテーションの改善に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The research focused on the maturation process of tendons and ligaments. Mechanical stress applied to the animal Achilles tendon has revealed increased collagen thickness. However, this did not directly translate to increased tensile strength. This may be explained by the location of tension experienced by the tendon which have different mechanical properties depending on its function, as demonstrated by the tendon-bone junction and the tendon-muscle junction.

Increased bone-tendon adhesion by the use of a titanium web in anterior cruciate ligament reconstruction, leads to increased strength histologically. Biochemical analysis also confirmed that collagen maturation is improved in these transplanted tendons. Furthermore, the mature collagen cross-links pattern is similar to those of the native tendon. Rigid fixation of the transplanted tendon to bone enables adequate force transmission to the tendon, to promote early maturation.

研究分野：腱・靭帯

キーワード：腱 靭帯 コラーゲン 運動応答 架橋

## 1. 研究開始当初の背景

腱・靭帯における研究はその原因遺伝子が不明であったことから他の筋骨格系組織より解析が遅れていた。腱・靭帯においては発生に重要な Scleraxis (*Scx*) 報告されているが、近年発見された Mohawk (*Mkx*) 遺伝子が発生後期から生後においても発現が継続することから、腱・靭帯の成熟、修復における *Mkx* の機能が注目されている。本申請者は、システム発生・再生医学分野にて *Mkx* の機能解析を行い *Mkx* の分化制御、恒常性の維持、運動応答性について報告してきた。

### ***Mkx* ノックアウトマウスによる遺伝子解析**

*Mkx*<sup>-/-</sup>マウスでは全身の腱の菲薄化と脆弱化が認められ、この原因として腱・靭帯の主な腱構成成分である Ⅰ型コラーゲンをコードする遺伝子 *Col1a1*, *Col1a2* や decorin, fibromodulin (*Fmod*) 等のプロテオグリカンの低下に伴うものであると考えられている。

### ***Mkx* は腱分化を制御する**

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を用いた BMP-12 (EGF7) による腱への分化誘導実験やマウス間葉系幹細胞において *Mkx* の過剰発現により腱細胞様の紡錘形へと形態が変化することが確認された。更に *Col1a1* や Tenomodulin (*Tnmd*) 等の腱関連遺伝子の上昇もみられ、*Mkx* は間葉系幹細胞の腱への分化誘導に重要であることが示された。そして腱細胞には間葉系幹細胞様の分化能を有する細胞集団が存在することが確認されている。我々の作製した *Mkx* ノックアウト由来の腱細胞を用い、骨・軟骨・脂肪の分化誘導実験を行ったところ、*Mkx*<sup>-/-</sup> 腱細胞では野生型由来の細胞よりも骨、軟骨分化が促進されていた。そして *Mkx* を過剰発現させると脂肪分化が抑制された。以上のことから我々は *Mkx* が骨、軟骨、脂肪分化を抑制し、腱分化を促すことを示した。

### **運動応答性遺伝子 *Mkx* と腱の成熟**

生後の腱の成熟にはメカニカルストレスが重要であると考え、*in vivo* と *in vitro* で負荷実験を行った。マウスのトレッドミル運動と腱細胞伸展により *Mkx*, *Col1a1*, *Tnmd*, *Fmod* 等の腱関連遺伝子の上昇を認めた。しかし、過度の運動・伸展負荷においてはこれらのマーカーが低下したため、腱の恒常性の維持には適度なストレスが必要であると考えられた。電子顕微鏡像では野生型マウスでは運動負荷により腱線維径の増大と密度の増加が認められるのに対し *Mkx*<sup>-/-</sup> では運動応答性が認められなかった。そこで本研究の目的は運動による腱線維変化の評価と、メカノトランスダクションの機構を明らかにすることである。

## 2. 研究の目的

腱・靭帯は生体内において強い力学的負荷を受け、その要求に応じた遺伝子と機能を発現する。しかし、これらの組織は血流が乏しく、損傷により瘢痕化や石灰化をきたすことも稀ではない。こうした問題点を解決するためには腱・靭帯の正常な修復過程を分子レベルで明らかにする必要がある。

これまで、本研究者は腱・靭帯特異的遺伝子 *Mkx* が運動応答性遺伝子であり、腱の成熟に重要であることを報告してきた。本研究では腱線維のコラーゲンを評価し、腱の成熟過程を解析する事で腱の正常な成熟・修復を促すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

## トレッドミル運動によるコラーゲン線維径の増加を認めた腱の力学的評価

以前我々が報告した *Mkx*、*Col1a1*、*Fmod* などの腱関連遺伝子が上昇する条件でマウストレッドミル運動を行い、力学試験を行った (Kayama T *et al.* Mol Cell Biol. 2016)。WT と *Mkx*<sup>-/-</sup> マウスを用い、運動後にアキレス腱を急速凍結し、評価する。引っぱり強度試験で野生型、*Mkx* ノックアウトマウスにおいて運動あり・なしのでそれぞれ強度の変化を評価した。

## コラーゲン架橋解析

プロテオグリカンの増加が成熟したコラーゲン架橋の増加につながるか検討した。そして成熟架橋の増加が力学的強度に影響するのかを評価する。コラーゲン架橋分析は当講座で開発された高速液体クロマトグラフィー法(HPLC)で測定した (Saito M *et al.* Osteoporos Int. 2006)。以下を測定し、運動応答によるコラーゲン架橋の変化を評価した：

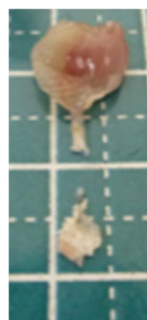
- コラーゲン含有量 (Hydroxyproline)
- 未熟架橋形成 (Lysinonorleucine): DHLNL, HLNL, LNL
- 成熟架橋形成 (Pyridinoline) : PYD, DPD
- 架橋パターン
- コラーゲン成熟指数

ミニプタの前十字靭帯損傷モデルを用いて腱と骨の結合組織の再現を目指した。チタンウェブを用いることで腱・骨付着部の強度を獲得し、移植腱のコラーゲン成熟度を評価した。コントロール移植腱、チタンウェブを用いた移植腱、そして Native な膝蓋腱を比較した。

## 4. 研究成果

### トレッドミル運動による腱の力学的評価の比較

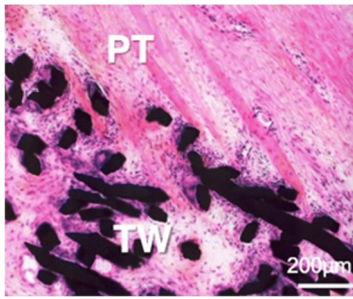
マウスのアキレス腱をトレッドミル運動後採取し、力学試験をアキレス腱が断裂するまで行った。



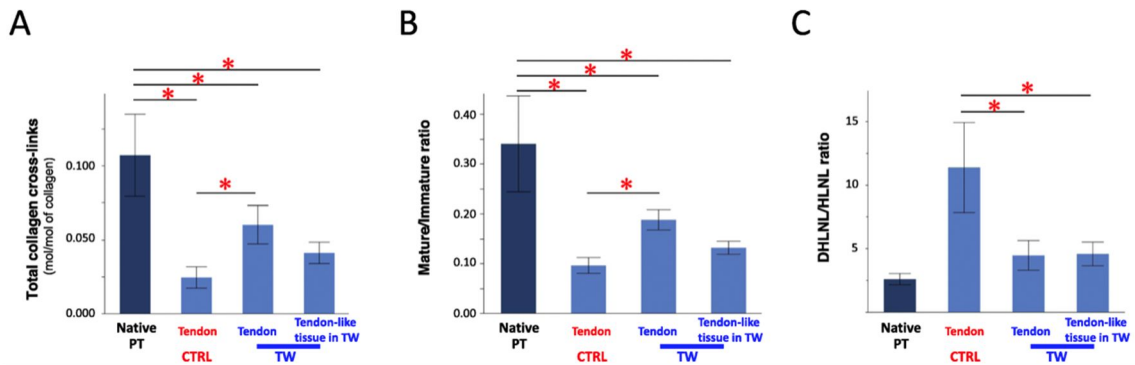
群	検体数	最大荷重 (N)
WT Control	18	5.1 ± 2.3
WT Treadmill	20	5.5 ± 2.7
Mkx <sup>-/-</sup> Control	14	3.0 ± 1.1
Mkx <sup>-/-</sup> Treadmill	16	3.1 ± 1.1

その結果野生型のマウスのアキレス腱は *Mkx* ノックアウトマウスと比較して断裂までの最大荷重量が多かった。コントロール群とトレッドミル群ではトレッドミル群のマウスの方が最大荷重量は大きかったが、統計学的な優位差を認めなかった。図のようにアキレス腱中心部で断裂を認める腱もあったが、筋腱移行部、腱骨移行部での断裂も見られたため、ばらつきが大きくなったものと考えられる。

## コラーゲン架橋解析



ミニブタに移植した移植腱・チタンウェブではチタンウェブ内に腱線維が確認され、良好な生着を示唆している。



移植後 15 週のコラーゲン架橋解析ではチタンウェブ内の腱組織のみならず、チタンウェブ外の腱組織でもコラーゲン架橋の増加と成熟を認めた。これらはチタンウェブを介して骨と良好な癒合を得る事により、腱の実質へのメカニカル刺激が伝達しやすくなったものと考えられる。さらに、コラーゲン解析でも、より正常な腱のコラーゲン成熟パターンに近くなることが確認された。これらのことから移植腱の腱・骨付着部の強化は移植腱実質へのメカニカルシグナルの伝達により成熟を促し、生体内の腱組織に近い組織となることが示唆された。腱・骨の固定強度をあげることで移植腱による損傷靭帯の早期修復に有効な方法であることが示唆された (Ryu K, Kayama T *et al.* BMC Musculoskel Dis. 2020 )

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Maeda Kazuhiro, Chino Hiroyuki, Tokashiki Tadashi, Udaka Jun, Okutsu Yuya, Yukawa Mitsuhito, Mitsuhashi Makoto, Inagaki Naoya, Osumi Hirofumi, Nagamine Yuji, Nishizawa Tetsuro, Kayama Tomohiro, Fukuda Takeshi, Fukuda Kunihiko, Ojiri Hiroya, Marumo Keishi	4. 巻 3
2. 論文標題 A case of carpal tunnel syndrome caused by giant gouty tophi: the usefulness of DECT for the diagnosis, preoperative planning and postoperative evaluation of atypical cases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology Case Reports	6. 最初と最後の頁 165 ~ 171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/24725625.2019.1596547	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 Hayashi Hiroteru, Kurosaka Daisaburo, Saito Mitsuru, Ikeda Ryo, Kubota Daisuke, Kayama Tomohiro, Hyakutake Takashi, Marumo Keishi	4. 巻 14
2. 論文標題 Positioning the femoral bone socket and the tibial bone tunnel using a rectangular retro-dilator in anterior cruciate ligament reconstruction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0215778
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0215778	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 Maeda Kazuhiro, Kobayashi Yasuhiro, Koide Masanori, Uehara Shunsuke, Okamoto Masanori, Ishihara Akihiro, Kayama Tomohiro, Saito Mitsuru, Marumo Keishi	4. 巻 20
2. 論文標題 The Regulation of Bone Metabolism and Disorders by Wnt Signaling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5525 ~ 5525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20225525	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 Ryu Keisho, Saito Mitsuru, Kurosaka Daisaburo, Kitasato Seiichiro, Omori Toshiyuki, Hayashi Hiroteru, Kayama Tomohiro, Marumo Keishi	4. 巻 21
2. 論文標題 Enhancement of tendon-bone interface healing and graft maturation with cylindrical titanium-web (TW) in a miniature swine anterior cruciate ligament reconstruction model: histological and collagen-based analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Musculoskeletal Disorders	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) 10.1186/s12891-020-03199-0	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 Kijima Eiji, Kayama Tomohiro, Saito Mitsuru, Kurosaka Daisaburo, Ikeda Ryo, Hayashi Hiroteru, Kubota Daisuke, Hyakutake Takashi, Marumo Keishi	4. 巻 21
2. 論文標題 Pre-operative hemoglobin level and use of sedative-hypnotics are independent risk factors for post-operative delirium following total knee arthroplasty	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Musculoskeletal Disorders	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) 10.1186/s12891-020-03206-4	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 林大輝、黒坂大三郎、斎藤充、池田亮、窪田大輔、嘉山智大、百武剛志、丸毛啓史	4. 巻 45
2. 論文標題 低侵襲な骨付き膝蓋腱採取法を応用した長方形骨孔の膝前十字靭帯再建術の小経験	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 100 - 101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 窪田大輔、林大輝、斎藤充、黒坂大三郎、池田亮、嘉山智大、百武剛志、丸毛啓史	4. 巻 45
2. 論文標題 長方形引き型ガイドに夜膝前十字靭帯再建術の術後成績	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 112-113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Koda Naoki, Sato Tempei, Shinohara Masahiro, Ichinose Shizuko, Ito Yoshiaki, Nakamichi Ryo, Kayama Tomohiro, Kataoka Kensuke, Suzuki Hidetsugu, Moriyama Keiji, Asahara Hiroshi	4. 巻 144
2. 論文標題 The transcription factor mohawk homeobox regulates homeostasis of the periodontal ligament	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 313 ~ 320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.135798	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

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 嘉山智大, 森雅樹, 中道亮, 鈴木英嗣, 浅原弘嗣, 斎藤充, 丸毛啓史
2. 発表標題 In vitroとIn vivoでの伸展刺激・運動刺激による腱・靭帯のメカノセンシング機構解析
3. 学会等名 日本生体電気・物理刺激研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 嘉山智大, 森雅樹, 中道亮, 鈴木英嗣, 浅原弘嗣, 斎藤充, 丸毛啓史
2. 発表標題 The role of tendon/ligament-specific transcription factor Mohawk in tendon development, maturation and homeostasis
3. 学会等名 The 41st Annual meeting of the Royal College of Orthopaedic Surgeons of Thailand (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林大輝, 黒坂大三郎, 斎藤充, 池田亮, 窪田大輔, 嘉山智大, 百武剛志, 丸毛啓史
2. 発表標題 低侵襲な骨つき膝蓋腱反射採取法を応用した長方形骨孔の膝前十字靭帯再建術の小経験
3. 学会等名 日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 窪田大輔, 林大輝, 斎藤充, 黒坂大三郎, 池田亮, 嘉山智大, 百武剛志, 丸毛啓史
2. 発表標題 長方形引き型ダイレーターに夜膝前十字靭帯再再建術の術後成績
3. 学会等名 日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会雑誌
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiro Kayama, Masaki Mori, Yoshiaki Ito, Ryo Nakamichi, Hidetsugu Suzuki, Takahide Matsushima, Shizuko Ichinose, Mitsuru Saito, Keishi Marumo, Hiroshi Asahara
2. 発表標題 Mechanoregulatory transcriptional network converges to tendon/ligament-specific Mohawk (Mkx) gene for collagen fiber maturation
3. 学会等名 第90回 日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 嘉山智大、森雅樹、伊藤義晃、中道亮、鈴木英嗣、幸田直己、齋藤充、丸毛啓史、浅原弘嗣
2. 発表標題 腱・靭帯特異的遺伝子Mohawk(MKX)を介した腱細胞の成熟メカニズム
3. 学会等名 第32回 日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2017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