

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02966

研究課題名（和文）硬組織の連結を司る細胞群の蛍光イメージングと分子生物学的特性の解明

研究課題名（英文）Fluorescent imaging and analysis of molecular biological properties of the cells that contribute to the integration of the skeletal components

研究代表者

宿南 知佐（Shukunami, Chisa）

広島大学・医系科学研究科（歯）・教授

研究者番号：60303905

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、硬組織の連結に寄与するScx陽性細胞やScx/Sox9陽性細胞の頭蓋顎顔面形成プロセスにおける時間的・空間的局在変化を、ScxTomato;Sox9GFPマウス胚を用いて解析した。また、ScxGFP Tgマウス胚由来の線維芽細胞から樹立したScxGFP iPS細胞を用いて、in vivoの腱・靭帯分化過程を忠実に反映する分化誘導系を構築し、single cell RNA-seqを行った。そのデータセットとScx欠失マウスでのトランスクリプトームの結果から、腱・靭帯細胞分化過程でScxと関連して機能する遺伝子群を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腱・靭帯は、硬組織と筋肉の連結の要となる組織である。とりわけ、硬組織と腱・靭帯の接合部は、運動機能を円滑に維持するために重要な部位である。本研究では、この接合部の形成に寄与する細胞集団の発生過程におけるダイナミックな局在変化を明らかにし、分子レベルで、その特性を解析した。これらの知見は、超高齢社会における我が国において、「寝たきりによる要介護状態」や「加齢」に伴う関節拘縮や筋萎縮等を予防・改善する治療法の確立に向けた基盤技術につながることで期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, taking advantage of ScxTomato;Sox9GFP mouse embryos, we analyzed the temporal and spatial localization changes of Scx-positive cells and Scx/Sox9-positive cells that contribute to the integration of skeletal components in the process of craniomaxillofacial formation. Using ScxGFP iPS cells established from fibroblasts derived from ScxGFP Tg mouse embryos, we developed the tenogenic and ligamentogenic differentiation system that faithfully reflects the in vivo process, and performed single cell RNA-seq. Dataset of scRNA-seq and transcriptome of Scx deficient tendon enabled identification of Scx-related genes in which tendon-related genes are enriched.

研究分野：分子生物がk

キーワード：腱 靭帯 細胞分化 幹細胞 Scleraxis Sox9

1. 研究開始当初の背景

腱は骨格筋の収縮力を硬組織に伝達し、靭帯は硬組織間を連結し関節を安定化することによって、身体の支持と運動機能の発現に不可欠の役割を果たしている。成熟した腱・靭帯細胞では、II型膜貫通型蛋白質である **Tenomodulin (Tnmd)** や **basic helix-loop-helix** 型転写因子である **Scx** のような特異的分子マーカーを発現している。**Tnmd** や腱・靭帯の主要な細胞外基質である **Col1** の遺伝子は、**Scx** によって遺伝子発現が転写レベルで制御されている。欠失マウスでの解析から、**Scx** は腱・靭帯や **Enthesis** の成熟に必須の遺伝子であることが明らかになっている。発生過程では、**Scx⁺** の細胞集団の中に、軟骨形成において必須の転写因子である **Sox9** を共発現する **Scx⁺/Sox9⁺** 細胞が存在し、これらの細胞が腱・靭帯付着部の形成に寄与している。**Scx⁺/Sox9⁺** 細胞は、頭蓋顎顔面でも、硬組織エレメント連結過程の様々な局面で出現し、**Scx⁺** 細胞や **Sox9⁺** 細胞と共に、近年、ますます、その重要性がクローズアップされている。実際、頭蓋顎顔面領域では、**Scx⁺** 細胞や **Scx⁺/Sox9⁺** 細胞は、腱・靭帯と腱・靭帯付着部だけでなく、顎関節の関節円板、歯周靭帯、セメント芽細胞、象牙芽細胞、縫合部などで観察されるが、その機能的役割や **Scx** が制御する分子の詳細については、ほとんど、明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、硬組織の連結に寄与する主要な細胞集団である **Scx⁺** 細胞や **Scx⁺/Sox9⁺** 細胞の頭蓋顎顔面形成プロセスにおける時間的・空間的局在変化と分子生物学的特性、それらの細胞で制御されている分子ネットワークの実体がどのようなものであるかということ、オリジナルに作製した遺伝子改変動物を用いて、明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

(1) 蛍光イメージングによる硬組織を連結に寄与する細胞集団の可視化

ScxTomato;Sox9GFP マウス胚を透明化し、蛍光実体顕微鏡、共焦点顕微鏡、多光子励起顕微鏡を駆使した蛍光イメージングによって、**Scx⁺** 細胞(赤色)、**Scx⁺/Sox9⁺** 細胞(黄色)、**Sox9⁺** 細胞(緑色)が複雑でダイナミックな頭蓋顎顔面形成のプロセスで、時空間的にどのように局在するかを三次元的に可視化する。並行して、組織切片による二次元的解析も行う。特に、顎関節、縫合部、**Enthesis** の形成プロセスに着目して解析を進める。

(2) 硬組織を連結する細胞群の分子生物学的特性の解明

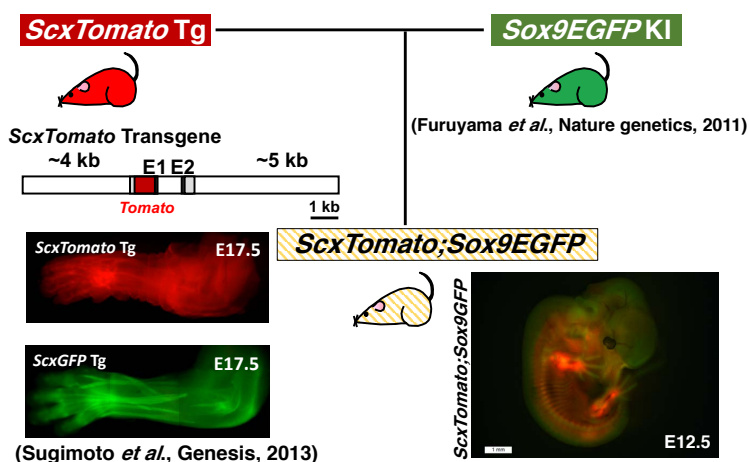
ScxTomato;Sox9GFP マウス胚から **Scx⁺** 細胞(赤色)、**Scx⁺/Sox9⁺** 細胞(黄色)、**Sox9⁺** 細胞(緑)をセルソーターによって分離する。また、**ScxGFP Transgenic (Tg)** マウスから樹立した iPS 細胞を用いて、腱・靭帯分化誘導系を確立し、分化過程における遺伝子発現プロファイルを明らかにする。**Scx** 欠失マウスと野生型マウスの腱の遺伝子発現プロファイルを **RNA Seq** によって解析し、**Scx** 欠失によって発現が有為に変動する遺伝子群を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 蛍光イメージングによる硬組織を連結に寄与する細胞集団の可視化

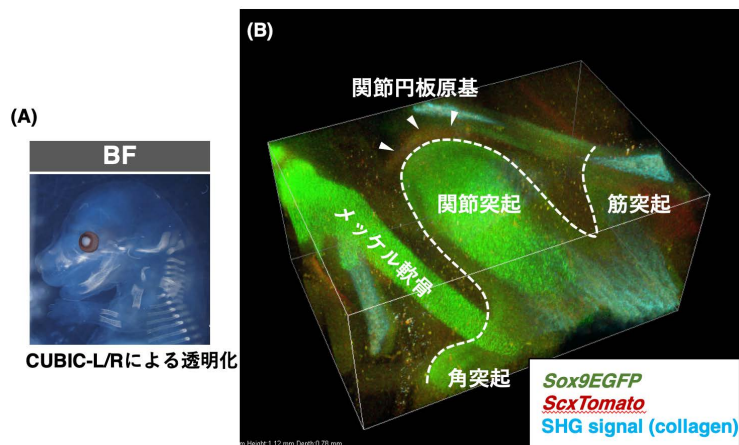
腱・靭帯とそれらの付着部で赤色蛍光蛋白質を発現する **ScxTomato Tg** マウスと軟骨形成に必須の転写因子である **Sox9** の発現領域で緑色蛍光蛋白質を発現する **Sox9GFP** ノックイン(KI)マウスを交配し、硬組織連結過程を可視化することの出来る **ScxTomato;Sox9GFP** マウス胚を得た(図1)。**ScxTomato;Sox9GFP** マウス胚を4%パラフォル

図1. **ScxTomato;Sox9GFP** マウス胚における **Scx⁺**, **Scx⁺/Sox9⁺**, **Sox9⁺** 細胞の局在



ムアルデヒドにて1時間あるいは Overnight で固定後、深部構造を観察するために、60% 2,2'-チオジエタノール(TDE)によって透明化して、胎生11.5日と14.5日の *ScxTomato;Sox9GFP* マウス胚の前肢、椎骨形成領域、耳小骨・下顎形成領域を多光子励起顕微鏡によって観察したが、良好な画像を得られなかったため、透明化試薬を CUBIC-L/R に変更した。図2に示すように、

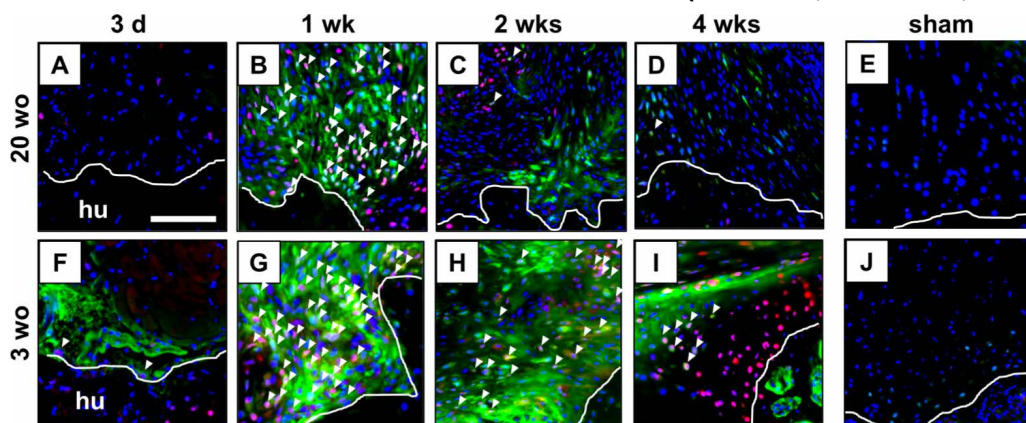
図2. 透明化した *Sox9EGFP;ScxTomato* の E16.5 マウス胚の顎関節



E16.5 マウス胚において、関節突起、筋突起、メッセル軟骨、関節円板原基の可視化に成功した。同時に、Second Harmonic Generation (SHG) イメージングによるコラーゲン形成過程の可視化を行った。これらの解析は、先端バイオイメージング支援プラットフォーム(ABiS)の支援を受けて行った。また、凍結切片を用いた解析によって、*Scx*⁺細胞(赤色)、*Scx*⁺/*Sox9*⁺細胞(黄色)、*Sox9*⁺細胞(緑)の局在を明らかにしている。マウスの肩腱板では、*Scx*⁺/*Sox9*⁺細胞が、修復過程で出現することも明らかになっている(図3)。

図3. 腱修復過程における *Scx*⁺/*Sox9*⁺細胞

(Ideo et al., PLOS One, 2021)



(2) 硬組織を連結する細胞群の分子生物学的特性の解明

胎生13.5日の野生型、*ScxTomato;Sox9GFP* マウス胚、*ScxTomato Tg* マウス胚、*Sox9GFP KI* マウス胚から、トリプシン・EDTAを用いて、線維芽細胞を分離した。セルソーター(SH800S)を用いて、*Scx*⁺細胞(赤色)、*Scx*⁺/*Sox9*⁺細胞(黄色)、*Sox9*⁺細胞(緑)を分離し、それぞれの細胞の特性を解析した。一方、*ScxGFP Tg* マウスの腱組織では、*Scx*の発現領域でGFPが高いレベルで検出されるが、腱細胞が、組織から outgrowth すると発現が著明に低下することを見出している(図4)。そこで、*in vitro*においても *Scx* を高いレベルで発現する腱細胞の分化誘導系を確立するために、*ScxGFP iPS* 細胞を樹立した。図5に示すように、*ScxGFP Tg* マウス胚から線維芽細胞を分離し、センダイウイルスを用いて、*Sox2*、*Oct3/4*、*L-MYC*、*KLF4* を発現させて、*ScxGFP iPS* 細胞を樹立した。樹立された *ScxGFP iPS* 細胞は、*Oct4* や *Nanog* などの多能性マーカーを発現し、transgene を有していた。

図4. *ScxGFP Tg* の尾部腱と腱細胞

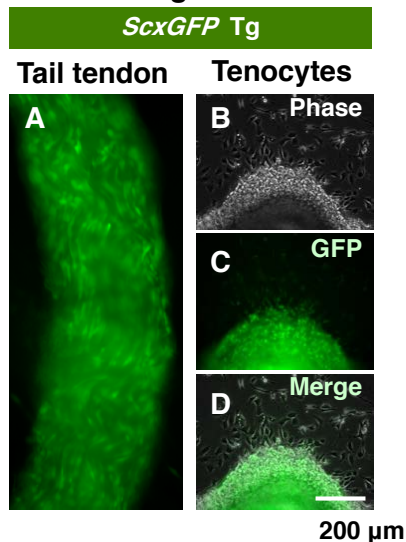


図5. *ScxGFP* iPS細胞の樹立と分化誘導系の確立

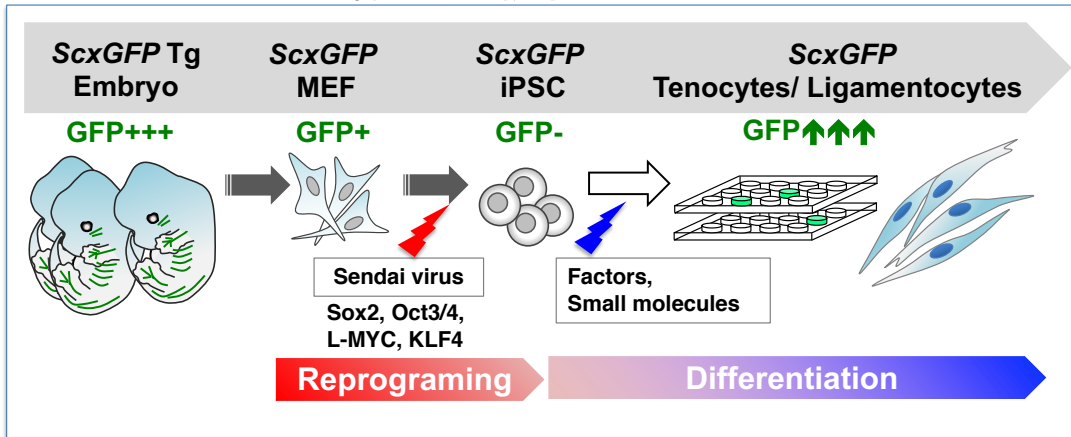
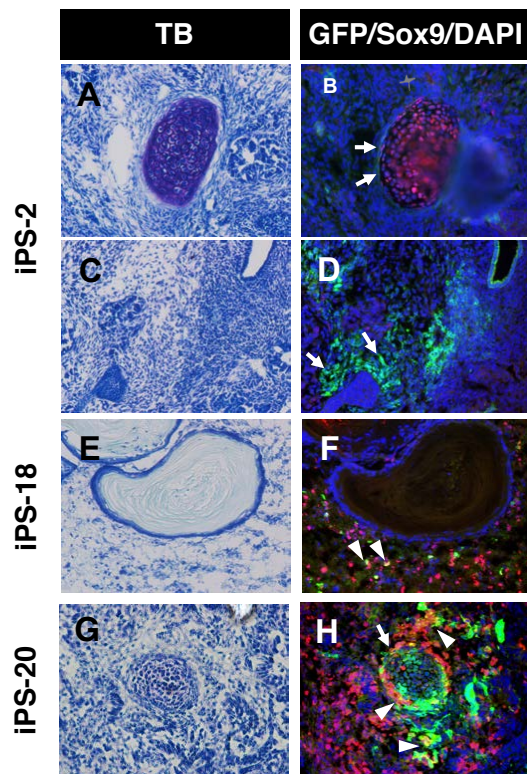


図6. *ScxGFP* iPS細胞由来の奇形腫

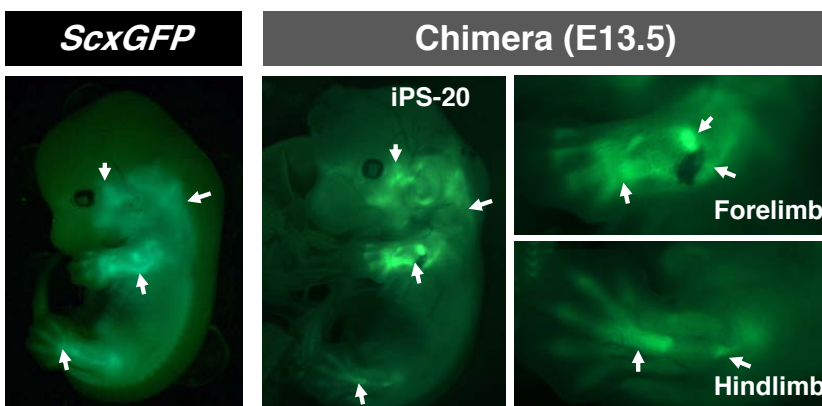


ScxGFP iPS 細胞から形成された胚様体と奇形腫では、三胚葉に由来する組織が観察された。図 6 に示すように、*ScxGFP* iPS 細胞由来の奇形腫では、トルイジンブルー(TB)でメタクロマジーが観察される軟骨様組織の近傍にある線維組織(矢印)に、GFP 陽性細胞が局在していた。これらが、腱・靭帯様組織であるかどうか、明確ではなかったため、更に、*ScxGFP* iPS 細胞を用いて、キメラマウスを作製した。その結果、図 7 に示すように、*ScxGFP* iPS 細胞は、キメラマウスの、腱・靭帯組織の形成に寄与していることが明らかになった。

樹立された *ScxGFP* iPS 細胞を用いて、GFP の発現を指標にして腱・靭帯細胞へ分化する培養条件を探索した。未分化 *ScxGFP* iPS 細胞を、インスリン存在下で Cyclopamine と CHIR を添加した培地で培養し、間葉系前駆細胞へ分化誘導した。さらに Transforming growth factor (TGF)- β 2 を添加すると、GFP を発現する *Scx*⁺細胞が多数出現し、これらの細胞は、*Tnmd*、*Mohawk*、*Col1a1* を培養腱細胞より高いレベルで発現していた。また、*Scx*⁺細胞の多くは *Sox9* を発現する *Scx*⁺/*Sox9*⁺細胞であることから、腱・靭帯細胞のみならず軟骨細胞への分化能を

有することが明らかになった。興味深いことに、TGF- β 2 の非添加群では軟骨細胞への分化が観察されたが、TGF- β 2 を添加すると濃度依存的に軟骨細胞への分化は抑制されて、腱・靭帯細胞への分化が促進された。また TGF- β 2 の阻害剤である SB431542 を併せて添加した場合、腱・靭帯細胞への分化は完全

図7. *ScxGFP* iPS細胞の腱・靭帯形成への寄与

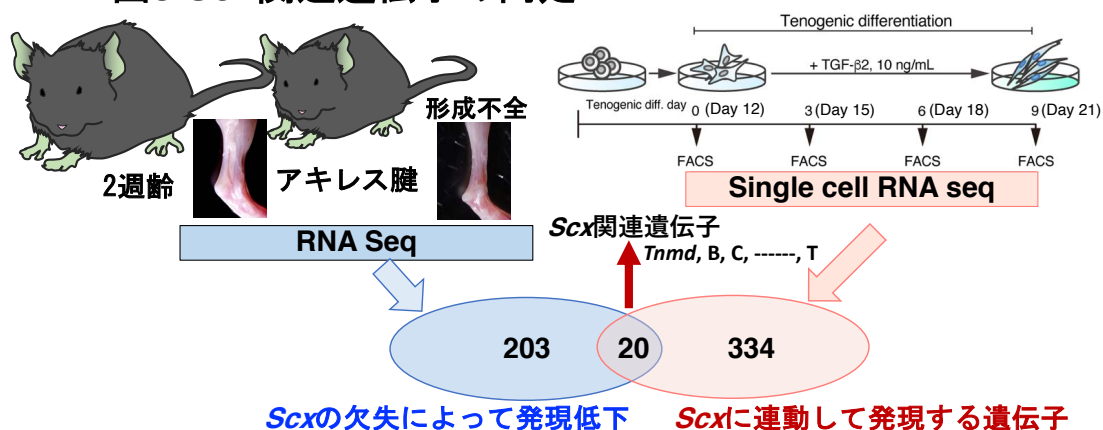


なりました。

に阻害され、軟骨細胞の分化が回復した。これらの結果から、TGF-β2によって腱・靭帯細胞分化と軟骨細胞分化は相反的に制御されており、分化の振り分けに TGF-β2 が関与していることが明らかとなった。

腱・靭帯細胞分化誘導直前の細胞および分化誘導 3、6、9 日目の細胞を単層培養状態からコラゲナーゼ/トリプシン処理で解離させた。ヘキストによって核を標識し、さらに死細胞を除去するために SYTOX によって標識し、生細胞のみを FACS によって細胞溶解液を含む 384 ウェルプレートへ各ウェルに 1 細胞ずつ分離した。各ステージ 3 プレートへ分離し、4608 細胞分のライブラリーを作成してシーケンスを行った。このうち、3 細胞以上で発現している遺伝子を 200 以上発現している 4592 細胞を、マーカー遺伝子の発現によって 11 のクラスターに分離した。シングルセルレベルでの解析によって、*Scx*⁺、*Scx*⁺/*Tnmd*⁺、*Tnmd*⁺細胞が分化成熟に伴って出現し、確立した分化誘導系が *in vivo* の組織形成における腱・靭帯細胞分化の過程を忠実に反映していることが明らかになった。さらに、2 週齢の *Scx* 欠失マウスと野生型マウスのアキレス腱の RNA Seq 解析を行って得られた結果とシングルセル RNA Seq の結果に基づいて、腱・靭帯細胞分化過程で *Scx* と関連して発現する *Tnmd* を含む遺伝子群を 20 遺伝子同定した(図 8)。

図8. *Scx*関連遺伝子の同定



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kawatsu M, Takeshita N, Takimoto A, Yoshimoto Y, Seiryu M, Ito A, Kimura S, Kawamoto T, Hiraki Y, Shukunami C, Takano-Yamamoto T	4. 巻 149
2. 論文標題 Scleraxis upregulated by transforming growth factor- 1 signaling inhibits tension-induced osteoblast differentiation of periodontal ligament cells via ephrin A2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2021.115969	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 -
1. 著者名 Ideo K, Tokunaga T, Shukunami C, Takimoto A, Yoshimoto Y, Yonemitsu R, Karasugi T, Mizuta H, Hiraki Y, Miyamoto T	4. 巻 15
2. 論文標題 Role of Scx+/Sox9+ cells as potential progenitor cells for postnatal supraspinatus enthesis formation and healing after injury in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0242286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0242286	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 -
1. 著者名 Lin D, Alberton P, Delgado Caceres M, Prein C, Clausen-Schaumann H, Dong J, Aszodi A, Shukunami C, Iatridis JC, Docheva D.	4. 巻 19
2. 論文標題 Loss of tenomodulin expression is a risk factor for age-related intervertebral disc degeneration.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aging Cell	6. 最初と最後の頁 e13091
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ace1.13091.	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 Kuriki M, Sato F, Arai HN, Sogabe M, Kaneko M, Kiyonari H, Kawakami K, Yoshimoto Y, Shukunami C, Sehara-Fujisawa A.	4. 巻 147
2. 論文標題 Transient and lineage-restricted requirement of Ebf3 for sternum ossification.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.186239.	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 三浦 重徳、宿南 知佐	4. 巻 63
2. 論文標題 腱・靭帯研究のフロンティア(11)「椎間板の形成と恒常性の維持」	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 整形・災害外科	6. 最初と最後の頁 1685-1689
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 西崎有利子, 宿南知佐	4. 巻 63
2. 論文標題 腱・靭帯研究のフロンティア(5)「腱・靭帯の特異的分子マーカー」	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 整形・災害外科	6. 最初と最後の頁 833-838
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 宿南 知佐	4. 巻 63
2. 論文標題 腱・靭帯研究のフロンティア 「腱・靭帯研究のあゆみ」	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 整形・災害外科	6. 最初と最後の頁 83-88
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 Arai HN, Sato F, Yamamoto T, Woltjen K, Kiyonari H, Yoshimoto Y, Shukunami C, Akiyama H, Kist R, Sehara-Fujisawa A.	4. 巻 29
2. 論文標題 Metalloprotease-Dependent Attenuation of BMP Signaling Restricts Cardiac Neural Crest Cell Fate.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.09.019.	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 吉本 由紀、宿南 知佐	4. 巻 33
2. 論文標題 Scxを中心とした腱・靭帯・歯周靭帯の機能制御	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Bone	6. 最初と最後の頁 99-104
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 Aki Takimoto, Chikara Kokubu, Hitomi Watanabe, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Gen Kondoh, Yuji Hiraki, Chisa Shukunami	4. 巻 9
2. 論文標題 Differential transactivation of the upstream aggrecan enhancer regulated by PAX1/9 depends on SOX9-driven transactivation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40810-4.	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 -

〔学会発表〕 計11件(うち招待講演 6件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宿南知佐
2. 発表標題 筋骨格システムのコンポーネントにおけるScxとSox9の機能的役割
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宿南 知佐
2. 発表標題 Establishment of an in vitro culture system for tenogenic/ligamentogenic differentiation using ScxGFP iPS cells
3. 学会等名 第68回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉本由紀, 黒澤珠希, 周赫英, 上住円, 外丸祐介, 宿南知佐, 上住聡芳
2. 発表標題 ScxGFP iPS細胞を用いたin vitro腱・靭帯細胞分化誘導システムの確立
3. 学会等名 第6回日本筋学学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宿南 知佐
2. 発表標題 筋骨格システムを統合する腱の形成と成熟プロセス
3. 学会等名 日本筋学会 第5回学会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宿南 知佐
2. 発表標題 ScxGFP iPS細胞を用いた腱・靭帯分化誘導系の構築
3. 学会等名 第20回運動器科学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉本 由紀, 藤田 和将, 宿南 知佐
2. 発表標題 ScxGFP iPS細胞を用いたin vitro分化誘導系の構築と腱・靭帯・軟骨細胞の分化制御の解析
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田 和将、吉本 由紀、秋山 治彦、今村 健志、宿南 知佐
2. 発表標題 硬組織連結に寄与するScx+/Sox9+細胞の蛍光イメージング
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉本 由紀、藤田 和将、山家 新勢、外丸 祐介、宿南 知佐
2. 発表標題 ScxGFP iPS細胞の樹立と腱・靭帯分化誘導系の確立
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宿南 知佐
2. 発表標題 腱・靭帯研究の現状と展望
3. 学会等名 日本骨代謝学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宿南 知佐
2. 発表標題 ScleraxisとOsterixによる歯周靭帯と歯槽骨のリモデリング制御
3. 学会等名 歯科基礎医学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宿南 知佐
2. 発表標題 腱・靭帯研究のためのインビボシステムの構築
3. 学会等名 運動器科学研究会
4. 発表年 2018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
研究分担者	谷本 幸太郎 (Tanimoto Koutarou) (20322240)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授 (15401)	
研究分担者	三浦 重徳 (Shigenori Miura) (70511244)	東京大学・生産技術研究所・特任講師 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------