

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17180

研究課題名(和文) 頭頸部骨化の鍵となる膜性骨が関与する「筋・腱・骨複合体」の組織構築機序の解明

研究課題名(英文) Developmental mechanism of muscle-tendon-bone complex in which membranous bone is involved

研究代表者

山本 将仁 (Masahito, Yamamoto)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：90733767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：運動器を構成する筋・腱・骨の形態形成をコントロールする共通因子はこれまで明らかにされてこなかった。そこで既知の転写因子であるSox9(SRY-box9)に着目し、頭部の運動器に焦点を当て、Sox9が筋・腱・軟骨の形成を統括するメカニズムの解明を試みた。in vivoならびにin vitroの実験から、筋においてSox9は筋芽細胞の時期にのみ発現することが明らかになった。一方、腱や軟骨の前駆細胞においてもSox9は発現するが、分化が進むと腱領域からは消失し、軟骨細胞にのみ発現が持続した。したがって、筋・腱・軟骨はSox9の発現を切り替えることで、運動器を形成していくことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ロコモティブシンドロームは運動器のコンポーネントである筋、腱、骨の複合疾患であり、多くの人を悩ませるこの疾患の新規治療法の開発が急がれる。本研究では、運動器の各コンポーネントの発生をSox9が統括することを明らかにした。本申請研究は、筋・腱・骨疾患を同時に治癒へ導く、新規治療法の創出につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：The musculoskeletal system, which comprises muscles, tendons, and bones, is an efficient tissue complex that coordinates body movement and maintains structural stability. The process of its construction into a single functional and complex organization is unclear. SRY-box containing gene 9 (Sox9) is expressed initially in pluripotent cells and subsequently in ectodermal, endodermal, and mesodermal derivatives. This study investigated how Sox9 controls the development of each component of the musculoskeletal system. Sox9 was expressed in MTJ, tendon, and bone progenitor cells at E13 and in bone at E16. We detected Sox9 expression in muscle progenitor cells using double-transgenic mice and myoblastic cell lines. However, we found no Sox9 expression in developed muscle. These results showed that switching on Sox9 expression in each component (muscle, tendon, and bone) is essential for the development of the musculoskeletal system.

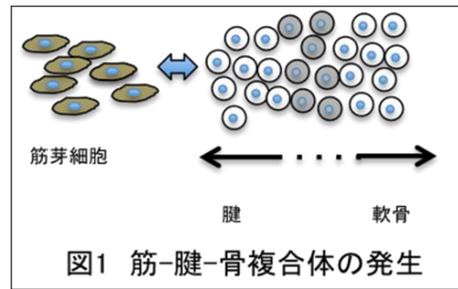
研究分野：解剖学

キーワード：運動器 Sox9 発生

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域において舌や口腔底部、下顎周囲の腫瘍により下顎骨を切除した症例は、下顎の対称性が失われ、機能時にきわめて不安定な運動様相を呈する。現在、切除された下顎骨はチタンプレートと自家骨移植の併用などにより再建手術が行なわれているが、切離した筋と骨の再付着ができず、咀嚼・嚥下障害、構音異常などの術後合併症に悩む患者が後を絶たない。この問題を解決するために、筋付着部の再生に向けた『筋-腱-骨複合体』すなわち運動器の発生・組織構築メカニズムの基礎研究を進める必要がある(図1)。



2. 研究の目的

運動器は主に筋・腱・骨で構成され、それぞれが協調することで身体活動を担う。しかし、各コンポーネントは異なる組織として研究が進められてきたため、筋・腱・骨の形態形成をコントロールする共通因子は明らかにされていない。既知の転写因子である Sox9(SRY-box9)は間葉系幹細胞に発現し、腱や軟骨細胞の分化に不可欠であるが、運動器の動力を生み出す筋細胞での Sox9 の役割は明らかにされていない。そこで本申請研究では頭部の運動器に焦点を当て、筋形成における Sox9 の役割を実証し、Sox9 が運動器発生をコントロールする機序の検索を行った。

3. 研究の方法

試料として C57BL6J, *Wnt1^{Cre}*(129S4.Cg-E2f1Tg(Wnt1-cre)2Sor/J), *Sox9^{flox/flox}*(B6.129S7Sox9tm2Crm/J), *Sox9^{preER}*(STOCKTg(Sox9cre/ERT2)1Msan/J), *R26tdTomato*(B6;129S6-Gt(ROSA)26Sortm14(CAG-tdTomato)Hze/J) マウスを用いた。各種マウスを用いて、組織学的な解析を行った。また、筋芽細胞株である C2C12 を筋へ分化誘導後に、各細胞の Sox9 の局在について調査した。

4. 研究成果

(1) 腱と骨領域における Sox9 の発現

胎生 13.5 日齢において、筋、腱、骨の領域を明示するために Desmin ならびに Sox9 の免疫組織学的染色、*Scleraxis* の in situ ハイブリダイゼーション、アルカリフォスター染色を行った。その結果、Sox9 は将来の腱と骨の領域にかけて発現することが明らかになった。

(2) 筋-腱-骨複合体における Sox9 発現の切り替え

腱ならびに骨領域における SOX9 の経時的変化を明らかにするために、胎生 13 日と 16 日齢のマウスの顎関節部に発現する Sox9 を比較した。胎生 13 日において腱と骨領域に Sox9 陽性細胞を認めたが、胎生 16 日齢の腱領域ではその発現が低下し、骨領域では持続して発現していた。さらに胎生 13 日の顎関節部を詳細に観察すると、筋腱接合部を構成する筋細胞にも Sox9 が発現することが明らかになった(図2)。

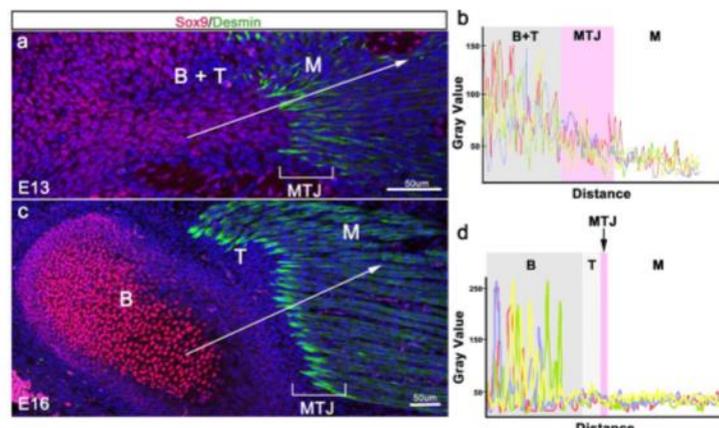


図2: 筋-腱-骨複合体では Sox9 発現の切り替えが起きていた。

(3) 筋発生初期における Sox9 の局在

ここまでの実験結果から、胎生 13 日齢以前の筋原基において Sox9 が発現するのではないかと仮説を立て、胎生 10 日齢のマウス胎児を用いた免疫組織学的染色を行った。その結果、筋発生初期において Sox9 が発現することを明らかにした(図 3)。

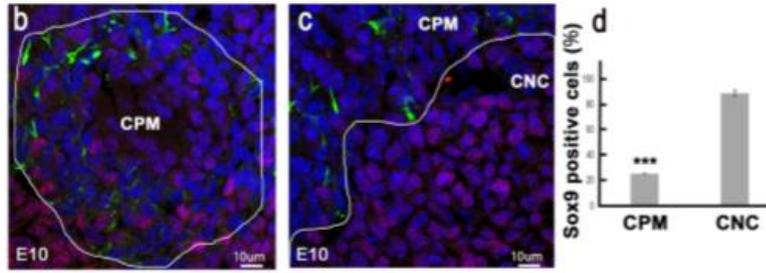


図 3: 発生初期の筋には Sox9 が発現していた。

(4) C2C12(筋芽細胞株)における Sox9 の発現

筋芽細胞株である Sox9 の局在を、筋誘導前・後に分け比較検討した。その結果、筋誘導前の細胞では Sox9 は核外に発現したが、筋誘導後には核内に移動することが分かった(図 4)。

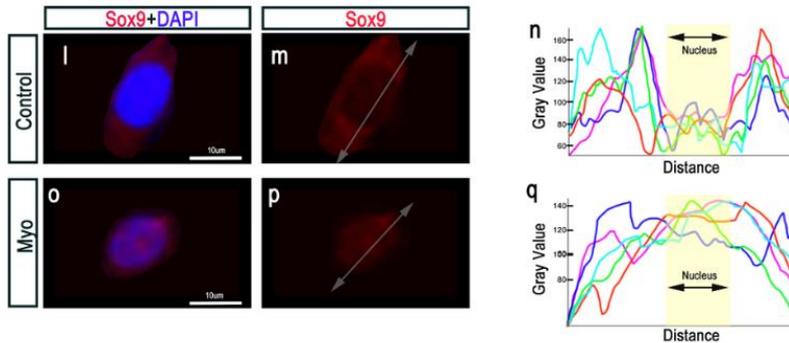


図 4: 発生初期の筋では Sox9 の発現は核外から核内へ移行した。

(5) 筋内における Sox9 陽性細胞の系譜解析

さらに筋に Sox9 が発現していることの確証を得るために、*Sox9creER;tdTomato* マウスを用いた細胞系譜解析を行った。タモキシフェンを胎生 9 日齢と胎生 15 日齢に投与し、胎生 18 日齢の *tdTomato* 陽性細胞数をカウントした。胎生 15 日投与群では、*tdTomato* 陽性細胞は筋内にほとんど認められなかった。しかし胎生 10 日投与群では筋内に *tdTomato* 陽性細胞を多数認めた(図 5)。

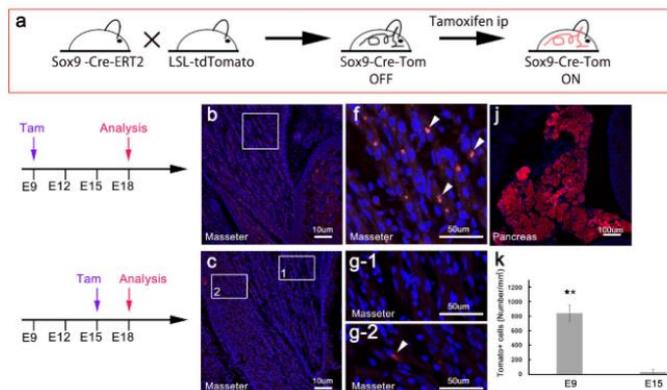


図 5: 筋内における Sox9 陽性細胞の系譜解析を行った。

(6) 運動器における *Sox9* の機能

最後に、*Wnt1Cre;Sox9^{fl/fl}* マウスを用いて、運動器における *Sox9* の役割を明らかにした。*Wnt1* は頭部の筋・腱・骨のいずれにも発現し、それらの *Sox9* をノックアウトすると、筋・腱・骨のいずれの組織も低形成を認めた(図 6)。

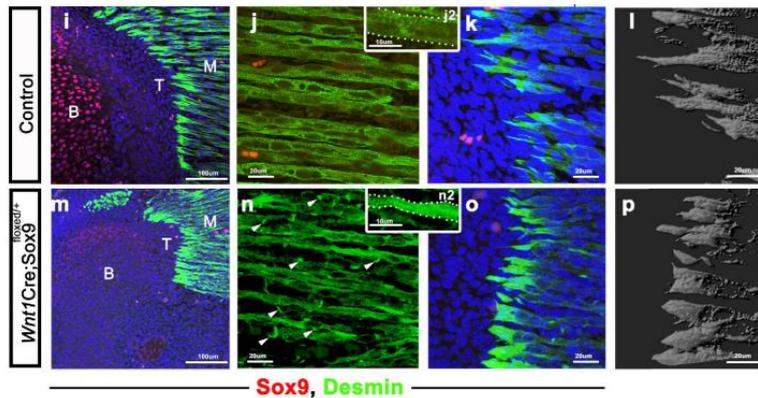


図 6: 筋・腱・骨のいずれの発生にも *Sox9* は不可欠であった。

(7) 結論

本研究結果より、運動器の形態形成には *Sox9* 発現の切り替えが必要であり、この転写因子が運動器の発生を統括していることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nagakura Ryotaro, Yamamoto Masahito, Jeong Juhee, Hinata Nobuyuki, Katori Yukio, Chang Wei-Jen, Abe Shinichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Switching of Sox9 expression during musculoskeletal system development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8425
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-65339-9	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 Yamamoto Masahito, Takada Hiromasa, Ishizuka Satoshi, Kitamura Kei, Jeong Juhee, Sato Masaki, Hinata Nobuyuki, Abe Shinichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Morphological association between the muscles and bones in the craniofacial region	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0227301
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0227301	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 Yamamoto Masahito, Abe Shinichi	4. 巻 95
2. 論文標題 Mechanism of muscle?tendon?bone complex development in the head	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anatomical Science International	6. 最初と最後の頁 165 ~ 173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12565-019-00523-0	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 Naito Tetsu, Cho Kwang Ho, Yamamoto Masahito, Hirouchi Hidetomo, Murakami Gen, Hayashi Shogo, Abe Shinichi	4. 巻 60
2. 論文標題 Examination of the Topographical Anatomy and Fetal Development of the Tendinous Annulus of Zinn for a Common Origin of the Extraocular Recti	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 4564 ~ 4564
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.19-28094	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本将仁, 是澤智久, 北村啓, 阿部伸一
2. 発表標題 顎舌骨筋の下顎骨付着部における形態形成獲得のプロセス
3. 学会等名 日本解剖学会第107回関東支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内藤哲, 山本将仁, 阿部伸一
2. 発表標題 頭頸部筋付着部における形態形成
3. 学会等名 日本解剖学会第107回関東支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本将仁, 石束叡, 内藤哲, 橋本千明, 北村啓, 阿部伸一
2. 発表標題 形態学的視点からみた筋-骨のインターラクシオン
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富田尚充, 永倉遼太郎, 山本将仁, 松永智, 四ツ谷護, 大平真理子, 菅野亜紀, 大久保真衣, 佐藤正樹, 比嘉一成, 阿部伸一
2. 発表標題 筋の骨への付着部形成過程におけるSox-9の局在に関する免疫組織化学的検索
3. 学会等名 第305回東京歯科大学学会例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石束叡, 四ツ谷護, 内藤哲, 永倉遼太郎, 山本将仁, 阿部伸一
2. 発表標題 マウス顎関節「筋-腱-骨」複合体における形態形成プロセス
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 是澤智久, 永倉遼太郎, 北村啓, 四ツ谷護, 山本将仁, 佐藤正樹, 阿部伸一
2. 発表標題 筋-腱-骨複合体：形態獲得プロセスの解明-Scleraxis, Sox9発現局在からの理解
3. 学会等名 第306回東京歯科大学学会
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
---------------------------	-----------------------	----